

EDNEIA AMANCIO DE SOUZA RAMOS

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES QSCN6 (Q6) E QSCN6L1 (Q10) EM
LINHAGENS TUMORAIS DE PRÓSTATA**

**CURITIBA
2007**

EDNEIA AMANCIO DE SOUZA RAMOS

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES QSCN6 (Q6) E QSCN6L1 (Q10) EM
LINHAGENS TUMORAIS DE PRÓSTATA**

Monografia apresentada à Banca Examinadora da
Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Profª orientadora: Giseli Klassen

**CURITIBA
2007**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe
e ao meu filho,
que agüentaram meus níveis de humor e entenderam
a necessidade de momentos tão ausentes.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Silvio Veiga e Silvio Zanata pelo uso da sala de cultivo, do Departamento de Biologia Celular.

Às professoras Maria Luiza P. Eller e Karin pelo uso do aparelho de espectrofotometria do Departamento de Genética.

A Giseli, minha orientadora, que sem ela este projeto jamais teria sido realizado. Pela sua paciência (e às vezes a falta dela também...), pela aceitação, confiança, ensino e cobrança entre outras tantas coisas. Muito obrigada!

Ao professor Emanuel Maltempi (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular) pelas idéias e pela disponibilização dos equipamentos e materiais quando precisávamos;

Aos meus professores... (as) Anãs, Márcia, Marcelo, Ricardo, Margarete, Erasto, Rodney, Cristina, Cíntia, entre tantos outros que doaram seus conhecimentos para que pudéssemos de, alguma forma, tornarmos um pouquinho dos biólogos que hoje somos;

À professora Eni que sempre me incentivou em tantas coisas;

Aos meus amigos (as): Edinara, Fátima, Gleise, João, Kleber, Patrícia e Wanessa por toda a ajuda, companheirismo e toda a amizade que me ofereceram e me deram durante a graduação, nos corredores ou não do Centro Politécnico;

Às minhas colegas de laboratório: Gerusa e Elisa que sem ajuda e amizade delas tudo seria mais difícil;

À Mariana, que se desligou de muita coisa pra poder me ajudar. Muito obrigada!

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui: Ana, Dione, Catiane, Silnara, Manu, Rafael, Dr. Sergey, Cassiano, Fabiano, Nil, Sandra, Edna, Marley, Gisele, Shizuê;

E a todos que de alguma forma participaram para que chegássemos ao fim desta etapa da vida, presentes ou não...

**A natureza fala.
E o que ela tem a dizer
pode caber num ano,
num dia,
ou até num segundo.
Pode ser uma frase curta,
ou uma conversa de horas.
Não importa.
O que a gente não pode
é deixar de escutar.**

(Autor desconhecido)

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. O Câncer de próstata.....	11
1.1.1. Anatomia da glândula prostática.....	11
1.1.2. Carcinoma prostático.....	13
1.1.3. Etiologia.....	14
1.1.4. Aspectos clínicos.....	15
1.1.5. Diagnóstico e tratamento.....	15
1.2. Marcadores moleculares em câncer de próstata.....	17
1.3. Mecanismos moleculares do câncer.....	18
1.4. Epigenética e câncer.....	19
1.4.1. Carcinogênese e metilação do DNA	21
1.4.2. Metilação do DNA e câncer de próstata.....	22
1.5. A quiescência celular e o câncer.....	23
1.6. Linhagens tumorais de câncer de próstata.....	25
2. OBJETIVO.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Material biológico.....	26
3.2. Extração de RNA.....	28
3.3. RT-PCR.....	29
3.3.1. Avaliação do padrão de expressão dos genes QSCN6 e Q10 em linhagens tumorais.....	29
3.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida e em gel de agarose	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1. Extração do RNA.....	31
4.2. Padrão de expressão.....	35
5. CONCLUSÃO.....	37

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
---	-----------

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1- Fatores de prognóstico no câncer de próstata.....	14
Tabela 2- Quantificação dos RNAs extraídos da HB4a, PC3 e DU145 (diluição 1:100).....	33
Figura 1- Glândula prostática normal.....	12
Figura 2: Desenho esquemático da próstata normal e a glândula com hiperplasia benigna da próstata (BPH).....	13
Figura 3- RNA extraídos das linhagens HB4a e PC3.....	32
Figura 4- RNAs extraídos da linhagem DU145.....	32
Figura 5- RT-PCR do gene GAPDH das amostras das linhagens HB4a e PC3.....	34
Figura 6- RT-PCR do gene GAPDH de amostras da linhagem DU145.....	34
Figura 7- RT-PCR Q6 35X e GAPDH 28X.....	36
Figura 8- RT-PCR Q10 35X e GAPDH 28X.....	36

ABREVIATÓES

AR - via de receptores

BPH - hiperplasia benigna da próstata

CaP - câncer de próstata

DRE - Exame Digital do Reto

PSA - prostate specific antigen / antígeno prostático específico

TRUS -Ultrassom Transretal da Próstata

γ SM - gama seminoproteína

GSTP1 - glutathione S-transferase 1

DNMT1 - DNA metiltransferase

Rb - retinoblastoma

IFN γ - interferon gama

PBS – tampão fosfato salina

DEPC – do inglês Diethyl Pirocarbonate Research Grade

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato deidrogenase

TEMED - Tetrametiletilenediamine

APS - persulfato de amônio

TBE - Tris-Borato-EDTA

RESUMO

O câncer de próstata é o segundo tipo de neoplasia mais freqüente diagnosticada entre os homens, principalmente acima dos 50 anos de idade. Possui potencial metastático especialmente para os ossos e para o cérebro. Os mecanismos oncogênicos envolvidos na progressão do câncer de próstata são ainda pouco conhecidos e controversos. Biomarcadores como o antígeno prostático específico, apresentam diversas ambigüidades e sua utilização é motivo de discussões controversas na literatura. É de consenso que para o câncer de próstata, assim como em outros tipos de carcinomas, é importante conhecer os mecanismos moleculares da doença para futura utilização de novos biomarcadores mais específicos no prognóstico, diagnóstico e tratamento. Em virtude disso iniciamos o estudo de expressão de genes que expressam quiescinas, a QSCN6 (Q6) e a QSCN6L1 (Q10) devido a estudos preliminares mostrando seu envolvimento em câncer de mama e neuroblastomas, respectivamente. Além disso, constatou-se que esses genes possuem ilhas de CpG na região promotora, sugerindo provável regulação da expressão por metilação. Essa abordagem conhecida amplamente na epigenética tem se mostrado como linha emergente de estudo nos últimos anos e tem revelado novos genes supressores tumorais e oncogenes de grande utilidade em diversos estudos. Nesse trabalho, portanto, como estudo preliminar, avaliou-se o perfil de expressão dos genes Q6 e Q10 em linhagens tumorais de próstata PC3 e DU145. Para tanto, foi efetuado o cultivo destas linhagens e também da linhagem tumoral de mama, HB4a, utilizada como controle. Posteriormente, foi realizada a extração do RNA para a síntese de cDNA, o qual foi utilizado como *template* para reações de PCR para transcrição reversa. Concluímos que há regulação da expressão do gene Q6 em ambas linhagens de estudo.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Câncer de próstata

O tema de estudo escolhido para este trabalho, consiste em um dos grandes males da humanidade, o câncer. Esta doença com suas variações e especificidades características é responsável pelo segundo maior número de óbitos no mundo, atrás apenas das doenças cardíacas.

Estimou-se um número superior a 47 mil casos de câncer de próstata (CaP) para o Brasil em 2006 correspondendo a um risco estimado de 51 novos casos a cada 100 mil homens. Tal ocorrência foi mais freqüente nas regiões sul e sudeste apresentando o risco estimado de 68/100.000 e 63/100.000 respectivamente (fonte: <http://www.inca.gov.br>).

Frente a estas proporções, tal patologia corresponde ao segundo tipo de câncer mais freqüente entre os homens e à quarta causa de morte por neoplasias no Brasil (fonte: <http://www.inca.gov.br>). Esta doença possui um potencial metastático ósseo, podendo também comprometer o tecido cerebral; com uma conseqüente disseminação para locais secundários, representando uma alta mortalidade com diversas complicações, incluindo fraturas e compressões espinhais (HAMDY, 2001). Entre os multiprocessos que desencadeiam a alta tumorigênese do câncer de próstata está o seu fenótipo androgênio independente interligado às alterações genéticas intrínsecas.

