

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

Departamento de Genética

Avaliação do padrão de metilação dos genes *ESR1*, *ESR2* e *PGR* em linhagens celulares derivadas do câncer de mama.

Mirella Baroni

Botucatu-SP

2011

MIRELLA BARONI

Avaliação do padrão de metilação dos genes *ESR1*, *ESR2* e *PGR* em linhagens celulares derivadas do câncer de mama.

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Aparecida Rainho

Botucatu

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Baroni, Mirella.

Avaliação do padrão de metilação dos genes ESR1, ESR2 e PGR nas linhagens celulares derivadas do câncer de mama / Mirella Baroni. – Botucatu : [s.n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Cláudia Aparecida Rainho

Capes: 20205007

1. Genética humana. 2. Mamas – Câncer.

Palavras-chave: Câncer de mama; Metilação; Receptores hormonais.

Agradecimentos

Primeiramente, queria agradecer aos meus pais por todo o amor, carinho, dedicação que tem por mim, na verdade não há palavras que possa descrever a gratidão que tenho, simplesmente obrigada por ser o melhor exemplo de pais que alguém poderia ter!

Queria agradecer as minhas queridas irmãs de coração que moraram comigo, a Patricia (Pesq), Carla (Póket), Patricia (Sonri), Mariella (Pepita), Maysa (Tete), Juliana (Pag), Evandra (Dyaxu). Me sinto muito privilegiada de ter conhecido cada uma e ter a chance de ser amiga de pessoas tão especiais. E ainda ter a sorte de passar por incontáveis momentos juntas, que transformou essa fase na melhor da minha vida!

Queria agradecer aos meus colegas da sala pelo companheirismo, pelas trocas de experiência, pelos diversos momentos juntos, em especial, as minhas amigas Thais (Pak), Ayesha (Bri), Carolina (Hava) que estiverem em momentos diferentes da minha vida, mas que nunca deixaram de ser muito importantes para mim!

Queria agradecer ao Wilson por todo o carinho e amor, e também pela força em todos os momentos!

Queria agradecer à minha família que mesmo não tão presente sempre torceu pelo meu sucesso!

Queria agradecer às meninas do laboratório, a Mariana, Érika, Dani, Joana, Carol e à minha orientadora Cláudia que me ajudaram e me ensinaram muito neste último ano!

Resumo

O câncer de mama tem ganhado cada vez mais atenção por ser uma das neoplasias mais comuns e a principal causa de morbidade e mortalidade entre as mulheres no mundo. É uma doença heterogênea e de grande variabilidade clínica e histopatológica. Nas últimas duas décadas, diversos estudos foram realizados buscando identificar as alterações moleculares, entre elas as que envolvem mudanças dos padrões de metilação do DNA, principal mecanismo epigenético, que está associado com o controle da expressão gênica. A hipermetilação das ilhas CpG localizadas em regiões promotoras contribui para a perda da função de vários genes relacionados com o câncer, incluindo os que codificam o receptor de estrógeno (*ESR*) e o receptor de progesterona (*PGR*). Esse projeto teve como objetivo analisar em 15 linhagens celulares derivadas de câncer de mama o padrão de metilação das ilhas CpG dos genes que codificam os receptores de estrógeno α (gene *ESR1*, promotores A e B), estrógeno β (gene *ESR2*) e progesterona (gene *PGR*, promotores A e B) e comparar com os dados existentes na literatura. Para isso utilizou-se a técnica de “Methylation-Specific-Polymerase Chain Reaction (MSP)”, a qual oferece uma avaliação qualitativa do estado de metilação das ilhas CpG. Os resultados obtidos revelaram dados heterogêneos, para a isoforma *ESR1A* observou-se somente uma linhagem com metilação total (BT549) e somente duas apresentaram metilação parcial (MDA-MB-231 e MDA-MB-453), enquanto as demais linhagens não apresentaram metilação nessa região. A região promotora *ESR1B* não apresentou metilação nas linhagens BT549, T47D e SKBR3, as linhagens que apresentam metilação parcial foram MDA-MB-231, MCF-7 e ZR-75-30, as demais linhagens apresentaram apenas alelos metilados (metilação completa). Todas as linhagens apresentaram metilação completa ou metilação parcial do promotor do gene *ESR2*. O padrão de metilação do promotor da isoforma A do gene *PGR* é muito variável nas linhagens. No promotor B deste gene, *PGRB*, foi observada a metilação completa somente nas linhagens MDA-MB-134IV e BT-20 e metilação parcial nas linhagens MDA-MB-231, BT-549, Hs578T, ZR-75-1. Nas demais linhagens não foi detectado a metilação desta região promotora. Pode-se concluir que as alterações da metilação do DNA em regiões distintas dos genes *ESR1*, *ESR2* e *PGR* pode ser utilizada para a identificação de um perfil de metilação característico, relacionados com os subtipos moleculares luminal e Basal A.

Abstract

Breast cancer has received an increasing attention because it is one of the most common cancer type and a leading cause of morbidity and mortality among women worldwide. This disease has been considered as a heterogeneous condition, demonstrating a large spectrum of clinical and histopathological variability. In the last two decades, several studies have been conducted to identify new molecular markers of cancer cells, including the alterations of DNA methylation, which is the major epigenetic mechanism associated with the control of gene expression. The hypermethylation of promoter-associated CpG islands contributes to the loss of function of several cancer-related genes, including those encoding to the estrogen receptor (*ESR*) and progesterone receptor (*PGR*). This study aimed to determine the methylation patterns of CpG islands of the genes encoding the estrogen receptor α (*ESR1* gene, promoters A and B), estrogen receptor β (*ESR2* gene) and progesterone receptor (*PGR* gene, promoter A and B) in 15 cell lines derived from breast cancer. The DNA methylation analysis was based on the "Methylation Specific-Polymerase Chain Reaction" (MSP), which provides a qualitative assessment of the methylation status of a specific CpG island. The results revealed heterogeneous data: the promoter region of *ESR1A* showed complete methylation in one cell line (BT549) and only two cell lines showed partial methylation (MDA-MB-231 and MDA-MB-453), while the others lineages presented unmethylated alleles. The promoter region of isoform *ESR1B* was unmethylated in the cell lines BT549, SKBR3 and T47D; partial methylation were observed in the cell lines MDA-MB-231, MCF-7 and ZR-75-30, while the others cell lines presented complete methylation. All lineages showed complete or partial methylation of the *ESR2* gene. The methylation pattern of the promoter A of the *PGR* gene was highly variable. The promoter region B of this gene was completely methylated in the cell lines MDA-MB-134IV and BT-20; partial methylation was detected in the cell lines MDA-MB-231, BT-549, Hs578T, and ZR-75-1. The present study provides evidences that altered DNA methylation patterns in distinct regions of *ESR1*, *ESR2* and *PGR* genes are associated with a specific methylation profile related to the molecular subtypes luminal and Basal A. Our results suggest that methylation may play an important role in the development of breast cancers.

Sumário

1. Introdução.....	7
1.1 Câncer de Mama.....	7
1.2 Receptores Nucleares.....	9
1.2.1 Relação dos Receptores Nucleares no Câncer de Mama.....	10
1.3 Epigenética.....	12
1.3.1 Conceitos.....	12
1.3.2 Alterações Epigenéticas no Câncer de Mama.....	13
2. Objetivo.....	15
3. Materiais e Métodos.....	15
4. Resultados.....	20
5. Discussão.....	31
6. Conclusão.....	34
7. Referências Bibliográficas.....	35

1. Introdução

1.1 Câncer de Mama

O câncer de mama é a neoplasia mais comum nas mulheres em todo o mundo, espera-se para o Brasil mais de 50 mil novos casos em 2012 (INCA, 2011). Por ser uma doença complexa e heterogênea, é a principal causa de mortalidade por câncer entre as mulheres (Ferlay, 2010 e Bird, 2002). Vários sistemas de classificação foram sugeridos como uma tentativa de se uniformizar os critérios diagnósticos. Essas classificações também são utilizadas como ferramentas auxiliares no tratamento e no prognóstico das pacientes. Atualmente, utilizam-se dois tipos de classificação: a histológica e a molecular. Na classificação histológica, o câncer de mama é categorizado em *in situ* e invasivo (Stingl, 2007). Carcinoma de mama *in situ* é subdividido em ductal e lobular, essa divisão é baseada nas características citológicas e no padrão de crescimento. O carcinoma ductal *in situ* possui uma grande variação histológica sendo categorizado em subtipos: comedo, cribiforme, micropapilar, papilar e sólido. Semelhante, o carcinoma de mama invasivo também possui subdivisões: tubular, ductal-lobular, lobular invasivo, ductal infiltrante, mucinoso (colóide), medular, papilar (Malhotra, 2010). Dentre os dois tipos de carcinoma de mama, *in situ* e invasivo, o mais comum é o ductal, 70-80% de todos os diagnósticos (Li, 2005).

Enquanto o modelo histológico para a classificação do câncer de mama tem valor prognóstico, a falta de um componente molecular do sistema de classificação limita a capacidade de prever uma resposta a novas terapias-alvo. A recente identificação dos subtipos moleculares do câncer de mama começou a abordar esta questão. Estudos recentes identificaram vários subtipos moleculares intrínsecos no câncer de mama, que foram confirmados e classificados em: *Basal-like*, *ErbB2+*, *Normal breast like*, luminal subtipo A e luminal subtipo B (Perou et al, 2000; Sorlie et al, 2001, Sorlie et al, 2003). Mais recentemente, um novo subtipo foi classificado como *claudin-low* (Herschkowitz et al, 2007; Prat et al, 2010). Esses subtipos moleculares foram identificados pela análise da expressão gênica em larga escala por microarray e pelo agrupamento hierárquico não supervisionado.

