

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**LILIANE MARIA BACARO KLASSEN**

**Correlação da Expressão do Gene *CXCL12* com  
o Perfil de Metilação de Ilhas de CpG na  
Região Promotora em Linhagens  
Tumorais de Mama**

**CURITIBA**

**2012**

**LILIANE MARIA BACARO KLASSEN**

**Correlação da Expressão do Gene *CXCL12* com  
o Perfil de Metilação de Ilhas de CpG na  
Região Promotora em Linhagens  
Tumorais de Mama**

Dissertação apresentado ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de Concentração em Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora :  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giseli Klassen

Co-orientadora:  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karin Braun Prado

**CURITIBA**

**2012**

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Klassen, Liliane Maria Bacaro

Correlação da expressão do gene CXCL12 com o perfil de metilação de ilhas de CpG na região promotora em linhagens tumorais de mama. / Liliane Maria Bacaro Klassen. – Curitiba, 2012.

87 f.: il. ; 30cm.

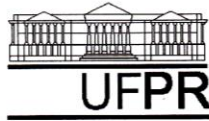
Orientadora: Giseli Klassen

Co-orientadora: Karin Braun Prado

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica.

1. Mamas – Cancer 2. Metilação de DNA 3. Ilhas CpG I. Título II. Klassen, Giseli III. Prado, Karin Braun IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica.

CDD (20. ed.) 618.19



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.


## TERMO DE APROVAÇÃO

**“Correlação da Expressão do Gene *CXCL12* com o Perfil de Metilação de Ilhas de CpG na Região Promotora em Linhagens Tumorais de Mama”**

por

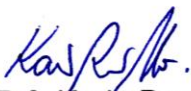
**LILIANE MARIA BACARO KLASSEN**

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giseli Klassen (presidente)

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Frohlich Mercadante

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiane Gomes de Moraes Rego

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karin Braun Prado  
Membro suplente

**Curitiba, 15 de março de 2012.**

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico essa dissertação de mestrado a uma pessoa que ama a pesquisa, e que certamente tem o mérito quase como um todo desse trabalho. Com o seu incentivo, seu apoio, sua dedicação, “- vai lá você consegue, eu te ajudo...” mesmo quando era apenas um sonho, sonho que dividimos e agora se tornou realidade, minha amiga, minha irmã, GI (Giseli Klassen).**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná, representada pelo departamento de Patologia Básica, e ao curso de Pós- Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, muito obrigado pela oportunidade, apoio na concretização desse trabalho.

À CAPES, CNPq, Fundação Araucária (Apoio ao Departamento Científico e Tecnológico do Paraná), pelos recursos financeiros aplicados na realização desse projeto.

À minha orientadora Prof. Dra. Giseli Klassen, pela oportunidade, pela dedicação e paciência. Obrigado por me ensinar a aquilo que tem de melhor, que é o amor pela pesquisa e a vontade de aprender cada dia mais.

Ao Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa e Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza pelo apoio ao permitir a utilização do Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio e Biologia Molecular no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Aos colegas de laboratório de Epigenética: Edneia, Graciele, Isabela, Fernando, Renata, Viviane e Camila, pelo apoio, companheirismos nessa caminhada de dois anos, sem a ajuda de vocês com certeza a jornada teria sido muito mais difícil. Meu muito obrigado.

Em especial agradeço a Edneia A. S. R. Cavallieri, pela sua paciência em passar seus conhecimentos e vivência no laboratório, sempre com muito carinho e boa vontade. Também pela participação direta nesse trabalho. Agradeço também a Graciele pela contribuição direta nesse trabalho.

À Prof. Dra Karin Braun Prado, pela sua colaboração, apoio, no decorrer desse trabalho, como uma valiosa co-orientadora, meu muito obrigado.

À banca examinadora Prof. Dra Fabiane Gomes de M Rego, Prof. Dra Adriana F Mercadante pela disponibilidade e dedicação em avaliar esse trabalho contribuindo para o enriquecimento do mesmo.

Ao Valter A. Baura pela sua disponibilidade, paciência em ajudar em todas as dificuldades, agilizar as realizações de sequenciamento e com isto os resultados desse trabalho.

A Sra. Roseli Prado, pela seu carinho e boa vontade em nos ajudar em tudo que precisamos de materiais e reagentes.

Aos alunos e professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular por dividir conosco os equipamentos e laboratórios, em especial a sala 275 e seus alunos, pela paciência e boa vontade em nos auxiliar quando necessário.

Ao Laboratório de Neurobiologia, do Departamento de Patologia, pela disponibilidade de equipamentos, e boa vontade de todos, alunos e professores em ajudar, obrigado.

À todos os colegas de mestrado e doutorado da turma de 2010, que contribuíram com aprendizado, dividindo experiências, partilhando conhecimentos, incentivos. Meu sincero muito obrigado.

A toda minha família que com apoio contribuíram para mais essa conquista, minha mãe, meu agradecimento eterno (Olga Baraniuk), meus irmãos (Douglas, Nereu e Paulo), cunhadas (Raynê e Giseli), sobrinhas (Amanda, Odette e Paula) e minha sogra (Iracy). Agradeço a compreensão nas horas de ausência e a paciência nas horas necessárias. Amo todos vocês, muito obrigado.

Aos amigos, que souberam compreender a jornada longa de dedicação e com isso muitas vezes a ausência necessária, muito obrigado.

EM ESPECIAL: Meu eterno e sincero agradecimento, pelo carinho, pela dedicação, parceria, incentivo, sem o teu apoio nada disso seria possível, meu amor, meu companheiro meu marido Rubens Klassen, amo você!

Ao meu filho amado, Gustavo Klassen por saber compreender a ausência, ter paciência para esperar a mamãe, muitas vezes ajudando, com sua tão pouca idade, amo você, muito obrigado. Vocês são a razão dessa vitória.

## RESUMO

O câncer de mama é o tipo mais comum e a principal causa de morte por câncer entre as mulheres no mundo todo. As metástases contribuem com 90% das causas de morte por câncer. O estudo de novos marcadores moleculares de câncer estão em amplo e atual desenvolvimento, tanto para diagnóstico como prognóstico da doença. Diversos estudos tem mostrado o papel de eventos epigenéticos entre eles a metilação do DNA, em regiões promotoras de genes como um evento importante no processo de tumorigênese em diversos tipos de câncer. No câncer de mama já foram descritos um grande número de genes envolvidos com controle da proliferação, adesão e migração celular que podem ser silenciados por mecanismos epigenéticos. O gene *CXCL12* codifica para uma quimiocina ou citocina quimiotática, que é comprovadamente silenciado por metilação de sua região promotora em câncer gástrico, de cólon intestinal e de mama. O produto deste gene esta envolvido no processo migratório como molécula ligante de células tumorais que superexpressam o receptor CXCR4 e que migram e colonizam secundariamente pulmões ossos, fígado ou linfonodos que tem altos níveis de *CXCL12*. Nesse trabalho estudamos detalhadamente a região promotora do gene *CXCL12* que contém 5 regiões ricas em dinucleotídeos CpGs (ilhas de CpG). As ilhas de CpG 1, 2, 3 e 5 foram amplificadas, clonadas e sequenciadas a partir de DNA de sete linhagens tumorais de mama. A ausência ou presença de metilação do DNA de cada região foi correlacionado com a presença ou ausência de expressão do gene *CXCL12*. A ilha de CpG 1 apresentou-se hipermetilada em linhagens que expressam *CXCL12*, sendo assim essa região parece não participar do processo de silenciamento desse gene nessas linhagens. A ilha de CpG 2 que contém 1346 pb foi analisada em 2 partes sendo que a parte inicial que contém o nucleotídeo +1 apresentou-se fortemente correlacionada com a expressão do gene. Somente uma linhagem imortalizada, a HB4a apresentou 53,25% de metilação global, o que poderia interferir na expressão do gene. A segunda parte da ilha 2, assim como a ilha de CpG 3 e 5 apresentaram-se hipermetiladas nas linhagens que expressam o gene, e portanto essas regiões provavelmente não interferem na expressão do gene *CXCL12* nessas linhagens tumorais. Por outro lado a ilha de CpG 4 localizada a cerca de 1500 pb de distância do início de transcrição e fora da provável região promotora, apresentou-se pouco metilada nas linhagens que expressam o gene e hipermetilada nas linhagens que não expressam *CXCL12*. Concluímos que as regiões denominadas ilhas de CpG 1 o terço final da Ilha de CpG 2, ilha de CpG 3 e 5 estão metiladas em linhagens que expressam o gene *CXCL12* e assim sendo, não são importantes no processo de regulação da expressão desse gene. A Ilha de CpG 4 é a única região diferencialmente metilada e que parece atuar de modo a sinalizar o silenciamento do gene *CXCL12*.

**Palavras chaves:** câncer de mama, epigenética, gene *CXCL12*, metilação do DNA.

## ABSTRACT

Breast cancer is the leading cause of death from cancer in worldwide. Moreover metastases contribute 90% of the causes of cancer death. The study of new molecular markers of cancer are extensive and ongoing development, both for diagnosis and prognosis. Several studies have shown the role of epigenetic events including DNA methylation in promoter regions of genes as an important event in the process of tumorigenesis in several types of cancer. In breast cancer there is already a large number of genes involved in controlling proliferation, cell adhesion and migration that can be silenced by epigenetic mechanisms. The *CXCL12* gene encodes a chemotactic cytokine or chemokine, which is arguably silenced by methylation of its promoter region in gastric, colon and breast cancer. The product of this gene is involved in the migration process as a linking molecule of tumor cells that overexpress the CXCR4 receptor and secondarily migrate and colonize the lungs bones, liver or lymph nodes that have high levels of CXCL12. In this work we studied in detail the promoter region of *CXCL12* that contain five CpG rich regions. The CpG islands 1, 2, 3 and 5 were amplified, cloned and sequenced from seven breast cancer cell lines DNA. The presence or absence of *CXCL12* expresion were correlated with methylation patterns in the CpG islands. The CpG island 1 showed hypermethylation in breast cancer cell lines that express *CXCL12* therefore could not be importat for epigenetic regulation. The CpG island 2 that contain 1346 pb was analysed in tow parts. The initial part that contain the +1 nucleotide were highly correlated with *CXCL12* expression but one cell line, HB4a showed 38,75 of global methylation that could interfere in the gene expression. The second region as well as CpG island 3 and 5 were hypermethylated in the cell lines that *CXCL12* expression were present and could indicate no interference in the gene expression. On the other hand the Cpg island 4 localized at 1500 bp from +1 region and out side of putative promoter showed hypomethylated in the cell lines positive for *CXCL12* expression and hypermethylated for *CXCL12* negative cell lines. We conclude that the regions named CpG islands 1 and the final third of a CpG island 2, CpG island 3 and 5 are methylated in cell lines expressing the gene *CXCL12* and therefore are not important in the regulation of expression of this gene. The CpG island 4 is the only region differentially methylated and that seems to act in order to signal the *CXCL12* gene silencing.

**Keywords:** breast cancer, epigenetics, gene *CXCL12*, DNA methylation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	Representação esquemática da 5 metilcitosina (5mC) e 5 hidroximetilcitosina (5hmC).....	<b>18</b>
<b>Figura 2-</b>	Metilação do DNA mediada por DNA metiltransferases (DNMTs).....	<b>20</b>
<b>Figura 3-</b>	Representação esquemática da hipermetilação localizada e hipometilação global que ocorrem na célula tumoral.....	<b>23</b>
<b>Figura 4-</b>	Balanco entre acetilação e desacetilação de histonas.....	<b>24</b>
<b>Figura 5-</b>	Representação esquemática das modificações nas histonas.....	<b>25</b>
<b>Figura 6-</b>	Uma visão da carcinogênese no câncer de mama do ponto de vista da metilação do DNA.....	<b>28</b>
<b>Figura 7-</b>	Famílias de quimiocinas, receptores e principais células secretoras.....	<b>33</b>
<b>Figura 8-</b>	Representação esquemática mostrando o papel da ativação do receptor celular CXCR4 no microambiente tumoral em ambos no sítio primário e metastático.....	<b>37</b>
<b>Figura 9-</b>	Representação esquemática da região promotora do gene <i>CXCL12</i> , localização e numeração dos iniciadores utilizados nesse trabalho.....	<b>44</b>
<b>Figura 10-</b>	Região de DNA contendo a ilha de CpG 1 do gene <i>CXCL12</i> .....	<b>46</b>
<b>Figura 11-</b>	Região de DNA contendo a ilha de CpG 2 do gene <i>CXCL12</i> .....	<b>47</b>
<b>Figura 12-</b>	Região de DNA contendo a ilha de CpG 3 do gene <i>CXCL12</i> .....	<b>49</b>
<b>Figura 13-</b>	Região de DNA contendo a ilha de CpG 5 do gene <i>CXCL12</i> .....	<b>50</b>
<b>Figura 14-</b>	Localização das 5 Ilhas de CpG do Gene <i>CXCL12</i> .....	<b>54</b>
<b>Figura 15-</b>	Região 5' do gene <i>CXCL12</i> contendo as ilhas de CpG.....	<b>55</b>

<b>Figura 16-</b>	Padronização da reação de PCR para amplificação da Ilha de CpG 1 do gene <i>CXCL12</i> .....	<b>56</b>
<b>Figura 17-</b>	Padronização das reações de PCR para amplificação das Ilhas de CpG do gene <i>CXCL12</i> , linhagem PMC-42.....	<b>57</b>
<b>Figura 18-</b>	Produto de PCR para clonagem do Fim da Ilha de CpG 2 do gene <i>CXCL12</i> .....	<b>57</b>
<b>Figura 19-</b>	Produtos da Ilha CpG 2F Purificado de todas as linhagens tumorais de mama.....	<b>58</b>
<b>Figura 20-</b>	DNA plasmidial purificado.....	<b>59</b>
<b>Figura 21-</b>	% de metilação de cada CG das ilhas de CpG 1, 2I, 2F, 3, 4 e 5 do Gene <i>CXCL12</i> de linhagens tumorais de mama....	<b>64</b>
<b>Figura 22-</b>	% de metilação global das ilhas de CpG 1, 2I, 2F, 3, 4 e 5 do Gene <i>CXCL12</i> de linhagens tumorais de mama.....	<b>66</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Lista dos principais genes reguladores por hiper ou hipo metilação do DNA em câncer de mama....	<b>30</b>
<b>Tabela 2-</b>	Iniciadores de ilhas CpGs do gene <i>CXCL12</i> .....	<b>45</b>
<b>Tabela 3-</b>	Expressão do gene <i>CXCL12</i> em linhagens tumorais de mama.....	<b>60</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**5hmC:** 5 hidroximetil citosina

**5mC:** 5 metil citosina

**Akt/PI3Ks:** phosphatidylinositol-3 kinases

**BCL2:** B-cell CLL/lymphoma 2 Gene

**BLAST:** do inglês, Basic Alignment Search School

**CD4:** do ingles, *cluster of differentiation 4*

**CpG:** Citosina-Fosfato-Guanina

**CXCL12:** Quimiocina ligante 12

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DNMTs:** Enzimas DNA metal-transferases

**ESR1:** Gene do receptor de estrógeno

**HAT:** Enzima acetiltransferase

**HDAC:** Enzima histona desacetilase

**HDMT:** Enzima histona demetilases

**HER2:** do ingles, human epidermal growth factor receptor type 2

**HIV:** Human immunodeficiency virus

**HMT:** Enzima histona metiltransferase

**Hox11:** Homeobox proto-oncogene 11

**ICGC:** do inglês, International Cancer Genome Consortium

**IFN $\gamma$ :** Interferon-gamma- $\gamma$

**IGF2:** Insulin-like Growth Factor 2

**IL5:** Interleucina 5

**INCA:** Instituto Nacional do Câncer

**MBDs:** do inglês, methyl-binding domain

**miRNA:** microRNA

**MMP2:** Metaloprotease de matriz 2

**MMP9:** Metaloprotease de matriz 9

**MSP:** do inglês, methylation specific PCR

**ncRNA:** RNAs não codificantes

**P53:** Proteína de 53 kilo Daltons

**pb:** Pares de base

**PCR:** do inglês, Polymerase Chain Reaction

**PGR:** Gene do receptor de progesterona

**RAS:** do inglês, *RA*t *Sarcoma vírus* ou vírus do sarcoma de rato  
(Proteína RAS)

**RB:** Retinoblastoma

**RE:** Receptor de estrógeno

**RNAs:** Ácido ribonucleico

**RP :** Receptor progesterona

**SATR1:** Região satélite 1

**SDF1 $\alpha$ :** do inglês Stromal-derived factor-1

**siRNA:** RNAs de interferência curtos

**snoRNA:** RNA nucleolares pequenos

**TGF- $\beta$ :** Transforming Growth Factor  $\beta$

**TSS:** do inglês, transcription start site

## SUMÁRIO

1.	<b>Introdução</b> .....	16
1.1.	Epigenética e Câncer.....	17
1.1.1	Metilação do DNA.....	18
1.1.2.	Ilhas de CpG e seu papel na regulação da expressão gênica.....	20
1.1.3.	A constituição da cromatina e o silenciamento gênico no câncer...	24
1.1.4.	RNAs não codificantes - ncRNA.....	26
1.2.	Epigenética e câncer de mama.....	27
1.3.	Quimiocinas.....	32
1.3.1.	A Quimiocina CXCL12 (SDF1 $\alpha$ ).....	35
2.	<b>Justificativa</b> .....	39
3.	<b>Objetivo Geral</b> .....	40
3.1.	Objetivos Específicos.....	40
4.	<b>Materiais e Métodos</b> .....	41
4.1.	Cultivo celular.....	41
4.2.	Extração de DNA.....	41
4.3.	Tratamento do DNA com Bissulfito de Sódio.....	42
4.4.	Planejamento dos Iniciadores para clonagem das ilhas de CpG....	43
4.5.	Reação de PCR para clonagem das ilhas de CpG.....	51
4.6.	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	52
4.7.	Clonagem das ilhas de CpG do gene CXCL12.....	52
5.	<b>Resultados</b> .....	54
5.1.	Clonagem de ilhas de CpG do gene CXCL12.....	54
5.2.	Perfil de metilação das ilhas de CpG do gene CXCL12 e correlação com a expressão gênica.....	59

5.2.1.	Perfil de metilação da ilha de CpG 1 do gene CXCL12 .....	60
5.2.2.	Perfil de metilação da ilha de CpG 2I do gene CXCL12.....	61
5.2.3.	Perfil de metilação da ilha de CpG 2F do gene CXCL12.....	62
5.2.4.	Perfil de metilação da ilha de CpG 3 do gene CXCL12.....	62
5.2.5.	Perfil de metilação da ilha de CpG 4 do gene CXCL12.....	63
5.2.6.	Perfil de metilação da ilha de CpG 5 do gene CXCL12.....	63
6.	<b>Discussão</b> .....	69
7.	<b>Conclusões</b> .....	73
8.	<b>Referências</b> .....	74
9.	<b>Anexo</b> .....	85

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos e a segunda causa de morte nos países em desenvolvimento (Jemal *et al.*, 2011). Dados estatísticos extraídos do Globocan e também dados do *International Agency for Research on Cancer* relatam que os números ascendentes de câncer nas últimas décadas são resultantes das escolhas de estilo de vida associadas ao câncer tais como, uso do tabaco, sedentarismo e dietas inapropriadas denominadas de ocidentalizadas (Ferlay *et al.*, 2010). O câncer de mama é o tipo mais comum e a principal causa de morte por câncer entre as mulheres no mundo todo (Jemal *et al.*, 2011). No Brasil foram estimados 52.680 novos casos para 2012, com um risco de 50-90 casos a cada 100 mil mulheres na região sul (INCA, 2012).

O câncer de mama é provavelmente o mais temido pelas mulheres, devido à sua alta frequência e sobre tudo pelos seus efeitos psicológicos, que afetam a percepção da sexualidade e a própria imagem pessoal. Ele é relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente.

Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico, se diagnosticado e tratado precocemente, as taxas de mortalidade para o câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda está sendo diagnosticada em estádios avançados.

As formas mais eficazes para detecção precoce do câncer de mama são o autoexame das mamas, o exame clínico e a mamografia. Todas as mulheres devem ser estimuladas e conscientizadas a realizar o autoexame periódico, uma vez que o carcinoma de mama pode surgir também em pacientes sem risco aparente (INCA, 2012).

As metástases são a causa das mortes em 90% dos casos a partir de tumores sólidos, e no caso do câncer de mama os locais mais comuns para metástases são unicamente ou combinações entre, ossos, pulmões, fígado e linfonodos (Lee, 1983). Aproximadamente 10 a 15% das pacientes com tumor maligno de mama apresentam doenças agressivas, que recidivam em até três anos após a detecção do tumor primário. Entretanto, é comum a manifestação de sítios de metástases 10 anos ou mais após o diagnóstico inicial da doença. Assim sendo,

pacientes que tiveram câncer de mama estão sob risco de metástase por toda sua vida. A natureza heterogênea das metástases no câncer de mama torna muito difícil não somente uma definição de cura para essa doença, mas também o acesso aos fatores de risco que conduzem para os tumores secundários (Bird, 2002).

Ainda não é possível prever o risco de desenvolvimento de metástases, por isso no momento mais de 80% das pacientes recebem terapia adjuvante e apesar disso, em 40% dessas, ocorre recidiva e morte devido às metástases (Weigelt *et al.*, 2005).