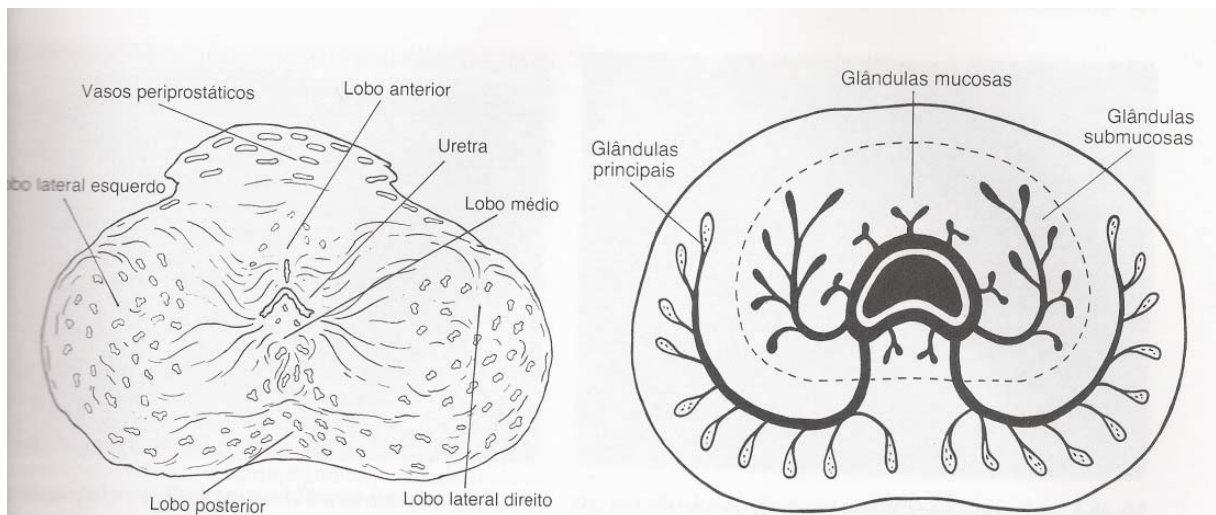
1.1.1. Anatomia da glândula prostática

A próstata apresenta-se como uma glândula compacta sem distinção lobular. Possui dimensões aproximadas em homem adulto de 4 cm x 2,5 cm e pesa aproximadamente 20 g. A glândula normal exibe uma distinção anatômica que, em geral, é descrita em três zonas: central (a porção que acompanha os ductos ejaculadores), de transição (região da uretra proximal) e uma zona externa ou periférica (envolve a uretra distal que corresponde à região apical da próstata), constituindo uma árvore distinta de septos e ductos (Figura 1) (CUNHA et al., 2004). Morfologicamente é formada por células cúbicas e/ou cilíndricas altas (BOGLIOLO,

2000), com núcleos basais e citoplasma que por imuno-histoquímica, caracteriza uma forte positividade para o antígeno prostático específico (PSA). Abaixo desta, ocorrem células basais com função de reserva e secreção (KUMAR et al., 1999).

A próstata está sob influência hormonal, sendo o hormônio luteinizante (LH) responsável pela estimulação das células de Leiding testiculares a produzirem testosterona, responsável pela libido e potência sexual (BOGLIOLO, 2000). Os efeitos androgênicos no desenvolvimento da próstata são mediados através de uma via de receptores (AR) no contexto das interações mesênquima/epitélio. Durante o desenvolvimento pré-natal, tal via AR é inicialmente detectada no mesênquima urogenital e de acordo com Cunha et al (2004) esta via é indetectável no epitélio prostático não participando portanto, da resposta. Esta via androgênica é imprescindível na manutenção do epitélio prostático de um indivíduo adulto e sua privação, como por castração por exemplo, levam a apoptose celular.

Figura 1- Glândula prostática normal. A gravura à direita representa um corte transversal mostrando a disposição concêntrica das glândulas da mucosa, submucosa e externas. A glândula prostática apresenta-se dividida em região central, externa e de transição, sendo esta a região mais frequentemente atingida pelo adenocarcinoma de próstata.



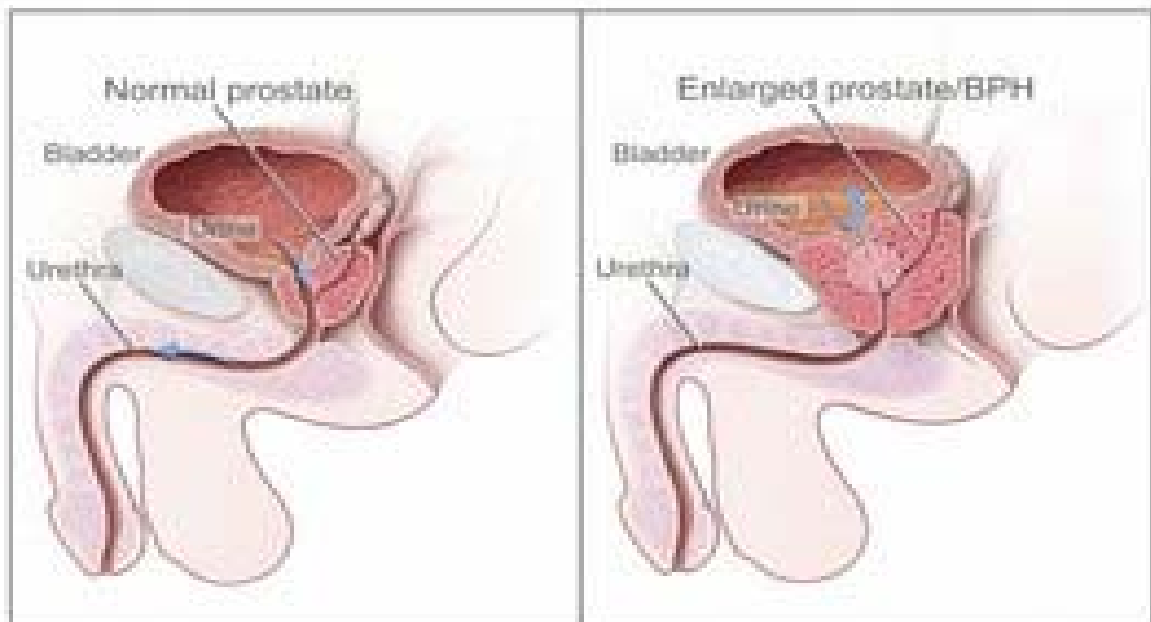
Fonte: BOGLIOLO, 2000.

1.1.2. Carcinoma prostático

Os mecanismos moleculares envolvidos na oncogênese e progressão do câncer de próstata ainda são pouco esclarecidos. Os tumores variam de formas brandas, com evolução lenta a até formas extremamente agressivas e de crescimento rápido (FERREIRA et al., 2004). Estas alterações incluem a ativação de oncogenes e a perda de genes supressores de tumor, que regulam a proliferação e apoptose celular (ZENG et al., 2005).

Adenocarcinomas (câncer maligno glândular) geralmente se apresentam na zona externa enquanto a hiperplasia benigna da próstata (BPH) ocorre mais freqüentemente na zona de transição (CUNHA et al., 2004). Na zona central raramente há ocorrência do câncer, apesar de ser invadida, não raramente por tumores volumosos (STEVENS, 1998). A glândula e sua localização anatômica pode ser visualizada na Figura 2 .

Figura 2- Desenho esquemático da próstata normal e a glândula com hiperplasia benigna da próstata (BPH). A próstata normal não bloqueia o fluxo de urina ou comprime a bexiga, ao contrário da próstata alargada, que pressiona a bexiga e a uretra, bloqueando o fluxo da urina.



FONTE: http://www.upmccancercenters.com/pdq_xml/cancer.cfm?id=113

1.1.3. Etiologia

Fatores de risco podem ser determinantes na ocorrência de cânceres. Para o câncer de próstata podemos enumerá-los a seguir:

Tabela1- Fatores de prognóstico no câncer de próstata. A tabela a seguir aponta os fatores que predispoem ao câncer de próstata. Tais fatores estão interligados, mas apenas por uma questão didática, aqui eles se apresentam de maneira separada.

Fator	Característica
Idade	Associado tanto ao carcinoma clínico quanto ao histológico. A idade é um fator de risco importante, ganhando um significado especial no câncer da próstata, uma vez que tanto a incidência quanto a mortalidade aumentam exponencialmente após os 50 anos de idade.
Etnia	O carcinoma de próstata é mais freqüente em negróides em relação aos caucasóides.
Fatores genéticos	Caracterizado como uma herança autossômica dominante. Histórico familiar de pai ou irmão com câncer da próstata pode aumentar o risco de 3 a 10 vezes em relação à população em geral, podendo refletir tanto fatores hereditários quanto hábitos alimentares ou estilo de vida de risco de algumas famílias.
Hormônios	Andrógenos são necessários para o desenvolvimento normal da próstata. Indivíduos castrados têm possibilidade mínima de desenvolverem o câncer. Desconhece-se, no entanto, o papel exato na carcinogênese prostática, no entanto, sabe-se que a medida em que os níveis de testosterona diminuem, a incidência do câncer de próstata aumenta.
Dieta	A influência que a dieta pode exercer sobre a gênese do câncer ainda é incerta, não sendo conhecidos os exatos componentes ou através de quais mecanismos estes poderiam estar influenciando o desenvolvimento do câncer da próstata. Contudo, já está comprovado que uma dieta rica em frutas, verduras, legumes, grãos e cereais integrais, e com menor teor de lipídios, principalmente as de origem animal contribuem para uma vida saudável.

Fonte: Adaptada de BOGLIOLO, 2000 & INCA, 2002.

1.1.4. Aspectos clínicos

A graduação histológica para diferenciação do câncer de próstata é determinada por uma escala designada de escore de Gleason. A partir desta, considera-se que quanto mais diferente estiver a célula cancerosa em relação às células normais, mais agressivo se apresentará o tumor e mais rápida será sua disseminação (TRUE et al., 2006). Essa escala vai do grau 1 ao 5 em complexidade, como segue:

- Grau 1: as células prostáticas apresentam-se uniformes, densamente agrupadas, com bordos bem definidos e com pouco estroma entre si.
- Grau 2: as células variam em tamanho e forma, com glândulas uniformes, frouxamente agrupadas e com bordos irregulares.
- Grau 3: as células podem variar em tamanho e forma, sendo muito pequenas individualizadas ou espalhadas pelo estroma; ou fusiformes com bordas lisas.
- Grau 4: muitas células da próstata estão fusionadas, com glândulas irregulares distribuídas anarquicamente, infiltração e invasão de tecidos adjacentes.
- Grau 5: tumor anaplásico. A maioria das células está agrupada em grandes massas que invadem os órgãos e tecidos vizinhos. A massa de células pode exibir necrose central. Pode não haver diferenciação glandular (INCA, 2002).