O processo de carcinogênese mamária envolve a evolução de uma célula epitelial somática normal, com tempo de vida finito, para células imortalizadas e metastáticas, requerendo o acúmulo de mutações que levam à perda da regulação de múltiplos processos celulares, incluindo estabilidade genômica, proliferação, apoptose, motilidade e angiogênese. Há duas propostas para a origem do câncer de mama: a hipótese clonal e a hipótese da célula-tronco (Reya et al, 2001, Melchor, 2008, Bombonati, 2010). A hipótese da origem clonal propõe que primeiramente a transformação maligna ocorreria por múltiplas mutações ao acaso em uma única célula e subsequente expansão e seleção clonal, ou seja, células com alterações genéticas e epigenéticas com vantagens são selecionadas com o tempo, o que contribui para a progressão do tumor. Em contraste, a hipótese da célula-tronco sustenta que a transformação maligna ocorre somente em células-tronco normais ou células progenitoras, provavelmente através da perda da regulação das vias de auto-renovação (Wicha et al, 2006).

Assim, todos os cânceres de mama têm origem genética. Acredita-se que 90%-95% deles sejam esporádicos (não-familiares) e decorram de mutações somáticas que se verificam durante a vida, e que 5%-10% sejam hereditários devido à herança de uma mutação germinativa ao nascimento, que confere a estas mulheres um alto risco de desenvolvimento de câncer de mama, ou predisposição genética (Barrol et al., 2001).

As situações que aumentam a chance de uma mulher vir a apresentar câncer de mama são denominadas fatores de risco. Além da história familiar positiva de casos de câncer de mama na família, que é indicativa de uma síndrome de câncer hereditário, são conhecidos outros fatores de risco como a idade avançada, o uso de tratamento hormonal durante um longo período, menopausa tardia, menarca precoce entre outros (NCCN, 2010).

As modalidades terapêuticas para o câncer de mama incluem a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia, a terapia hormonal e a terapia-alvo. Em adição, há novos tratamentos sendo testados clinicamente. O plano de tratamento de cada paciente será baseado no subtipo do seu câncer de mama. O *status* dos receptores hormonais, o *status* do gene *HER2*, a observação das características celulares, o tamanho do tumor e o envolvimento de linfonodos são parâmetros prognósticos importantes (Maughan, 2010).

1.2 Receptores Nucleares

Os receptores nucleares são fatores de transcrição regulados por um ligante que tem como principal função o controle da expressão de diversos genes. Mesmo antes destes genes serem clonados, sabia-se que estes codificavam proteínas com três domínios principais: domínio da transativação, na região amino-terminal que é reconhecido pelo coativador ou por outros fatores de transcrição, domínio central de ligação ao DNA e o domínio de ligação ao ligante, correspondente à região carboxi-terminal (Gronemeyer & Gustafsson, 2004).

Os receptores nucleares, por estarem envolvidos em diversos processos fisiológicos, são considerados um dos principais alvos terapêuticos contra doenças hormônio-dependentes. A superfamília dos receptores nucleares inclui os receptores para hormônios esteróides, vitamina D, hormônios tireoidianos, prostaglandinas, ácido retinóico, entre outros (Pearce & Jordan, 2004).

Os hormônios esteróides como o estrógeno e a progesterona, são lipofílicos e entram nas células e nos núcleos pela difusão através do plasma e das membranas nucleares. Uma vez no núcleo, os esteróides encontram proteínas, os receptores nucleares, aos quais se ligam com alta afinidade e especificidade (Anderson, 2002). Quando ativados pelo ligante, os receptores controlam a expressão gênica, pois a transcrição é diretamente controlada pelo hormônio através da sua interação física com seu receptor nos sítios regulatórios no genoma e/ou na sinalização dos efetores da tradução (Grober, 2011).

O estrógeno regula o crescimento, a diferenciação e a homeostase em células eucarióticas, mas tem sido patologicamente associado com o maior risco de câncer de mama (Shao e Brown, 2004). A sua capacidade de modulação da expressão gênica é mediada pela sua associação com o receptor de estrógeno (ER). Até agora, duas isoformas do receptor de estrógeno alfa e beta (ER- α e ER- β) foram identificadas. Estas isoformas são codificadas por genes independentes, *ESR1* (*estrogen receptor 1*) e *ESR2* (*estrogen receptor 2*), respectivamente (Giacinti et al., 2006). As duas isoformas mostram 55% de identidade no domínio de ligação ao estrógeno e aproximadamente 97% de identidade no domínio de

ligação ao DNA (Matthews e Gustafsson, 2003). Os genes *ESR1* e *ESR2* são membros de uma superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição e estão localizados respectivamente em 6q25.1 e 14q23.2. O gene *ESR1* é regulado via múltiplos promotores, sendo A, B e C usados alternativamente em diferentes tecidos. Os promotores A e B estão localizados dentro de uma região de 2kb *upstream* ao sítio de início da tradução, enquanto o promotor C localiza-se a 101kb *upstream* a este sítio. Os transcritos resultantes dos promotores A e B diferem apenas na região 5'UTR e codificam a mesma proteína. Da mesma forma, diferentes transcritos (RNAm) do gene *ESR2* são gerados por múltiplos promotores e por *splicing* alternativo (Pearce & Jordan, 2004).

O receptor de progesterona media os efeitos da progesterona que tem papel fundamental na reprodução, no desenvolvimento da glândula mamária e está envolvida também na carcinogênese mamária (Poole et al., 2006). O PR tem duas isoformas predominantes, denominadas PR-A e PR-B, que são codificadas pelo mesmo gene, o PGR (*progesterone receptor*). (Jeltsch et al., 1986). O gene PGR está localizado no cromossomo 11q22. As duas isoformas codificam receptores com atividades de ligação no DNA similares, mas tem sido sugerido que PR-B é o maior ativador transcricional e que PR-A é o repressor da atividade de PR-B (Anderson, 2002).

1.2.1 Relação dos Receptores Nucleares com o Câncer de Mama

Há evidências de que os receptores nucleares, do estrógeno e da progesterona, são importantes para o início, a progressão, o prognóstico do câncer de mama e também como preditores para a terapia endócrina (Feinberg et al., 2006; Orlando e Brown, 2009).

A expressão do receptor de estrógeno alfa está intimamente associada com a biologia do câncer de mama, por exemplo, tumores que não expressam o ER- α (ER-) tendem a apresentar um fenótipo mais agressivo (Hayashi et al., 2003). Entretanto, ER- α é expresso em 70% dos cânceres de mama (ER+) e permanece sendo um efetivo alvo biológico para o tratamento endócrino. O intrigante é que após uma análise na literatura epidemiológica concluiu que a exposição ao estrógeno é associada com o aumento do risco de câncer de mama ER+ e não ER- (Althuis et al., 2004). Isso sugere que a ativação do ER pela exposição ao estrógeno pode ser um evento crítico que leva ao câncer de mama ser ER+ e não ER-,

então outros fatores devem estar envolvidos com *status* negativo do câncer de mama, incluindo genéticos e alimentares (Cozen, 2008).

A descoberta do gene codificador do ER- β , o *ESR2*, encontrado em um locus cromossômico distinto, ajudou a entender a complexidade da sinalização do estrógeno na mama e em outros tecidos. Embora, os dois receptores sejam similares na estrutura e na sequência, no câncer de mama o ER- β tem um efeito biológico diferente do ER- α (Heldring et al., 2007). Além disso, os dois ERs apresentam uma grande diferença no nível de expressão no câncer de mama, com um maior nível do ER- α e um menor do ER- β em células malignas em comparação com epitélio mamário normal ou células tumorais benignas (Sugiura et al, 2007 e Saji et al., 2005). Adicionalmente, enquanto o ER- α induz a resposta mitogênica ao estrógeno, o ER- β , quando expresso sozinho, não é capaz de induzir a mesma resposta mitogênica, mas reduz a proliferação celular hormônio-dependente (Lindberg, 2003). Finalmente, ER- β tem mostrado mudar dramaticamente o comportamento celular *in vivo* do câncer de mama ER- α +, pois a sua expressão nas células previne a tumorigenicidade no modelo xenográfico de ratos pela redução do crescimento tumoral e da angiogênese (Behrens, 2007, Grober 2011).

Mais da metade dos cânceres de mama ER+ expressam PR (PR+), e a sinalização do estrógeno através de seu receptor é necessária para a ativação de PR. Adicionalmente, o tratamento hormonal é mais efetivo em tumores ER+/PR+ quando comparado com os tumores ER+/PR- (Creighton, 2009). Há estudos que mostram que a razão entre as isoformas de PR (PR-A e PR-B) têm um papel muito importante na carcinogênese mamária. Há algumas evidências que mostram que a razão entre PR-A e PR-B é alterada durante a tumorigênese, com a predominância do PR-A. Isso pode ser conciliado com a sugestão de que PR-A tem uma ação como repressor da ação de PR-B e de outros receptores esteróides. (Anderson, 2002).

1.3 Epigenética

1.3.1 Conceito

Epigenética são as alterações da cromatina e do DNA que são estáveis nas divisões celulares e não alteram a sequência de nucleotídeos, que tem como função a regulação da transcrição gênica. Alguns de seus mecanismos são a metilação do DNA e a modificação de histonas (Ballestar, 2011).

A metilação do DNA corresponde à adição de um grupo metil à citosina. Esse processo é mediado pelas metiltransferases do DNA (DNMT) que adicionam o grupo metil ao carbono 5 da citosina, gerando a 5-metilcitosina. Ocorre quase que exclusivamente nas citosinas (C) seguidas por guaninas (G), denominados de dinucleotídeos CpG, que muito frequentemente encontram-se nas chamadas ilhas CpG (regiões do genoma com alto conteúdo de C e G, >55% e com razão de CpGs observados; esperado > 0.65), diferenciando-se do resto do genoma. A 5 metilcitosina é quimicamente instável e pode sofrer desaminação espontânea resultando em timina. O padrão de metilação é apagado no início da embriogênese e restabelecido no desenvolvimento. O conteúdo de metilação também se acentua com o envelhecimento.