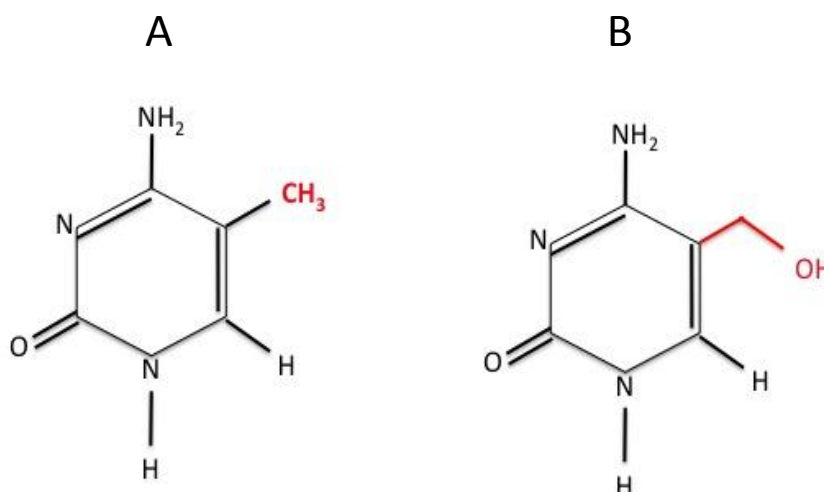
### **1.1. Epigenética e Câncer**

O projeto do genoma humano foi concluído há mais de dez anos e o número estimado de genes é de aproximadamente 23.000 (Perteira e Salzberg, 2010). Entretanto, o genoma humano é muito mais complexo do que um simples catálogo de genes. Uma área de estudo conhecida como epigenética, vem trazendo um enorme impacto na medicina esclarecendo mecanismos que regulam a expressão dos genes.

A epigenética está relacionada com a modificação da conformação estrutural do DNA e consequente alteração na expressão gênica sem haver, no entanto, mudança da sequência de nucleotídeos (Verma e Srivastava, 2002). Recentemente a epigenética vem sendo considerada o epicentro da medicina moderna, trazendo novos conceitos que vem a esclarecer a relação entre o material genético de um indivíduo com o ambiente, com o envelhecimento e também com relação as doenças (Feinberg, 2008). Os mecanismos epigenéticos compreendem: a metilação do DNA, modificações pós-traducionais das histonas e os RNAs não codificantes (Verma e Srivastava, 2002).

### 1.1.1. Metilação do DNA

A metilação do DNA foi descoberta por Hotchkiss (1948) no DNA obtido em timo de bezerro e ocorre no quinto carbono das citosinas (5mC) sendo considerada a quinta base do genoma eucarionte (Figura 1A) (Hotchkiss, 1948).



**Figura 1-** Representação esquemática da 5 metilcitosina (5mC) e 5 hidroximetilcitosina (5hmC). (A) 5mC tendo em vermelho destacado o grupo metil no carbono 5 da citosina e (B) 5hmC destacando em vermelho a modificação do grupo metil  
Fonte: O autor (2012).

Recentemente foi demonstrado que o DNA genômico humano contém não somente a 5 metil citosina (5mC) mas também a 5 hidroximetilcitosina (5hmC) (Figura 1B), a qual é agora considerada a sexta base do genoma dos organismos superiores (Kriaucionis e Heintz, 2009). Curiosamente este não é um achado novo pois a 5hmC já havia sido descrita em 1972 (Penn *et al.*, 1972), porém a dúvida sobre a sua existência permaneceu até recentemente pela dificuldade em reproduzir os resultados. Há evidências de que a 5hmC esteja envolvida no processo de pluripotência celular em camundongos (Ficz *et al.*, 2011) e que sua diminuição em câncer cólon retal esteja envolvida no processo de tumorigênese (Li e Liu 2011).

A distribuição da metilação do DNA nos genomas eucariontes foi encontrada principalmente nos dinucleotídeos CpG (citosinas adjacentes a guaninas) (Sinsheimer, 1955). Nos primórdios dos estudos epigenéticos já havia sido proposto

que a metilação das citosinas no DNA eucarionte poderia atuar como uma modificação estável e herdável que poderia afetar a diferenciação celular (Holliday and Pugh, 1975). Atualmente muitos processos envolvendo a metilação do DNA vem sendo estudados, tais como, a regulação da expressão gênica, interações DNA proteína, diferenciação celular, supressão de elementos transponíveis, embriogênese, inativação do cromossomo X nas mulheres, *imprinting* genômico e tumorigênese (Bestor, 2000; Lippman *et al.*, 2004; Strausman *et al.*, 2009).

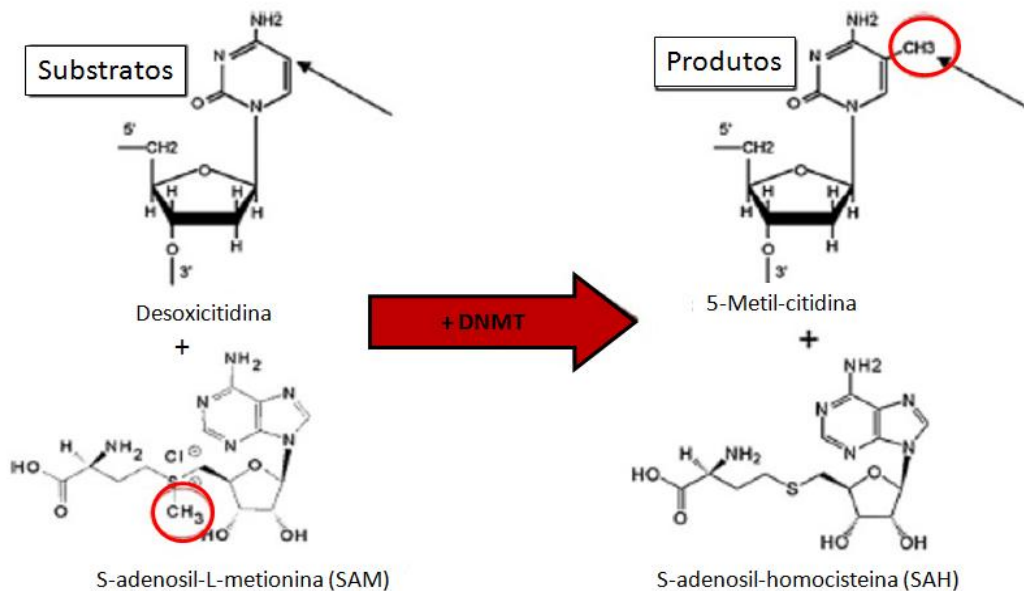
A metilação do DNA nos mamíferos ocorre predominantemente ou exclusivamente nos dinucleotídeos CpG, entretanto já foi descrita a metilação em outros locais do DNA de células humanas. Woodcock *et al.*, (1987) calcularam a frequência global para todos do dinucleotídeos possíveis presentes no genoma humano e observou que 45,5% do total de 5mC estão presentes em CpGs e que 54,5% estão presentes em CpA, CpT mais CpC (Woodcock *et al.*, 1987). Além disso estudos de metiloma humano com resolução de bases, tem mostrado que aproximadamente um quarto de toda metilação em células tronco embrionárias ocorre no contexto não CG, sugerindo que estas células usem diferentes mecanismos de metilação para atuar na regulação da expressão gênica (Lister *et al.*, 2009).

A metilação do DNA é um processo complexo no qual um grupo de enzimas denominadas de DNA metiltransferases (DNMTs), adicionam um grupo metil a partir do doador universal S-adenosilmetionina para o carbono na posição 5 das citosinas adjacentes a guaninas (Bestor, 2000) (Figura 2). As DNMTs estão divididas em: DNMT1, DNMT2 e DNMT3 que tem duas isoformas DNMT3a e DNMT3b. A DNMT1 reconhece preferencialmente substratos de DNA que se apresentam metilados em apenas uma fita (DNA hemimetilado) possibilitando que, durante a replicação ocorra a propagação do padrão de metilação das fitas recém-sintetizadas (Bird, 2002). A superexpressão da enzima DNMT1 parece ser um fator comum no câncer de cólon (Issa *et al.*, 1993). Por outro lado algumas mutações no gene DNMT1 podem resultar na diminuição da atividade dessa enzima levando a hipometilação global em todos os tecidos, estando diretamente envolvida em um tipo agressivo de linfoma de células T (Gaudet *et al.*, 2003).

A DNMT2 possuem um domínio catalítico que não tem capacidade de metilação em células humanas, sendo assim não tem atividade de DNMT em humanos (Xu *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2001)

Os padrões de metilação são estabelecidos nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário pelas metilases de *novoo* DNMT3a e DNMT3b e são copiadas nas células somáticas pela DNMT1 de manutenção (Yang *et al.*, 2001; Bird, 2002a).

A metilação *de novo* leva ao silenciamento gênico em diversos tipos de câncer e pode ocorrer tanto através da condução DNMT1 como pela DNMT3a ou DNMT 3b (Hatzia Apostolou e Iliopoulos, 2011).



**Figura 2- Metilação do DNA mediada por DNA metiltransferases (DNMTs).**

O grupo de enzimas DNMT catalisam a reação entre o S-adenosilmetionina (SAM) (proveniente do metabolismo da metionina), que doa o grupo CH<sub>3</sub> para o carbono 5 da desoxicitidina gerando a 5-metilcitidina

Fonte: Li e Liu, 2011

### 1.1.2. Ilhas de CpG e seu papel na regulação da expressão gênica

Bird (1986) descreveu que existem 2 sítios de reconhecimento das RNA polimerases II no genoma eucarionte. Em uma classe de sítio a frequência de CpGs é a mesma da média do restante do genoma (1 para cada 100 nucleotídeos). E existe uma outra classe de sítios de reconhecimento que são regiões de aproximadamente 1000 pb, onde a frequência de CpGs é 10 vezes mais alta do que

a média do genoma. Estas regiões passaram então a ser chamadas de ilhas de CpG (Bird, 1986). A partir de 1986 foram criados critérios para definir de forma mais precisa as ilhas de CpG, e um dos mais utilizados até hoje estabelecem que, para satisfazer o conceito de ilha de CpG, a região de DNA precisa ser maior do que 200 pb, e com um conteúdo de G+C de 0,5 ou maior e uma razão entre o observado e o esperado da frequência de CG maior ou igual a 0,6 (Gardiner-Garden and Frommer, 1987). Estes critérios vem sendo redefinidos constantemente principalmente por causa das regiões repetitivas dos genomas dos mamíferos, sendo que Takai e Jones (2002) propõe que seja mais adequado utilizar pelo menos 500 bp com conteúdo de G+C de 0,55 (Takai e Jones, 2002).

As ilhas de CpG estão localizadas em regiões promotoras de mais da metade do genoma dos mamíferos e são geralmente não metiladas nas células normais (Bird, 1986). Exceção a essa regra são observadas no cromossomo X inativado das mulheres (Mohandas *et al.*, 1981) e nos genes imprintados (Efstratiadis, 1994). Esse conceito tem sido reavaliado a partir de resultados de (Shen *et al.*, 2007) que encontrou 455 genes, contendo em ilhas de CpG hipermetiladas em tecidos normais. O silenciamento gênico neste caso parece estar envolvido no mecanismo de silenciamento gênico tecido específico (Shen *et al.*, 2007).

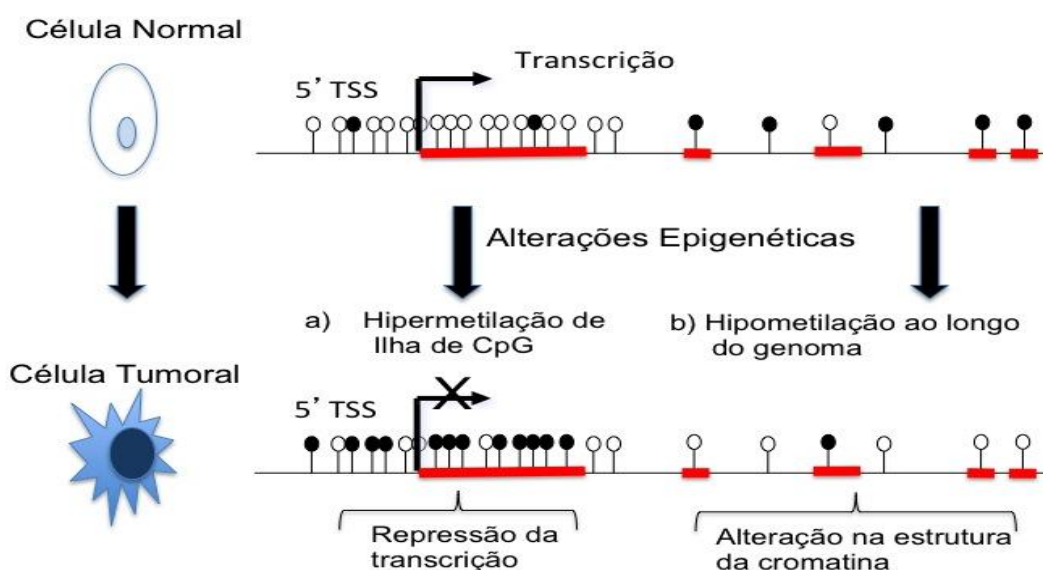
A primeira evidência de alteração no perfil de metilação do DNA no genoma humano foi descrito em 1983, quando observou-se que ocorria hipometilação global do genoma em células cancerosas (Feinberg e Vogelstein, 1983). Este evento é considerado um marco no estudo da epigenética e câncer, produzindo a partir de então grande interesse da comunidade científica mundial. A perda de metilação está envolvida na tumorigênese de todos os tipos de câncer (Hatzia Apostolou e Iliopoulos, 2011) sendo que, lesões pré-malignas como os adenomas sempre apresentam hipometilação global (Feinberg *et al.*, 1988). A perda global de metilação no câncer ocorre principalmente em regiões repetitivas do genoma, regiões que contém retrotransposons, promotores pobres em CpG e introns (Figura 3) observados em vários tipos de câncer, como por exemplo, próstata, leucemia linfocítica crônica e hepatomas (Ehrlich, 2002). Três mecanismos tem sido descritos como proposta para explicar a contribuição da hipometilação na carcinogênese: primeiro, a hipometilação do DNA leva a instabilidade genômica, essa instabilidade pode ser observada em sequências repetitivas que sofrem recombinação, produzindo deleções e

translocações (Hatziapostolou e Iliopoulos, 2011). Segundo, a hipometilação pode favorecer ativação de retrotransposons que tem como característica promover quebras cromossômicas. Como por exemplo a hipometilação de retrotransposons L1 (*long interspersed nuclear elements*) promovem rearranjos cromossomais em tumores em camundongos (Howard *et al.*, 2008). Terceiro, existem também algumas evidências de que a hipometilação em promotores que contém ilhas de CpG conduza a ativação oncogênica. Esses eventos em promotores não são tão comuns como a hipermetilação que será descrita a seguir, e alguns exemplos de genes hipometilados em câncer são *Hox11*, *cMYC* e a perda de *imprinting* do gene *IGF2* (Ehrlich, 2002). Recentemente em nosso laboratório foi demonstrado que a hipometilação do gene *CXCR4* está associada com um pior prognóstico em câncer de mama (Ramos *et al.*, 2011).

Estudos posteriores mostraram que apesar de ter sido observada a hipometilação global do genoma em células cancerosas, a hipermetilação em alguns locais leva ao silenciamento gênico, e a um estado inativo da cromatina (Figura 3). Isto foi evidenciado pela primeira vez no estudo do gene do retinoblastoma (RB), um supressor de tumor que controla o ciclo celular em um tumor raro de retina que pode ser silenciado por hipermetilação (Greger *et al.*, 1989). Atualmente a hipermetilação da região promotora de genes é a alteração epigenética mais bem estudada dos tumores e encontrada em todos os tipos de câncer (Figura 3) (Jones e Baylin, 2002). Deste modo, cada tipo de câncer tem um enorme potencial para ser classificado de acordo com o seu perfil de hipermetilação como mostrado para tumores gástricos (Okamoto *et al.*, 2011), pancreáticos (Vincent *et al.*, 2011), cabeça e pescoço (Furusawa *et al.*, 2011) e mama (Jovanovic *et al.*, 2010a) ou mesmo em lesões pré-cancerosas em diferentes tipos de tumores benignos como observado por Kanai (Kanai, 2010).

Apesar de diversos estudos sobre os mecanismos nos quais a metilação do DNA está relacionada com o silenciamento gênico, ainda não existe um consenso. Existem 2 mecanismos gerais propostos: primeiro a modificação das citosinas pela metilação inibiria a associação entre os fatores que se ligam ao DNA e uma evidência que justifica essa proposta vem de experimentos com o análogo da citidina denominado 5 azacitina (Jones e Taylor, 1981). Este composto pode ser incorporado ao DNA durante a replicação, e por causa da sua estrutura química (um átomo de nitrogênio ao invés de um carbono na posição 5) não pode ser metilado. Esta

molécula ao ser inserida no DNA inibe a ação da DNA metilase de manutenção (DNMT1), e assim o perfil de metilação do local não é transmitido na próxima etapa de replicação ativando genes que tenham sido silenciados por hipermetilação (Jones e Taylor, 1981). A segunda proposta é a de que o silenciamento ocorre pelo recrutamento de proteínas ligantes de metil (*methyl-binding domain* ou MBDs) que atuam atraindo outros co-repressores que modificam a conformação tridimensional do DNA e impedem a transcrição (Jones *et al.*, 1998). Deste modo o silenciamento da transcrição de um gene envolve uma estreita relação entre a metilação do DNA e modificações das histonas (isto será discutido no próximo item).



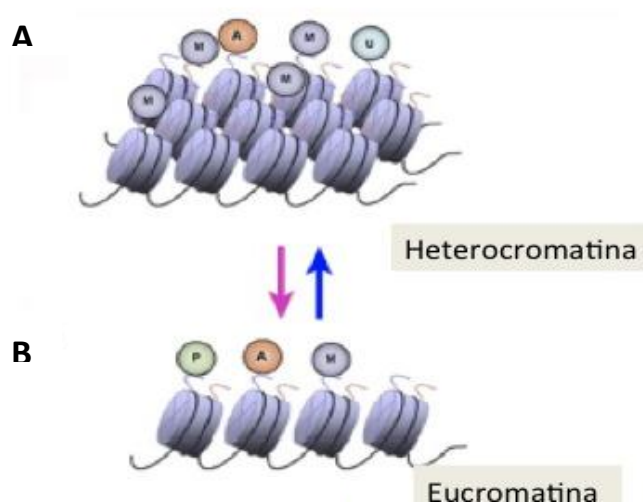
**Figura 3- Representação esquemática da hipermetilação localizada e hipometilação global que ocorrem na célula tumoral.**

Na célula normal as regiões ricas em CpG (ilhas de CpG) estão desmetiladas favorecendo a transcrição. As regiões contendo CpG ao longo de um gene são metiladas numa proporção que pode ser de 3 em cada 4 CpGs. Na célula tumoral podem ocorrer dois eventos que envolvem metilação do DNA a) hipermetilação da ilha de CpG que tem como consequência a repressão da transcrição do gene e b) hipometilação global que altera a estrutura normal da cromatina, podendo conduzir a quebras cromossômicas. As bolinhas brancas são CpG desmetilado. As bolinhas pretas são CpG metilado. Em vermelho estão destacados os exons de um gene. 5'TSS é a região do início de transcrição localizada a 5' de um gene.

Fonte: O autor (2012).

### 1.1.3. A constituição da cromatina e o silenciamento gênico no câncer

A cromatina é classificada em eucromatina ou heterocromatina que são ativa ou inativa respectivamente. O principal fator determinante da estrutura da cromatina são as histonas (Figura 4). O DNA dá voltas a um octâmero de histonas e forma uma estrutura denominada nucleossomo. Cada partícula de nucleossomo compreende aproximadamente 147 pb de DNA ou 1,7 volta em torno das histonas H2A, H2B, H3 e H4 (Luger *et al.*, 1997).

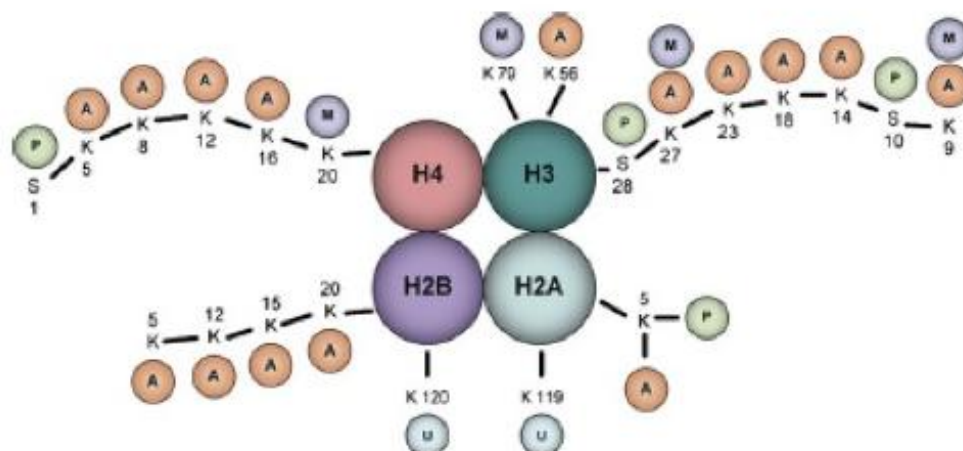


**Figura 4-** Balanço entre acetilação e desacetilação de histonas.

A) heterocromatina com histonas predominantemente metiladas (M). B) eucromatina com acetilação de resíduo de lisina e uma conformação “aberta” do DNA.

Fonte: Shukla et al, 2008

As quatro histonas possuem caudas que se estendem para fora dos nucleossomos (Figuras 4 e 5) que podem sofrer diversos tipos de modificações pós-traducionais influenciando a expressão do gene associado. Essas modificações ocorrem principalmente na região N-terminal e as mais conhecidas são acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, ADP-ribosilação (Kouzarides, 2007). Várias enzimas estão envolvidas nessas reações destacando-se a acetiltransferase (HAT), histona desacetilase (HDAC), histona metiltransferase (HMT) e histona demetilases (HDMT).