A retenção urinária, pela compressão da uretra, é um sintoma importante pois este é o motivo da busca por um diagnóstico. Entretanto, quando esse sintoma ocorre o câncer pode estar em estágio clínico avançado e com conseqüente pequena sobrevida. Este sintoma também pode ocorrer na BHP, sendo portanto bastante controverso tanto os achados clínicos quanto os laboratoriais relacionados à análise dos níveis de PSA.

1.1.5. Diagnóstico e tratamento

A detecção molecular das células tumorais circulantes e micrometástases surgem como marcadores do prognóstico para o câncer de próstata. A detecção de células malignas circulantes vem sendo feita através da técnica altamente sensível de reação em cadeia pela polimerase, após transcrição reversa do mRNA para

cDNA (RT-PCR). Estes ensaios são, em grande maioria, dirigidos contra marcadores teciduais específicos da próstata.

Segundo a revisão de Hamdy (2001), a ausência de terapias capazes de curar este câncer torna seu diagnóstico precoce muito importante. O Exame Digital do Reto (DRE) ainda é de grande eficácia, mesmo em fases iniciais, no entanto, somente as porções posterior e lateral da próstata podem ser apalpada, alcançando apenas metade dos tumores, sem diminuir, no entanto, sua especificidade que pode chegar a 68% (INCA, 2002).

Outras ferramentas utilizadas incluem a biópsia, orientada pelo uso do Ultrassom Transretal da Próstata (TRUS), que permite determinar o volume prostático e a extensão local da doença, a análise dos níveis do antígeno prostático específico (PSA) e o escore de Gleason, comentado anteriormente (item 1.1.5. Aspectos clínicos) (ROBBINS, 1996).

O PSA é produzido pelas células epiteliais e pelo ducto da glândula prostática, sendo secretado para a liquificação do coágulo seminal que adiciona ao esperma mobilidade e cria condições que levam à fertilização (MAKAROV e CARTER, 2006; BOGLIOLO, 2000). O PSA é uma glicoproteína monomérica pertencente à família das serina proteases, com 237 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular de 35 kDa.

A análise do PSA é efetuada desde 1966. Inicialmente esta molécula foi designada de γ SM (gama seminoproteína) e foi utilizada como um marcador forense (MAKAROV e CARTER, 2006). Em 1979 foi descrito no plasma seminal por Wang et al. Sua dosagem no soro é um recurso terapêutico que, no entanto, pode gerar resultados falso-negativos e falso-positivos. Isso ocorre pois seus níveis podem se apresentar elevados em prostatites, infartos, cirrose, embolias pulmonares, osteoporose, metástases ósseas não-prostáticas e em casos de hiperplasia normal da próstata (BOGLIOLO, 2000; FERREIRA et al., 2004).

Segundo recente revisão de Makarov e Carter (2006), estudos demonstram que níveis de PSA de 4,0 ng/ml tiveram alta sensibilidade e especificidade na detecção do câncer de próstata e que níveis abaixo disto estão associados a um risco insignificante de desenvolvimento do câncer. No entanto, ressalta-se que seu uso deve ser associado a outros aspectos clínicos, histológicos e patológicos da doença (HAMDY, 2001).

De acordo com várias pesquisas, existem três principais opções de tratamento voltadas para o câncer de próstata: o de observação vigilante, que se aplica apenas às manipulações hormonais baseadas na regressão ou progressão do antígeno prostático; a prostatectomia radical baseada nos parâmetros de estágio patológico e grau (ou score) de Gleason (KUMAR et al., 1999); e o combinado, que seria uma mescla entre fármacos e radioterápicos (HAMDY, 2001).

Quimioterapias e radioterapias locais por braquiterapia ou não, fazem parte do tratamento paliativo do câncer de próstata. Pacientes que apresentam a doença confinada ao órgão possuem uma grande chance de cura através da terapia definitiva. As duas modalidades terapêuticas mais adotadas são a prostatectomia radical e a irradiação, com taxa de sobrevivência de mais de 90% em 10 anos. Embora eficientes no tratamento, as duas metodologias apresentam complicações que podem afetar a qualidade de vida do paciente, dentre as quais destacam-se a impotência e a incontinência urinária (INCA, 2001; CHANG, 2006; HAMDY, 2001).

Como qualquer tratamento de câncer, todos apresentam seu risco *versus* benefício e a mescla deles visa uma resposta adaptativa e positiva do paciente. A escolha de tais métodos varia com a clínica e conseqüentemente com a resposta (CHANG, 2006).

1.2. Marcadores moleculares em câncer de próstata

A dificuldade de um prognóstico mais preciso para a detecção do câncer de próstata têm gerado pesquisas em busca de novos biomarcadores de maior poder discriminatório, capazes de auxiliar no tratamento. Perfis de expressão gênica utilizando-se da técnica de microarranjo de DNA, demonstraram que o gene EZH2 é um marcador tecidual superexpresso em câncer de próstata metastático (WEI, 2002). Este gene apresenta-se refratário ao tratamento hormonal com atividade relacionada a um pior prognóstico, sendo assim considerado um potencial marcador de progressão (TAVTIGIAN et al., 2001; VARAMBALLY et al., 2002; FERREIRA et al., 2004).

O gene P504S também foi recentemente descrito como um gene específico para o câncer de próstata. Este codifica uma proteína envolvida na beta oxidação de ácidos graxos e mostrou-se, por imuno-histoquímica, que seu produto de expressão

constitui um marcador sensível e específico para carcinoma de próstata em tecidos parafinados fixados em formol (RUBIN et al., 2002).

Foi verificado que indivíduos não-haplóides para o gene ANXA7 (localizado no cromossomo humano 10q21) possuem um equilíbrio de expressão sendo sua perda observada em indivíduos portadores desta neoplasia. Sua haploinsuficiência por homozigose é portanto ineficaz para o seu controle negativo do ciclo celular, tornando-se outro marcador molecular (DONG, 2006).

O gene BRCA1 está localizado no cromossomo 17q21 e codifica uma proteína que tem sido implicada na regulação do ciclo celular. Este gene tem importância em diferentes tipos de cânceres, e não possui uma relação direta com o câncer de próstata. Já o gene presente no cromossomo 13q12, o BRCA2 têm-se mostrado um fator de risco para o câncer de próstata e suas evidências apontam para o desenvolvimento do câncer em indivíduos jovens. Similarmente ao BRCA1, estudos clínicos mostram que mutações no gene BRCA2 são raras e dependentes de um histórico familiar (SCHAID, 2004).

O gene GSTP1 vem sendo estudado para ser utilizado com um marcador de prognóstico e exclusão de câncer de próstata ou BPH, e, por estar relacionado diretamente à epigenética, suas características serão enumeradas com maiores detalhes posteriormente.

1.3. Mecanismos moleculares do câncer

Na próstata normal, assim como no câncer em geral, há um contrabalanço entre variados processos, como a atividade proliferativa e apoptótica das células (ZENG et al., 2005). Algumas explicações têm sido sugeridas para a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo neoplásico. Dentre elas, a proposta de Hanahan e Weinberg et al. (2000) é a mais recente e aceita. Segundo eles, existem seis alterações fisiológicas celulares comuns à maioria dos cânceres, expostas a seguir:

- Auto-suficiência em fatores de crescimento: as células tumorais são capazes de sintetizar fatores de crescimento próprios e de produzir em excesso os receptores para tais fatores, amplificando a resposta. Além disso, são

capazes de promover a difusão do sinal estimulador sem o ligante externo por promover alterações na conformação do receptor.

- Insensibilidade a fatores inibitórios de crescimento: os mecanismos que inviabilizam a multiplicação celular podem ser evitados pela síntese de moléculas promotoras da divisão celular.
- Evasão à apoptose: em alguns tumores a hiperexpressão do oncogene BCL-2 (elemento anti-apoptótico) e a inativação do *p53* são estratégias que permitem o escape do processo fisiológico da apoptose.
- Potencial replicativo ilimitado: nas células tumorais ocorre a imortalização, ou seja, duplicação infinita dessas células, devido a um aumento da expressão da enzima telomerase. Esta é responsável por acrescentar fragmentos na extremidade do cromossomo, impedindo a redução progressiva do telômero.
- Angiogênese sustentada: o tumor é capaz de promover a formação de um aporte vascular para obtenção de oxigênio e nutrientes, que é induzido por diversos fatores, sendo o principal deles, o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF).
- Invasão tecidual/ metástase: alguns estudos apontam as moléculas de adesão intercelulares e as proteases como os principais elementos envolvidos no processo de desagregação da massa tumoral e migração para outros tecidos, via circulação sangüínea.

1.4. Epigenética e câncer

Os mecanismos que desencadeiam o câncer podem incluir as alterações genéticas (amplificação gênica, deleções, mutações de ponto, perda de heterozigossidade e rearranjos cromossômicos) e epigenéticas (ADORJAN et al., 2002, BAYLIN, 2002, BAYLIN e BESTOR, 2002, ISSA, 2002, ANTEQUERA, 2003, LOEB et al., 2003, MOMPARDLER, 2003).