Desta forma, pode-se dizer que nos vertebrados a sequência CpG é um sinal para a metilação pelas metiltransferases de DNA. A principal função da metilação nestes organismos é a repressão da expressão gênica (Gibney, 2010). Sequências de DNA não devem estar metiladas para serem transcritas (ao menos na região promotora). Genes que possuem altos níveis de expressão apresentam ilhas CpG associadas não metiladas geralmente localizadas *upstream* ao sítio de início da transcrição, na região do promotor e, algumas vezes, se estendendo ao primeiro éxon (Jovanovic, 2010)

O DNA juntamente com proteínas forma um complexo altamente organizado e dinâmico formando uma plataforma para a transcrição, que é denominado cromatina. O estado da cromatina “aberto” (eucromatina) e “fechado” (heterocromatina) é controlado pelas

modificações das histonas e pela sua composição. A subunidade fundamental da cromatina, o nucleossomo, é composto por um octâmero de quatro histonas, um tetrâmero H3/H4 e dois dímeros H2A/H2B, ao redor do DNA (Ito et al. 2002, Strahl e Allis, 2000). A arquitetura local da cromatina é reconhecida como um importante fator na regulação da expressão gênica, altamente influenciada pelas modificações pós-traducionais das caudas N-terminal das histonas (Rodolph, 2010).

As principais modificações de histonas são a acetilação e a metilação das mesmas. A acetilação das histonas é a mais investigada das modificações, sendo um mecanismo de estímulo à transcrição. Várias acetiltransferases de histonas (HATs) foram descritas como catalizadores da adição de um grupo acetil (CH_3CO) aos resíduos lisina das cadeias laterais dos octâmeros de histonas. As HATs funcionam como coativadores da transcrição, sendo o seu efeito final a facilitação do acesso às regiões dos promotores gênicos, facilitando a transcrição. A metilação de histonas é promovida por algumas metiltransferases que tem como alvo determinados resíduos de arginina e de lisina nas histonas, particularmente a histona H3. A metilação de arginina nas histonas é relacionada à ativação da transcrição; entretanto, a metilação de lisina é relacionada à ativação ou repressão da transcrição. O padrão de modificações das histonas influencia a metilação do DNA, contribuindo para uma menor ou maior compactação da cromatina, respectivamente (Wade, 2001; Forsberg and Bresnick, 2001)

1.3.2 Alterações Epigenéticas e o Câncer de Mama

A carcinogênese é um processo múltiplo resultado do acúmulo de alterações genéticas, como as mutações, rearranjos e também envolve as alterações epigenéticas, como a metilação da DNA e a modificação das histonas (Jaenisch et al, 2003; Dworkin et al, 2009).

Em células cancerosas, as ilhas CpG que normalmente estão desmetiladas se tornam metiladas, o que resulta no silenciamento de importantes genes, como os supressores de tumor. Ao mesmo tempo, em outras regiões as ilhas CpG se tornam desmetiladas, levando a uma menor repressão transcricional de genes normalmente silenciados (Berdasco & Esteller, 2010). Diferentes classes de genes são silenciadas pela metilação aberrante do DNA: genes

supressores de tumor, que são genes que inibem a invasão do tumor e a metástase; genes de reparo do DNA; genes dos receptores hormonais e genes que inibem a angiogênese. A metilação do DNA afeta a expressão do gene, pois as proteínas que atuam como reguladores transcricionais são sensíveis à metilação. O silenciamento gênico pela hipermetilação dos promotores dos genes é um importante mecanismo da carcinogênese que pode ser no futuro uma ferramenta para o diagnóstico precoce e terapia do câncer (Lo and Sukumar, 2008).

A análise do perfil de metilação dos cânceres em humanos indica que a hipermetilação de algumas ilhas CpG é compartilhada por múltiplos tipos de tumores, porém outras ilhas são metiladas de modo tumor-específico (Esteller, 2000 e Bae, 2004). A metilação aberrante do promotor parece ser um evento precoce na tumorigênese, e o aumento do número de genes metilados durante a progressão tem sido observado em diversos tumores, inclusive no câncer de mama (Subramaniam, 2009).

No câncer de mama é observado a hipermetilação de diversos genes, entre eles os que estão envolvidos com a regulação do ciclo celular (*TP16*, *CCDN2*), com a adesão celular (*CDH1*), com o reparo do DNA (*BRCA1*) (Li, 2005). Para os genes dos receptores de estrógeno e progesterona alguns estudos mostraram a hipermetilação de seus promotores como uma das prováveis causas da inibição da expressão no câncer de mama, que leva ao fenótipo ER- e PR- dos tumores (Ottaviano, 1994, Lapidus, 1998 e Yan 2001).

2. Objetivo

Esse estudo teve como objetivo avaliar o padrão da metilação das ilhas CpG dos genes dos receptores de estrógeno (*ESR1* e *ESR2*) e progesterona (*PGR*) em 15 linhagens celulares derivadas de câncer de mama.

3. Material e Métodos

As linhagens celulares de câncer de mama têm sido usadas extensivamente em pesquisas básicas e tem fornecido informações valiosas de vários aspectos da biologia do câncer de mama. No entanto, a linhagem celular escolhida para um determinado estudo é baseado em suas características únicas e na sua disponibilidade (Subik et al., 2010). Se o câncer de mama representa um heterogêneo grupo de doenças, as linhagens celulares derivadas de diferentes tumores de pacientes devem refletir essa diversidade biológica (Neve et al, 2006).

As linhagens selecionadas para o presente estudo encontram-se listadas abaixo, incluindo os dados relatados por Neve et al, 2006, que compararam as características moleculares e biológicas de 51 linhagens derivadas de carcinomas mamários humanos com as dos tumores primários de mama.

Tabela 1: As características moleculares das linhagens celulares derivadas de câncer de mama utilizadas no projeto.

	Linhagem Celular	Subtipo molecular (*)	ER	PR
1	BT20	BaA	-	-
2	BT474	Lu	+	+
3	BT483	Lu	+	+
4	BT549	BaA	-	-
5	HS578T	BaA	-	-
6	MCF-7	Lu	+	+
7	MDA-MB-134IV	Lu	+	-
8	MDA-MB-231	BaA	-	-
9	MDA-MB-361	Lu	+	-
10	MDA-MB-436	BaA	-	-
11	MDA-MB-453	Lu	-	-
12	SKBR3	Lu	-	-
13	T47D	Lu	+	+
14	ZR-75-1	Lu	+	-
15	ZR-75-30	Lu	+	-

*Classificação molecular baseada nos perfis globais de expressão gênica. BaA = Basal A; BaB = Basal B; Lu = Luminal; (+) presença de expressão do receptor (-) ausência de expressão, retirado de Neve et al, 2006.

⇒ Extração do DNA

A extração do DNA das linhagens celulares de câncer de mama foi realizada em *pellets* de células cultivadas previamente (Prando et al., 2011) e congeladas em freezer a -80°C, pela desagregação enzimática, adicionando-se proteinase K na concentração final de 100µg/mL, tampão de extração (100mM de Tris pH 8,0; 50mM de EDTA e 500mM de NaCl) em um volume final de 500µL e 30µL de SDS 20%. Após homogeneização, o tubo foi incubado a 37°C, *overnight* ou até a dissolução completa das células.

Após a digestão protéica, foi realizada a extração padrão com solventes orgânicos. Foi adicionado igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) seguido de homogeneização por 5 minutos e centrifugação a 14000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e foi adicionado clorofórmio. Após homogeneização por cinco minutos e centrifugação por 15 minutos a 14000rpm o sobrenadante foi mais uma vez transferido para um novo microtubo. O DNA foi precipitado adicionando-se 50µL de acetato de amônio 7,5M e 800µL de etanol absoluto gelado. O

microtubo foi mantido a -20°C *overnight*. Em seguida, o material foi centrifugado a 14000rpm durante 15 minutos e depois de descartado o sobrenadante, o *pellet* foi lavado com etanol 70%, secado em temperatura ambiente e ressuspendido em 50 μL de água ultra-pura estéril, sendo posteriormente armazenado no freezer -20°C . A quantidade e qualidade do DNA foram avaliadas através da leitura em espectrofotômetro NanoDrop® ND-100.

⇒ **Modificação do DNA por bissulfito de sódio**

A modificação por bissulfito de sódio foi realizada segundo o protocolo descrito por Paulin et al. (1998), com algumas modificações. Aproximadamente 2 μg do DNA genômico foram diluídos em água ultra pura estéril para completar um volume final de 18 μL . Este DNA foi desnaturado pela adição de 2 μL de uma solução de NaOH 3M (para obter uma concentração final de 0,3M) a 40°C durante 15 minutos, ao abrigo da luz. Foi adicionado 208 μL da solução de bissulfito de sódio 4M/uréia 6,25M e 12 μL de hidroquinona 10mM (concentração final de 0,5mM) ao DNA. Ambas as soluções foram preparadas imediatamente ao uso. O conteúdo foi cuidadosamente homogeneizado por inversão e submetido a 20 ciclos de 15 minutos a 55°C , separados por um período de desnaturação de 30 segundos a 95° em um termociclador PTC200 (MJ Research).

Foi adicionado 1 mL de resina (Kit Wizard DNA Clean-Up System – Promega) ao DNA resultante do processo de modificação pelo bissulfito de sódio, homogeneizados por inversão. Em seguida, foi utilizado o equipamento *Vaccun Manifold* (Promega), uma seringa de 3mL desprovida de êmbolo que foi adaptada a uma mini-coluna e o DNA ligado à resina foi a ela transferido. Foi adicionado, posteriormente, 2mL de isopropanol 80% que foram passados através da mini-coluna por pressão com auxílio de uma bomba de vácuo. Após desconectada, a mini-coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5mL e centrifugada a 14000rpm durante 3 minutos para a remoção do excesso de álcool. A eluição foi realizada pela adição de 45 μL de água (pré-aquecida a $65-80^{\circ}\text{C}$) à mini-coluna. Passado 1 minuto, a mini-coluna adaptada ao tubo de micro-centrífuga foi centrifugada durante 3 minutos para a recuperação do DNA. A mini-coluna foi removida e descartada.