**Figura 5- Representação esquemática das modificações nas histonas.**

As modificações pós-traducionais das histonas ocorrem principalmente na cauda N-terminal do núcleo de histonas (H2A, H2B, H3 e H4) e incluem: (A) acetilação, (M) metilação, (P) fosforilação, (U) ubiquitinação. Note que os resíduos de lisina (K9) e (K27) podem ser acetilado ou metilado. (K resíduo de lisina, S serina).  
Fonte : Shukla et al., 2008.

Especificamente resíduos de lisina na cauda N-terminal das histonas são o principal substrato dessas modificações sendo que a acetilação por exemplo, é relacionada com ativação gênica (Figura 4). Um outro grau de complexidade é inserido quando por exemplo se altera o número de modificações de grupamentos metil (mono, di ou trimetilação) (Berger, 2007). Essas modificações podem ocorrer em vários aminoácidos diferentes produzindo então o que tem sido chamado de código das histonas. As alterações mais bem estudadas até o momento envolvem a acetilação e a metilação das histonas H3 e H4. A adição de um grupo acetil neutraliza a carga positiva dos resíduos de lisina mantendo a fita de DNA (carga negativa) afastada das histonas próximas, promovendo um estado da cromatina acessível para a maquinaria de transcrição (Struhl, 1998).

Existem dois modelos que procuram descrever a sequência molecular que leva ao estabelecimento do silenciamento epigenético. Um modelo sugere que as modificações das histonas seriam o evento iniciante da repressão, e que a metilação do DNA nas ilhas de CpG ocorreria subsequentemente, acumulando então um estado herdável de heterocromatina (Tamaru e Selker, 2001). O segundo modelo sugere que a metilação do DNA pode especificar um código de histonas e nesse

caso esse evento precederia as modificações das histonas (Eden *et al.*, 1998; Stirzaker *et al.*, 2004).

Em câncer de mama foi mostrado que a silenciamento do gene que regula a sinalização mediada pelo estrógeno, seria acompanhada pela repressão de um gene alvo como o receptor de progesterona. Neste modelo o gene do receptor de estrógeno (*ESR1*) foi silenciado e a partir disso ocorrem modificações das histonas no promotor do gene do receptor de progesterona (*PGR*) seguido da metilação do DNA (Leu *et al.*, 2004).

Como ainda não existe um consenso na ordem das etapas que envolvem o silenciamento gênico, existe a dúvida “ovo ou galinha” em que entra em questão o que ocorre primeiro, metilação do DNA ou modificação de histona ou outro mecanismo epigenético ainda não esclarecido.

#### **1.1.4. RNAs não codificantes - ncRNA**

Os RNAs não codificantes (ncRNA) são moléculas transcritas a partir do genoma não traduzidas em polipeptídeos, e sua principal função é a regulação da expressão gênica (Goldberg *et al.*, 2007). Assim como genes codificantes de proteínas os genes de RNA não codificantes são ativados por fatores de transcrição e transcritos pela RNA polimerase II (Bartel, 2004).

Os ncRNAs estão divididos em três grandes grupos em função de seu tamanho, sendo o primeiro grupo os microRNA (miRNA) e os RNAs de interferência curtos (siRNA). Neste grupo as moléculas são muito pequenas com tamanho aproximado de 20 a 30 nucleotídeos. O segundo grupo compreende os RNA nucleolares pequenos (snoRNA) com tamanho de 60 a 300 nucleotídeos, e por fim o terceiro grupo os RNA não codificantes longos, com o tamanho médio de 2000 nucleotídeos (Goldenberg, 2007).

Os microRNA foram descritos no início da década de 1990 em *Caenorhabditis elegans*, no qual sugeriu-se um modelo molecular em que a tradução do RNAm lin-14 em proteína, era inibida pela ligação de uma pequena molécula de RNA na extremidade 3' UTR do RNAm de lin-14 (Lee *et al.*, 1993).

O mecanismo de controle da expressão gênica pelo qual os miRNA e siRNA impedem a tradução do RNAm alvo dependerá do grau de complementaridade entre

estas moléculas, se o pareamento for perfeito o RNAm será clivado, caso ocorra um pareamento imperfeito o processo de tradução será inibido, resultando assim na repressão da tradução ou degradação do transcrito (Bartel, 2004).

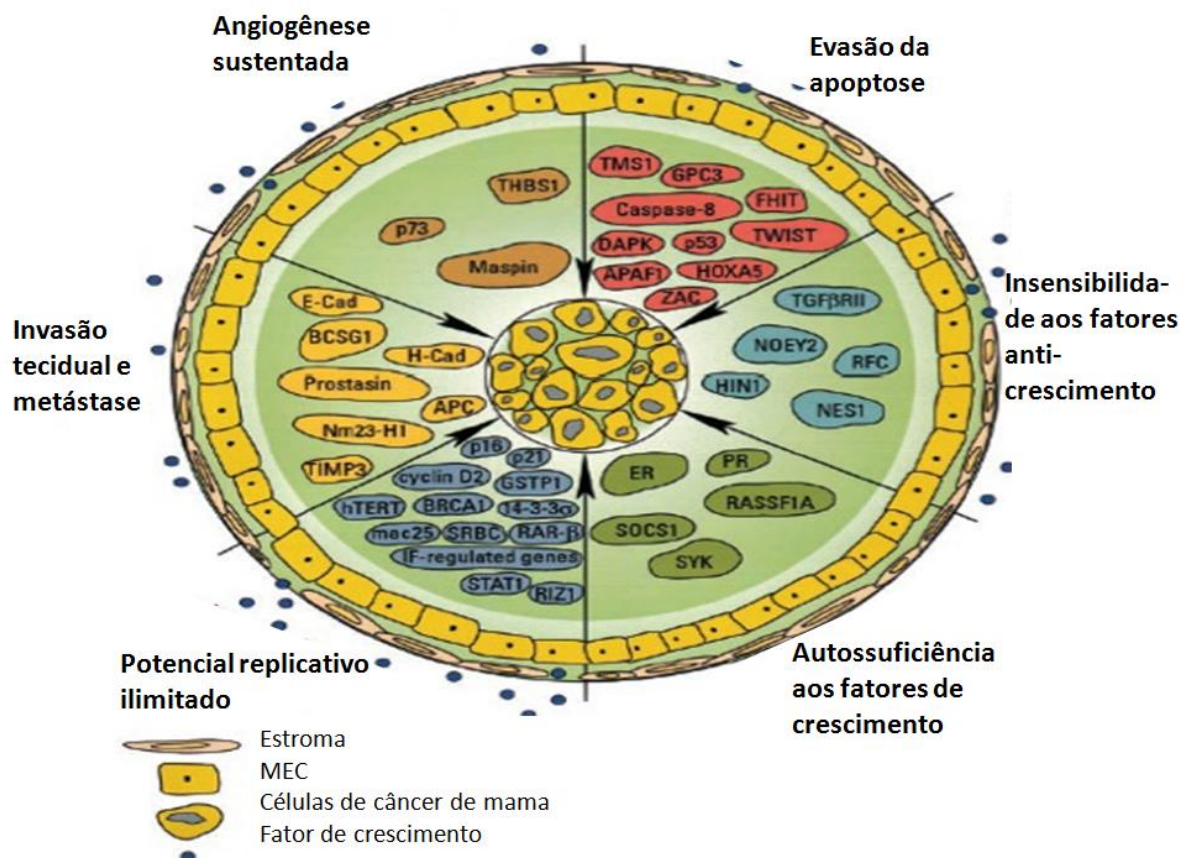
Sabendo da importância do papel dos microRNA na regulação da proliferação, diferenciação celular e do controle da expressão gênica, pode se concluir que uma alteração nesses padrões poderá levar a um grande número de patologias, como o câncer, doenças autoimunes, entre muitas outras. No caso do câncer os microRNAs tem sido repetidamente associados a diversos tipos de tumores, podendo esses atuarem como supressores de tumores ou como oncogenes (Sun e Tsao, 2008). Um exemplo em diversos estudos de microRNA apontam o miR145 como um gene silenciado em vários tipos de câncer, como câncer de mama (Iorio *et al.*, 2005), e próstata (Schaefer *et al.*, 2010) entre outros. Neste sentido, o silenciamento do gene do microRNA está relacionada com a proliferação celular, sendo então miR145 considerado um microRNA supressor de tumor. No momento já existe um grande número de genes de microRNA descritos envolvidos diretamente com a progressão do câncer de mama, revelando a grande importância dessa recente abordagem na compreensão dessa doença (Sato *et al.*, 2011).

A respeito da importância da expressão dos microRNAs é razoável dizer que em função do número de genes já conhecidos e dos diferentes padrões de expressão estabelecidos por estudos de transcriptoma, cada tipo celular tem em uma determinada etapa do desenvolvimento embrionário ou tecidual, um perfil distinto de microRNA, resultando não apenas da expressão ou não-expressão de certas moléculas, mas também da abundância destas num dado momento (Bartel, 2004; Esteller, 2011).

## **1.2. Epigenética e câncer de mama**

Hanahan e Weinberg (2000) descreveram um apanhado geral das alterações na fisiologia celular, que coletivamente compõe ou definem o crescimento de células tumorais malignas (Hanahan e Weinberg, 2000). Widschwendter e Jones em 2002 prepararam uma clássica revisão detalhando a metilação do DNA especificamente em câncer de mama utilizando as seis alterações descritas por Hanahan e Weinberg

(2000) (Figura 6), fazendo uma adaptação com genes que estão diretamente relacionados epigeneticamente ao câncer de mama (Widschwendter e Jones, 2002). As seis alterações que são: angiogênese sustentada, evasão a apoptose, insensibilidade a fatores anti-crescimento, autossuficiência em fatores de crescimento, potencial replicativo ilimitado e invasão tecidual as metástases, podem ser vistos na Figura 6, onde estão destacados os principais genes até então descritos como epigeneticamente modificados em câncer de mama (Widschwendter e Jones, 2002).



**Figura 6-** Uma visão da carcinogênese no câncer de mama do ponto de vista da metilação do DNA.

Genes envolvidos epigeneticamente em cada uma das seis alterações que contribuem para o câncer de mama. Em cada tipo de alteração que são angiogênese sustentada, evasão da apoptose, insensibilidade aos fatores anti-crescimento, autossuficiência em fatores de crescimento, potencial replicativo ilimitado e invasão tecidual as metástase. Em cada etapa estão mostrados exemplos de genes que são alterados por hipermetilação do DNA especificamente no câncer de mama.

Fonte: (Widschwendter e Jones, 2002)

As alterações epigenéticas câncer específicas tem um imenso potencial para utilização como método de detecção precoce e prevenção. A utilização de DNA metilado como biomarcador tem diversas vantagens quando comparado com a tradicional utilização de mutações gênicas. Primeiro, a incidência de metilação aberrante em locais específicos nas ilhas de CpG, são mais altas do que as mutações, além disso a metilação pode ser mensurada no genoma como um todo. Segundo, os padrões de metilação aberrantes podem ser detectados mesmo quando existem moléculas normais, provenientes de células não tumorais (que podem sempre estar presentes numa amostra). Terceiro, as técnicas de determinação de metilação que envolvem uso de enzimas de restrição metilação específicas ou PCR metilação específica (MSP), entre outras, são relativamente fáceis de serem utilizadas (Dworkin *et al.*, 2009).

Pacientes com câncer de mama que são receptor de estrógeno (RE) positivo, podem ser tratadas com drogas anti-estrogênicas como o Tamoxifen. As pacientes que apresentam tumor RE negativo não respondem a essa terapia (Giacinti *et al.*, 2006). A droga tamoxifen utilizada na terapia do câncer de mama RE positivo, também chamada de terapia hormonal, beneficia cerca de 70% das pacientes com essa doença, entretanto 40% das pacientes adquirem resistência ao tamoxifen (Giacinti *et al.*, 2006). Um dos mecanismos propostos para a resistência ao tamoxifen é a hipermetilação do gene *ESR1* ( gene do receptor de estrógeno). Portanto identificar pacientes que possam vir a apresentar resistência a terapia hormonal, buscando conhecer a hipermetilação do gene *ESR1* pode evitar o uso inadequado do tamoxifen (Dworkin *et al.*, 2009).

Para o câncer de mama como em outros tipos de câncer, o diagnóstico precoce faz toda a diferença no tempo de sobrevida livre de doença e na mortalidade. O método mais utilizado de detecção precoce no caso do câncer de mama ainda é a mamografia, que é altamente sensível porém pouco específico, o que tem criado a necessidade da procura por outros métodos de detecção precoce, como por exemplo a epigenômica do câncer de mama (Dedeurwaerder *et al.*, 2011; Lo and Sukumar, 2008). Uma abordagem epigenética muito importante e recente vem surgindo na pesquisa do câncer de mama, a busca por uma assinatura epigenética e sua perspectiva de uso na clínica (Parrella, 2010). Existem diversos genes com potencial prognóstico e preditivo baseados em biomarcadores metilados em câncer de mama, entre eles destacam-se os biomarcadores teciduais como

cistatina M (*CST6*), *RASSF1A*, biomarcadores do soro, *APC*, *RASSF1A*, *ESR1* entre outros, sendo que as regiões pesquisadas são os promotores desses genes, ou melhor, promotores desses genes hipermetilados, utilizando-se de técnicas de PCR metilação específica (MSP) (Parrella, 2010 e Jovanovic *et al.*, 2010). Alguns importantes exemplos de genes alterados por metilação do DNA em câncer de mama estão mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1- Lista dos principais genes regulados por hipermetilação ou hipometilação do DNA em células humana de câncer de mama.**

Gene	Função	Estado de metilação
MGMT	Regulação do DNA	Hipermetilado
ERCA 1		Hipermetilado
MLH1		Hipermetilado
RAD9		Hipermetilado
LDLRAP1 (ARH1)	Homeostase celular	Hipermetilado
GPC3		Hipermetilado
HOXD11		Hipermetilado
LAMA3		Hipermetilado
LAMB3		Hipermetilado
LAMC2		Hipermetilado
ROBO1		Hipermetilado
BCSG1	Invasão celular/metástase	Hipometilado
CDH1		Hipometilado
CDH3		Hipometilado
CDH13		Hipermetilado
CAV1		Hipometilado
CST6		Hipermetilado
NAT1		Hipometilado
SYK		Hipermetilado
UPA		Hipometilado
CCND2	Regulação do ciclo celular	Hipermetilado
14-3-sigma(SFN)		Hipermetilado
AKS		Hipermetilado
CDKN1C		Hipermetilado
CDKN2A		Hipermetilado
ER		Hipermetilado
FOXA2		Hipermetilado
PGR		Hipermetilado
RAR-β		Hipermetilado
RASSF1A		Hipermetilado
RUNDC3		Hipermetilado
SFRP1		Hipermetilado
WIF1		Hipermetilado
WRN		Hipermetilado
WT1		Hipermetilado
APC	Apoptose	Hipermetilado
HDC1		Hipermetilado
HOXAS		Hipermetilado
DAPK		Hipermetilado
BCL2		Hipermetilado
DCC		Hipermetilado
TWIST		Hipermetilado
TMS1		Hipermetilado

Fonte: (Jovanovic *et al.*, 2010)

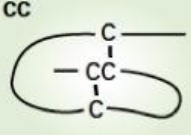





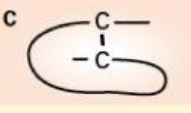

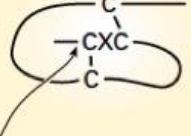

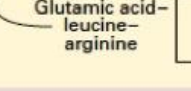

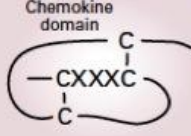

Nos últimos anos com o crescente conhecimento em torno do ncRNAs (*non coding* RNAs) (ver <http://microrna.sanger.ac.uk>) é natural que diversos deles estejam sendo identificados no contexto do câncer de mama. Um exemplo importante é o miR-21 superexpresso em câncer de mama que está relacionado com a capacidade de invasão e metástases de mama para os pulmões. Estão sendo estudados também uma lista de miRNAs específicos de câncer de mama pouco expressos que regulam genes alvos como *RAS* (let-7) *BCL2* (miR-15/16), *ESR1* (miR-206) entre outros (Hu *et al.*, 2012)

O *International Cancer Genome Consortium* (ICGC, <http://www.icgc.org>) tem como finalidade o estudo de todos os principais tipos de câncer em adultos e crianças. Estudos sistemáticos em mais de 25.000 genomas de câncer em termos de genoma, epigenoma e transcriptoma tem revelado um repertório de mutações oncogênicas, de subtipos clinicamente relevantes para o prognóstico e tem tornado possível o desenvolvimento de novas terapias (Hudson *et al.*, 2010; Veeck and Esteller, 2010). Neste momento (fevereiro de 2012) existem quatro projetos de estudo de câncer de mama no ICGC sendo eles, da França, USA, Reino Unido e México que devem juntos analisar mais 1500 tumores de mama, visando a pesquisa do genoma, transcriptoma e epigenoma por tecnologias modernas de sequenciamento de DNA (<http://icgc.org>). Os resultados obtidos nesses e outros projetos de estudo como de 500 tumores HER2 positivos (*French National Cancer Institute*), tumores triplo negativo (RE, RP e HER2) e carcinomas lobulares (*Sanger Institute*), deverão acumular um imenso número de trabalhos e novos dados para decifrar em termos epigenéticos (e outros mecanismos moleculares) as alterações implicadas na carcinogênese da mama e permitir identificar a correlação entre mudanças epigenéticas tumor específica, alterações clínicas e histopatológicas, incluindo prognóstico, predição e resposta a terapia.

### 1.3. Quimiocinas

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas e as suas funções mais bem conhecidas envolvem os processos inflamatórios. Uma das primeiras moléculas identificadas como quimiocina foi a interleucina 8 devido a sua capacidade de atrair monócitos (Luster, 1998).

A partir dessa época, surgiram outras proteínas que compõem a super família das quimiocinas. Esta família é constituída por peptídeos contendo de 8 a 12 kDa, ricos em resíduos básicos de aminoácidos, e que regulam o movimento dos leucócitos e outras células através da interação com receptores transmembrana acoplados a proteína G (Zlotnik *et al.*, 2011). A super família das quimiocinas foi dividida em quatro subfamílias, conforme o arranjo de dois de seus resíduos conservados de cisteínas, localizados na extremidade amino-terminal (Figura 7) (Luster, 1998; Zlotnik *et al.*, 2011). Essas subfamílias estão divididas em grupos da seguinte forma. No primeiro, as quimiocinas CC, (ou beta), possuem duas cisteínas adjacentes. No segundo grupo as quimiocinas C (ou gama) não possuem a primeira e a terceira de quatro cisteínas conservadas e seu único representante é a linfotactina (Lptn). No terceiro grupo as quimiocinas CXC (ou alfa) apresentam um aminoácido entre os dois resíduos de cisteínas. O quarto grupo é constituído pela quimiocina CX<sub>3</sub>C (ou delta) que contém três resíduos de aminoácidos entre as cisteínas conservadas (Luster, 1998). Completando a nomenclatura das quimiocinas, adiciona-se a letra L de ligantes ou a letra R de receptores, e por fim um número de identificação que representa a ordem de descoberta dessas quimiocinas. Os grupos ou famílias de quimiocinas podem possuir mais de um ligante para o mesmo receptor e vice-versa podendo, portanto, ocorrer uma relação intercruzada entre os ligantes e os receptores de quimiocinas (Zlotnik *et al.*, 2011). No entanto, essa redundância ocorre somente entre ligante e receptores pertencentes à mesma família, ou seja, um receptor CXC pode se ligar a diferentes quimiocinas CXC, e vice-versa (Zlotnik *et al.*, 2011).

Chemokine	Receptor	Cell Type
 <p>Chemokine receptor </p> <p>MCP-3, -4; MIP-1<math>\alpha</math>; RANTES MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES</p>	CCR1 CCR3	Eosinophil 
MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES	CCR2 CCR3	Basophil 
MCP-3, -4; MIP-1 $\alpha$ ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES I-309 MDC, HCC-1, TECK	CCR1 CCR2 CCR5 CCR8 ?	Monocyte 
Fractalkine	CX <sub>3</sub> CR1	
SDF-1	CXCR4	
MCP-3, -4; MIP-1 $\alpha$ ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 TARC MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES MIP-3 $\beta$ (ELC) PARC, SLC, 6CKine (Exodus-2)	CCR1 CCR2 CCR4 CCR5 CCR7 ?	Activated T cell 
Fractalkine	CX <sub>3</sub> CR1	
IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3	
 <p>PARC, DC-CK1 Lymphotactin</p>	? ?	Resting T cell 
SDF-1	CXCR4	
 <p>MCP-3, -4; MIP-1<math>\alpha</math>; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES TARC MIP-1<math>\alpha</math>, MIP-1<math>\beta</math>, RANTES MIP-3<math>\alpha</math> (LARC, Exodus-1) MDC, TECK</p>	CCR1 CCR2 CCR3 CCR4 CCR5 CCR6 ?	Dendritic cell 
SDF-1	CXCR4	
 <p>Glutamic acid-leucine-arginine</p> <p>Interleukin-8, GCP-2 Interleukin-8, GCP-2; GRO-<math>\alpha</math>, -<math>\beta</math>, -<math>\gamma</math>; ENA-78; NAP-2; LIX</p>	CXCR1 CXCR2	Neutrophil 
 <p>Chemokine domain</p> <p>Mucin-like domain</p> <p>Cytoplasmic domain</p> <p>MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1<math>\alpha</math>, MIP-1<math>\beta</math>, RANTES</p>	CCR2 CCR5	Natural killer cell 
Fractalkine	CX <sub>3</sub> CR1	
IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3	

**Figura 7- Famílias de quimiocinas, receptores e principais células secretoras.**  
 Na primeira coluna a representação das quatro famílias de quimiocinas, na segunda coluna representantes de seus receptores e na ultima coluna estão as células que secretam essas quimiocinas.  
 Fonte : (Luster, 1998)

As quimiocinas podem ser classificadas também quanto ao seu padrão de expressão e função em quimiocinas homeostáticas ou inflamatórias. As quimiocinas homeostáticas são constitutivamente expressas em determinados tipos de células e tecidos, e desencadeiam um papel de grande importância no desenvolvimento embrionário e para migração de células tronco através do corpo. Já as quimiocinas inflamatórias não são constitutivamente expressas, mas induzidas por estímulos inflamatórios (Zlotnik *et al.*, 2011).