Epigenética é o termo aplicado às mudanças na expressão de um gene que não decorre de alteração na seqüência dos nucleotídeos. Nos últimos dez anos, diversos trabalhos indicam um papel essencial das mudanças epigenéticas na tumorigênese. As principais alterações epigenéticas que ocorrem durante o desenvolvimento de um tumor são anormalidades na metilação de genes

supressores tumorais ou proto-oncogenes e modificações das histonas (MOMPARLER, 2003).

A molécula de DNA dos eucariotos está associada às histonas, formando a cromatina. Estas possuem uma extensão amino-terminal chamada de “cauda”, na qual podem ocorrer modificações covalentes importantes para a organização dos cromossomos e para a regulação dos genes. A desacetilação das histonas causa uma mudança na estrutura da cromatina, deixando-a condensada e inacessível à DNA polimerase e, portanto, inativando a transcrição (VERMA et al., 2002).

As citosinas podem sofrer um processo auto-catalítico, com perda de um grupo amina, e se transformar em uracila. Evolutivamente, observa-se a metilação da citosina e a redução na frequência de dinucleotídeos CG do genoma humano. (VERMA e SRIVASTAVA, 2002). O padrão de metilação em células normais é conservado depois da replicação e divisão celular por DNA metiltransferases, como a DNMT1 (BESTOR et al., 1988). Estas enzimas promovem a adição de um grupo metil no carbono 5' da citosina em dinucleotídeos CG (CHEN et al., 1991). Sabe-se que alterações nas histonas afetam a metilação, pois a desacetilação destas proteínas é o primeiro passo que desencadeia o recrutamento das metiltransferases para as ilhas de CpG, promovendo a hipermetilação da região promotora (VERMA et al., 2002).

Apesar da diversidade entre promotores, genes transcritos pela RNA polimerase II podem ser classificados em dois grupos diferentes de acordo com a distribuição de dinucleotídeos CpG. Em uma classe, a frequência de CpGs é a mesma que a encontrada no genoma em geral, que é em torno de 1 para cada 100 nucleotídeos (ANTEQUERA, 2003). Por outro lado, alguns genes pertencentes ao segundo grupo apresentam na região 5', aproximadamente a 1 kb do início do gene, uma frequência de CpGs 10 vezes maior que no restante do genoma. Essas regiões são chamadas de Ilhas de CpG (BIRD, 1986). Aproximadamente 60% dos genes humanos estão associados a ilhas CpG, isso inclui os genes constitutivos e aqueles tecido-específicos. As ilhas de CpG podem ter uma alta frequência de metilação, com transformações relativas na estrutura da cromatina que bloqueiam a transcrição de genes (VOET & VOET, 2000).

De uma maneira geral, a metilação do DNA impede a expressão gênica inibindo a transcrição através de dois mecanismos. Primeiramente, os dinucleotídeos

CpG metilados interferem na ligação dos fatores de transcrição ao promotor do gene (RAZIN e RIGGS, 1980). Além disso, as citosinas metiladas são reconhecidas por proteínas que se ligam ao grupamento metil ("*methyl binding proteins*") e competem com os fatores de transcrição pelo sítio do promotor (MCCLELLAND e IVARIE, 1982). As "*methyl binding proteins*" podem ainda atrair complexos protéicos contendo co-repressores e histona deacetilases. A ligação destes complexos no DNA leva a um remodelamento na estrutura da cromatina para uma forma mais compacta, inativando a transcrição gênica (NAN et al., 1998).

Nos últimos anos evidenciou-se a presença de ilhas de CpG em um grande número de genes, em geral, não metilados em tecidos normais e metilados em tecidos cancerosos (WIDSCHWENDTER e JONES, 2002). Em células de tecidos normais as regiões intergênicas são hipermetiladas, enquanto as regiões promotoras são hipometiladas. Em células cancerosas esta situação se inverte.

1.4.1. Carcinogênese e metilação do DNA

A possível associação entre metilação e câncer surgiu da observação de que grande parte dos genes supressores de tumor continha ilhas de CpG nas suas seqüências regulatórias e, geralmente, o padrão de metilação do DNA apresentava-se alterado em células tumorais (SCHMUTTE e JONES, 1998; BAYLIN et al., 2002). A primeira constatação da presença de metilação em ilhas de CpG de um gene supressor de tumor humano foi feita por GREGER et al., em 1989, quando estudava o gene retinoblastoma (Rb).

Os mecanismos epigenéticos nos permitem fixar as heranças das propriedades celulares e no câncer de próstata, esses mecanismos são essenciais para o desenvolvimento, progressão, complementação, amplificação e diversidade das alterações genéticas. A hipermetilação do DNA afeta ao menos 30 genes individuais, enquanto seqüências repetitivas incluindo retrotransposons e genes seletos tornam-se hipometilados (SCHULZ, 2006).

Uma vantagem clara do estudo da metilação de genes como marcadores epigenéticos em tumores é que, para cada câncer, a hiper ou hipometilação acontece sempre na mesma região de um determinado gene, ao contrário das mutações, que ocorrem em qualquer porção dos genes e podem ser de diferentes

tipos. Além disso, a hipermetilação pode ser detectada mesmo em meio a um grande número de células normais, enquanto outras alterações genéticas como a perda de heterozigose (LOH) ou deleções homozigóticas não são detectadas nesse contexto (ESTELLER, 2002). A relevância disto têm sido reforçada pelo emprego de tecnologia genômica para estudo diferencial da metilação de genes em larga escala, através de análise de microarranjo de DNA (*microarrays*) de amostras de tecidos normais e de câncer. Esses trabalhos correlacionam perfis de metilação alterados em determinados dinucleotídeos CpG com a progressão para a doença maligna (ADORJÁN et al., 2002) e associam a hipermetilação global a um pior prognóstico ou recorrência após o tratamento (WEI et al., 2002).

1.4.2. Metilação do DNA e câncer de próstata

Trabalhos recentes em câncer de próstata sugerem que o gene $p21^{WAF1/CIP}$ é inativado por metilação. Nas três linhagens metastáticas celulares trabalhadas de câncer de próstata (PC3, LNCaP, DU145) a expressão deste gene foi baixa ou indetectável, mas foi altamente expressa na linhagem celular epitelial da próstata normal (1542NP). Tratamentos com compostos específicos que alteram a metilação do DNA modificaram os níveis de expressão $p21^{WAF1/CIP}$ das linhagens (BOTT et al., 2005).

Outros trabalhos envolvendo as tirosinas quinases receptoras (que representam uma classe maior de protooncogenes) mostram que a família do *erbB/EGFR* é a mais freqüentemente implicada em cânceres humanos. A co-expressão do *erbB/EGFR* (transformando o fator de desenvolvimento α -EGF) é uma ocorrência comum em vários cânceres de origem epitelial, sendo demonstrado inclusive nas três linhagens celulares de câncer de próstata vastamente utilizadas (PC3, DU145, e LNCaP) (ROBINSON et al., 1996).

Genes pertencentes à família das glutathiona S-transferases estão envolvidos na carcinogênese e nas reações oxidativas de algumas espécies, podendo expor o genoma a níveis de stress e instabilidade no câncer. Estudos mostram que a hipoexpressão do GSTP1 é comum no câncer de próstata tornando um mecanismo primário de detecção (DONG, 2006). Sua total ausência em tecidos normais de

próstata e a ocorrência de ilhas de CpG presentes em pacientes com câncer fazem deste gene um importante biomarcador epigenético (BASTIAN, 2005).

Estudos ainda avaliando a metilação em tecidos de tumores verificaram que os genes GSTP1 e RARbb2 são freqüentemente metilados em tumores de próstata (>90% dos tumores) e em lesões pré-invasivas (aproximadamente 50% das neoplasias intra-epiteliais de próstata em alto-grau). Inversamente, CD44 metilados e outros genes metilados que são associados com fenótipos de doenças agressivas não estão presentes nas lesões neoplásicas intraepiteliais de próstata em alto-grau, mas são encontrados com uma freqüência maior em tumores de alto-grau. Esse estudo, apresenta a primeira evidência de que essas alterações funcionais denotam que a metilação genética em um campo de tumor epitelial e estroma tumor-associado têm implicações na prevenção do câncer, tratamento, e diagnóstico (HANSON, 2006).

Mutações no *p53* são raras no câncer de próstata primário, mas como na maioria dos cânceres, torna-se mais comum à medida que aumenta seu estadio, grau tumoral ou metastático. Alterações neste gene estão associadas ao aumento na incidência de metástases à distância e decréscimo na sobrevida (DONG, 2006).

1.5. A quiescência celular e o câncer

A quiescência é o processo que envolve a saída das células do ciclo celular proliferativo para a fase G₀, ou seja, uma fase na qual ocorre a parada da replicação celular e eventualmente conduz a apoptose.

As quiescinas, também designadas de quiescinas sulfidril oxidases (QSOX), catalisam a reação de oxidação de ditióis protéicos, introduzindo pontes dissulfeto, reduzindo o oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (HOBBER, 1999).