A modificação do DNA foi finalizada pela adição de 5 μL de NaOH 3M (concentração final de 0,3M) a temperatura ambiente por 15 minutos para a dessulfonação das uracilas. A precipitação foi realizada pela adição de 30 μL de acetato de amônio 5M (pH 7,0) aguardando

5 minutos para a completa desaminação. Na sequência, foram acrescentados 350µL de etanol 100% gelado e 1,0µL de glicogênio (20µg/mL) incubando o DNA a -20°C *overnight*. Para a ressuspensão, o conteúdo foi centrifugado por 20 minutos a 14000rpm a temperatura ambiente. Depois de removido o sobrenadante, foi adicionado ao DNA 500µL de etanol 70% (temperatura ambiente) e por seguinte centrifugado por 20 minutos a 14000rpm. Foi dispensado o álcool e os tubos foram mantidos horizontalmente para secar o sedimento de DNA. Após a secagem, o precipitado foi ressuscitado em 40µL de água ultra-pura e mantido a temperatura ambiente por 1 hora.

⇒ ***Methylation-Specific Polymerase Chain-Reaction (MS-PCR)***

O DNA modificado pelo bissulfito de sódio e purificado foi utilizado para a avaliação do padrão de metilação dos genes selecionados pela utilização de pares de oligonucleotídeos específicos para alelos metilados e não metilados.

Os conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores foram selecionados baseados em Sasaki et al (2002). A sequência dos *primers* e as condições de amplificação estão descritas na Tabela 2. As reações ocorreram em um volume final de 25µL, contendo 0,24µM de cada *primer*, 200µM de cada dNTP, 15mM de Tris-HCl pH 8,0, 50mM KCl, 1 U de *AmpliTaq Gold* (Applied Biosystem). As concentrações de MgCl₂ variam da forma como se segue: 2mM para *PGR* (isoformas A e B) e *ESR1* (isoformas A e B) e 1,5 mM para *ESR2*. Os produtos amplificados foram visualizados após a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante e coloração com nitrato de prata. A análise e a interpretação dos resultados foram realizadas por uma abordagem qualitativa, com base na presença ou ausência do produto amplificado.

Tabela 2: Sequência dos *primers* e as condições de amplificação do PCR dos genes *PGRA*, *PGRB*, *ESR1A*, *ESR1B* e *ESR*.

Gene	Iniciadores	Condição da PCR	Tamanho do amplicon
ESR1A	UF 5'-GGATATGGTTTGTATTTGTTTGT-3' UR 5'-ACAAACAATTCAAAACTCCAAC-3' MF 5'-GATACGGTTTGTATTTGTTTCGC-3' MR 5'-CGAACGATTCAAAACTCCAAC-3'	1 ciclo: 95°, 10 min 35 ciclos: 95°C, 1 min 49°C(M), 1 min 47°C(U), 1min 72°C, 1min 1 ciclo: 72°C, 7min 15°C, ∞	123pb
ESR1B	UF 5'-TTTATTGTTATTTATTTAGT-3' UR 5'-AAAAATATACTCACATATACA-3' MF 5'-TTTATTGTTATTTATTTAGC-3' MR 5'-AAAAATATACTCGCATATACG-3'	1 ciclo: 95°, 10 min 35 ciclos: 95°C, 1 min 49°C(M), 1 min 47°C(U), 1min 72°C, 1min 1 ciclo: 72°C, 7min 15°C, ∞	180pb
ESR2	UF 5'-TTTGGAAGGTGGGTTTGGTT-3' UR 5'-CACATACAAATATAATACTAACA-3' MF 5'-TTTGGAAGGTGGGTTTGGTC-3' MR 5'-CGCATACAAATATAATACTAACG-3'	1 ciclo: 95°, 10 min 35 ciclos: 95°C, 1 min 54°C(M), 1 min 55°C(U), 1min 72°C, 1min 1 ciclo: 72°C, 7min 15°C, ∞	109 pb
PGRA	UF 5'-ATGGGTTATTTTTTTTTTG-3' UR 5'-TAAATATACACCCTCCACA-3' MF 5'-ACGGGTTATTTTTTTTTTCG-3' MR 5'-TAAATATACGCCCTCCACG-3'	1 ciclo: 95°, 10 min 35 ciclos: 95°C, 1 min 51°C, 1 min 72°C, 1min 1 ciclo: 72°C, 7min 15°C, ∞	99 pb
PGRB	UF 5'-TGATTGTTGTTGTAGTATG- 3' UR 5'-CAACAATTTAATAACACACA- 3' MF 5'-TGATTGTCGTTCTAGTACG- 3' MR 5'-CGACAATTTAATAACACGCG- 3'	1 ciclo: 95°, 10 min 35 ciclos: 95°C, 1 min 50°C, 1 min 72°C, 1min 1 ciclo: 72°C, 7min 15°C, ∞	200 pb

MF = Primer Forward Metilado; MR = Primer Reverse Metilado; UF = Primer Forward Não-metilado; UR = Primer Reverse Não-metilado; bp = base pair.

4. Resultados

4.1 Avaliação preliminar *in silico*

Inicialmente, foi realizada avaliação *in silico* dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que foram utilizados para a análise de MSP dos genes *ESR1* (promotores A e B), *ESR2*, *PGR* (promotores A e B) relatados por Sasaki et al (2002). Além da confirmação de suas sequências também considerou-se outras características importantes da região em análise, como a posição de anelamento dos *primers* em relação ao sítio de início da transcrição.

Inicialmente, as sequências de cada um dos genes foram identificadas em bancos de dados públicos (<http://genome.ucsc.edu>), incluindo 2000 pb upstream ao primeiro éxon. No software *Methyl Primer Express 1.0* a sequência selecionada foi submetida à simulação da modificação pelo bissulfito de sódio em que todas as citosinas foram substituídas por timina, considerando-se a ausência de metilação e, para a condição metilada, apenas as citosinas não CpG foram convertidas. As sequências resultantes foram alinhadas com os respectivos *primers* no *BLAST 2 Sequences* (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>). Todos os *primers* apresentaram 100% de identidade com as sequências investigadas e delimitaram o tamanho dos *amplicons* para as respectivas reações de MSP.

Uma segunda avaliação foi realizada utilizando a ferramenta MethBLAST (<http://medgen.ugent.be/methBLAST/>) que permitiu a análise da especificidade dos *primers* selecionados para este estudo. A partir dos melhores *hits*, a região delimitada pelos *primers* foi recuperada e alinhada no genoma humano usando o UCSC Genome Browser on Human, Feb. 2009. (GRCh37/hg19) Assembly (<http://genome.ucsc.edu/>). Os dados de alinhamento confirmaram o tamanho dos *amplicons* de 123, 180, 109, 99 e 200pb para os genes *ESR1A*, *ESR1B*, *ESR2*, *PGRB* e *PGRB*, respectivamente e o mapeamento das regiões alvos dos ensaios de MSP. As figuras 1 a 5 ilustram estes dados.

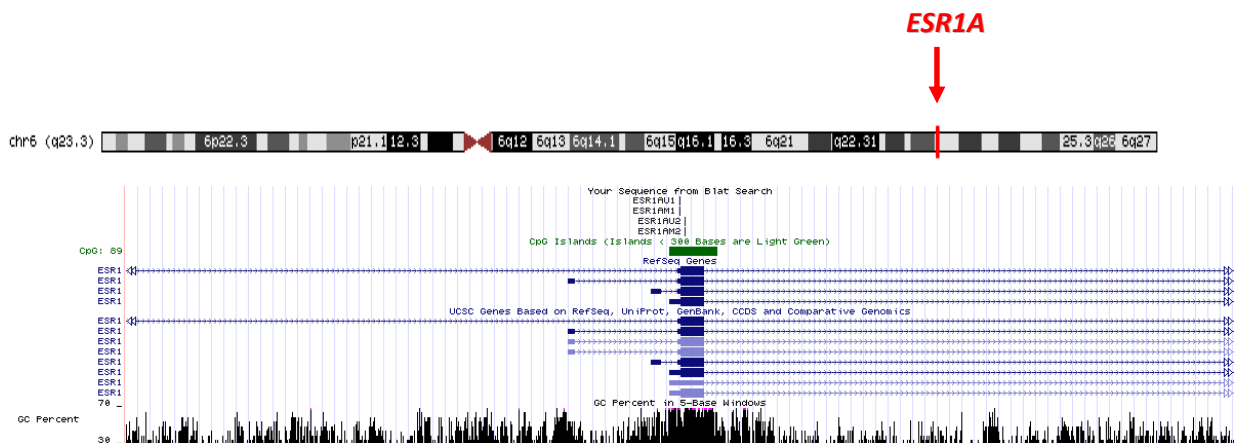


Figura 1 - Dados do mapeamento da região alvo do ensaio de MSP do promotor A do gene *ESR1* (*ESR1A*), que se sobrepõe à ilha CpG 89. Estão também ilustrados os diferentes transcritos alternativos deste gene. [Human (Homo sapiens) Genome Browser Gateway, assembly: Feb.2009 (GRCh37/hg19), disponível em <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, acesso em Novembro/ 2011].