A princípio, as quimiocinas eram descritas por sua capacidade de regular seletivamente o recrutamento e o tráfego de leucócitos no entanto, atualmente sabe-se que as quimiocinas participam de outros processos tais como nas respostas imunes, doenças infecciosas, no desenvolvimento de vários sistemas e órgãos, e sua ligação direta com o desenvolvimento do câncer e metástases (Zlotnik, 2004).

Um exemplo importante da atuação das quimiocinas é descrito na infecção pelo HIV. Para que o vírus da imunodeficiência humana possa infectar os linfócitos ou macrófagos é necessária a ligação do vírus à proteína de superfície CD4 e também de CXCR4, um receptor de quimiocina (Bleul *et al.*, 1996).

Um dos papéis mais importantes das quimiocinas está relacionado com o seu envolvimento com a regulação na formação de metástases. Receptores de quimiocinas podem potencialmente facilitar a disseminação de um tumor desde a adesão das células tumorais ao endotélio, o extravasamento pelos vasos sanguíneos, a colonização metastática, angiogênese, proliferação e proteção contra a resposta do hospedeiro (Allinen *et al.*, 2004; Hartmann *et al.*, 2004).

Também é cada vez mais reconhecido que as quimiocinas desempenham um papel importante no sentido de facilitar a comunicação entre as células cancerosas e células não-neoplásicas no microambiente tumoral, incluindo células endoteliais e fibroblastos, promovendo a entrada de neutrófilos e macrófagos associados ao tumor dentro do microambiente tumoral (Allinen *et al.*, 2004; Hartmann *et al.*, 2004).

### **1.3.1. A Quimiocina CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ )**

O gene da quimiocina *CXCL12* foi clonado a partir de linhagem de célula de estroma da medula óssea de camundongo em 1993, sendo que originalmente foram

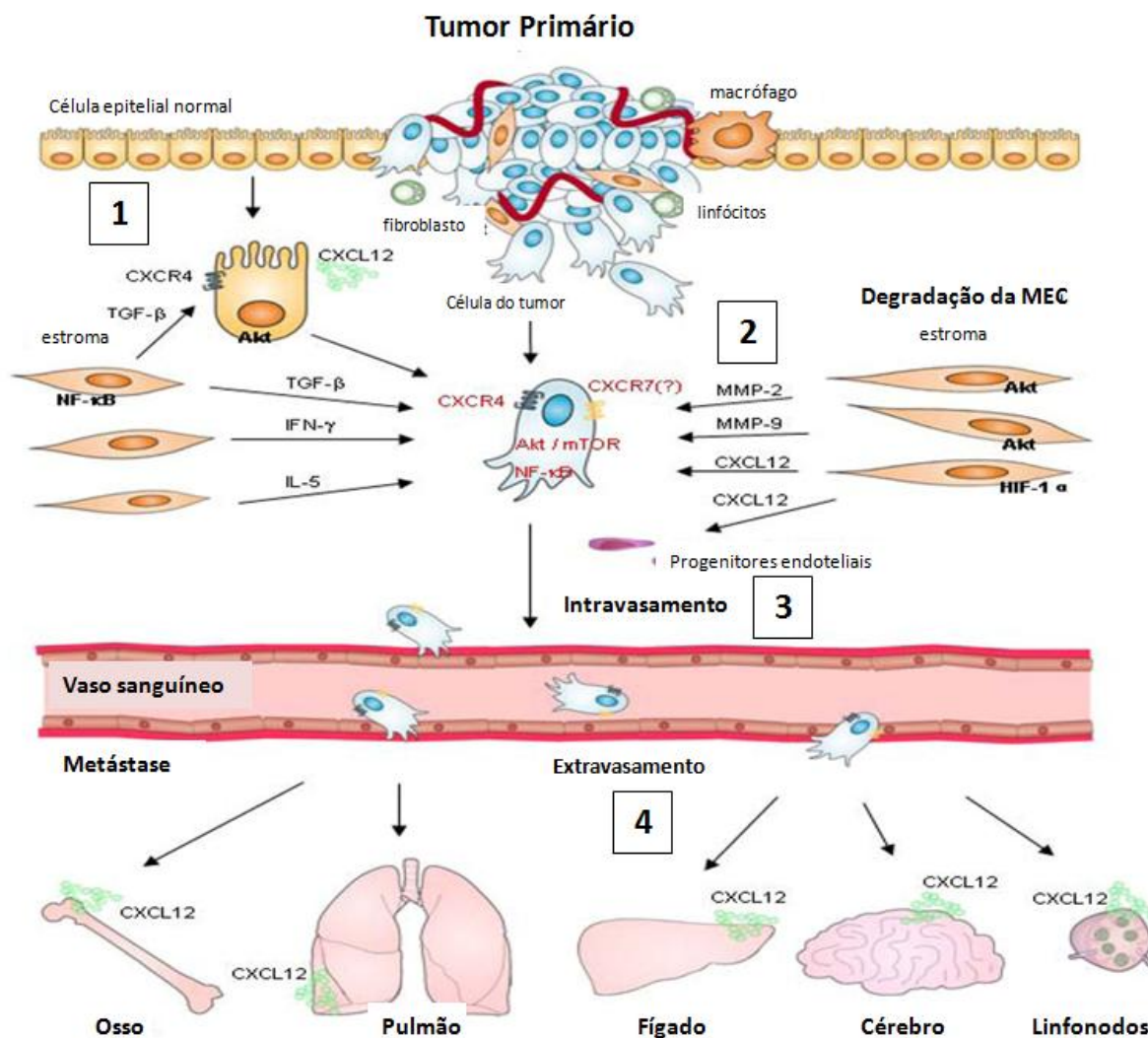
encontradas duas isoformas denominadas SDF-1 $\alpha$  e SDF-1 $\beta$  (*Stromal-derived factor-1*) (Tashiro *et al.*, 1993). CXCL12 $\alpha$  é a isoforma predominante secretada pelas células estromais da medula óssea podendo ser encontrada em quase todos os órgãos. CXCL12 $\beta$  difere por diferentes aminoácidos na porção C-terminal (Tashiro *et al.*, 1993). Existem ainda outras quatro isoformas de CXCL12, todas com atividades quimiotáticas (Yu *et al.*, 2006). Elas são derivadas de eventos de processamento alternativo sendo idênticas na região dos três primeiros exons, com tamanho variável da proteína final contendo no máximo 140 aminoácidos sendo que foram descritas como CXCL12 $\gamma$  (gama), CXCL12 $\delta$  (delta), CXCL12 $\epsilon$  (epsilon) e CXCL12 $\phi$  (phi) (Zhou *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2006).

A quimiocina CXCL12 possui diversas funções bem estudadas como a estimulação da migração celular durante o desenvolvimento embrionário, a quimiotaxia de leucócitos, além da migração de células tronco embrionárias circulantes para locais que necessitem de reparo ou regeneração tecidual, na sinalização do sistema imune, resposta inflamatória e também no desenvolvimento do câncer (Kucia *et al.*, 2006; Karin, 2010). Por exemplo, na fase embrionária, CXCL12 juntamente com fatores de crescimento, direciona a proliferação e diferenciação de células progenitoras imaturas, promovendo a ativação da maquinaria de adesão, rearranjo do citoesqueleto, controle do ciclo celular e secreção de enzimas proteolíticas (Dar *et al.*, 2006). CXCL12 está envolvida também em diversas doenças do sistema imune como artrite, lúpus eritematoso sistêmico, entre outras, destacando-se as múltiplas faces de CXCL12 na saúde e na doença (Karin, 2010; Sun *et al.*, 2010).

A quimiocina CXCL12 exerce suas funções de sinalização celular através de dois receptores, CXCR4 (Nagasawa *et al.*, 1998) e CXCR7 que parece atuar como um co-receptor (Miao *et al.*, 2007). Muller *et al.* (2001) foram os primeiros a demonstrar o envolvimento das quimiocinas com o processo de metástases no câncer de mama. Este trabalho foi determinante para mostrar que as metástases não ocorrem de maneira aleatória, mas sim, de forma direcionada por um gradiente de concentração de moléculas, entre elas CXCL12. Muller *et al.*, (2001) observaram que células mamárias normais não expressam ou expressam pouco CXCR4. Por outro lado às células tumorais mamárias que superexpressam CXCR4 são direcionadas para os locais que expressam CXCL12, sendo os mais comuns, ossos, pulmões, fígado, cérebro e linfonodos (Muller *et al.*, 2001). CXCR4 é amplamente

expresso em células hematopoiéticas, linfócito T e B, monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, cérebro, pulmões, cólon, fígado, endotélio, retina entre outros (Ratajczak *et al.*, 2006). Existe uma interação fisiológica normal entre CXCL12 e seu receptor CXCR4, e nas neoplasias malignas o mesmo tipo de interação funciona para direcionar a migração de células metastáticas. Nesse processo células tronco ou célula tumoral primária seguem várias etapas: a) saem do seu local e entram na circulação sanguínea, b) chegam ao seu local alvo via circulação sanguínea periférica ou via drenagem linfática, c) aderem ao endotélio, d) invadem o tecido, proliferam e se estabelecem no local novo (Furusato *et al.*, 2010).

Diversas moléculas tem seu papel comprovado no processo de migração e estabelecimento de células metastáticas no câncer de mama (Sun *et al.*, 2010). Resumidamente, as células do estroma do microambiente tumoral possuem a capacidade de modular a expressão de CXCR4 da célula epitelial normal através de TGF- $\beta$  e assim, pode proporcionar a interação entre CXCL12 e esta célula (ver número 1 na Figura 8). CXCL12 pode ativar nessa célula alvo a via de sinalização mediada pela Akt, e este seria um evento inicial muito importante para produzir a massa tumoral predisposta à progressão maligna. De modo similar as células do estroma produzem IFN $\gamma$  e IL5 que também atuam estimulando o crescimento da massa tumoral (ver número 1 Figura 8). Para que as células tumorais malignas possam migrar é necessária a produção de algumas moléculas que produzam a degradação da matriz extracelular, tais como, as metaloproteases MMP2 e MMP9. Além disso, o estroma produz continuamente CXCL12 que atrai células progenitoras endoteliais promovendo angiogênese (ver número 2 Figura 8). A partir de algum ponto nessa etapa as células tumorais malignas estão aptas para a etapa de intravasão vascular (ver número 3 Figura 8), seguida da extravasão para órgãos que expressam CXCL12 em quantidades significativas para promover um gradiente de concentração (ver número 4 Figura 8) (Sun *et al.*, 2010).



**Figura 8-** Representação esquemática mostrando o papel da ativação do receptor celular CXCR4 no microambiente tumoral em ambos no sítio primário e metastático.

A interação molecular entre o estroma e células tumorais no microambiente tumoral pode levar a superexpressão de CXCR4, a qual está envolvida na tumorigênese, e intravasão de células tumorais. CXCL12 produz um gradiente quimio-atrativo para células circulantes do tumor CXCR4-positivas podendo assim serem responsáveis pelo processo de extravasão e metástase a órgãos específicos. CXCL12 (SDF-1), fator 1 derivado de estroma; TGF- $\beta$ , fator de transformação do crescimento  $\beta$ ; MEC, matriz extracelular; IFN- $\gamma$ ; interferon- $\gamma$ ; NF- $\kappa$ B, fator nuclear  $\kappa$ B; MMP-2, MMP-9, metaloproteinase de matriz 2 e 9.

Fonte: Sun *et al.*, 2010.

Wendt *et al.*, em 2008, avaliaram o silenciamento do gene *CXCL12* estudando uma região do promotor contendo uma parte de uma ilha de CpG (-143 até +75) em linhagens tumorais de mama. Esta região foi sequenciada e ficou demonstrado que a linhagem MDA-MB-231 que não expressa o gene *CXCL12* possui essa região de DNA densamente metilada. Por outro lado, a linhagem MCF7 que expressa este gene, estava quase totalmente desmetilada, demonstrando que o silenciamento de *CXCL12* ocorre por hipermetilação da região promotora do gene. Em nosso laboratório estudamos mais detalhadamente a região a 5' do gene *CXCL12* que contém cinco ilhas de CpG e o seu envolvimento com o câncer de mama (Ramos, 2009). Foi utilizada neste estudo a técnica de PCR metilação específica (MSP) em tumores primários de mama, para a ilha de CpG 2 estudada por Wendt *et al.*, (2008) e não foram encontrados resultados com significado estatístico com os dados clínicos patológicos avaliados. Por outro lado, o silenciamento do gene *CXCL12* na região da ilha de CpG 4 possui significância estatística com dados clínicos patológicos das pacientes. Destacando-se a ocorrência de metástases ( $p = 0,0008$ ) e morte ( $p = 0,0019$ ) (Ramos *et al.*, 2010). Além disso foi encontrada também uma forte associação entre essa região do promotor do gene *CXCL12* com a hipermetilação do gene do receptor de estrógeno (*ESR1*), ambas relacionadas com a diminuição da sobrevida global das pacientes (Ramos *et al.*, 2010). Resumidamente nossos resultados nos permitiram concluir que quando o gene *CXCL12* é silenciado no câncer de mama ocorre a ativação do processo de metástases nas células tumorais e as metástases diminuem o tempo de vida das pacientes. Portanto, este trabalho demonstrou que a ilha de CpG 4 do gene *CXCL12* estava envolvida no silenciamento gênico em tumores primários de mama (Ramos *et al.*, 2010), o que não foi observado no trabalho descrito por Wendt *et al.*, (2008).

## 2. JUSTIFICATIVA

Apesar do avanço no diagnóstico e tratamento, o câncer de mama é o tipo mais comum e a principal causa de morte por câncer entre as mulheres no mundo (Jemal *et al.*, 2011). Entretanto, não é o tumor primário em si que causa a morte, mas sim a sua disseminação para outros locais secundários como ossos, pulmões, fígado, cérebro e linfonodos. Nesse momento estão sendo discutidos dois modelos de disseminação das metástases. O primeiro é denominado modelo linear no qual o tumor maligno tendo início em uma célula passa por múltiplas fases e após 12 anos, pode alcançar uma massa de aproximadamente um cm. Em seguida, após 31 meses pode ocorrer a disseminação da primeira colônia metastática e a partir dessa colônia, em apenas 30 dias podem se formar metástases das metástases, o que geralmente leva a paciente a óbito (Klein, 2009). O segundo modelo denominado paralelo, é mais agressivo e o mais provável biologicamente e envolve a formação das metástases em qualquer tempo dentro de 12 anos, com a formação de múltiplos clones metastáticos, que se desenvolvem da massa primária com tamanho inferior a um mm (Klein, 2009). Nesse sentido, todos os estudos relacionados com os genes envolvidos com o processo de metástase tem um imenso potencial para esclarecer como todas essas etapas ocorrem, e com isto, buscar o diagnóstico precoce e tratamento efetivo para essa doença.

No estudo do câncer de mama o par CXCR4/CXCL12 tem papel bem definido como proteínas que fazem parte do mecanismo de metástases. O receptor CXCR4 é fundamental para a migração de células tumorais metastáticas para órgãos onde a quimiocina CXCL12 está expressa, além disso, alguns trabalhos indicam seu envolvimento com a disseminação e progressão de diversos tumores (Burger e Kipps, 2006). O gene *CXCL12* possui uma região promotora rica em dinucleotídeos CpG distribuídos em cinco regiões como estudo por Ramos *et al.*, 2010.

Esse trabalho teve como objetivo a continuidade do estudo de toda a região promotora do gene *CXCL12* com intuito de se avaliar a dinâmica do silenciamento epigenético de um marcador metastático em câncer de mama, e com isso, determinar regiões que se sobrepõem a outras em termos de expressão gênica.

### **3. OBJETIVO GERAL:**

Correlacionar a expressão do gene *CXCL12* em linhagens tumorais de mama com o perfil de metilação das ilhas de CpG 1, 2, 3, 4 e 5 da região promotora.

#### **3.1. Objetivos Específicos:**

- Amplificação as regiões que contém as ilhas de CpG 1, 2, 3 e 5 da região promotora do gene *CXCL12* de linhagens tumorais de mama
- Clonagem das regiões amplificadas em vetor de sequenciamento.
- Sequenciamento dos clones de todas as linhagens tumorais.
- Estudo de correlação entre o perfil de metilação das ilhas de CpG com a expressão do gene *CXCL12* em linhagens tumorais de mama.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo Instituto Ludwig – SP e são provenientes de diferentes tipos anatomo-patológicos de tumores de mama. Estas linhagens foram coletadas de líquido pleural de pacientes que tiveram metástases pulmonares (MCF7, PMC42, MDA-MB-435, MDA-MB 436 e MDA-MB 231) descritas por (Lacroix e Leclercq, 2004). As linhagens HB4aC3.6 e HB4a (que são linhagens imortalizadas por SV40) (Stamps *et al.*, 1994).

O cultivo foi realizado em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com glutamina 0,2 mM e contendo gamicina 40 µg/ml em ambiente de CO<sub>2</sub> 5% à 37°C. O cultivo celular foi iniciado em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> e quando necessário transferido para garrafas de 75 cm<sup>2</sup>. Para mudança de garrafas ou estocagem das linhagens foi utilizada a mistura de proteases contidas no reagente TrypLE™ Express (Gibco) 1 mL/25 cm<sup>2</sup> seguida de incubação por 5 minutos a 37°C. O coquetel de proteases foi diluído com 2 mL de meio RPMI 1640 e as células foram então centrifugadas a 700 x g por 4 minutos. O concentrado celular foi ressuspensão em 1 mL de meio RPMI e transferido para nova garrafa ou tubo criogênico.

### 4.2. Extração de DNA

O DNA das linhagens tumorais foi extraído, através do método de fenol/clorofórmio (Sambrook e Russel, 2001).

Para extração de DNA foram utilizadas células crescidas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> contendo aproximadamente 4 x 10<sup>6</sup> células/ml. As células concentradas por centrifugação foram ressuspensas em 4 ml de tampão TES ( Tris/HCL 1M, EDTA 0,5M e SDS 10%) contendo 100 µg/ml de Proteinase K. O processo de lise celular e digestão protéica foi incubado a 37°C por um tempo aproximado de 15 a 18 horas. Após esse período foi realizada a extração do DNA com 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico, na proporção 24:24:1 seguida de centrifugação a

700 x g por 10 minutos. Esse processo foi repetido até a obtenção de uma fase aquosa transparente (no sobrenadante), livre de proteínas. Após recuperação da fase aquosa, o DNA foi precipitado com 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto seguido de incubação em -20°C por aproximadamente 18 horas. Após este período o DNA foi centrifugado a 8000 x g por 30 minutos, o DNA precipitado foi lavado com etanol 70%, e após centrifugação, o material foi seco em estufa a 37°C. O DNA seco foi ressuspensão em aproximadamente 500 µl de TE (10 mM de TrisHCl e 50 mM de EDTA pH 8,0) e armazenado a 8°C. A quantidade e qualidade do DNA obtido de cada linhagem tumoral foram avaliadas através de leitura em espectrofotômetro Nanodrop 2000 e gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

#### **4.3. Tratamento do DNA com Bissulfito de Sódio.**

O DNA das linhagens foi tratado com bissulfito de sódio utilizando o kit EpiTect segundo especificações do fabricante QIAGEN. O tratamento com bissulfito de sódio nas amostras gera a deaminação das citosinas gerando uracilas, que após a reação de PCR serão substituídas por timinas, ou seja, nas análises de sequenciamento do DNA, as citosinas que se mantiveram na sequência são consideradas metiladas por não terem sofrido a modificação com o bissulfito de sódio, e aquelas que não estavam metiladas foram visualizadas como timinas. A utilização do tratamento com o bissulfito de sódio nas análises de metilação foi descrito por (Clark *et al.*, 1994), e atualmente é a metodologia mais utilizada nessas análises. A etapa mais crítica para determinar o padrão de metilação é a completa conversão da citosinas não metiladas. Este objetivo pode ser alcançado incubando o DNA em altas concentrações do sal bissulfito de sódio, altas temperaturas e baixo pH. Estas condições extremas geralmente levam a um alto grau de fragmentação do DNA e perda durante a purificação. A purificação é necessária para remover os bissulfito e outros componentes que poderão prejudicar a reação de sequenciamento posteriormente.

Resumidamente segundo o protocolo, utilizamos o DNA em uma concentração de até 2 µg em um volume de 20 µl, foram acrescentado 85 µl da mistura do kit contendo bissulfito de sódio (preparado conforme protocolo do kit

Epithec), foi acrescentado 35 µl de DNA *protect buffer*, (contém tetrahydrofurfuril álcool) que evita fragmentação do DNA, promove uma efetiva desnaturação e além de conter um indicador de pH 7,0 (azul a verde). O volume final foi de 140 µl que foi dividido em dois tubos, e incubado em termociclador por 5 horas a 99°C por 5 min, 60°C 25 min, 99°C 5 min, 60°C 85 min, 99°C 5 min e por fim 70°C 175 min, para que ocorresse a reação de deaminação do DNA. Após o término da reação, foi acrescentado ao DNA 560 µl do buffer BL (tiocianato de guanidina), e a mistura foi transferida para uma coluna. A coluna foi centrifugada a 8000 x g por 1 minuto, lavada duas vezes com o buffer BW (500µl), (contém etanol 96%) centrifugada por 1 minuto, três vezes para secar completamente a coluna. Em seguida foi adicionado a coluna 500 µl do buffer BD (que contém hidróxido de sódio) por 15 min em temperatura para que ocorresse a dessulfonação da amostra (neutralização do bissulfito de sódio). O buffer BD foi descartado por centrifugação da coluna, que em seguida foi seca para posterior eluição do DNA tratado com buffer EB (aproximadamente 30µl).