Tais moléculas são flavoenzimas compostas pelo domínio tioredoxina (TRX) e pelo domínio EVR/ALR (HOOBER et al., 1999). As tioredoxinas, como a proteína dissulfeto isomerase, são pequenas proteínas constituídas por 95 a 110 aminoácidos que atuam em processos redox celulares (HOLMGREN, 1989;

FERRARI e SOLING, 1999, apud HOOBER, 1999). O último domínio (EVR/ALR) está envolvido com a regulação do ciclo celular em leveduras e na biogênese da mitocôndria (LISOWISKY, 1998, apud HOOBER, 1999). A ALR1 presente em mamíferos, um homólogo do EVR, é uma proteína composta de 125 aminoácidos envolvidos nos processos de desenvolvimento celular na espermatogênese e na regeneração do fígado (HAGYIA et al., 1994; LISOWISKY, 1998, apud HOOBER, 1999).

Coppock et al., em 1993, estudando a saída do estado proliferativo e a entrada no estado de quiescência reversível (G0), com cultura de células WI38 como modelo, isolou clones de cDNAs altamente expressos em células quiescentes. Eles observaram que tais genes eram muito semelhantes aos genes do colágeno alfa1 (VI), colágeno alfa1 (III), decorina, complemento C1r, colágeno 1 (I), colágeno alfa 2 (I) e a dois novos genes denominados Q6 (QSCN6) e Q10 (QSCN6L1).

A expressão do gene da Q6 também foi estudada em linhagens celulares de carcinomas mamários em que se constatou a expressão de dois tamanhos de RNAm e baixos níveis de expressão em linhagens positivas para receptor de estrógeno (COPPOCK et al., 2000).

O gene da Q6 está localizado no cromossomo humano 1q24 e foi caracterizado como uma fusão de duas famílias de gene antigas (COPPOCK et al., 1998). Esta região do genoma contém um locus com potencial para hereditariedade do câncer de próstata 1q24-q25 (HPC1) (SMITH et al., 1996). A expressão deste gene induz os fibroblastos à saída do ciclo proliferativo e entrada na quiescência, sugerindo sua ação direta no ciclo celular. Têm-se mostrado que há regulação epigenética em alguns genes envolvidos no câncer de próstata, e por isso, buscamos identificar a expressão da Q6 dentro destas linhagens. Além disso, uma análise feita através de ferramentas de bioinformática em nosso laboratório mostrou que o gene QSCN6 possui uma região promotora rica em dinucleotídeos CpG, caracterizando uma provável ilha de CpG.

Parmigiani et al., 2004 avaliou o perfil de expressão do gene GSTP1 em diversas linhagens tumorais, entre elas a de próstata, para posterior continuidade dos estudos em tumores de pacientes e verificou que a metilação de genes específicos está associada com a progressão histológica.

Uma outra quiescina denominada Q10 foi também isolada por Coppock et al. (1998) e tem sido recentemente estudada em neuroblastoma, em que se demonstrou um papel pró-apoptótico deste gene, porque foi observado o aumento da susceptibilidade das células tumorais a apoptose induzida por IFN γ (WITTKKE et al., 2003).

A Q10 é codificada por um gene presente no cromossomo 9 (9q34.3) e apresenta apenas um variante transcricional (GenBank entry: NM_181701.2) o qual possui 4582 pares de bases e codifica uma proteína de 77.55 kDa, contendo 698 aminoácidos (ROLLINS, 1997; NCBI, 2006).

1.6. Linhagens tumorais de câncer de próstata

Inicialmente, a técnica de cultivo celular foi elaborada por uma desagregação tecidual e o crescimento foi restringido para a migração de células provenientes do tecido fragmentado, com ocasional mitose de crescimento. Desde que as culturas semelhantes aos explantes primários de tecidos foram implantadas, as técnicas de cultivo celular tiveram uma expansão importante a partir da segunda metade do século XX, quando se utilizaram células de cultura dispersas (FRESHNEY, 2000).

Ainda segundo Freshney (2000), as duas maiores vantagens da cultura de células são o controle do ambiente físico-químico (pH, temperatura, pressão osmótica, e a tensão de O $_2$ e CO $_2$) que possuem uma atividade mais precisa; e as condições fisiológicas, que são relativamente constantes, porém, nem sempre definitivas. Algumas linhagens requerem uma suplementação ao meio de cultura e determinados componentes podem ajudar a entender os fatores de regulação da proliferação celular.

Kaighn et al. (1979) observou a existência de uma linhagem celular proveniente de metástases ósseas e para a adrenal, de um homem caucasiano de 62 anos, com sintomas de retenção urinária, perda de peso e anemia. Esta linhagem foi obtida pela remoção do tecido tumoral na autópsia de uma vértebra lombar e posteriormente foi cultivada. A PC3, como foi designada, possui características androgênicas independentes, sem a interferência de fatores externos como insulina, tiidotironina, transferrina, calcitonina, hidrocortisona, diidrotestosterona e fator de crescimento epidermal no seu crescimento *in vitro*. Esta mesma linhagem apresenta

o número cromossômico totalmente aneuplóidico (alteração no número de cromossomos) com características tumorigênicas em ratos, apresentando muitos marcadores e perdas cromossômicas, como p.ex., a do cromossomo Y (OHNUKI et al, 1980). Suas feições cariotípicas são únicas e características de células altamente neoplásicas e foram submetidas ao ATCC sob numeração CRL1435 (CHEN, 1992). Por micrografia eletrônica as células apresentam-se com numerosas microvilosidades, complexos juncionais incluindo desmossomos com tonofilamentos, mitocôndrias anormais, muitos lisossomos, invaginações do envoltório nuclear e hipertrofia nucleóide.

Outra linhagem de carcinoma prostático isolado de metástases no cérebro de um paciente foi descrita por Stone, em 1978. Esta linhagem semelhante a PC3, também é aneuplóidica e tumorigênica em ratos, contudo seu cariótipo difere significativamente da PC3 e possui poucos marcadores cromossômicos. Tal linhagem foi designada DU145.

2. OBJETIVO

Avaliar os níveis de expressão dos genes QSCN6 e Q10 em linhagens tumorais de próstata pela técnica de PCR com transcrição reversa (RT-PCR).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

As linhagens tumorais de próstata PC3 e DU145 e a linhagem normal de mama HB4a, usada como controle, foram cedidas pelo Instituto Ludwig - São Paulo. A HB4a tem sido utilizada em diversos trabalhos de estudo de câncer de próstata por ser de origem epitelial. A utilização de linhagens celulares se justifica do ponto de vista técnico pela disponibilidade de grandes quantidades de material, assim como pela ausência de contaminação com células normais. Todas as linhagens foram mantidas em nitrogênio líquido no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e foram cultivadas no Departamento de Biologia Celular. As culturas foram manipuladas em câmara de fluxo laminar previamente limpa e descontaminada pelo

uso da lâmpada Ultra Violeta. Também foram utilizados materiais limpos e previamente autoclavados.

Os cultivos das linhagens foram realizados em meio RPMI1640 (meio de cultivo contendo aminoácidos, vitaminas e sais inorgânicos) Gibco, suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10%, antibiótico garamicina (40 µg/ml), para evitar contaminação bacteriana, ciprofloxacina (10 µg/ml), para evitar contaminação por espécies de *Mycoplasma* e insulina (5 µg/ml) no caso da HB4a. Ainda para as linhagens de próstata, foi adicionado ao meio 1% de piruvato de sódio, segundo as especificações da ATCC. As células foram acondicionadas em garrafas plásticas com incubação em câmara úmida a uma atmosfera de CO₂ a 5%, 37°C.

As amostras de células contendo aproximadamente 10⁶ foram retiradas do nitrogênio líquido, descongeladas a 37°C e repassadas dos tubos criogênicos para um tubo tipo *falcon* de 15 ml contendo 2 ml de meio RPMI 1640 aquecido a 37°C. Este tubo foi centrifugado por 4000 rpm (HT 80-2B) por 3 minutos e descartado o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 1 ml de meio de cultivo e repassado cuidadosamente para uma garrafa pequena (24 cm³) contendo aproximadamente 3,5 ml de meio de cultura e acondicionadas na estufa de CO₂ a 5 % tomando o cuidado de deixar a tampa frouxa para que houvesse a troca gasosa. No dia seguinte, este meio foi aspirado com o uso de uma pipeta Pasteur acoplada a bomba de vácuo, para retirada das células mortas e do meio exaurido. Em seguida foram adicionados 3 ml de PBS (tampão fosfato salina) 1x para lavar as células que permaneceram aderidas. Após a aspiração do tampão de lavagem foi adicionado a esta garrafa meio de cultivo novo seguido de incubação para crescimento. Estas trocas de meio eram realizadas cerca de duas a três vezes por semana, ou quando fosse necessário. As células aderidas ou a quantidade de células mortas flutuando na garrafa eram visualizadas em microscópio invertido em 100 ou 400x de aumento da sala de cultivo do Departamento de Biologia Celular.

O total preenchimento da garrafa foi o indicativo para troca de garrafas (transferência para a garrafa média com 80 cm³). Para o desprendimento das células foi adicionado tripsina 0,25% (Gibco), seguido de incubação por 5 minutos em estufa a 37°C, seguido da neutralização da tripsina com meio de cultura e transferência das células para tubos tipo *falcon* de 15 ml. Este tubo foi centrifugado a 3000 rpm

(HT 80-2B) por 3 minutos para precipitação das células. O meio foi descartado e adicionado 1 ml de meio novo para ressuspensão das células. Essa ressuspensão era transferida para a nova garrafa, já contendo o meio de cultura novo, nas quantidades requeridas para cada garrafa (3 ml para a pequena e 15 ml para a média) e levadas à estufa de CO₂.