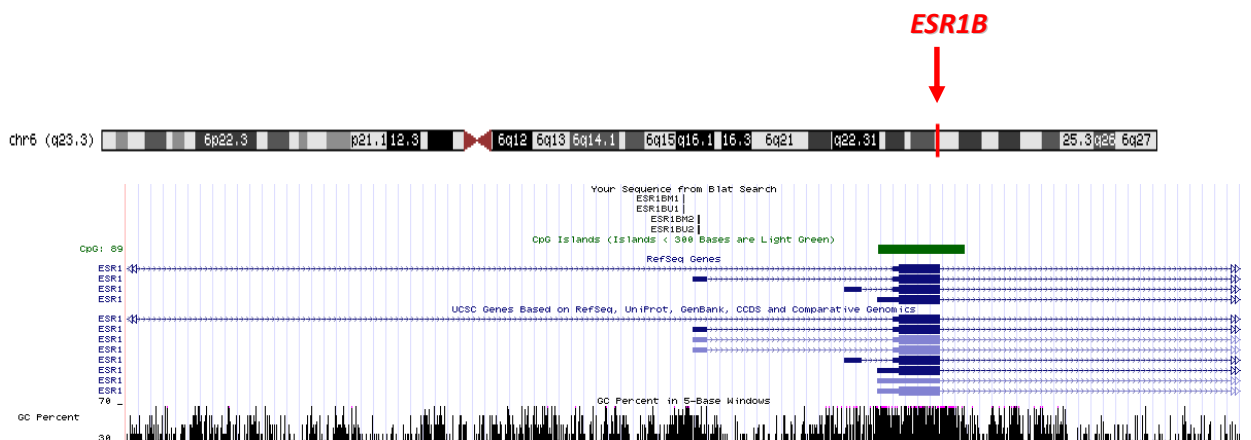


Figura 2 - Dados do mapeamento da região alvo do ensaio de MSP do promotor B do gene *ESR1*, (*ESR1B*). Estão também ilustrados os diferentes transcritos alternativos deste gene. [Human (Homo sapiens) Genome Browser Gateway, assembly: Feb.2009 (GRCh37/hg19), disponível em <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, acesso em Novembro/ 2011].

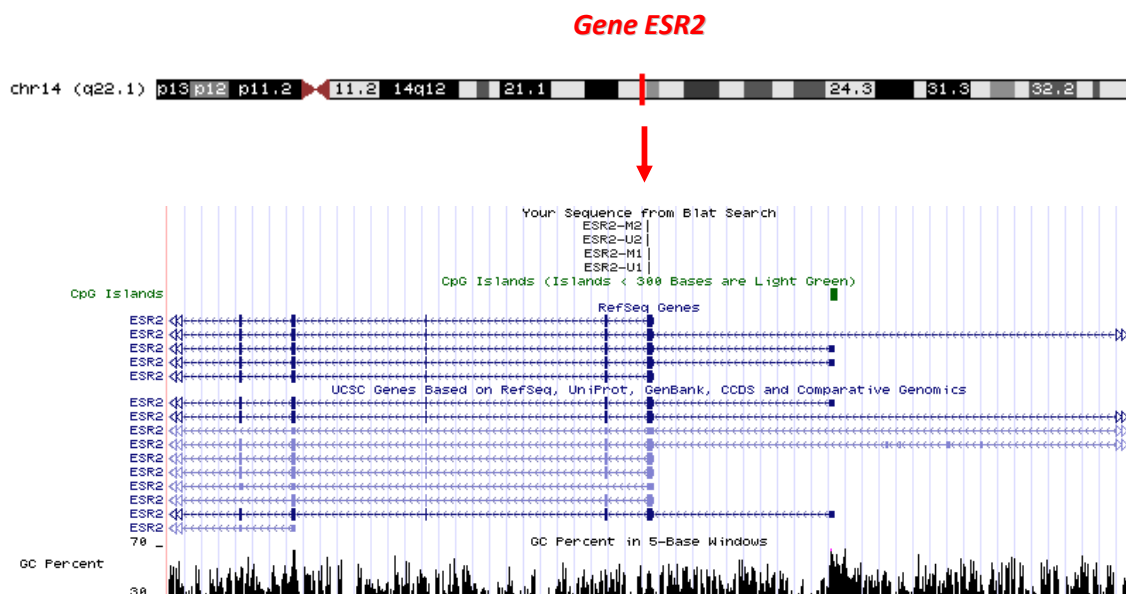


Figura 3 - Dados do mapeamento da região alvo do ensaio de MSP do gene *ESR2*. Estão também ilustrados os diferentes transcritos alternativos deste gene. [Human (Homo sapiens) Genome Browser Gateway, assembly: Feb.2009 (GRCh37/hg19), disponível em <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, acesso em Novembro/ 2011].

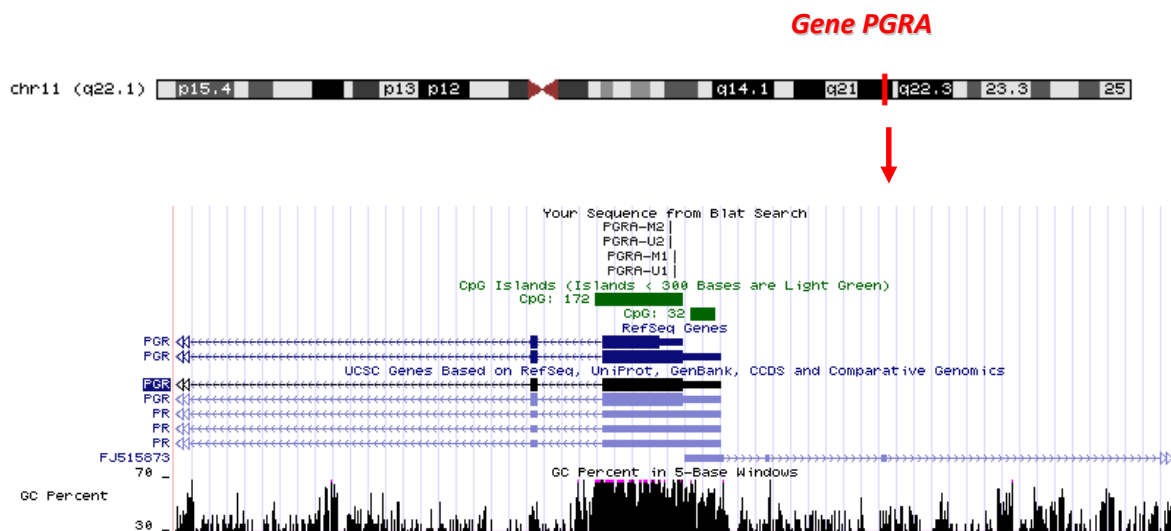


Figura 4 - Dados do mapeamento da região alvo do ensaio de MSP do promotor A do gene *PGR*, (PGRA), que se sobrepõe à ilha CpG 172. Estão apresentados nesta figura os diferentes transcritos alternativos deste gene. [Human (Homo sapiens) Genome Browser Gateway, assembly: Feb.2009 (GRCh37/hg19), disponível em <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, acesso em Novembro/ 2011].

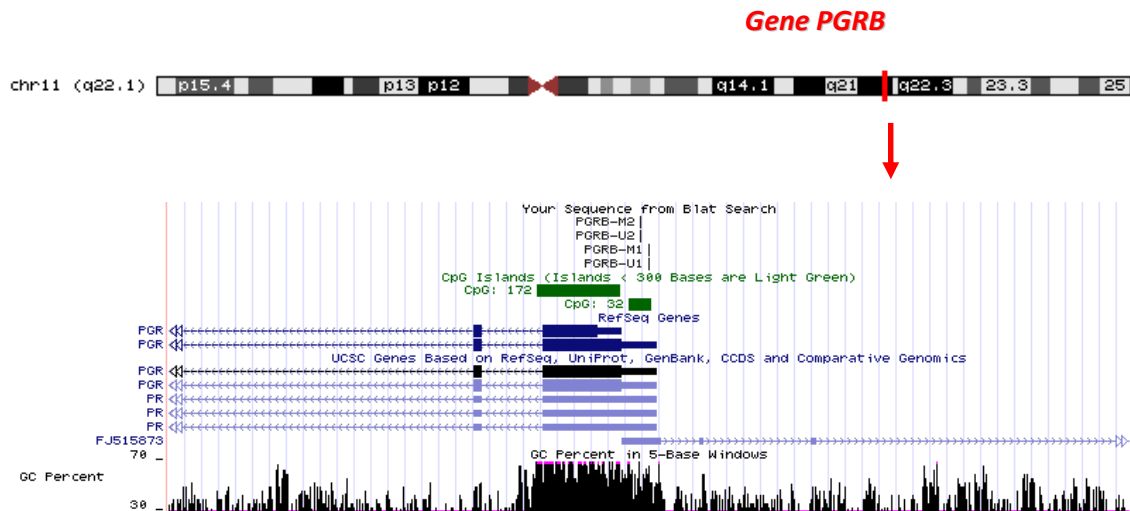


Figura 5 - Dados do mapeamento da região alvo do ensaio de MSP do promotor B gene PGR, (PGRB), que se sobrepõe à ilha CpG 32. Estão apresentados também nesta figura os diferentes transcritos alternativos deste gene. [Human (Homo sapiens) Genome Browser Gateway, assembly: Feb.2009 (GRCh37/hg19), disponível em <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, acesso em Novembro/ 2011].

4.2 Resultados da análise de MSP

Dentre as quinze linhagens celulares selecionadas para o presente estudo, a análise de MSP foi conduzida com sucesso em 14 e 12 linhagens celulares para as regiões promotoras A e B do gene *ESR1*, respectivamente. Em adição, em uma linhagem não foi possível a determinação do padrão de metilação da região promotora A do gene *PGR*.

Os dados globais do padrão de metilação dos receptores hormonais encontram-se apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Resultado da análise de MSP para as linhagens celulares derivadas de câncer de mama.

Linhagens Celulares	Genes				
	<i>ESR1A</i>	<i>ESR1B</i>	<i>ESR2</i>	<i>PGRA</i>	<i>PGRB</i>
BT20	U	M	M	M	M
BT549	M	U	M/U	M	M/U
HS578T	U	NA	M	U	M/U
MDA-MB-231	M/U	M/U	M/U	M/U	M/U
MDA-MB-436	U	NA	M	M/U	U
MDA-MB-453	M/U	M	M/U	M/U	U
SKBR3	U	U	M/U	NA	U
MDA-MB-134IV	U	M	M	M	M
ZR-75-1	U	M	M	M/U	M/U
MDA-MB-361	U	NA	M	U	U
ZR-75-30	U	M/U	M	U	U
BT474	NA	M	M	M/U	U
BT483	U	M	M	U	U
MCF-7	U	M/U	M/U	U	U
T47D	U	U	M	U	U

M = metilação completa, M/U = metilação parcial, U = sem metilação, NA = Não analisado

A análise do padrão de metilação da ilha CpG 89 que se sobrepõe à região promotora da isoforma A do gene *ESR1* (*ESR1A*) revelou o predomínio de alelos não metilados na maioria das linhagens (Figura 6). A metilação completa foi observada na linhagem BT549 e somente duas apresentaram metilação parcial, a MDA-MB-231 e MDA-MB-453. Quando

estes dados foram comparados com a expressão da proteína ER pode-se observar que a única linhagem que possui metilação total, a BT549, não possui a expressão do ER. Achados concordantes também foram observados em relação à ausência de metilação, pois entre as 11 linhagens que não apresentam metilação nessa região, sete expressam a proteína ER- α (63%).