Para o controle de eficiência do tratamento de DNA com o bissulfito de sódio foi feita uma reação *nested PCR* utilizando os iniciadores para a região SATR1 como descrito (Costa *et al.*, 2006). Essa reação utiliza iniciadores que flanqueiam uma região de DNA hipometilada ou seja, rica em timinas após o tratamento com bissulfito de sódio.

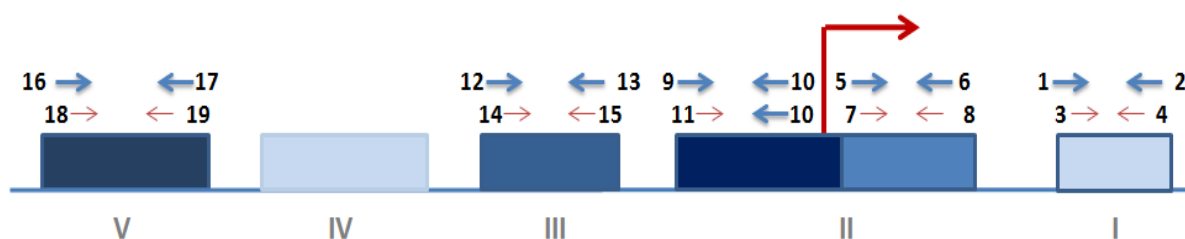
#### **4.4. Planejamento dos Iniciadores para clonagem das ilhas de CpG.**

Os iniciadores planejados para este estudo foram aqueles que amplificaram as ilhas de CpGs do gene *CXCL12*, que estão representados na figura 9 como I, II, III, e V.

Para cada ilha de interesse foram planejados dois pares de iniciadores, uma vez que utilizamos a técnica de *nested PCR*, onde utilizamos o primeiro par de iniciadores para uma reação de PCR de menor estringência e o segundo par para outra reação de PCR com maior estringência, utilizamos como molde o produto de reação da primeira PCR. Para tanto levamos em consideração que o estudo era de metilação, então, o DNA deveria obrigatoriamente estar tratado com bissulfito de

sódio, sendo assim, a etapa de planejamento dos iniciadores foi de fundamental importância. Toda a sequência de DNA não metilada foi modificada após o tratamento com bissulfato de sódio, portanto os iniciadores foram planejados fora da região rica em CG, sendo que esses não poderiam anelar em nenhum dinucleotídeo CpG, garantindo assim que a ilha de CpG de interesse fosse clonada de todas as linhagens desse estudo. Consideramos então para o desenho dos iniciadores, que na sequência universal todas as citosinas são convertidas em timinas e na sequência dos iniciadores reversos todas as guaninas se convertem em adeninas. Para conseguirmos iniciadores em regiões adequadas, utilizamos o programa Methprimer (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) que mostra a conversão do DNA após o tratamento com bissulfato.

A Figura 9 mostra esquematicamente a região promotora do gene *CXCL12* com as ilhas de CpG e os iniciadores com os números correspondente a Tabela 2.



**Figura 9- Representação esquemática da região promotora do gene *CXCL12*, localização e numeração dos iniciadores utilizados nesse trabalho.**

As ilhas de CpG do gene *CXCL12* estão mostradas nos retângulos azuis e numeradas em I-(ilha 1), II-(ilha 2), III-(ilha 3), IV-(ilha 4) e V-(ilha 5). As setas em azul acima das ilhas estão representando os iniciadores da primeira reação de PCR e as setas em vermelho os iniciados da reação *nested*, os números ao lado de cada seta representam os iniciadores, e a sequência dos mesmos estão mostrados na Tabela 2.

Fonte: O autor (2012)

**Tabela 2 - Iniciadores de ilhas CpGs do gene *CXCL12***

Iniciadores	Temperatura de anelamento para <i>Nested PCR</i> (°C)	Tamanho do Fragmento
1-F1I1 TTGATTTTAAGTTGGTTGTA	43, 45, 47	684
2-R1I1 CTTTACTACAACCTCTCATTCTA		
3-FNI1 TTTGTTTGTATTATTTTATTATTGTT	47, 49, 51	454
4-RNI1 ATCCCTAAACCTCTCTCAAATAAAC		
5-FFI2 GGAAGAGTTTTTTGGATTAGAAG	41, 43, 45	696
6-RFI2 TTATTATCCCTATAACAAAACC		
7-FNI2 FNGAGTTTTAGTTTTTTGGGT	44, 46, 48,5	511
8-RNI2 CAATAAAAACAAACAAATTAATC		
9-FII2 GGATTAATTGTTTGTTTTATTG	52, 54, 56	711
10-RII2 AACTACCTCCACCCCACTATAT		
11-FNI2 GGGGTTTTGTTATAGGATAATAA	54, 56, 58	595
12-FI3 GGATTTTTAGGGATAGGGA		
13-RI3 TCTAACAAACAAACAATACTCA	44, 46, 48	453
14-FNI3 GTTGGGAAGGATATAGAGAGGTGGTT		
15-RNI3 AAATAAAAACCTCCCCACCCC	46, 48, 50	271
16-FI5 AATGGTTTGGTTTGATGGT		
17-RI5 ACACCCACTATATACTAAACCT	46, 48, 50	668
18-FNI5 ATTTAGGTTGGAGTGTAG		
19-RNI5 ACAAACCTCACAAATTTTA	46, 48, 50	306

O autor (2012)

A primeira ilha a ser estudada foi a ilha CpG 1 do gene *CXCL12*, que possui 454 pares de bases e está localizada entre os nucleotídeos +512 e +853.

A Figura 10 a seguir mostra os nucleotídeos na forma que o programa Methprimer representa, o DNA tratado com bissulfito esta na fita alinhada abaixo. Os dois pares de iniciadores planejados para as reações de PCR estão em destaque.

```

1  GAGGGTTTGTGACCTGCAGAGAGCGACCGCTGACC TCAAGCTGGCTGCAGAGCGAGGTC
   ||||| ||||| ::||: |||||++| :++: |||: |||: |||: |||: |||++||| :
1  GAGGGTTTGTGATTGTAGAGAGCGATCGT TTGATTTTAAGTTGTTGTA GAGCGAGGTT
                                     (1) FI1

61  AGCCGGGACAAC TGGGCAGGAACGCCCAAGAGAGCGTT CGGACTGGCGCGGAAGGCG
   ||:++|||: |||: ||||: |||||++: ::||| |||++|||++|||: |||++|||++|||++
61  AGTCGGGATAAT TGGGTAGGAACGTTTAAGAGAGCGTT CGGGATTGGCGCGGAAGGCG

```











#### 4.5. Reação de PCR para clonagem das ilhas de CpG

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo tampão de PCR 1x, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, 1 U de *Taq* Platinum (Invitrogen), 8 pmoles de iniciadores e 1 µL de DNA previamente tratado com bissulfito de sódio. As reações *nested* foram realizadas nas mesmas condições utilizando de 1 µL do produto da primeira reação como molde. As reações foram realizadas em condições *Touch Up* com incremento de 2°C na temperatura de anelamento após o primeiro ciclo e com aumento de mais 2°C após o sexto ciclo e seguindo com esta temperatura de anelamento até o final da reação em 35 ciclos. Os iniciadores empregados, temperaturas e fragmentos amplificados para todas as ilhas de CpG deste estudo estão relacionadas na Tabela 2.

As condições de amplificação dos fragmentos na primeira reação, para todas as ilhas foram: desnaturação inicial do DNA por 5 minutos a 94°C, seguida por 1 ciclo de desnaturação a 94°C por 40 segundos, temperatura inicial de anelamento por 2 minutos, essas temperaturas variaram de ilha para ilha e estão relacionadas na (Tabela 2), seguido de extensão a 72°C por 2 minutos. Cinco ciclos de desnaturação a 94°C durante 40 segundos, segunda temperatura de anelamento por 2 minutos, que também é variável conforme a ilha e extensão a 72°C por 2 minutos. Por fim, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, temperatura final de anelamento por 2 minutos, (variável para cada região) e extensão a 72°C por 2 minutos. Ao final da ciclagem, as moléculas foram estendidas por 5 minutos a 72°C.

As condições de amplificação dos fragmentos, nas reações *nested*, para todas as ilhas foram similares as descritas acima alterando tempo e temperatura de anelamento conforme visto na Tabela 2.

Os produtos amplificados, para cada ilha de CpG de ambas as reações foram visualizados em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata e também em agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,2 µg/mL.

#### 4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos das reações de PCR foram analisados em gel de poliacrilamida. Os géis de poliacrilamida 8% foram preparados a partir de uma solução de poliacrilamida e bisacrilamida na proporção 29:1, TEMED (*Life Technologies*) como doador de elétrons da reação e persulfato de amônio (APS) 10% como catalisador da reação. A eletroforese foi conduzida em aparato de gel médio a 80-100 V por aproximadamente uma hora em tampão TBE 1 X (ácido bórico 100 mM e EDTA 10 mM). O gel foi incubado por três minutos em solução fixadora (0,5% de ácido acético glacial, 10% de etanol absoluto), sob agitação suave. A esta solução adicionou-se nitrato de prata 10% (o gel permanece sob agitação por mais dez minutos). Após impregnação do DNA com prata, o gel foi lavado com água ultrapura e a este foi adicionado o revelador (hidróxido de sódio 3% e formaldeído 0,5%) por mais cinco minutos, sob agitação. Após a revelação, o gel foi lavado com água ultrapura, e deixado por mais três minutos em solução fixadora, após o gel foi seco em papel celofane e sua imagem foi digitalizada.

#### 4.7. Clonagem das ilhas de CpG do gene *CXCL12*

A clonagem dos fragmentos de DNA contendo ilhas de CpG do gene de estudo foi realizada utilizando DNA das linhagens tumorais tratadas com reagente bissulfito de sódio, sendo essas amplificadas por reações de PCR como descrito anteriormente.

Após as reações de amplificação de cada região das ilhas de CpG de todas as linhagens, os produtos amplificados foram purificados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A purificação do gel de agarose foi feita utilizando o kit QIAEX II gel de extration (Qiagen) conforme protocolo do fabricante. Após cada etapa de purificação o fragmento foi quantificado em Nanodrop 2000 e também em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo usando o vetor pGEM 100 ng/μl como padrão de massa molecular.

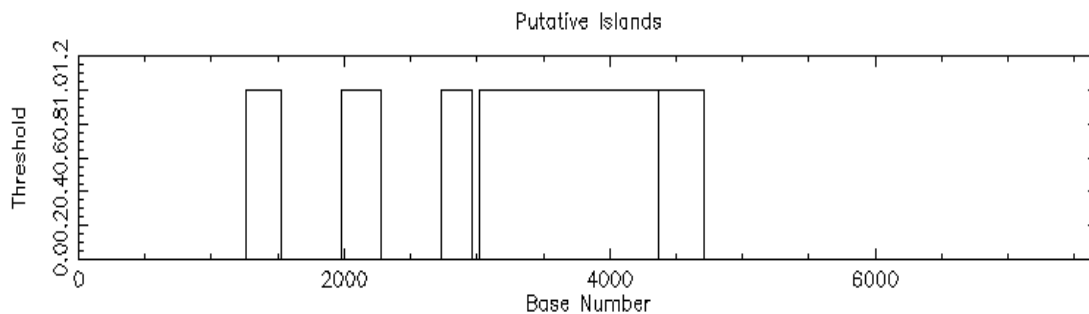
As reações de ligação foram feitas utilizando aproximadamente 200 ng de fragmento e 50 ng de vetor pGEMTeasy (Promega) conforme especificações do fabricante. As ligações foram então eletroporadas em estirpe de *Escherichia coli* DH10B. Os clones foram selecionados por alfa-complementação em meio seletivo

contendo Xgal (50 µg/ml) e IPTG (45 µg/ml) e ampicilina 250 µg/mL (marca de resistência do vetor) e estreptomicina 40 mg/mL (marca de resistência da estirpe DH10B). Para cada ilha de CpG foram selecionados pelo menos oito colônias brancas de cada linhagem (para permitir uma abordagem suficiente de alelos). Cada clone foi selecionado a partir de uma reação de PCR de colônia para confirmar a clonagem. A seguir foi obtido DNA plasmidial de cada clone que foi purificado utilizando o protocolo do *kit QiaPrep spin miniprep* (Qiagen). O DNA plasmidial de cada clone foi submetido a reação de sequenciamento utilizando o *kit BigDye terminator* (Applied Biosystems) segundo protocolo do fornecedor. Resumidamente foi utilizado um sistema de 10 µL contendo: 3 µL de Big Dye Terminator v3.0, 1 µL de Tampão Save Money 2,5X (200 mM TrisHCl e 5 mM MgCl<sub>2</sub>), 10 pmoles de um dos iniciadores universal ou reverso (Invitrogen) e aproximadamente 200 ng de DNA plasmidial. As condições das reações foram: desnaturação por 1 minuto a 95°C, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos e 60°C por 2 minutos e 30 segundos para anelamento e extensão. O produto amplificado foi purificado utilizando 60 µl de isopropanol 75% seguido de incubação a -20 °C por 15 minutos. O material foi centrifugado a 10.000 x g por 20 min e lavado com etanol 60%, centrifugado novamente, retirado o etanol e seco a 37°C. Ao material seco foi acrescentado 10 µl de formamida e a seguir submetido a desnaturação 95 °C por 5 min. O sequenciamento de cada clone foi realizado no seqüenciador capilar ABI Prism3100.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Clonagem de ilhas de CpG do gene *CXCL12*

Este estudo analisou o perfil de metilação da região 5' do gene *CXCL12* em linhagens tumorais de mama. A seleção das regiões a serem clonadas teve como base resultados descritos por (Ramos *et al.*, 2010). A região promotora do gene em estudo que englobava 2000 pb à jusante e 1000 pb a montante do TSS (transcription start site) foi selecionada com auxílio do programa BLAT (<http://genome.ucsc.edu>). A região contendo 5677 pb foi submetida então ao programa CpGPlot disponível na página do grupo *European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot>). Este programa forneceu distribuição das ilhas de CpG seguindo os parâmetros estipulados por (Gardiner-Garden and Frommer, 1987) que define uma ilha de CpG do gene *CXCL12* como uma sequência maior ou igual a 200 pb com >50% de C+G e > do que 0,6 de CpG observados/CpG esperados. A Figura 14 mostra as cinco ilhas de CpG do gene *CXCL12*.

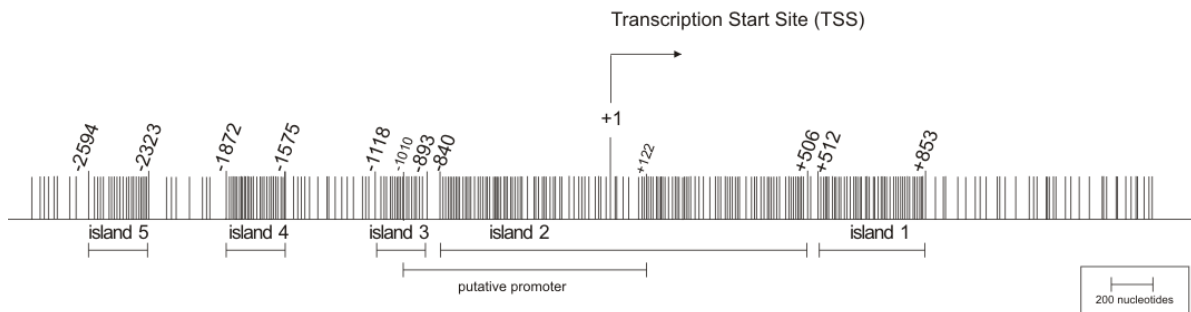


**Figura 14- Localização das 5 Ilhas de CpG do Gene *CXCL12*.**

Uma região de DNA de 5677 pb contendo a região promotora do gene *CXCL12* foi submetida ao programa CpG Plot que retornou o gráfico mostrando cinco ilhas de CpG. O eixo Y representa a razão entre CpG observado/esperado conforme critérios criados por Gardiner and Fromer 1987. O eixo X representa a posição das ilhas de CpG em pares de base.

Fonte: (Ramos, 2009).

A seguir na Figura 15 está mostrando a região com a localização detalhada das ilhas de CpG do gene *CXCL12* (Ramos et al., 2010).



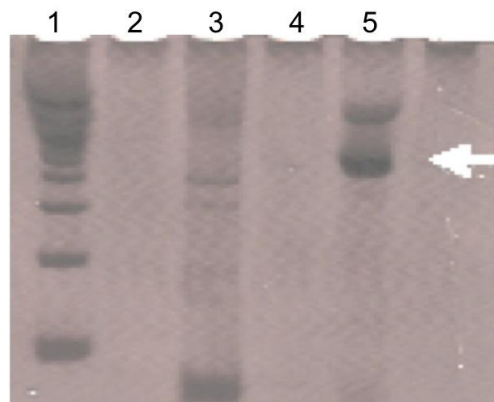
**Figura 15-** Região 5' do gene *CXCL12* contendo as ilhas de CpG.

Região de DNA contendo as 5 ilhas de CpG (*island 1, 2, 3, 4, 5*) com sua exata localização com relação ao TSS (*transcription start site*).

Fonte: (Ramos et al., 2010).

Para o estudo das ilhas de CpG foram planejados 2 pares de iniciadores para cada ilha de CpG (exceto ilha de CpG 2I). O primeiro par foi sempre usado em uma reação de PCR de baixa estringência com objetivo de amplificar a região alvo porém outras regiões menos específicas são amplificadas também, e o segundo par mais interno foi utilizado em condições de maior estringência com o objetivo de amplificar somente a região alvo de clonagem. Essa estratégia de clonagem é denominada *nested* e é amplamente utilizada quando a região a ser amplificada na amostra possui pouco número de cópias. Isso acontece nesse trabalho em especial devido ao tratamento prévio do DNA com bissulfito de sódio, que causa uma drástica diminuição da concentração de DNA na amostra.

A primeira região de estudo foi a ilha CpG 1 do gene *CXCL12* que está compreendida entre os nucleotídeos +512 a +853 (Figura 15). A padronização das reações de PCR de cada uma das ilhas de CpG deste estudo está mostrada na Tabela 1 (Anexo). Foram clonados 5 fragmentos contendo as ilhas de CpG 1, 2 (2I e 2F), 3 e 5. A Figura 16 a seguir mostra a padronização da amplificação da ilha de CpG 1 como um exemplo do aspecto final da reação de PCR 1 e da reação *nested* contendo o fragmento de interesse.

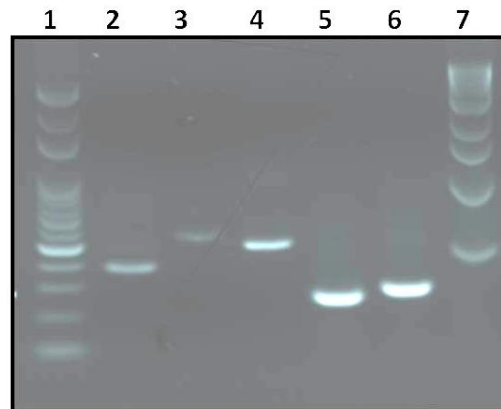


**Figura 16-** Padronização da reação de PCR para amplificação da Ilha de CpG 1 do gene **CXCL 12**.

Gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. *Lanes*: 1- marcador 100 bp; 2- controle negativo da PCR1; 3- PCR 1; 4- Controle negativo da reação *Nested*; 5- PCR *nested*. A seta indica o produto de PCR desejado com 454 pb.

Fonte: O Autor (2012).

Neste resultado pode ser observado que a primeira reação de PCR por possuir baixas temperaturas de anelamento dos iniciadores, pode possuir várias bandas de DNA, de diferentes tamanhos (Figura 16 *Lane* 3). Com esta amplificação de baixa estringência, espera-se que nesse processo seja também amplificado o produto desejado, porém nem sempre ele aparece nesta etapa do resultado. A seguir na próxima reação por apresentar um par de iniciadores mais interno e também temperaturas de anelamento mais altas, ocorreu a amplificação do fragmento de DNA do tamanho desejado, nesse caso 454 pb (Figura 16 *lane* 5). Apesar da reação ser mais específica, apareceram bandas de tamanho diferente do desejado (principalmente uma banda destacada de aproximadamente 800 pb). Entretanto o aparecimento dessa banda não significou um problema para a próxima etapa, que foi a separação do produto desejado em gel de agarose. Na Figura 17 foi mostrado um exemplo de padronização das reações de PCR dos fragmentos de todas as ilhas de CpG estudadas da linhagem PMC42.

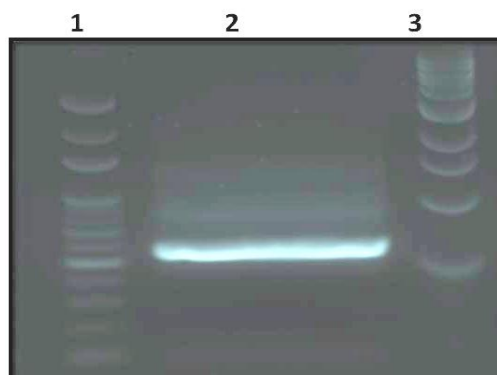


**Figura 17- Padronização das reações de PCR para amplificação das Ilhas de CpG do gene *CXCL12*, linhagem PMC-42.**

Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. *Lanes*: 1- marcador 100 bp; 2- ilha 1 (454pb); 3- Início da ilha 2 (595pb); 4- fim da ilha 2 (511 pb); 5- Ilha 3 ( 271 pb); 6- Ilha 5 (306 pb); 7- marcador 1 Kb.