Para a obtenção das amostras para o presente trabalho, efetuou-se as trocas de 1 garrafa pequena para 1 média e desta média para novas duas médias. De uma garrafa média foi feita a extração de RNA total e da outra novo estoque de células.

3.2. Extração de RNA

Para a manipulação de todo o material foi utilizado o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001). Foram tomadas precauções para evitar a presença de RNase ativa em qualquer material usado, como a autoclavação 2 vezes seguidas de todos os plásticos, vidrarias e reagentes utilizados. O manuseio do material foi realizado em fluxo laminar com o uso de luvas, máscara e touca descartáveis.

O RNA total das linhagens celulares foi isolado utilizando-se o reagente Trizol® (GIBCO BRL, Life Technologies, USA). O RNA foi extraído da seguinte forma: foi acrescentado a garrafa de cultura previamente lavada com tampão PBS 1X, 1 ml de Trizol para cada 10 cm², ou seja, para a garrafa média foram utilizados 8 mL. Em seguida homogeneizou-se e incubou-se a mistura à temperatura ambiente por 5 min. A seguir 1 ml dos lisados foram distribuídos em tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml contendo 250 µl de clorofórmio (MERCK). A mistura foi deixada à temperatura ambiente por mais 5 minutos e centrifugada por 12.000G por 15 min a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado para novo tubo contendo 500 µl de isopropanol e incubado por 18 horas a -20°C. Os tubos foram centrifugados e o RNA foi lavado com etanol 75% em água DEPC. Finalmente, o etanol foi desprezado e o RNA foi seco à temperatura ambiente sobre papel toalha em fluxo laminar. Após a secagem, o RNA total foi ressuspenseo em 15-60 µl de água DEPC autoclavada. A eficiência do RNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1%, especialmente preparado para evitar contaminação com RNases e, a seguir, corado com brometo de etídio. As intensidades relativas das bandas do RNA 18S e do RNA

28S foram avaliadas para verificar a qualidade do RNA. A quantificação do RNA foi feita através da leitura de uma alíquota da amostra no espectrofotômetro em comprimento de onda de 260 nm, considerando-se que 1 DO_{260 nm} equivale a 40 µg/ml de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas. Invariavelmente, o valor dessa relação estava contido na faixa de 1,6 a 1,8.

3.3. RT-PCR

Quinhentos nanogramas de RNA total foram transcritos reversamente à primeira fita de cDNA na presença de 200 U da enzima transcriptase reversa (Superscript II, Gibco BRL), utilizando 25 pmoles do iniciador OLIGO dT em uma reação com volume final de 20 µl, contendo solução tampão 1x, 25 U de inibidor de Rnase (Rnasin, Promega) e 200 µM da mistura de dNTP.

O gene constitutivo GAPDH foi utilizado como controle para analisar a eficiência de síntese do cDNA nas amostras. As seqüências dos iniciadores utilizados para o gene constitutivo GAPDH foram: universal 5` CTG CAC CAC CAA CTG CTT A 3` e reverso 5` CAT GAC GGC AGG TCA GGT C 3`. A eficiência da síntese é importante para que ocorra um anelamento eficaz à cauda poli A, realizada pelos oligos dTs.

3.3.1. Avaliação do padrão de expressão dos genes QSCN6 e Q10 em linhagens tumorais

Iniciadores específicos foram desenhados para a região 3' da molécula de mRNA (trabalho de mestrado que já estava em andamento estudando o gene QSCN6 em mama) para utilização em reações de RT-PCR para avaliar o padrão de expressão gênica em tecido normal e nas linhagens tumorais de próstata. Os iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa Oligotech e posicionados em exons diferentes para que uma eventual contaminação com DNA genômico fosse passível de ser detectada. Para RT-PCR da QSCN6 foram utilizados os primers: universal 5´ TAG CCA CTT CGA GCA GAT G 3´ e reverso 5´ CAC ATC CAG GCG TTC ATT G 3´, sendo esperada a amplificação de um fragmento de 199

pb. As condições utilizadas foram de uma desnaturação inicial do DNA por 10 minutos a 95°C, seguida por 35 ciclos sucessivos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, 62,6°C de anelamento por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final da ciclagem as moléculas foram estendidas por 5 minutos a 72°C. A análise da amplificação foi feita em gel de poliacrilamida 8%.

Para o gene Q10 esta técnica também foi realizada, utilizando-se agora, os seguintes primers universal 5´ GGT GTA AGG AAT GTG GTG 3´ e reverso 5´ TTT CTC CTC TTC CTC ACC 3´. O produto esperado era de 353 pb. As condições utilizadas foram de uma desnaturação inicial do DNA por 10 minutos a 95°C, seguida por 35 ciclos sucessivos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, 59,5°C de anelamento por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final da ciclagem as moléculas foram estendidas por 5 minutos a 72°C. A análise da amplificação também foi feita em gel de poliacrilamida 8%.

Foi realizado também o controle de *Mycoplasma hominis* das linhagens trabalhadas utilizando para isto os primers A (5´GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG 3´) e B (5´CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G 3´), para a síntese e sob as seguintes condições: uma desnaturação inicial do DNA por 5 minutos a 95°C, seguida por 35 ciclos sucessivos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, 60°C de anelamento por minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final da ciclagem as moléculas foram estendidas por 7 minutos a 72°C. A análise da amplificação também foi feita em gel de poliacrilamida 8%. O produto esperado era de 450 pares de bases. Foi feita em gel de poliacrilamida e gel de agarose 1 %.

Para o RT-PCR semi-quantitativo foram realizadas ciclagens de 22, 28 e 35 ciclos para o GAPDH e 28, 35 e 38 ciclos para o gene em questão. As ciclagens de 28 ciclos para o GAPDH e de 35 ciclos para o gene QSOX se encaixaram melhor na nossa análise, portanto, foram nossos parâmetros de comparação no trabalho.

3.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida e em gel de agarose

Os produtos das reações de RT-PCR foram analisados em gel de poliacrilamida e de agarose.

Os géis de poliacrilamida 8% foram preparados a partir de uma solução de poliacrilamida e bis-acrilamida 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 1 hora. O gel foi incubado por três minutos em solução fixadora (0,5% de ácido acético glacial, 10% de etanol absoluto), sob agitação suave, à temperatura ambiente. A esta solução foi adicionado nitrato de prata 10% e o gel permaneceu 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, à temperatura ambiente. Após a revelação, o gel foi incubado em solução fixadora por dez minutos, lavado com água ultrapura e seco em papel celofane.

Os géis de agarose a 1% foram preparados fundindo 1,5 g de agarose em 150 ml de TBE 1x. O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta. A corrida eletroforética foi conduzida por aproximadamente 1 hora utilizando-se uma voltagem de 80-100 V.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração do RNA

As linhagens tumorais de próstata PC3 e DU145 e a linhagem imortalizada de mama, HB4a foram cultivadas para posterior realização da extração do RNA. O gel contendo os produtos purificados pode ser visualizado nas Figuras 3 e 4.

Figura 3- RNA total extraídos das linhagens HB4a e PC3. O gel apresenta-se com eficiente extração pela boa visibilidade das bandas correspondentes ao RNA 18s E RNA 28S. Gel de agarose 1% representando o perfil de extração dos RNAs extraídos das linhagens HB4a e PC3. Amostras: 1. marcador molecular 100bp, 2-5. RNAs HB4a, 6. marcador molecular 100bp, 7-10. RNA-PC3.

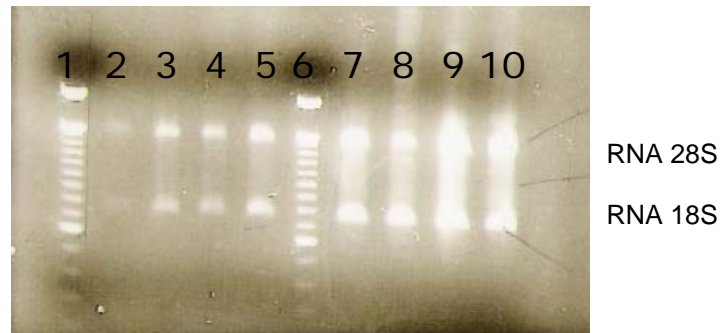
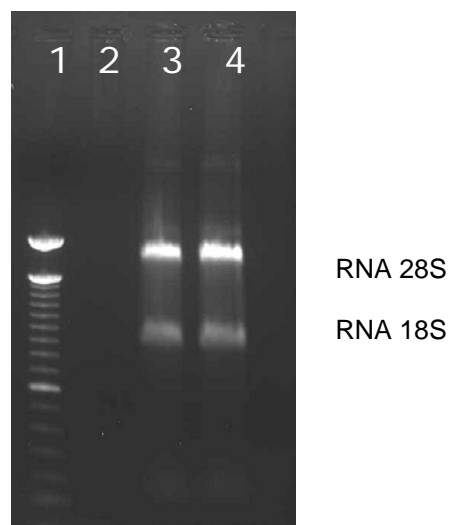


Figura 4- RNAs extraídos da linhagem DU145. O gel apresenta-se com eficiente extração pela boa visibilidade das bandas correspondentes ao RNA 18s E RNA 28S. Gel de agarose 1% representando o perfil de extração dos RNAs extraídos da linhagem DU145. Amostras: 1. marcador molecular 100bp, 2. amostra com problemas na extração, 3-4. RNA-DU145.