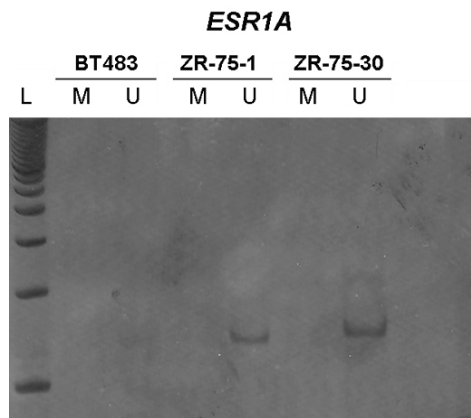


Figura 6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida ilustrativo do padrão de metilação do promotor A do gene *ESR1* nas linhagens BT483, ZR-75-1 e ZR-75-30. As três linhagens mostraram banda correspondente ao alelo não metilado. M – alelo metilado; U – alelo não metilado; L – marcador de tamanho molecular 100pb DNA Ladder.

No entanto, o mesmo perfil não foi observado para a região promotora que controla a expressão da isoforma beta, *ESR1B*. A presença exclusiva de alelos metilados ou não metilados foi observada em seis (BT20, MDA-MB-453, MDA-MB-134Iv, ZR-75-1, BT474 e BT483) e três linhagens (BT549, SK-BR-3, e T47D), respectivamente. O padrão hemimetilado (Figura 7) foi observado em quatro linhagens (MDA-MB-231, MCF-7 e ZR-75-30).

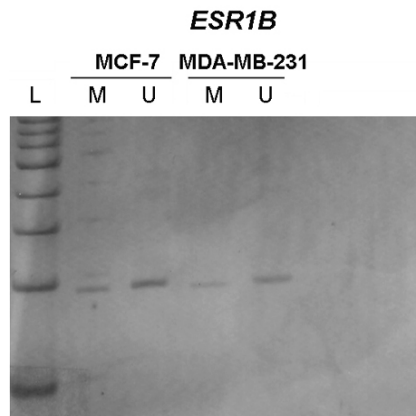


Figura 7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida ilustrativo do padrão de metilação da região promotora B do gene *ESR1* nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. As duas linhagens mostraram bandas correspondentes ao alelo não metilado e ao alelo metilado. M – alelo metilado; U – alelo não metilado; L – marcador de tamanho molecular 100pb DNA Ladder.

Todas as linhagens apresentaram metilação completa ou metilação parcial do gene *ESR2* (Figura 8).

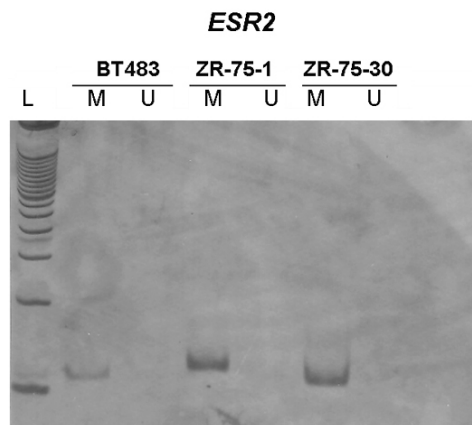


Figura 8 – Eletroforese em gel de poliacrilamida ilustrativo do padrão de metilação do gene *ESR2* nas linhagens BT483, ZR-75-1 e ZR-75-30. As três linhagens mostraram banda correspondente ao alelo metilado. M – alelo metilado; U – alelo não metilado; L – marcador de tamanho molecular 100pb DNA Ladder.

A região promotora que controla a expressão da isoforma A do gene *PGR*, *PGRA*, apresenta-se metilada nas linhagens BT549, MDA-MB-134IV e BT20, parcialmente metilada

nas linhagens MDA-MB-231, BT474, MDA-MB-453, ZR-75-1 e MDA-MB-436, e não é metilada nas linhagens, MCF-7, T47D, BT483, ZR-15-30, HS578T, MDAMB361 (Figura 9). A comparação do padrão de metilação da ilha CPG 172 com a expressão da proteína PR, revelou que todas as linhagens (100%) que possuem a metilação completa ou parcial, não apresentam a expressão desta isoforma, enquanto metade das linhagens que não possuem metilação, expressam a mesma.

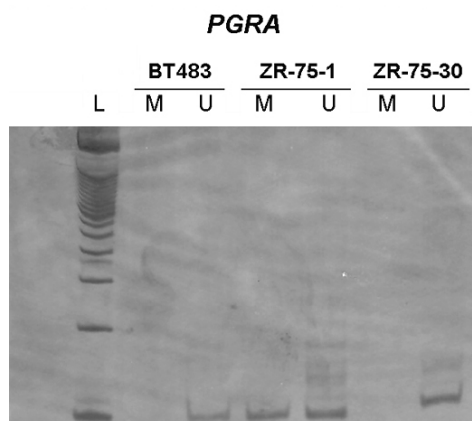


Figura 9 – Eletroforese em gel de poliacrilamida ilustrativo do padrão de metilação do promotor A do gene *PGR* nas linhagens BT483, ZR-75-1 e ZR-75-30. As linhagens, BT483 e ZR-75-30, mostraram banda correspondente ao alelo não metilado e a linhagem ZR-75-1 mostrou bandas correspondentes ao alelo metilado e ao alelo não metilado. M – alelo metilado; U – alelo não metilado; L – marcador de tamanho molecular 100pb DNA Ladder.

A análise do padrão de metilação (Figura 10) da região promotora B (ilha CpG 32) do gene *PGR* revelou que todas as linhagens que apresentam metilação completa ou parcial não apresentavam a expressão de PR. Observou-se metilação completa somente nas linhagens MDA-MB-134IV e BT20 e metilação parcial nas linhagens MDAMB231, BT549, HS578T, ZR75-1.

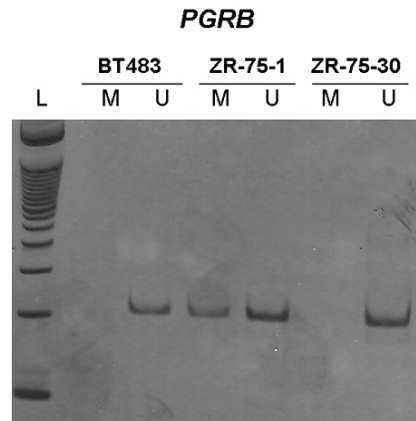


Figura 10 – Eletroforese em gel de poliacrilamida ilustrativo do padrão de metilação do promotor B do gene PGR nas linhagens BT483, ZR-75-1 e ZR-75-30. As linhagens, BT483 e ZR-75-30 mostraram banda correspondente ao alelo não metilado e linhagem ZR-75-1 mostrou bandas correspondentes ao alelo metilado e ao alelo não metilado. M – alelo metilado; U – alelo não metilado; L – marcador de tamanho molecular 100pb DNA Ladder.

Quadro 1. Perfil de metilação dos genes dos receptores de hormônios esteróides em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários.

<i>Linhagem Celular</i>	<i>Subtipo Molecular (*)</i>	<i>E S R 1 A</i>	<i>E S R 1 B</i>	<i>E S R 2</i>	<i>P G R A</i>	<i>P G R B</i>
BT20	BaA					
BT549	BaA					
HS578T	BaA					
MDA-MB-231	BaA					
MDA-MB-436	BaA					
MDA-MB-453	Lu					
SKBR3	Lu					
MDA-MB-134IV	Lu					
ZR-75-1	Lu					
MDA-MB-361	Lu					
ZR-75-30	Lu					
BT474	Lu					
BT483	Lu					
MCF-7	Lu					
T47D	Lu					

Ausência de metilação dos genes
 Presença de alelos metilados e não metilados
 Presença de alelos metilados apenas



*Classificação molecular baseada nos perfis globais de expressão gênica. BaA = Basal A; BaB = Basal B; Lu = Luminal; (+).

Quadro 2. Comparação entre o perfil de metilação do DNA dos genes *ESR1* e *PGR* e a expressão dos receptores ER- α e PR.

<i>Linhagem Celular</i>	<i>Subtipo Molecular (*)</i>	<i>ER</i>	<i>PR</i>	<i>ESR1 A</i>	<i>ESR1 B</i>	<i>PGR A</i>	<i>PGR B</i>
BT20	BaA	-	-				
BT549	BaA	-	-				
HS578T	BaA	-	-				
MDA-MB-231	BaA	-	-				
MDA-MB-436	BaA	-	-				
MDA-MB-453	Lu	-	-				
SKBR3	Lu	-	-				
MDA-MB-134IV	Lu	+	-				
ZR-75-1	Lu	+	-				
MDA-MB-361	Lu	+	-				
ZR-75-30	Lu	+	-				
BT474	Lu	+	+				
BT483	Lu	+	+				
MCF-7	Lu	+	+				
T47D	Lu	+	+				

Ausência de metilação dos genes
 Presença de alelos metilados e não metilados
 Presença de alelos metilados apenas



*Classificação molecular baseada nos perfis globais de expressão gênica. BaA = Basal A; BaB = Basal B; Lu = Luminal; (+) presença de expressão do receptor (-) ausência de expressão , retirado de Neve et al, 2006

5. Discussão

A expressão dos transcritos alternativos dos genes *ESR* e *PGR* é regulada por múltiplos promotores, alguns destes associados a ilhas CpG. Atualmente, tem sido sugerido que a metilação anormal das ilhas CpG está associada ao desenvolvimento de doenças humanas, sendo que a hipermetilação do DNA das ilhas CpG tem sido associada com o silenciamento gênico (Portela e Esteller, 2010).