Fonte: O Autor (2012).

Uma vez obtida a padronização foi realizada a reação de amplificação dos fragmentos das linhagens do estudo. A partir desse resultado foi repetida a reação de PCR em um volume de 50  $\mu$ l, o produto foi aplicado em um gel de agarose, e a banda de DNA desejada foi purificada. A Figura 18 está mostrando um exemplo de gel de agarose antes da purificação de DNA.

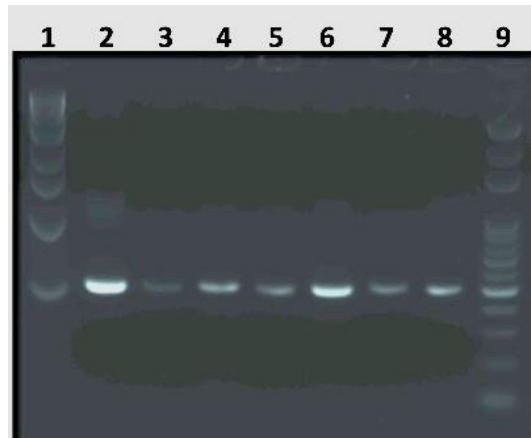


**Figura 18- Produto de PCR para clonagem do fim da Ilha de CpG 2 do gene *CXCL12*.**

Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. *Lanes*: 1- Marcador 100 bp 2- DNA amplificado contendo 511 pb (fim da ilha 2) a partir da linhagem MCF7; 3- marcador 1 kb.

Fonte: O Autor (2012).

A Figura 19 mostra os produtos amplificados, obtidos após etapa de purificação em gel de todas as linhagens deste estudo (como exemplo esta apresentado o produto do fim da ilha de CpG 2F com 511 pb).

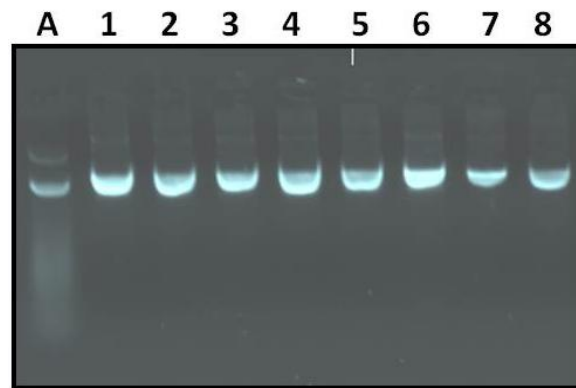


**Figura 19-** Produtos da Ilha CpG 2F de todas as linhagens tumorais de mama após a purificação.

Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Lanes: 1- Marcador 1 kb; 2- HB4a; 3- HB4aC3.6; 4- MCF7; 5- PMC-42; 6- MDAMB436; 7- MDAMB435; 8- MDAMB231; 9- marcador 100 bp. O fragmento tem 511 pb.

Fonte: O Autor (2012).

Após a purificação foi feita a clonagem de cada um dos fragmentos de cada linhagem e de cada ilha de CpG em vetor de sequenciamento pGEMT easy. As reações de ligação foram eletroporadas em estirpe de *Escherichia coli* e foram selecionados pelo menos oito colônias de cada linhagem, sendo que a clonagem foi confirmada através de PCR de colônia. Foi isolado DNA plasmidial de cada clone e na Figura 20 estão representados DNA de 8 clones da ilha de CpG 1 do gene *CXCL12* a partir da linhagem HB4a.



**Figura 20-** DNA plasmidial purificado.

Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. *Lanes*: A- representa o plasmídeo íntegro pGEM 100 ng; em seguida os oitos clones da ilha de CpG 1 do gene *CXCL12* a partir da linhagem HB4a.  
Fonte: O Autor (2012).

Resumidamente, neste estudo foram clonados 5 fragmentos contendo as ilhas de CpG 1, 2 (2I e 2F), 3 e 5, sendo que destes fragmentos foram isolados 8 clones de cada linhagem relacionadas na Tabela 3. Dos fragmentos clonados, foram então obtidos 280 clones e realizadas pelo menos 560 reações de sequenciamento.

Os plasmídeos recombinantes obtidos das clonagens foram purificados, submetidos a reação de sequenciamento e a seguir serão mostrados os resultados obtidos em forma de gráficos.

## 5.2. Perfil de metilação das ilhas de CpGs do gene *CXCL12* e correlação com a expressão gênica

Para análise de correlação entre a metilação do DNA com a expressão do gene *CXCL12* foram utilizados os dados de RT-PCR de Ramos *et al.*, (2010) que estão mostrados na Tabela 3.

Em nosso trabalho estudamos as ilhas de CpG 1, 2, 3 e 5 que se encontram na região de DNA entre -2594 e +853 pb (Figura 15). Esta região contém ao todo 225 CpGs (os 9 primeiros CpG do início ilha de CpG 2 não foram clonados), destes,

27 CpGs que correspondem a ilha de CpG 4 foram analisados por Ramos *et al.*, (2010). Neste trabalho analisamos os remanescentes 189 CpGs.

**Tabela 3- Expressão do gene *CXCL12* em linhagens tumorais de mama**

<b>Linhagem</b>	<b>Expressão de <i>CXCL12</i></b>
HB4a	+
HB4aC3.6	+
MCF7	+
PMC-42	+
MDAMB-435	–
MDAMB-436	–
MDAMB-231	–

Fonte : (Ramos *et al.*, 2010)

### 5.2.1. Perfil de metilação da ilha de CpG 1 do gene *CXCL12* .

Os resultados de metilação de DNA das ilhas de CpG do gene *CXCL12* estão mostrados em percentagem de metilação de cada dinucleotideo (representado por uma barra em percentagem com relação a 8 clones) e de cada linhagem tumoral estão mostrados na Figura 21. Os resultados avaliando o perfil de metilação de cada linhagem como um todo, foram convertidos em perfil de metilação global e estão mostrados na Figura 22.

Para o estudo da ilha de CpG 1 foram clonados fragmentos de 454 pb que contém a região +512 a +853 e 41 dinucleotideos CpG. A ilha de CpG 1 nas linhagens que não expressam o gene *CXCL12*, MDA-MB-435, 436 e 231, apresentou-se altamente metilada com percentagens de 97,5%, 94,2% e 90,8% respectivamente (Figura 21 em azul e Figura 22 A). Este resultado portanto

apresentou correlação entre a alta densidade de metilação e ausência de expressão do gene *CXCL12*.

As duas linhagens imortalizadas (HB4a e HB4aC3.6) que expressam o gene *CXCL12* apresentaram baixos níveis de metilação, 38,7% e 6,7% respectivamente (ver Figura 21 em azul e Figura 22 A). Esses dados de metilação são compatíveis com a expressão do gene. Porém as outras duas linhagens, (MCF7 e PMC42) que também expressam o gene apresentaram altos níveis de metilação ao longo de toda a ilha de CpG 1, 95,4% e 86% respectivamente (Figura 21 em azul e Figura 22 A). Este resultado a princípio não era esperado e ficou evidenciado que diferenças no padrão de metilação ao longo da região promotora, podem indicar as regiões envolvidas na regulação epigenética da expressão de *CXCL12*.

### 5.2.2. Perfil de metilação da ilha de CpG 2I do gene *CXCL12*.

A ilha de CpG 2 é a maior de todas e contém 1346 pb (Figura 15) compreendendo a região -840 a +506, esta região contém o início de transcrição do gene e a maior parte do provável promotor entre as posições +122 a +1010 (Figura 15) (Garcia-Moruja *et al.*, 2005). Para facilitar a etapa de clonagem esta região foi dividida em 2 partes, início da ilha que contém 595 pb e 77 CpG (ilha de CpG 2I) a qual contém a região analisada por (Wendt *et al.*, 2008) e o fim da ilha 2 que contém 511 pb e 36 CpGs (ilha de CpG 2F).

Os dados de sequenciamento mostraram que as linhagens HB4a.C3.6, MCF7 e PMC42 apresentaram percentagem de metilação baixos próximo ao início de transcrição (ilha de CpG 2I) (Figura 21 em verde escuro) e metilação global de 2,6%, 14,7% e 16,6% respectivamente (Figura 22 B). Embora estes resultados tenham correlação positiva com o perfil de expressão do gene *CXCL12* nessas linhagens destaca-se a hipermetilação dos CpGs 79 e 80 em 40% e 20% respectivamente na linhagem PMC42. Estes dois dinucleotídeos metilados próximos a região +1 podem influenciar o planejamento de iniciadores para MSP feito por Wendt *et al.*, (2008) como discutido mais tarde. As demais linhagens que não expressam o gene MDA-MB-436, 435 e 231 apresentaram altos níveis de metilação 97,2%, 94,5% e 82% respectivamente (Figura 22 B).

Estes resultados estão de acordo a ausência de expressão desse gene nessas linhagens. Porém a linhagem normal HB4a que também expressa o gene apresentou uma alta densidade de metilação de com 53,75% ao longo de toda a ilha (Figura 21 em verde escuro e Figura 22 B).

### **5.2.3. Perfil de metilação da ilha de CpG 2F do gene *CXCL12*.**

Para o estudo da ilha de CpG 2F, foram clonados fragmentos de 511 pb que contém a região -1118 a -893 e contendo 36 dinucleotídeos CpG. Os resultados de percentagem de metilação de cada dinucleotídeo e de cada linhagem tumoral estão mostrados na Figura 21 em verde claro.

Essa região da ilha 2 apresentou significativa discrepância entre o perfil de expressão do gene e a metilação. Somente a linhagem HB4aC3.6 que expressa o gene, apresentou baixos níveis de metilação (4,6%) (Figura 22 C). As outras linhagens, HB4a, MCF7 e PMC42 que também expressam o gene tiveram alta percentagem de metilação, 63%, 98,6 e 98,2% respectivamente (Figura 22 C). As linhagens que não expressam o gene, MDAMB436, 435 e 231 tiveram percentagem de metilação de 96 %, 92% e 92,5% respectivamente.

### **5.2.4. Perfil de metilação da ilha de CpG 3 do gene *CXCL12*.**

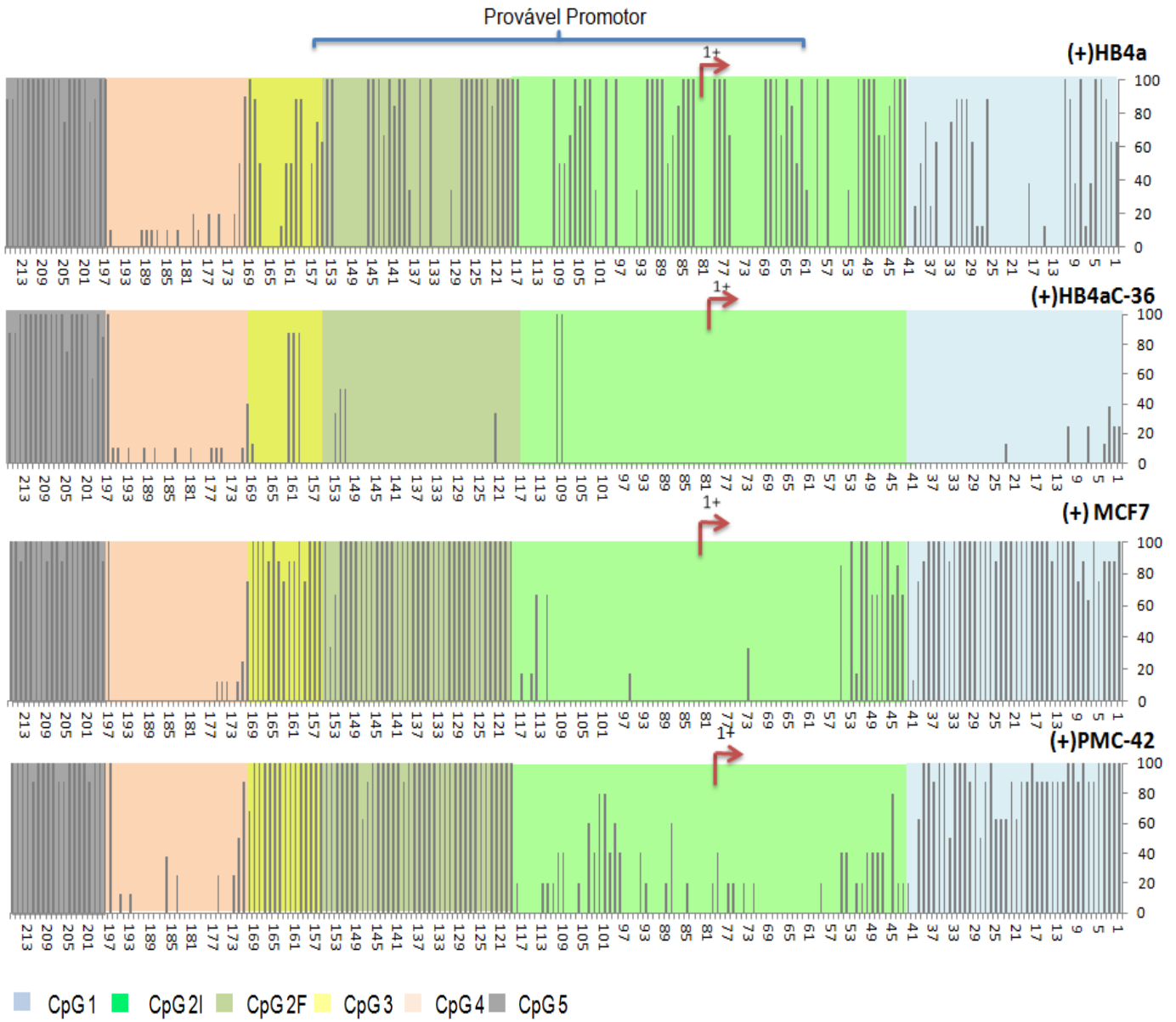
Para análise da ilha de CpG 3 foram clonados fragmentos de 271 pb compreendendo a região -1118 a -893 e 15 dinucleotídeos CpGs. Esta região apresentou-se densamente metilada em seis das sete linhagens deste estudo (Figura 21 em amarelo) sendo observada correlação positiva com a expressão do gene *CXCL12* somente para a HB4aC3.6 com 18,3 % de metilação global (Figura 22 D).

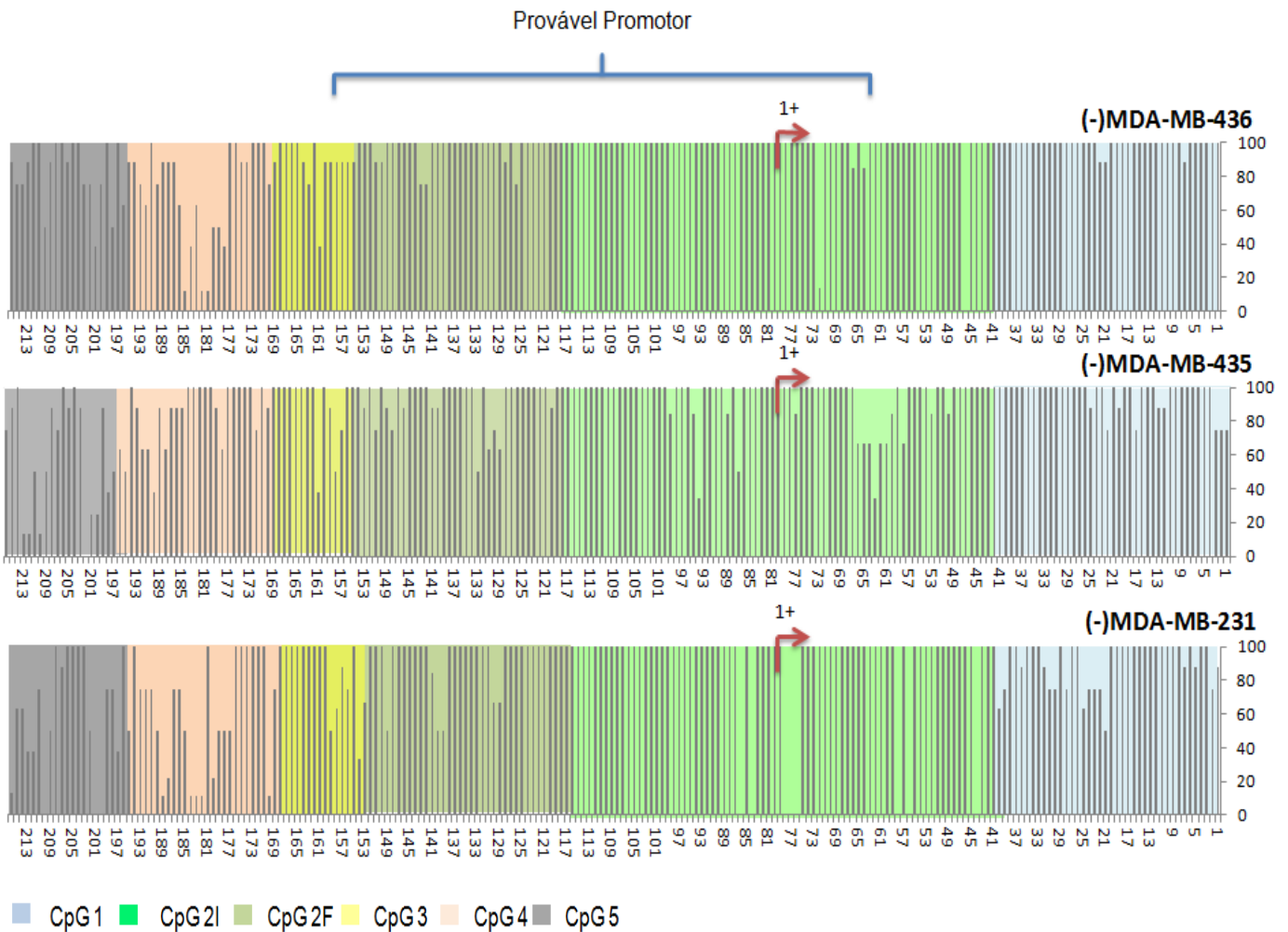
### **5.2.5. Perfil de metilação da ilha de CpG 4 do gene *CXCL12*.**

Esta região de DNA foi clonada e sequenciada por Ramos *et al.*, (20010) e utilizada aqui para comparação com os resultados desse trabalho. Esta região do DNA foi a única que apresentou correlação da diminuição de metilação e expressão positiva do gene *CXCL12* (Figura 21 em rosa) com 11%, 4%, 5% e 12% respectivamente para as linhagens HB4a, HB4aC3.6, MCF7 e PMC42, respectivamente, que expressam o gene (Figura 22 E). Além disso o oposto também é verdadeiro, hipermetilação nas linhagens, MDAMB436, 435 e 231 que não tem expressão de *CXCL12* (Figura 21 em rosa) com 71%, 84% e 78% respectivamente (Figura 22 E).

### **5.2.6. Perfil de metilação da ilha de CpG 5 do gene *CXCL12*.**

Para análise da ilha de CpG 5 foram clonados fragmentos de 306 pb compreendendo a região -2594 a -2323 e 20 dinucleotídeos CpGs. Esta região de DNA apresentou-se densamente metilada em todas as linhagens estudadas (Figura 21 em cinza). Foi observada metilação global de 95%, 76,9%, 96,3%, 96,3%, 82,5%, 58,75% e 58,13% respectivo a cada linhagem estudada (Figura 22 F).