A análise dos géis mostra que as bandas 18S e 28S estão bem visíveis (sendo as bandas correspondentes aos RNAs ribossômicos) tendo a primeira o dobro da intensidade da segunda. Entre as bandas há um arraste correspondente ao RNA mensageiro. Este resultado mostra que a extração de RNA total foi eficiente pois parece haver quantidade e qualidade, além da ausência de DNA genômico. Assim sendo foi possível passar para a próxima etapa .

Foi feita a quantificação das amostras para verificar o grau de pureza, ou contaminação por proteínas. Foi utilizado o espectrofotômetro do Departamento de Genética desta Universidade. A quantificação foi feita com as amostras diluídas de 1:100 e os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2- Quantificação dos RNAs extraídos da HB4a, PC3 e DU145 (diluição 1:100). Nesta tabela estão representados os dados obtidos por espectrofotometria. Os valores de razão são obtidos a partir da divisão entre a absorbância obtida do DO₂₆₀ pela DO₂₈₀. Quanto mais próximo de 2, melhor foi a extração do RNA.

RNA	DO	ABSORBÂNCIA	RAZÃO	CONCENTRAÇÃO
HB4a	260	0,043	1,936	166,1 µg/ml
	280	0,026		
PC3	260	0,079	1,91	326 µg/ml
	280	0,045		
DU145	260	0,177	1,687	669,5 µg/ml
	280	0,106		

Por esses dados observamos que a razão está indicando eficiência da purificação com ausência de quantidades significativas de proteínas. Depois de quantificadas as amostras, utilizamos aproximadamente 500 ng de RNA total para a síntese de cDNA. Para verificarmos a eficiência da síntese de cDNA utilizamos como controle o gene constitutivo GAPDH. Nas Figuras 5 e 6 é possível visualizar a banda de 296 pb esperada, mostrando que a purificação de RNA foi realmente qualitativamente satisfatória. Ou seja, é possível concluir que a expressão do gene constitutivo está bem representada na amostra. Além disso, novamente confirmamos

a ausência de DNA genômico devido ausência da banda de 489 pb que representaria a presença do íntron.

Figura 5- RT-PCR do gene GAPDH das amostras das linhagens HB4a e PC3. Gel de poliacrilamida 8% representando a expressão do gene constitutivo GAPDH nas linhagens HB4a e PC3. Amostras: 1. marcador molecular 100bp, 2. controle negativo, 3-6. GAPDH-HB4a, 7-10. GAPDH-PC3.

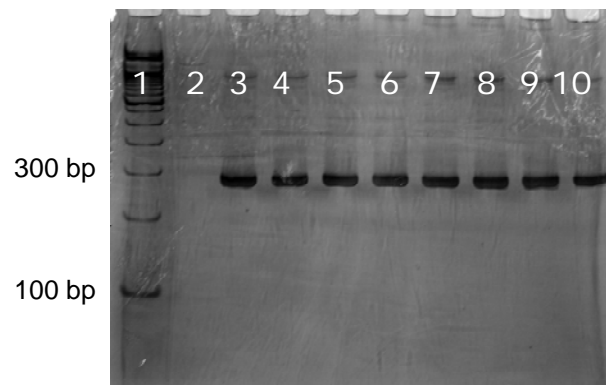
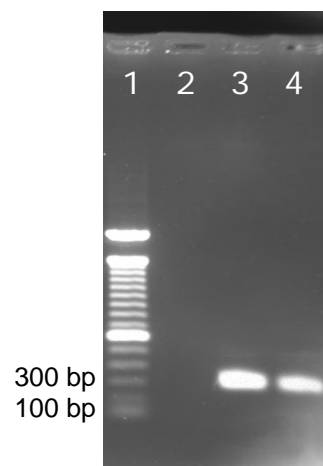


Figura 6- RT-PCR do gene GAPDH de amostras da linhagem DU145. Gel de agarose 1% representando a expressão do gene constitutivo GAPDH na linhagem DU145. Amostras: 1. marcador molecular 100bp, 2. controle negativo, 3-4. GAPDH-DU145.



4.2. Padrão de expressão dos genes Q6 e Q10.

Para analisar se os genes de estudo apresentam diferença de expressão nas linhagens tumorais de próstata utilizamos 2 controles. Primeiro utilizamos a linhagem normal imortalizada de células de mama humana, a linhagem HB4a, como controle de célula epitelial normal, conforme observado em diversos trabalhos publicados anteriormente. O segundo controle foi a expressão do gene GAPDH, o qual se espera estar sendo expresso constitutivamente em todas as linhagens em quantidade maior do que qualquer outro gene que não seja constitutivo. Com este segundo controle podemos sugerir que a presença do gene em estudo pode estar sendo regulado ou não. Para tanto, a fim de discriminar as diferenças de expressão utilizamos a reação de RT-PCR com 28 ciclos de amplificação para o gene constitutivo GAPDH e com 35 ciclos para o gene estudo.

Os resultados de RT-PCR para os genes Q6 e Q10 estão mostrados nas Figuras 7 e 8.

Figura 7- RT-PCR Q6 35X e GAPDH 28X. Gel de agarose 1% representando a expressão do gene constitutivo GAPDH e do gene Q6 nas linhagens HB4a, PC3 e DU145. Tamanho do fragmento esperado: GAPDH. 296 pb, Q6. 199 pb.

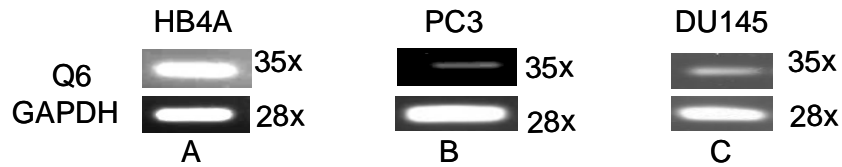
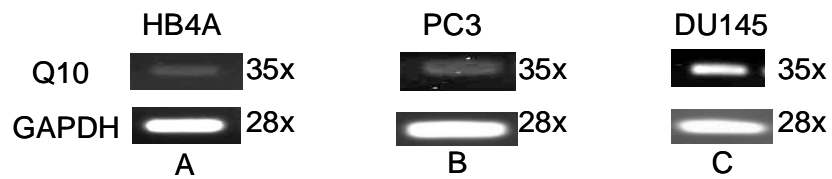


Figura 8- RT-PCR Q10 35X e GAPDH 28X. Gel de agarose 1% representando a expressão do gene constitutivo GAPDH e do gene Q10 nas linhagens HB4a, PC3 e DU145. Tamanho do fragmento esperado: GAPDH. 296 pb, Q10. 353 pb.



A análise dos géis nos permite observar que a linhagem epitelial normal usada como controle de expressão dos genes de estudo apresenta a banda do gene controle GAPDH com 35 ciclos como já visto anteriormente (Figura 7A). Ainda, esta linhagem expressa o gene Q6 com 28 ciclos como esperado. Nas linhagens de estudo PC3 (Figura 7B) e DU145 (Figura 7C) o gene Q6 apresenta diminuição da expressão ou seja a banda com 35 ciclos mostra-se mais fraca quando comparada com a linhagem controle e com o gene controle. Com este resultado preliminar podemos sugerir que o gene Q6 apresenta-se com expressão regulada nas linhagens de próstata. A confirmação deste resultado deve ser realizada com ensaios de RT-PCR semi-quantitativo seguido de Southern blot, utilizando como sonda o gene Q6 clonado ou, ainda, através de PCR em tempo real. Em confirmando essa suposição torna-se possível prosseguir o estudo buscando elucidar se a regulação observada deve-se ou não pela presença da ilha de CpG na região promotora do gene Q6. Ou seja, se a regulação é devido a metilação do DNA. Estes ensaios envolvem isolamento de DNA das linhagens, seguido de tratamento com bissulfito de sódio que atua como agente desmetilante *in vitro*, seguido de clonagem da ilha de CpG do gene Q6 e sequenciamento.

Com relação ao gene Q10 os resultados estão mostrados na Figura 8. Observamos que o gene Q10 possui uma expressão mínima na linhagem controle (Figura 8A). Portanto para este gene não temos no momento um controle adequado para interpretar os resultados. A linhagem PC3 apresenta expressão similar a HB4a (Figura 8B). Além disso colocamos também em questão o uso da linhagem HB4a como controle. Isto porque esse gene apresentou expressão mais intensa na linhagem DU145 (Figura 8C). Portanto nossos dados não são conclusivos para análise do gene Q10.