Estudos prévios relataram que os genes codificadores dos receptores dos hormônios esteróides são regulados epigeneticamente. Pilat et al (1998), analisaram um painel de linhagens celulares epiteliais mamárias e detectaram que o conteúdo total de 5-metilcitosina foi menor nas derivadas de carcinomas (MCF-7 e T47D) quando comparadas com duas linhagens não tumorigênicas, a MCF12M e a MCF10A. Os autores também demonstraram que a região promotora do gene *ESR1* encontra-se não metilada nas linhagens MCF-7 e MCF10A. Estes dados foram compatíveis com a expressão positiva do receptor ER- α nestas duas linhagens. Em adição, as linhagens não tumorigênicas estudadas não apresentaram diferenças na atividade de DNA metiltransferase, mas houve um aumento de 3 a 10 vezes nas linhagens derivadas de carcinomas (MCF-7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-231 e MDA-MB-468). A análise do padrão de metilação nestas linhagens revelou a ausência de metilação em todas as linhagens, com exceção da MDA-MB-468, que apresentou padrão hemimetilado. Os dados do presente estudo são concordantes com a ausência de metilação do gene *ESR1A* nas linhagens MCF-7, T47D, SK-BR-3; no entanto, foram contrastantes para a linhagem MDA-MB-231, que foi hemimetilada para todas as regiões analisadas.

Kang et al (2005) observaram que a expressão do gene *ESR1* foi induzida pelo tratamento com BBP (butil benzil ftalato), uma substância usada na indústria de plastificantes que possui efeitos no sistema endócrino por sua atividade anti-androgênica e pro-estrogênica. A expressão gênica foi correlacionada com a desmetilação da região promotora do gene *ESR1* na linhagem MCF-7. Os autores sugeriram que os níveis de expressão deste gene estão associados com alterações da metilação do DNA. Em adição, outro estudo mostrou que a ausência de expressão do ER- α está associada com a presença de metilação na região promotora A e B, mas não na região C, na linhagem celular MDA-MB-231 (Tang et al, 2005).

Os dados do presente estudo mostraram uma relação entre a expressão da proteína ER, a ausência de metilação do DNA e o subtipo molecular luminal; por outro lado, a ausência de expressão de ER nas linhagens BT20, BT549, Hs578T, MDA-MB-231 e MDA-MB-436 foi relacionada com a presença de alelos metilados nos promotores A ou B do gene *ESR1* em três destas linhagens (BT20, BT549, MDA-MB-231), que são do subtipo basal A. Wang et al (2006), detectaram que a inativação do gene *ESR1* apresentava uma forte relação com a metilação anormal da sua região promotora e que o tratamento com o agente desmetilante 5-Aza-2'-desoxicitidina foi capaz de causar a desmetilação efetiva destas regiões e restaurar a expressão da proteína ER na linhagem celular MDA-MB-231. Em adição, o tratamento com o inibidor de desacetilases de histonas, tricostatina A (TSA) reativa a expressão do gene *ESR1* nas linhagens ER- MDA-MB-231 e MDA-MB-435 por mediar a reorganização de proteínas associadas à cromatina, sem necessariamente induzir alterações na hipermetilação da região promotora. Em conjunto, estes dados indicam que a terapia epigenética pode oferecer uma alternativa para que pacientes portadoras de carcinomas de mama ER negativo também possam se beneficiar da terapia hormonal.

A variabilidade observada no perfil de metilação das cinco regiões estudadas por MSP nas 15 linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários, provavelmente, correlaciona-se com a heterogeneidade descrita por Subik et al. (2010) após a análise imunohistoquímica, bem como aquela detectada pelas análises de expressão gênica global (Neves et al., 2006). O presente estudo mostrou que foi possível identificar três agrupamentos diferentes, o grupo do subtipo molecular BaA (*Basal-like A*) formado pelas linhagens BT20, BT549, Hs578T, MDA-MB-231, MDA-MB-436, caracterizado por um maior número de regiões apresentando metilado do DNA e pela ausência de expressão dos receptores ER α e PR. O grupo do subtipo molecular Lu (Luminal) foi caracterizado por um menor número de regiões mostrando metilação do DNA e a expressão de ambas as proteínas (linhagens BT474, BT 483, MCF-7, T47D). Um terceiro agrupamento apresentou características intermediárias: estas linhagens do subtipo molecular Luminal apresentaram um perfil mais heterogêneo, tanto para os resultados de MSP quanto para a expressão dos receptores. Este grupo formado pelas linhagens MDA-MB-453, SK-BR-3, MDA-MB-134IV, ZR-75-1, MDA-MB-361, ZR-75-30 não expressa o receptor de progesterona; entretanto, apenas 50% destas linhagens apresentam a metilação parcial ou total dos promotores A ou B do gene *PGR*. A falta de expressão de PR na

ausência de metilação DNA em *PGR*A e/ou *PGR*B pode ser explicada pelo fato de outros mecanismos epigenéticos, como as modificação de histonas e a regulação pós-transcricional mediada por microRNAs (Jovanovic, 2010, Huang, 2011).

O padrão de metilação do gene *ESR*2 é distinto daquele observado para o gene *ESR*1. Foi observado que 70% das linhagens ER+ apresentavam metilação completa deste gene. Em adição, três das seis linhagens ER- também mostrava apenas alelos metilados. Estes achados corroboram dados da literatura que mostram que no câncer de mama há um maior nível de expressão do receptor ER- α codificado pelo *ESR*1 em relação ao ER- β codificado pelo *ESR*2 (Sugiura et al, 2007 e Saji et al., 2005). Estes dados sugerem que as diferenças na razão entre os níveis de expressão de ER- α / ER- β pode ser mediada pelos nível de metilação.

6. Conclusão

Baseado nos dados apresentados pode-se concluir que as alterações da metilação do DNA em regiões distintas dos genes *ESR1*, *ESR2* e *PGR* pode ser utilizada para a identificação de um perfil de metilação característico, relacionado com o subtipo molecular.

O *status* dos receptores de estrógeno (ER) e progesterona (PR) tem sido reconhecido como um importante fator prognóstico em pacientes de câncer de mama, por ser um marcador preditivo para a resposta ao tratamento com a terapia endócrina. O padrão de expressão de ER e PR é influenciado pelas mudanças na cromatina e interfere com os níveis de expressão dos transcritos. Assim, a metilação do DNA e as modificações de histonas tem um papel crucial na regulação transcricional. O presente estudo, mostrou evidências adicionais de que a metilação do DNA está relacionada com a regulação da expressão dos genes estudados em um painel composto por linhagens derivadas de câncer de mama, a maioria ainda não caracterizadas em relação à presença ou ausência de metilação dos promotores associados à expressão de transcritos alternativos. No entanto, a metilação do DNA não deve ser considerada o único fator envolvido nesta regulação. Estes dados são relevantes e poderão subsidiar estudos futuros, pois as linhagens celulares estudadas são consideradas sistemas modelos para estudos sobre os mecanismos básicos e sobre o efeito de novas drogas para o tratamento do câncer.

7. Referências Bibliográficas

ALTHUIS M. D., FERGENBAUM J. H., GARCIA-CLOSAS M., et al.: *Etiology of Hormone Receptor-Defined Breast Cancer: A Systematic Review of the Literature*. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 13:1558-1568, 2004.

ANDERSON E. *Review: Progesterone receptors – animal models and cell signaling in breast cancer. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigênese*. **Breast Cancer Res**, 4:197-201, 2002.

BAE Y. K., BROWN A., GARRETT E., BORNMAN D., FACKLER M. J., SUKUMAR S., HERMAN J. G., GABRIELSON E.: *Hypermethylation in histologically distinct classes of breast cancer*. **Clin Cancer Res**, 10:5998–6005, 2004.

BALLESTAR E. *An introduction to epigenetics*. Capítulo 1: Epigenetic contributions in autoimmune disease, 2011.

BARROS A. C. S. D., BARBOSA E. M., GEBRIM L. H.. *Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama*, **Diretrizes Médicas**, 2001

BEHRENS D., GILL J. H., FICHTNER I.: *Loss of tumourigenicity of stably ERbeta-transfected MCF-7 breast cancer cells*. **Mol Cell Endocrinol**, 274:19-29, 2007.

BERDASCO M., ESTELLER M. *Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry*. **Dev Cell**, 19, November 16, 2010

BIRD A.: *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. **Genes Dev**, 1: 166-21, 2002.

CHAD J. CREIGHTON, C. KENT OSBORNE, MARC J. VAN DE VIJVER⁵, JOHN A. FOEKENS, JAN KLIJN⁷, HUGO M. HORLINGS⁵, DIMITRY NUYTEN⁵, YIXIN WANG, YI ZHANG, GARY C. CHAMNESS², SUSAN G. HILSENBECK, ADRIAN V. LEE, RACHEL SCHIFF. Molecular profiles of progesterone receptor loss in human breast Tumors *Breast Cancer Res Treat*. 2009 March ; 114(2): 287–299. doi:10.1007/s10549-008-0017-2.

CREIGHTON C. J., KENT C., VAN DE VIJVER M. J, FOEKENS J. A., KLIJN J., HUGO M. HORLINGS, NUYTEN D., WANG Y., ZHANG Y., CHAMNESS G. C, HILSENBECK S. G., LEE A. V., SCHIFF R. *Molecular profiles of progesterone receptor loss in human breast Tumors. Breast Cancer Res Treat*, 114(2): 287–299. doi:10.1007/s10549-008-0017-2, 2009.

DWORKIN A. M., HUANG T. H., TOLAND A. E.: *Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. Semin Cancer Biol*, 19:165-171, 2009.