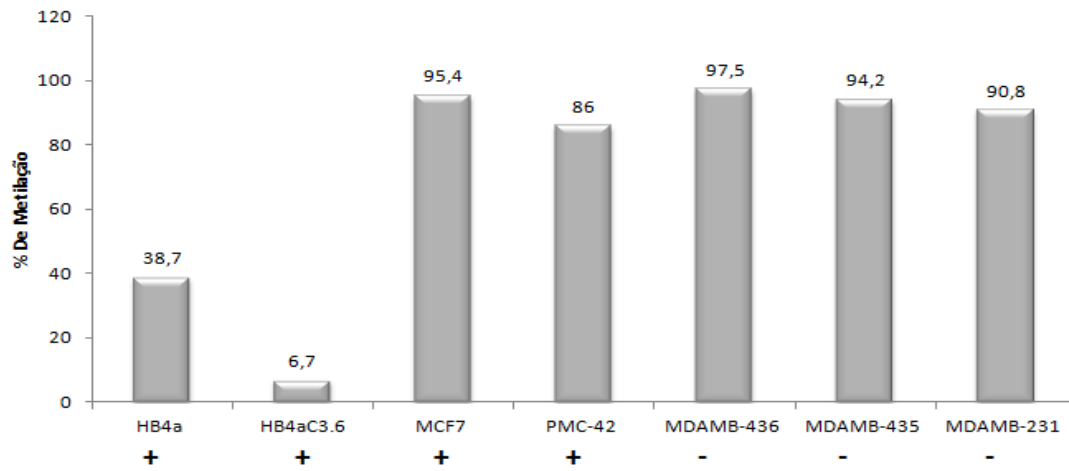
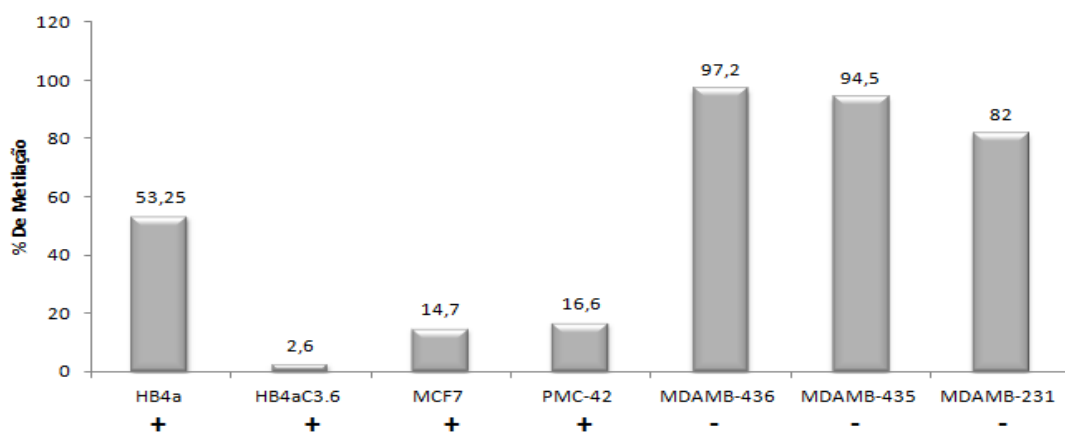




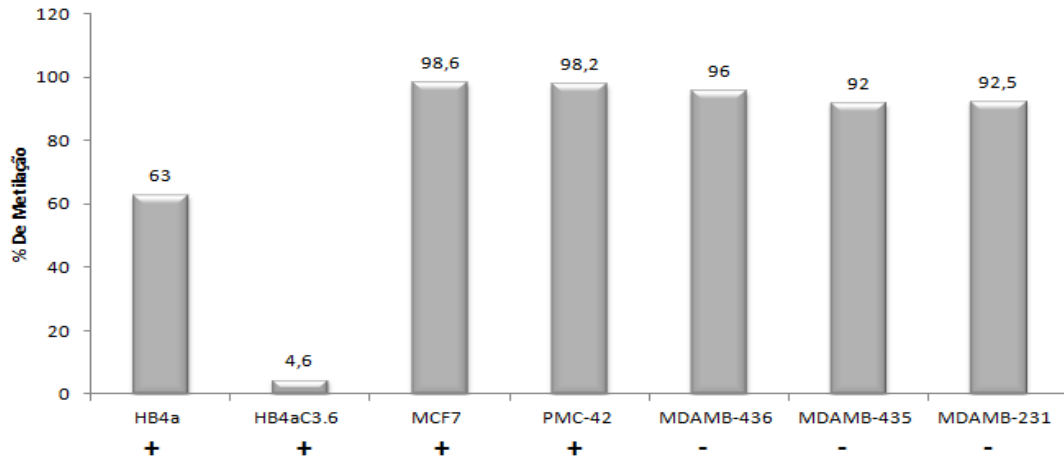
**Figura 21-** % de metilação de cada CG das ilhas de CpG 1, 2I, 2F, 3, 4 e 5 do Gene *CXCL12* de linhagens tumorais de mama.

Cada gráfico representa uma linhagem tumoral de mama. No eixo Y está representado o percentual de metilação de cada CG analisado de todas as ilhas do gene *CXCL12*. Foram numerados de 1 a 216 CG representado no eixo X. A ilha de CPG 1 está representado com a cor azul, o início da ilha de CpG 2 pela cor verde claro, o fim da ilha de CpG 2 pela cor verde escura, a ilha de CpG 3 pela cor amarela, a ilha de CpG 4 pela cor rosa e por fim a ilha de CpG 5 pela cor cinza. A seta vermelha representa o início da transcrição do gene e a chave acima dos gráfico a provável área do promotor nos entre os CGs 61 a 157.

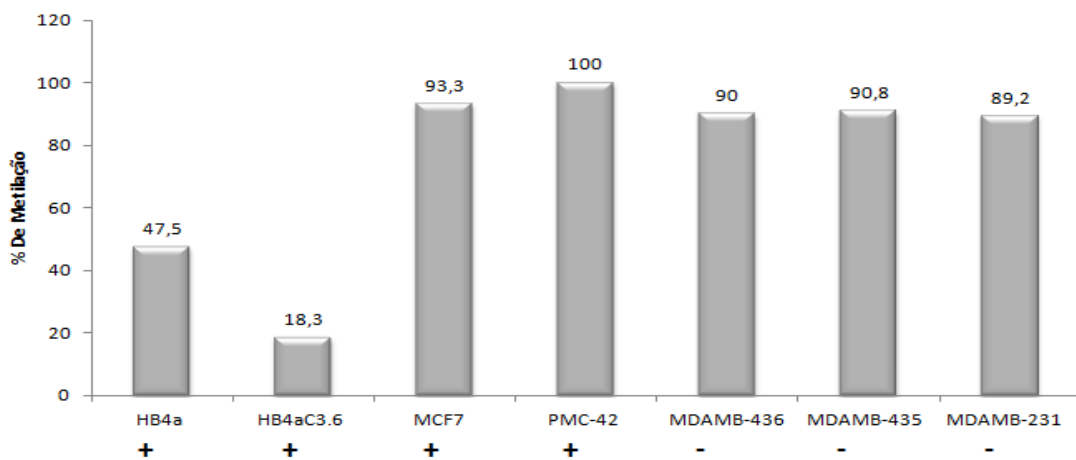
Fonte: O Autor (2012).

**A) % Metilação Global Ilha de CpG 1****B) % Metilação Global Ilha de CpG 2I**

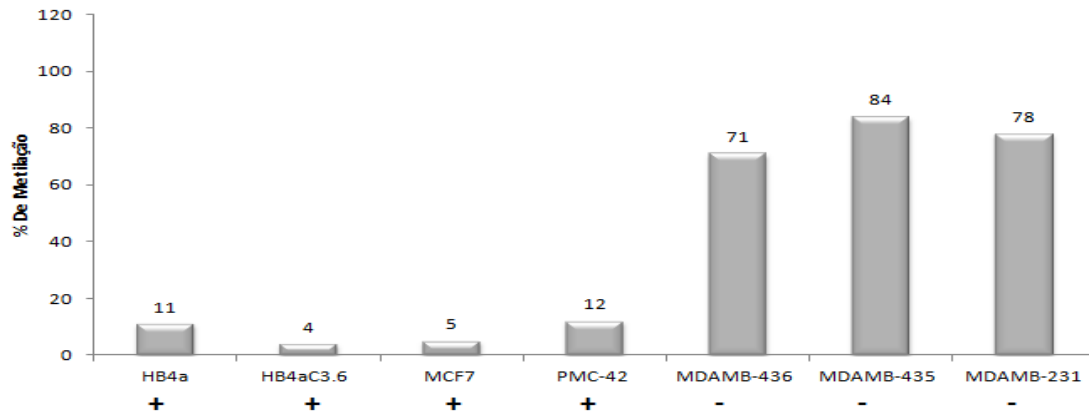
**C) % Metilação Global Ilha de CpG 2F**



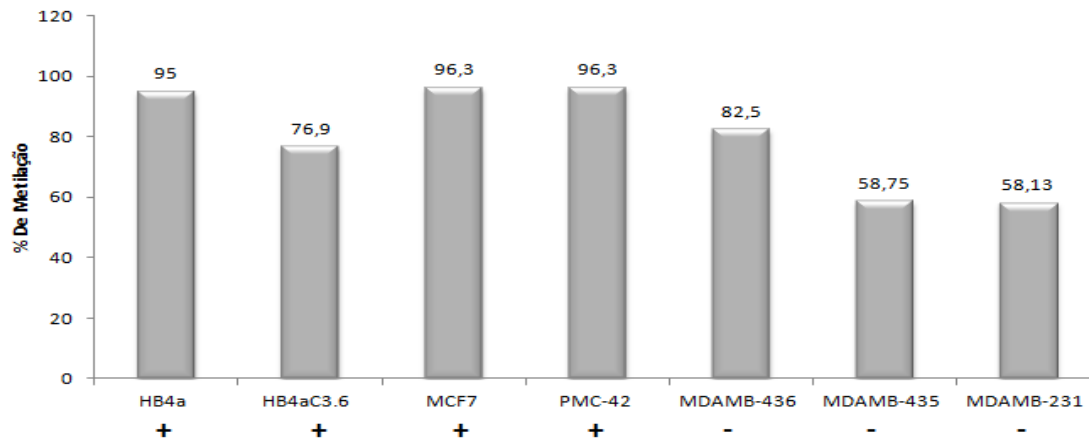
**D) % Metilação Global Ilha de CpG 3**



## E) % Metilação Global Ilha de CpG 4



## F) % Metilação Global Ilha de CpG 5



**Figura 22-** % de metilação global das ilhas de CpG 1, 2I, 2F, 3, 4 e 5 do Gene *CXCL12* de linhagens tumorais de mama.

Os dados obtidos com o percentual de metilação de cada CG analisado foram convertidos em percentagem de metilação global para cada linhagem tumoral. No eixo Y representação da percentagem global de metilação. No eixo X as linhagens tumorais de mama. Os números acima das barras destacam o valor total de metilação e o sinal de + ou de - foi colocado a baixo do nome da linhagem para destacar se a linhagem expressa ou não o gene *CXCL12*.

Fonte: O Autor (2012).

## 6. DISCUSSÃO

O câncer de mama é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Nas últimas décadas foram desenvolvidos muitos testes de diagnóstico e também protocolos terapêuticos, porém o câncer de mama ainda é o principal tipo de câncer e o que causa maior número de mortes no mundo, entre mulheres acometidas dessa doença (DeSantis *et al.*, 2011; Jemal *et al.*, 2011).

As metástases são causas de morte em 90% dos casos câncer (Weigelt *et al.*, 2005b). Nesse sentido, a busca dos mecanismos moleculares envolvidos com a progressão tumoral e desenvolvimento de metástases é de extrema importância. O gene *CXCL12* e o seu par receptor *CXCR4* foram descritos em 2001 (Muller *et al.*, 2001) como moléculas que direcionam as células tumorais primárias para seus sítios alvos, efetivando assim as metástases, e desde então diversos estudos vem procurando aprimorar o conhecimento desse par *CXCL12/CXCR4* no processo do câncer de mama.

Wendt *et al.*, em 2008, identificaram o silenciamento do gene *CXCL12* por metilação do DNA, estudando uma região do promotor contendo uma parte de uma ilha de CpG (que contém o sítio +1) em linhagens tumorais de mama. Recentemente em nosso laboratório estudamos uma outra região a 5' do gene *CXCL12* e o seu envolvimento com o câncer de mama (Ramos, 2009). Foram identificadas 5 ilhas de CpG e estudadas a ilha de CpG 2 (parte da região dessa ilha), que corresponde ao trabalho de Wendt e colaboradores (2008) e a ilha de CpG 4 (Ramos, 2009). Ficou evidenciado que em tumores primários o silenciamento do gene *CXCL12*, especificamente na ilha de CpG 4, possui correlação clínica com a presença de metástases e morte (Ramos *et al.*, 2010). Porém a maior parte da região promotora do gene *CXCL12* permaneceu não estudada. Por essa razão, apesar de ficar claro que o silenciamento da ilha de CpG 4 estava relacionada com um pior prognóstico, não foi possível entender o papel funcional da ilha de CpG 2 onde se encontra o provável promotor (Garcia-Moruja *et al.*, 2005) e todas as outras regiões ricas em dinucleotídeos CGs próximos a esse local. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi continuar o estudo de todas as ilhas de CpG do gene *CXCL12* e correlacionar com os dados de expressão gênica procurando entender o processo dinâmico de metilação do DNA no silenciamento desse gene.

Em nosso modelo de estudo utilizamos linhagens tumorais de mama. Estas linhagens foram coletadas de líquido pleural de pacientes que tiveram metástases pulmonares (MCF7, PMC42, MDA-MB-435, MDA-MB-436 e MDA-MB-231) descritas por (Lacroix and Leclercq, 2004) ou então foram imortalizadas com vírus (HB4a e HB4aC3.6) (Stamps *et al.*, 1994). A metilação de ilhas de CpG ocorre de forma mais intensa em linhagens tumorais (Antequera e Bird, 1999; Antequera *et al.*, 1990). Esta parece ser uma característica comum deste tipo de célula em que ocorre constantemente metilação *de novo* por motivos ainda não bem esclarecidos (Antequera *et al.*, 1990). Esta característica foi explorada em nosso trabalho para estudar a dinâmica da metilação do promotor do gene *CXCL12* em especial a distribuição da metilação ao longo das 5 ilhas de CpG e sua correlação com a expressão gênica.

Nossos resultados de sequenciamento mostraram que a região de DNA contida na ilha de CpG 1 estava hipermetilada nas linhagens MCF7 e PMC42 que expressam o gene (Figura 21 em azul). Esse dado inicial foi controverso porém importante para mostrar que existem regiões que predominam no processo de regulação da expressão gênica quando se trata de epigenética. Nesse caso parece que essa região pode estar hipermetilada e isso não afeta a expressão do gene *CXCL12* nestas linhagens.

Em continuidade estudamos a ilha de CpG 2 nas linhagens tumorais disponíveis na expectativa de complementar os estudos anteriores em que menos de 50% da ilha havia sido sequenciada (Wendt *et al.*, 2008). A partir dos dados mostrados na Figura 21 (em verde claro e escuro) podemos observar dois fatos importantes. A primeira, a linhagem HB4a apresenta hipermetilação de 53,25% dessa região de DNA o que poderia interferir na transcrição do gene (Figura 22 B). Porém esta linhagem expressa o gene *CXCL12* (Tabela 2). Segundo, a linhagem PMC42 apresenta metilação em diversos CpGs nessa região (Figura 21 em verde escuro). Estes dados podem indicar que essa região, em especial o início da ilha de CpG 2 (Figura 21 em verde escuro) não é essencial para o silenciamento do gene *CXCL12*. No trabalho de Ramos (Ramos *et al.*, 2010) esta mesma região foi estudada através da técnica de *Methylation specific PCR* (MSP) na qual são feitas reações de PCR para condição metilada e não metilada em DNA tumores primários de mama (DNA tratado com bissulfato de sódio). Esses dados mostraram que a região da ilha de CpG 2 não apresentou correlação estatística significativa com

nenhum dado clínico-patológico. Nossa discussão sobre esse resultado foi a de que a etnia da população feminina poderia ter alguma influência e que a população estudada no modelo europeu poderia ser diferente por essa razão. Assim a região relevante, hipermetilada do promotor do gene *CXCL12*, na população brasileira foi a ilha de CpG 4 (significativamente silenciada nas amostras de pacientes que tiveram metástases e foram a óbito).

A fim de verificar está hipótese fizemos a análise de comparação dos nossos dados de sequenciamento com os dados publicados por Wendt *et al.*, (2008) utilizando as linhagens MCF7 e MDA-MB-231 (as únicas feitas pelo estudo europeu). Nessa comparação inicia-se observando na Figura 21 em verde escuro, a região escolhida por Wendt *et al.*, (2008) para o planejamento de iniciadores específicos para análise por PCR nos tumores (MSP), os autores selecionaram os CpGs 69 para o iniciador *forward*, e 79, 80 e 81 para o iniciador reverso. Para a linhagem MCF7 que expressa o gene e a linhagem MDA-MB-231 que não expressa, estes locais parecem realmente ser adequados para amplificar o DNA tumoral por MSP. Porém analisando os nossos resultados da linhagem PMC42 (que expressa o gene) observamos que os CpGs 79 e 80 estão metilados em 40% e 20% respectivamente (Figura 21 em verde escuro). Este resultado mostra que no tumor primário de mama, algumas amostras que também tivessem esses CpGs metilados mas que mesmo assim poderiam expressar o gene *CXCL12*, teriam amplificação na reação de PCR metilação específica (MSP). Isto poderia então explicar a amplificação aleatória da condição metilada, e que não corresponde aos fatores clínico-patológicos no estudo de Ramos *et al.*, (2010). Os dados conflitantes com o trabalho de Wendt *et al.*, (2008) podem ser provenientes do estudo de sequenciamento utilizando somente duas linhagens tumorais que expressam ou não, um gene. O modelo de linhagens não é absoluto e a análise de resultados de várias linhagens, torna o planejamento dos iniciadores de MSP correspondentes o mais próximo possível com a real expressão do gene de estudo nos tumores primários. Portanto, a fim de poder utilizar também a ilha de CpG 2, em qualquer estudo em tumores é primordial planejar outros iniciadores a partir dos nossos resultados para essa região de DNA. Além disso com os dados de sequenciamento da linhagem HB4a (Figura 21), o planejamento desses novos iniciadores poderia ser ainda mais preciso. Os CpGs metilados observados nessa linhagem devem obrigatoriamente ser avaliados do planejamento de novos iniciadores.

Os dados de sequenciamento da ilha de CpG 2F mostraram que esta região é densamente metilada mesmo nas linhagens que expressam o gene, MCF7 e PMC42 com 98,6% e 98,2% de metilação respectivamente (Figura 22 C). Estes dados podem significar que esta região, assim como a ilha de CpG 1 não são importantes para regular a expressão do gene *CXCL12* em linhagens tumorais de mama.

Por outro lado a ilha de CpG 4 mostrou ser a região característica de silenciamento do gene *CXCL12*. Esta região de DNA localizada a 1575 a pb do início de transcrição e 565 pb do final do provável promotor (Figura 15) é a única região quase totalmente desmetilada nas linhagens que expressam *CXCL12* (Figura 21 em rosa) com 11%, 4%, 5% e 12% respectivamente (Figura 22 E) e densamente metilada nas linhagens silenciadas com 71%, 84%, 78% respectivamente. O início de transcrição e o provável promotor do gene *CXCL12* foram caracterizados por Garcia-Moruja *et al.*, (2005). A atividade promotora foi estudada utilizando ensaios de atividade com o gene da luciferase e assim foi determinada a provável região promotora entre -1010 a +506 (Garcia-Moruja *et al.*, 2005).

Nossos resultados mostraram pela primeira vez a importância do estudo de uma grande região de DNA a 5' de um gene que contenha alta densidade de dinucleotídeos CpG. O estudo detalhado aqui mostrou que a região promotora do gene *CXCL12* contém uma ilha de CpG, que está fora do provável promotor, e que regula a expressão mediada por metilação do DNA (Klassen *et al.*, 2012, resumo submetido em anexo).

Esses dados vem a corroborar os dados obtidos por Ramos *et al.*, (2010) acrescentando a importância do detalhamento do estudo da região promotora de um gene para o planejamento de estudo de sua expressão no contexto do câncer de mama.

Devido a grande importância do gene *CXCL12* no contexto da sobrevida global e livre de metástases no câncer de mama destacamos assim o detalhamento da região promotora deste gene como provável alvo para estudos de diagnóstico e prognóstico no câncer de mama.

## 7. CONCLUSÕES

- a) A hipermetilação das ilhas de CpG 1, Ilha de CpG 2F, ilha de CpG 3 e ilha de CpG 5, não está envolvida na regulação da expressão do gene *CXCL12* em linhagens tumorais de mama.
- b) A região denominada ilha de CpG 2I somente pode ser utilizada para análise por MSP em tumores primários de mama a partir do planejamento de novos iniciadores utilizando nossos resultados de sequenciamento.
- c) A ilha de CpG 4 parece controlar o silenciamento por metilação do DNA do gene *CXCL12* em linhagens tumorais de mama.

O detalhamento do estudo da região 5' de um gene que contém várias regiões rica em dinucleotídeos CpG, como é o caso do gene *CXCL12*, pode revelar a importância de sítios regulatórios distantes. Esta é uma abordagem descrita pela primeira vez por esse trabalho.

## 8. REFERÊNCIAS

ALLINEN M., BEROUKHIM R., CAI L., BRENNAN C., LAHTI-DOMENICI J., HUANG H., PORTER D., HU M., CHIN L., RICHARDSON A., SCHNITT S., SELLERS W.R., POLYAK K. **Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer**. *Cancer cell* 6:17-32, 2004.

ANTEQUERA F., BIRD A. **CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins**. *Current biology* : CB 9:R661-7, 1999.

ANTEQUERA F., BOYES J., BIRD A. **High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines**. *Cell* 62:503-14, 1990.

BARTEL D.P. **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function**. *Cell* 116:281-97, 2004.

BERGER S.L. **The complex language of chromatin regulation during transcription**. *Nature* 447:407-12, 2007.

BESTOR T.H. **The DNA methyltransferases of mammals**. *Hum Mol Genet* 9:2395-402, 2000.

BIRD A. **DNA methylation patterns and epigenetic memory**. *Genes Dev* 16:6-21, 2002.

BIRD A.P. **CpG-rich islands and the function of DNA methylation**. *Nature* 321:209-13, 1986.

BLEUL C.C., FARZAN M., CHOE H., PAROLIN C., CLARK-LEWIS I., SODROSKI J., SPRINGER T.A. **The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry**. *Nature* 382:829-33, 1996.

BURGER J.A., KIPPS T.J. **CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment**. *Blood* 107:1761-7, 2006.

CLARK S.J., HARRISON J., PAUL C.L., FROMMER M. **High sensitivity mapping of methylated cytosines**. *Nucleic Acids Res* 22:2990-7, 1994.

COSTA F.F., PAIXAO V.A., CAVALHER F.P., RIBEIRO K.B., CUNHA I.W., RINCK J.A., JR., O'HARE M., MACKAY A., SOARES F.A., BRENTANI R.R., CAMARGO A.A. **SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer.** *Cancer Genet Cytogenet* 165:135-43, 2006.

DAR A., KOLLET O., LAPIDOT T. **Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice.** *Experimental hematology* 34:967-75, 2006.

DEDEURWAERDER S., FUMAGALLI D., FUKS F. **Unravelling the epigenomic dimension of breast cancers.** *Current opinion in oncology* 23:559-65, 2011.

DESANTIS C., HOWLADER N., CRONIN K.A., JEMAL A. **Breast cancer incidence rates in U.S. women are no longer declining.** *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 20:733-9, 2011.

DWORKIN A.M., HUANG T.H., TOLAND A.E. **Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment.** *Seminars in cancer biology* 19:165-71, 2009.

EDEN S., HASHIMSHONY T., KESHET I., CEDAR H., THORNE A.W. **DNA methylation models histone acetylation.** *Nature* 394:842, 1998.

EFSTRATIADIS A. **Parental imprinting of autosomal mammalian genes.** *Curr Opin Genet Dev* 4:265-80, 1994.

EHRlich M. **DNA methylation in cancer: too much, but also too little.** *Oncogene* 21:5400-13, 2002.

ESTELLER M. **Non-coding RNAs in human disease.** *Nature reviews. Genetics* 12:861-74, 2011.

FEINBERG A.P. **Epigenetics at the epicenter of modern medicine.** *JAMA* 299:1345-50, 2008.

FEINBERG A.P., GEHRKE C.W., KUO K.C., EHRlich M. **Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia.** *Cancer research* 48:1159-61, 1988.

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

FERLAY J., PARKIN D.M., STELIAROVA-FOUCHER E. **Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008.** European journal of cancer 46:765-81, 2010.

FICZ G., BRANCO M.R., SEISENBERGER S., SANTOS F., KRUEGER F., HORE T.A., MARQUES C.J., ANDREWS S., REIK W. **Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation.** Nature 473:398-402, 2011.

FURUSATO B., MOHAMED A., UHLEN M., RHIM J.S. **CXCR4 and cancer.** Pathology international 60:497-505, 2010.

FURUSAWA J., ZHANG H., VURAL E., STONE A., FUKUDA S., ORIDATE N., FANG H., YE Y., SUEN J.Y., FAN C.Y. **Distinct epigenetic profiling in head and neck squamous cell carcinoma stem cells.** Otolaryngol Head Neck Surg 144:900-9, 2011.

GARCIA-MORUJA C., ALONSO-LOBO J.M., RUEDA P., TORRES C., GONZALEZ N., BERMEJO M., LUQUE F., ARENZANA-SEISDEDOS F., ALCAMI J., CARUZ A. **Functional characterization of SDF-1 proximal promoter.** Journal of molecular biology 348:43-62, 2005.

GARDINER-GARDEN M., FROMMER M. **CpG islands in vertebrate genomes.** J Mol Biol 196:261-82, 1987.

GAUDET F., HODGSON J.G., EDEN A., JACKSON-GRUSBY L., DAUSMAN J., GRAY J.W., LEONHARDT H., JAENISCH R. **Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation.** Science 300:489-92, 2003.

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.

GOLDBERG A.D., ALLIS C.D., BERNSTEIN E. **Epigenetics: a landscape takes shape.** Cell 128:635-8, 2007.

GREGER V., PASSARGE E., HOPPING W., MESSMER E., HORSTHEMKE B. **Epigenetic Changes May Contribute to the Formation and Spontaneous Regression of Retinoblastoma**. Human Genetics 83:155-158, 1989.

HANAHAHAN D., WEINBERG R.A. **The hallmarks of cancer**. Cell 100:57-70, 2000.

HARTMANN T.N., BURGER M., BURGER J.A. **The role of adhesion molecules and chemokine receptor CXCR4 (CD184) in small cell lung cancer**. Journal of biological regulators and homeostatic agents 18:126-30, 2004.

HATZIAPOSTOULOU M., ILIOPOULOS D. **Epigenetic aberrations during oncogenesis**. Cellular and molecular life sciences : CMLS 68:1681-702, 2011.

HOLLIDAY R., PUGH J.E. **DNA modification mechanisms and gene activity during development**. Science 187:226-32, 1975.

HOTCHKISS R.D. **The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography**. J Biol Chem 175:315-32, 1948.

HOWARD G., EIGES R., GAUDET F., JAENISCH R., EDEN A. **Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice**. Oncogene 27:404-8, 2008.

HU Z., DONG J., WANG L.E., MA H., LIU J., ZHAO Y., TANG J., CHEN X., DAI J., WEI Q., ZHANG C., SHEN H. **Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls**. Carcinogenesis, 2012.

HUDSON T.J., ANDERSON W., ARTEZ A., BARKER A.D., BELL C., BERNABE R.R., BHAN M.K., CALVO F., EEROLA I., GERHARD D.S., GUTTMACHER A., GUYER M., HEMSLEY F.M., JENNINGS J.L., KERR D., KLATT P., KOLAR P., KUSADA J., LANE D.P., LAPLACE F., YOUYONG L., NETTEKOVEN G., OZENBERGER B., PETERSON J., RAO T.S., REMACLE J., SCHAFER A.J., SHIBATA T., STRATTON M.R., VOCKLEY J.G., WATANABE K., YANG H., YUEN M.M., KNOPPERS B.M., BOBROW M., CAMBON-THOMSEN A., DRESSLER L.G., DYKE S.O., JOLY Y., KATO K., KENNEDY K.L., NICOLAS P., PARKER M.J., RIAL-SEBBAG E., ROMEO-CASABONA C.M., SHAW K.M., WALLACE S., WIESNER G.L., ZEPS N., LICHTER P., BIANKIN A.V., CHABANNON C., CHIN L., CLEMENT B., DE ALAVA E., DEGOS F., FERGUSON M.L., GEARY P., HAYES D.N., JOHNS A.L., KASPRZYK A., NAKAGAWA H., PENNY R., PIRIS M.A., SARIN R., SCARPA A., VAN DE VIJVER M., FUTREAL P.A., ABURATANI H., BAYES M., BOTWELL D.D., CAMPBELL P.J., ESTIVILL X., GRIMMOND S.M., GUT I., HIRST M., LOPEZ-OTIN C., MAJUMDER P., MARRA M., MCPHERSON J.D., NING Z., PUENTE X.S.,

RUAN Y., STUNNENBERG H.G., SWERDLOW H., VELCULESCU V.E., WILSON R.K., XUE H.H., YANG L., SPELLMAN P.T., BADER G.D., BOUTROS P.C., FLICEK P., GETZ G., GUIGO R., GUO G., HAUSSLER D., HEATH S., HUBBARD T.J., JIANG T., *et al.* International network of cancer genome projects. *Nature* 464:993-8., 2010.

INCA. **Incidência do câncer no Brasil**. Estimativa 2012:100, 2012.

IORIO M.V., FERRACIN M., LIU C.G., VERONESE A., SPIZZO R., SABBIONI S., MAGRI E., PEDRIALI M., FABBRI M., CAMPIGLIO M., MENARD S., PALAZZO J.P., ROSENBERG A., MUSIANI P., VOLINIA S., NENCI I., CALIN G.A., QUERZOLI P., NEGRINI M., CROCE C.M. **MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer**. *Cancer research* 65:7065-70, 2005.

ISSA J.P., VERTINO P.M., WU J., SAZAWAL S., CELANO P., NELKIN B.D., HAMILTON S.R., BAYLIN S.B. **Increased cytosine DNA-methyltransferase activity during colon cancer progression**. *Journal of the National Cancer Institute* 85:1235-40, 1993.

JEMAL A., BRAY F., CENTER M.M., FERLAY J., WARD E., FORMAN D. **Global cancer statistics**. *CA Cancer J*, 2011.

JONES P.A., BAYLIN S.B. **The fundamental role of epigenetic events in cancer**. *Nat Rev Genet* 3:415-28, 2002.

JONES P.A., TAYLOR S.M. **Hemimethylated duplex DNAs prepared from 5-azacytidine-treated cells**. *Nucleic Acids Res* 9:2933-47, 1981.

JONES P.L., VEENSTRA G.J., WADE P.A., VERMAAK D., KASS S.U., LANDSBERGER N., STROUBOULIS J., WOLFFE A.P. **Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription**. *Nat Genet* 19:187-91, 1998.

JOVANOVIC J., RONNEBERG J.A., TOST J., KRISTENSEN V. **The epigenetics of breast cancer**. *Mol Oncol* 4:242-2010

KANAI Y. **Genome-wide DNA methylation profiles in precancerous conditions and cancers**. *Cancer Sci* 101:36-45, 2010.

KARIN N. **The multiple faces of CXCL12 (SDF-1alpha) in the regulation of immunity during health and disease.** Journal of leukocyte biology 88:463-73, 2010.

KLEIN C.A. **Parallel progression of primary tumours and metastases.** Nature reviews. Cancer 9:302-12, 2009.

KOUZARIDES T. **Chromatin modifications and their function.** Cell 128:693-705, 2007.

KRIAUCIONIS S., HEINTZ N. **The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain.** Science 324:929-30, 2009.

KUCIA M., WOJAKOWSKI W., RECA R., MACHALINSKI B., GOZDZIK J., MAJKA M., BARAN J., RATAJCZAK J., RATAJCZAK M.Z. **The migration of bone marrow-derived non-hematopoietic tissue-committed stem cells is regulated in an SDF-1-, HGF-, and LIF-dependent manner.** Archivum immunologiae et therapiae experimentalis 54:121-35, 2006.

LACROIX M., LECLERCQ G. **Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update.** Breast cancer research and treatment 83:249-89, 2004.

LEE R.C., FEINBAUM R.L., AMBROS V. **The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.** Cell 75:843-54, 1993.

LEE Y.T. **Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy.** Journal of surgical oncology 23:175-80, 1983.

LI W., LIU M. **Distribution of 5- hydroxymethylcytosine in different human tissues.** J. of Nucleic Acids 2011:1-5, 2011.

LEU Y.W., YAN P.S., FAN M., JIN V.X., LIU J.C., CURRAN E.M., WELSHONS W.V., WEI S.H., DAVULURI R.V., PLASS C., NEPHEW K.P., HUANG T.H. **Loss of estrogen receptor signaling triggers epigenetic silencing of downstream targets in breast cancer.** Cancer Res 64:8184-92, 2004.

LIPPMAN Z., GENDREL A.V., BLACK M., VAUGHN M.W., DEDHIA N., MCCOMBIE W.R., LAVINE K., MITTAL V., MAY B., KASSCHAU K.D., CARRINGTON J.C., DOERGE R.W., COLOT V., MARTIENSSSEN R. **Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control**. Nature 430:471-6, 2004.

LISTER R., PELIZZOLA M., DOWEN R.H., HAWKINS R.D., HON G., TONTI-FILIPPINI J., NERY J.R., LEE L., YE Z., NGO Q.M., EDSALL L., ANTOSIEWICZ-BOURGET J., STEWART R., RUOTTI V., MILLAR A.H., THOMSON J.A., REN B., ECKER J.R. **Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences**. Nature 462:315-22, 2009.

LO P.K., SUKUMAR S. **Epigenomics and breast cancer**. Pharmacogenomics 9:1879-902, 2008.

LUGER K., MADER A.W., RICHMOND R.K., SARGENT D.F., RICHMOND T.J. **Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution**. Nature 389:251-60, 1997.

LUSTER A.D. **Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation**. The New England journal of medicine 338:436-45, 1998.

MIAO Z., LUKER K.E., SUMMERS B.C., BERAHOVICH R., BHOJANI M.S., REHEMTULLA A., KLEER C.G., ESSNER J.J., NASEVICIUS A., LUKER G.D., HOWARD M.C., SCHALL T.J. **CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104:15735-40, 2007.

MOHANDAS T., SPARKES R.S., SHAPIRO L.J. **Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation**. Science 211:393-6, 1981.

MULLER A., HOMEY B., SOTO H., GE N., CATRON D., BUCHANAN M.E., MCCLANAHAN T., MURPHY E., YUAN W., WAGNER S.N., BARRERA J.L., MOHAR A., VERASTEGUI E., ZLOTNIK A. **Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis**. Nature 410:50-6, 2001.

NAGASAWA T., TACHIBANA K., KISHIMOTO T. **A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection**. Seminars in immunology 10:179-85, 1998.

OKAMOTO Y., SAWAKI A., ITO S., NISHIDA T., TAKAHASHI T., TOYOTA M., SUZUKI H., SHINOMURA Y., TAKEUCHI I., SHINJO K., AN B., ITO H., YAMAO K., FUJII M., MURAKAMI H., OSADA H., KATAOKA H., JOH T., SEKIDO Y., KONDO Y. **Aberrant DNA methylation associated with aggressiveness of gastrointestinal stromal tumour.** *Gut*, 2011.

ORIMO A., GUPTA P.B., SGROI D.C., ARENZANA-SEISDEDOS F., DELAUNAY T., NAEEM R., CAREY V.J., RICHARDSON A.L., WEINBERG R.A. **Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion.** *Cell* 121:335-48, 2005.

PARRELLA P. **Epigenetic Signatures in Breast Cancer: Clinical Perspective.** *Breast care* 5:66-73, 2010.

PENN N.W., SUWALSKI R., O'RILEY C., BOJANOWSKI K., YURA R. **The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid.** *Biochem J* 126:781-90, 1972.

PERTEA M., SALZBERG S.L. **Between a chicken and a grape: estimating the number of human genes.** *Genome biology* 11:206, 2010.

RAMOS E.A., CAMARGO A.A., BRAUN K., SLOWIK R., CAVALLI I.J., RIBEIRO E.M., PEDROSA FDE O., DE SOUZA E.M., COSTA F.F., KLASSEN G. **Simultaneous CXCL12 and ESR1 CpG island hypermethylation correlates with poor prognosis in sporadic breast cancer.** *BMC Cancer* 10:23, 2010.

RAMOS E.A., GROCHOSKI M., BRAUN-PRADO K., SENISKI G.G., CAVALLI I.J., RIBEIRO E.M., CAMARGO A.A., COSTA F.F., KLASSEN G. **Epigenetic Changes of CXCR4 and Its Ligand CXCL12 as Prognostic Factors for Sporadic Breast Cancer.** *PloS one* 6:e29461, 2011.

RAMOS E.A.D.S. **Hipermetilação de ilhas de CpG dos genes CXCL12 e ESR1: correlação com dados clínico-patológicos em câncer de mama.** pp. 120, 2009.

RATAJCZAK M.Z., ZUBA-SURMA E., KUCIA M., RECA R., WOJAKOWSKI W., RATAJCZAK J. **The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis.** *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 20:1915-24, 2006.

SAMBROOK J., RUSSEL D.W. **Molecular cloning: A laboratory manual** Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2001.

SATO F., TSUCHIYA S., MELTZER S.J., SHIMIZU K. **MicroRNAs and epigenetics.** The FEBS journal 278:1598-609, 2011.

SCHAEFER A., JUNG M., MOLLENKOPF H.J., WAGNER I., STEPHAN C., JENTZMIK F., MILLER K., LEIN M., KRISTIANSEN G., JUNG K. **Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma.** International journal of cancer. Journal international du cancer 126:1166-76, 2010.

SHEN L., KONDO Y., GUO Y., ZHANG J., ZHANG L., AHMED S., SHU J., CHEN X., WATERLAND R.A., ISSA J.P. **Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters.** PLoS genetics 3:2023-36, 2007.

SINSHEIMER R.L. **The action of pancreatic deoxyribonuclease. II. Isomeric dinucleotides.** J Biol Chem 215:579-83, 1955.

STAMPS A.C., DAVIES S.C., BURMAN J., O'HARE M.J. **Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalized by retroviral infection with a temperature-sensitive SV40 T-antigen construct.** International journal of cancer. Journal international du cancer 57:865-74, 1994.

STIRZAKER C., SONG J.Z., DAVIDSON B., CLARK S.J. **Transcriptional gene silencing promotes DNA hypermethylation through a sequential change in chromatin modifications in cancer cells.** Cancer Res 64:3871-7, 2004.

STRAUSSMAN R., NEJMAN D., ROBERTS D., STEINFELD I., BLUM B., BENVENISTY N., SIMON I., YAKHINI Z., CEDAR H. **Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome.** Nat Struct Mol Biol 16:564-71, 2009.

STRUHL K. **Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms.** Genes Dev 12:599-606, 1998.

SUN B.K., TSAO H. **Small RNAs in development and disease.** Journal of the American Academy of Dermatology 59:725-37; quiz 738-40, 2008.

SUN X., CHENG G., HAO M., ZHENG J., ZHOU X., ZHANG J., TAICHMAN R.S., PIANTA K.J., WANG J. **CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression.** Cancer metastasis reviews 29:709-22, 2010.

TAKAI D., JONES P.A. **Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22.** Proc Natl Acad Sci U S A 99:3740-5, 2002.

TAMARU H., SELKER E.U. **A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in Neurospora crassa.** Nature 414:277-83, 2001.

TASHIRO K., TADA H., HEILKER R., SHIROZU M., NAKANO T., HONJO T. **Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins.** Science 261:600-3, 1993.

VEECK J., ESTELLER M. **Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs.** Journal of mammary gland biology and neoplasia 15:5-17, 2010.

VERMA M., SRIVASTAVA S. **Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention.** Lancet Oncol 3:755-63, 2002.

VINCENT A., OMURA N., HONG S.M., JAFFE A., ESHLEMAN J., GOGGINS M. **Genome-wide analysis of promoter methylation associated with gene expression profile in pancreatic adenocarcinoma.** Clin Cancer Res 17:4341-54, 2011.

WEIGELT B., PETERSE J.L., VAN 'T VEER L.J. **Breast cancer metastasis: markers and models.** Nat Rev Cancer 5:591-602, 2005.

WENDT M.K., COOPER A.N., DWINELL M.B. **Epigenetic silencing of CXCL12 increases the metastatic potential of mammary carcinoma cells.** Oncogene 27:1461-71, 2008.

WIDSCHWENDTER M., JONES P.A. **DNA methylation and breast carcinogenesis.** Oncogene 21:5462-82, 2002.

WOODCOCK D.M., CROWTHER P.J., DIVER W.P. **The majority of methylated deoxycytidines in human DNA are not in the CpG dinucleotide.** Biochem Biophys Res Commun 145:888-94, 1987.

XU F., MAO C., DING Y., RUI C., WU L., SHI A., ZHANG H., ZHANG L., XU Z. **Molecular and enzymatic profiles of mammalian DNA methyltransferases: structures and targets for drugs.** Current medicinal chemistry 17:4052-71, 2010.

YANG X., YAN L., DAVIDSON N.E. **DNA methylation in breast cancer**. *Endocrine-related cancer* 8:115-27, 2001.

YU L., CECIL J., PENG S.B., SCHREMENTI J., KOVACEVIC S., PAUL D., SU E.W., WANG J. **Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1**. *Gene* 374:174-9, 2006.

ZHOU Y.P., PENA J.C., ROE M.W., MITTAL A., LEVISETTI M., BALDWIN A.C., PUGH W., OSTREGA D., AHMED N., BINDOKAS V.P., PHILIPSON L.H., HANAHAN D., THOMPSON C.B., POLONSKY K.S. **Overexpression of Bcl-x(L) in beta-cells prevents cell death but impairs mitochondrial signal for insulin secretion**. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 278:E340-51, 2000.

ZLOTNIK A. **Chemokines in neoplastic progression**. *Seminars in cancer biology* 14:181-5, 2004.

ZLOTNIK A., BURKHARDT A.M., HOMEY B. **Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis**. *Nature reviews. Immunology* 11:597-606, 2011.

**ANEXO**

**Tabela 1- Padronização do PCR 1 e *Nested* PCR de toas as Ilhas de CpG do gene *CXCL12*.**

ILHA CpG	1ª Tentativa Temperaturas °C	2ª Tentativa Temperaturas °C	3ª Tentativa Temperaturas °C	4ª Tentativa Temperaturas °C
Ilha 1	F1/N1-42, 44, 46 FN/RN- 46, 48, 50	F1/N1- 43, 45, 47 FN/RN- 47, 49, 51		
Ilha 2 I	F1/N1- 52, 54,56 FN/RN- 56, 58, 60	F1/N1- 51, 53,55 FN/RN- 54, 56, 58	F1/N1- 52, 54,55 FN/RN- 54, 56, 58	
Ilha 2 F	F1/N1- 42, 44, 46 FN/RN- 44, 46, 48	F1/N1- 41, 43, 45, FN/RN- 43, 45, 47	F1/N1- 41, 43, 45 FN/RN- 44, 46, 48	F1/N1- 41, 43, 45 FN/RN- 44, 46, 48,5
Ilha 3	F1/N1- 42, 44, 46 FN/RN- 44, 46, 48	F1/N1- 44, 46, 48 FN/RN- 46, 48, 50		
Ilha 5	F1/N1- 46, 48, 50 FN/RN- 48, 50, 52	F1/N1- 46, 48, 50 FN/RN- 47, 49, 51	F1/N1- 46, 48, 50 FN/RN- 46, 48, 50	



XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq  
Foz do Iguaçu, PR, Brasil - 19 a 22 de maio de 2012

### **CpG island region outside the putative promoter controls *CXCL12* expression in breast cancer cell lines**

Klassen, L.M.B. , Ramos, E.A.S., Manica, G.C.M., Chequim, A. Prado, K.B., Michielin, F. A., Souza, E. M., and Klassen, G.

Metastasis contributes to 90% of all breast cancer death. Several studies have highlighted the role of epigenetic events such as DNA methylation in promoter regions of genes as an important event in the process of metastasis in breast cancer. The promoter of the *CXCL12* gene, encoding a chemokine, is silenced by methylation in gastric, colon as well as in the breast cancer. The promoter region of *CXCL12* gene has five CpG islands regions and the fourth region is hypermethylated in breast tumors from patients with metastasis. The aim of this work was to map methylated regions flanking the promoter of *CXCL12* by cloning bisulfite treated DNA containing the distinct CpG regions and also correlate methylation pattern with the gene expression in different breast tumor cell lines. The results showed that the CpG islands 1, 3, 5 as well as the final third of CpG 2 were more than 80% methylated in the cell lines that expressed the gene *CXCL12* (HB4a, PMC42 and MCF7). Expression analysis indicates strongly that these regions do not regulate this gene. However CpG island 4, located approximately 1550 bp away from the transcription start region and outside the putative promoter region, was differentially methylated and it seems to promote *CXCL12* gene silencing.

Keywords: *CXCL12*, chemokine, DNA methylation, epigenetics, breast cancer.

Supported by: Fundação Araucária, CNPq and CAPES.