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

FEINBERG A. P., OHLSSON R., HENIKOFF S.: *The epigenetic progenitor origin of human cancer. Nat Rev Genet*, 7:21-33, 2006.

FERLAY J., SHIN H. R., BRAY F., FORMAN D., MATHERS C., PARKIN D. M.: *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer*, 2010.

FORSBERG, E. C., BRESNICK, E. H. *Histone acetylation beyond promoters: long-range acetylation patterns in the chromatin world. Bioessays*, 23, 820e830, 2001.

GIACINTI L., CLAUDIO P. P., LOPEZ M., GIORDANO A.: *Epigenetic Information and Estrogen Receptor Alpha Expression in Breast Cancer*. **The Oncologist**, 11:1-8, 2006.

GIBNEY E. R., NOLAN C. M. *Epigenetics and gene expression*. **Nat Heredity**, 105, 4–13, 2010

HAYASHI S-I., EGUCHI H., TANIMOTO K., YOSHIDA T., OMOTO Y., INOUE A., YOSIDA N., YAMAGUCHI Y. *The expression and function of estrogen receptor and in human breast cancer and its clinical application*. **Endocrine-Related Cancer**, 10:193–202, 2003.

HELDING N., PIKE A., ANDERSSON S., MATTHEWS J., CHENG G., HARTMAN J., TUJAGUE M., STROM A., TREUTER E., WARNER M., GUSTAFSSON J. A. *Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets*. **Physiol Rev**, 87:905–931, 2007.

HERSCHKOWITZ J. I., SIMIN K., WEIGMAN VJ, MIKAELIAN I, USARY J, HU Z. *Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors*. **Genome Biol**, 8:76, 2007.

HUANG Y., NAYAK S., JANKOWITZ R., DAVIDSON N. E., OESTERREICH S. *Epigenetics in breast cancer: what's new?* **Breast Cancer Research**, 13:225, 2011

INCA, 2011 – Disponível em: <http://www.inca.gov.br>, acessado em novembro de 2011.

ITO, K., BARNES, P. J., ADCOCK, I. M. *Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1 β -induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12*. **Mol. Cell. Biol.**, 20, 6891e6903, 2002.

JAENISCH R., BIRD A.: *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. **Nat Genet**, 33(Suppl):245-254, 2003.

- JELTSCH J. M., KROZOWSKI Z., QUIRIN-STRICKER C., GRONEMEYER H., SIMPSON R. J., GARNIER J. M., KRUST A., JACOB F., CHAMBON P.: *Cloning of the chicken progesterone receptor*. **Proc Natl Acad Sci**, 83:5424–5428, 1986.
- JOVANOVIĆ J., RØNNEBERG J. A., TOST J., KRISTENSEN V.: *The epigenetics of breast cancer*. **Molecular Oncology**, 242-254, 2010.
- KANG S. C, LEE B. M. *DNA methylation of estrogen receptor alpha gene by phthalates*. **J Toxicol Environ Health A**. 10;68(23-24), 2005.
- LAPIDUS R. G., FERGUSON A. T., OTTAVIANO Y. L., PARL F. F., BAYLIN S. B., ISSA J-P. J., DAVIDSON A. E.. *Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 50 CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors*. **Clin. Cancer Res**. 2:805–810, 1996.
- LI C. I., URIBE D. J. , DALING J. R. *Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer*. **Br J Cancer**, 93:1046-52, 2005.
- LINDBERG M. K. *Estrogen Receptor (ER)-beta Reduces ERalpha-Regulated Gene Transcription, Supporting a "Ying Yang" Relationship between ERalpha and ERbeta in Mice*. **Mol Endocrinol**, 17:203-208, 2003.
- LO, P. K., SUKUMAR, S., *Epigenomics and breast cancer*. **Pharmacogenomics**, 12, 1879e1902, 2008.
- MALHOTRA G. K., ZHAO X., BAND H., BAND V. *Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers*. **Cancer Biology & Therapy**, 10:10, 1-6, 2010.

MATTHEWS J., GUSTAFSSON J. A.: *Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta*. **Mol Interv**, 3:281–292, 2003.

MAUGHAN K. L., LUTTERBIE M. A., HAM P. S. *Treatment of breast cancer*. **Am Fam Physician**, 81:1339-46, 2010.

NCCN *Clinical Practice Guidelines in Oncology*. **Breast Cancer**, 2010.

NEVE R. M., CHIN K., FRIDLYAND J., YEH J., BAEHNER F. L., FEVR T., CLARK L., BAYANI N., COPPE J.-P., TONG F., SPEED T., SPELLMAN P. T., DEVRIES S., LAPUK A., WANG N. J., KUO W.L., STILWELL J. L., PINKEL D., ALBERTSON D. G., WALDMAN F. M., MCCORMICK F., DICKSON R. B., JOHNSON M. D., LIPPMAN M., ETHIER S., GAZDAR A., E GRAY J. W.: *A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes*. **Cancer cell** 10, 515–527, 2006.

OTTAVIANO Y. L., ISSA J-P, PARL F. F., SMITH H. S., BAYLIN S. B., DAVIDSON N. E. *Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells*. **Cancer Res**. 54:2552–2555, 1994.

PEROU C. M., SORLIE T., EISEN M. B., VAN DE RIJN M., JEFFREY S. S., REES C. A. *Molecular portraits of human breast tumours*. **Nature**, 406:747-52, 2000.

PILAT M. J., SCHWAB E. D., YAO K.L., PIENTA K. J. *Examination of the DNA methylation properties in nontumorigenic and tumorigenic breast epithelial cell lines*. **Anticancer Res**. 18(4A):2575-82, 1998.

PAULIN R. et al.: *Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA*. **Nucleic Acids Res**, 26, 5009-5010, 1998.

PEARCE T. S. & JORDAN V. C. The biological role of estrogen receptors α and β in cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, 50, 3–22, 2004.

POOLE A. J., LI Y, KIM Y, LIN S-CJ, LEE W-H, LEE EYHP. *Prevention of Brca1-mediated mammary tumorigenesis in mice by a progesterone antagonist*. **Science**, 314(5804):1467–1470, 2006.

PORTELA A., ESTELLER M. *Epigenetic modifications and human disease*. **Nat Biotechnol**. Oct; 28(10):1057-68, 2010.

PRAT A., PARKER J. S., KARGINOVA O., FAN C., LIVASY C., HERSCHKOWITZ J. I. *Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer*. **Breast Cancer Res**, 12:68, 2010.

PRANDO E. C., CAVALLI L. R., RAINHO C. *Evidence of epigenetic regulation of the tumor suppressor gene cluster flanking RASSF1 in breast cancer cell lines*. **Epigenetics**, Vol 06, Issue 12, 2011.

ORLANDO F. A., BROWN K. D.: *Unraveling breast cancer heterogeneity through transcriptomic and epigenomic analysis*. **Ann Surg Oncol**, 16:2270-2279, 2009.

REYA T., MORRISON S. J., CLARKE M. F. *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. **Nature**, 414: 105–111, 2001.

RODOLPHE T., M. D; JEAN-PIERRE J. I., MD. *Cancer Epigenetics*. **Ca cancer j clin**, 60:376–392, 2010.

SAJI S., HIROSE M., TOI M.: *Clinical significance of estrogen receptor β in breast cancer.* **Cancer Chemother Pharmacol**, 56(Suppl 1):21-26, 2005.

SASAKI M., DHARIA A., OH B. R., TANAKA Y., FUJIMOTO S., DAHIYA R. *Methylation and inactivation of estrogen, progesterone, and androgen receptors in prostate cancer.* **J Natl Cancer Inst**, 6; 94(5):384-90, 2002.

SHAO W., BROWN M.: *Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy.* **Breast Cancer Res**, 6:39–52, 2004.

SORLIE T., PEROU C. M., TIBSHIRANI R., AAS T., GEISLER S., JOHNSEN H. *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.* **Proc Natl Acad Sci**, 98:10869-74, 2001.

SORLIE T., TIBSHIRANI R., PARKER J., HASTIE T., MARRON J. S., NOBEL A. *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.* **Proc Natl Acad Sci**, 100:8418-23, 2003.

STINGL J., CALDAS C. *Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis.* **Nat Rev Cancer**, 7:791-9, 2007.

STRAHL, B. D., ALLIS, C. D. *The language of covalent histone modifications.* **Nature**, 403, 41e45, 2000.

SUBIK K., LEE J-F., BAXTER L., STRZEPEK T., COSTELLO D., CROWLEY P., XING L., HUNG M-C., BONFIGLIO T., HICKS D. G., TANG P.: *The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines.* **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, 2010:4 35–41, 2010.

SUBRAMANIAM M. M., CHAN J. Y., SOONG R., ITO K., ITO Y., YEOH K. G., SALTO-TELLEZ M., PUTTI T. C. *RUNX3 inactivation by frequent promoter hypermethylation and protein mislocalization constitute an early event in breast cancer progression.* **Breast Cancer Res Treat**, 113:113–121, 2009.

SUGIURA H., TOYAMA T., HARA Y., ZHANG Z., KOBAYASHI S., FUJII Y., IWASE H., YAMASHITA H. *Expression of estrogen receptor beta wild-type and its variant ERbetacx/beta2 is correlated with better prognosis in breast cancer.* **Jpn J Clin Oncol**, 37:820-828, 2007.

TANG B., PENG Z. H., JIANG J. *The synergistic inhibitory effect of 5-aza-2-deoxycytidine and tamoxifen on estrogen receptor alpha negative breast cancer cell lines in vitro*]. **Zhonghua wai ke za zhi**. 1;43(23):1545-9, 2005

WADE, P. A. *Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin.* **Hum. Mol. Genet.** 10, 693e698, 2001.

WANG R., LI L. W., WANG R. L., FAN Q. X., ZHAO P. R., WANG L. X., LU S. H. *[Demethylation of estrogen receptor gene and its re-expression in estrogen receptor-negative breast]*. **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi**. 28(12):894-7, 2006.

WICHA, M. S. *Cancer stem cells: an old idea - a paradigm shift.* **Cancer Res**, 66, 1883–1890, 2006.