5. CONCLUSÃO

Através deste trabalho podemos sugerir que existe regulação de expressão do gene Q6 nas linhagens tumorais de próstata PC3 e DU145.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADORJAN, P.; DISTLER, J.; LIPSCHER, E.; MODEL, F.; MULLER, J.; PELET, C.; BRAUN, A.; FLORL, A.R.; GUTIG, D.; GRABS, G.; HOWE, A.; KURSAR, M.; LESCHE, R.; LEU, E.; LEWIN, A.; MAIER, S.; MULLER, V.; OTTO, T.; SCHOLZ, C.; SCHULZ, W.A.; SEIFERT, H.H.; SCHWOPE, I.; ZIEBARTH, H.; BERLIN, K.; PIEPENBROCK, C. AND OLEK, A. **Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis**. *Nucleic Acids Res.*, 30:21, 2002.
- ANTEQUERA, F. **Structure, function and evolution of CpG island promoters**. *Cell Mol. Life Sci.* 60: 1647-1658, 2003.
- BASTIAN, P. J.; PALAPATTU, G.S.; LIN, X.; YEGNASUBRAMANIAN, S.; MANGOLD, L.A.; TROCK, B.; EISENBERGER, M.A.; PARTIN, A.W.; NELSON, W.G. **Preoperative serum DNA GSTP1 CpG island hypermethylation and the risk of early prostate-specific antigen recurrence following radical prostatectomy**. *Clin Cancer Res.* 11:4037-4043, 2005.
- BAYLIN, S. AND BESTOR, T. H. **Altered methylation patterns in cancer cell genomes: cause or consequence?** . *Cancer Cell.* 1: 299-305, 2002.
- BESTOR T.; LAUDANO A., MATTALINO R.; INGRAM V. **Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domains of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases**. *J. Mol. Biol.* 203:971-983. 1988.
- BIRD, A. **CpG-rich islands and the function of DNA methylation**. *Nature*, 321: 209-213. 1986.
- BOTT, S.R.J; ARYA, M.; KIRBY, R.S.; WILLIAMSON, M. **p21^{WAF1/CIP1} gene is inactivated in metastática prostatic cancer cell lines by promoter methylation**. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases.* 8: 321-326, 2005.

Câncer de Próstata. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/cancer/prostata>> Acesso em: 13 mar 2006.

CHANG, S.S. **Management of high risk metastatic prostate cancer: defining risk at the time of initial treatment failure.** The Journal of Urology. 176: S57-S60, 2006

CHEN, L.; MACMILLAN, A.M.; CHANG W.; EZAZ-NIKPAY K.; W.S LANE AND G.L. VEREDINE. **Direct identification of the active site nucleophile in a DNA (cytosine-5) methyltransferase.** Biochemistry. 30:11018-11025. 1991.

CHEN, T.R. **Chromosome identity of human prostate cancer cell lines, PC-3 and PPC-1.** Cytogenet Cell Genet. 62: 183-184, 1993.

CHOMCZYNSKI, P. AND SACCHI, N. **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** Anal.Biochem., 162: 156-159, 1987.

COPPOCK, D.L.; KOPMAN, C.; SCANDALIS, S.; GILLERAN, S. **Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts.** Cell Growth & Differ. 4:483-493, 1993.

COPPOCK, D.L.; CINA-POPPE D.; GILLERAN, S. **The quiescin Q6 (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: thioredoxin and ERV1.** Genomics. 54: 460-468, 1998.

COPPOCK, D.L.; KOPMAN, C.; GUDAS, J. AND CINA-POPPE, D.A. **Regulation of the quiescence-induced genes: quiescin Q6, decorin, and ribosomal protein S29.** Bioch. and Bioph. Res. Comm., 269: 604-610. 2000.

CUNHA, G.R.; RICKE, W.; THOMSON, A.; MARKER, P.C.; RISBRIDGER, G.; HAYWARD, S.W.; WANG, Y.Z.; DONJACOUR, A.A.; KURITA, T. **Hormonal,**

cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic development.
Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 92: 221-236, 2004.

DANIEL J. SCHAID. **The complex genetic epidemiology of prostate cancer.**
Human Molecular Genetics. 13: 103-121. Review, 2004.

ESTELLER, M. **CpG islands hipermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future.** Oncogene, 21: 5427-5440. 2002.

FERREIRA, C.G. ; ROCHA, J.C.C. . **Oncologia Molecular.** São Paulo: ed Atheneu: 2004. p. 219-224.

FRESHNEY, I.R. **Culture of animal cells:** a manual of basic technique. Wiley-Liss Publication: 4 ed., 2000.

FILHO, G.B. **Bogliolo patologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 6^o ed, 2000.

HAMDY, F.C. **Prognostic and predictive factors in prostate cancer.** Cancer treatment reviews, 27: 143-151, 2001.

HANSON J. A.; GILLESPIE J.W.; GROVER A.; TANGREA M.A.; CHUAQUI R.F.; EMMERT-BUCK M.R.; TANGREA J.A.; LIBUTTI S.K.; LINEHAN W.M.; WOODSON K.G. **Gene Promoter Methylation in Prostate Tumor – Associated Stromal Cells.** J Natl Cancer Inst. Feb 15;98(4):255-261, 2006.

HOOBER, K. L.; GLYNN, N. M.; BURNSIDE, J.; COPPOCK, D. L.; THORPE, C. **Homology between egg white sulfhydryl oxidase and quiescin Q6 defines a new class of flavin-linked sulfhydryl oxidases.** J Biol Chem., v. 274: 31759-31762, 1999.

JIN-TANG DONG. **Prevalent Mutations in Prostate.** Cancer Journal of Cellular. Biochemistry. 97:433–447, 2006.

- KAIGHN, M.E.; SHANKAR, N.; OHNUKI, Y.; LECHNER, J.F.; JONES, L.W. **Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)¹**. Urology. N° 1. 17:16-23.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran: Pathologic Basis of Diseases**. Elsevier Saunders. Philadelphia, USA. 7° ed.: 1047-1057,1999.
- MAKAROV, D. V.; CARTER, H. B. **The discovery of prostate specific antigen as as biomarker for the early detection of adenocarcinoma of the prostate**. The Journal Urology. 176: 2383-2385, 2006.
- MCCLELLAND, M. AND IVARIE, R. **Asymmetrical distribution of CpG in an 'average' mammalian gene**. Nucleic Acids Res. 10: 7865-7877, 1982.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional do Câncer. **Programa Nacional de Controle do Câncer de Próstata: documento de consenso**. Rio de Janeiro: INCA, 2002.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional do Câncer. **Programa Nacional de Controle do Câncer de Próstata**. Rio de Janeiro: INCA, 2001.
- MOMPARLER,R.L. **Cancer epigenetics**. Oncogene. 22: 6479-6483, 2003.
- NAN, X.; NG, H.H.; JOHNSON, C.A.; LAHERTY, C.D.; TURNER, B.M.; EISENMAN, R.N. AND BIRD, A. **Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex**. Nature, 393: 386-389. 1998.
- NCBI. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NLM_002826> Acesso em dez 2006.

OHNUKI, Y.; MARNELL, M.M.; BABCOCK, M.S.; LECHNER, J.F.; KAIGHN, M.E. **Chromosomal analysis of human adenocarcinoma cell lines.** Cancer Research. 40: 524-534, 1980.

PARMIGIANI R. B.; MAGALHÃES G. S.; PEDRO A.F. GALANTE P. A. F.;MANZINIC. V. B.; CAMARGO A. A. ; MALNIC B. **A novel human G protein-coupled receptor is over-expressed in prostate cancer.** Genet. Mol. Res. 3 (4): 521-531, 2004.

RAZIN, A. AND RIGGS, A.D. **DNA methylation and gene function.** Science, 210: 604-610, 1980.

ROBBINS, S.L. et al. **Patologia estrutural e funcional.** Guanabara Koogan: 5^a ed. Rio de janeiro, 1996. Pgs 213-216, 920-922.

ROBINSON, D.; HE. F.; PRETLOW, T.; KUNG, H-J. **A tyrosine kinase profile of prostate carcinoma.** Proc. Natl Acad. Sci. 93: 5958-5962, 1996.

RODBELL, M.; BIRNBAUMER, L.; POHL, S. L.; KRANS, H. M. **The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action.** J Biol Chem, v. 246, p.1877-1882, 1971.

ROLLINS, B. J. **Chemokines.** Blood, v. 90, n. 3, p. 909-928, ago. 1997.

SCHMUTTE, C. AND JONES, P.A. **Involvement of DNA methylation in human carcinogenesis.** Biol. Chem., 379: 377-388, 1998.

SCHULZ, W. A.; HATINA, J. **Epigenetics of prostate cancer: beyond DNA methylation.** Journal of Cellular and Molecular Medicine.10:100-125, 2006.

SMITH, JEFFREY R. DIHA FREIJE, JOHN D. CARPTEN, HENRIK GRÖNBERG, JIANFENG XU, SARAH D. ISAACS, MICHAEL J. BROWNSTEIN, G. STEVEN

BOVA, HONG GUO, PIROSKA BUJNOVSZKY, DEBORAH R. NUSSKERN, JAN-ERIK DAMBER, ANDERS BERGH, MONIKA EMANUELSSON, OLLI P. KALLIONIEMI, JENNIFER WALKER-DANIELS, JOAN E. BAILEY-WILSON, TERRI BEATY, H.; DEBORAH A. MEYERS, PATRICK C. WALSH, FRANCIS S. COLLINS, JEFFREY M. TRENT, WILLIAM B. ISAACS. **Major Susceptibility Locus for Prostate Cancer on Chromosome 1 Suggested by a Genome-Wide**. Search Science. 264: 1371-1374. 1996.

SOORYANARAYANA VARAMBALLY, SARAVANA M. DHANASEKARAN, MING ZHOU, TERRENCE R. BARRETTE, CHANDAN KUMAR-SINHA, MARTIN G. SANDA, DEBASHIS GHOSHK, KENNETH J. PIENTA, RICHARD G. A. B. SEWALT, ARIE P. OTTE, MARK A. RUBIN & ARUL M. CHINNAIYAN. **The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer**. NATURE: Nature Publishing Group. 419: 624-629 , 2002

STEVENS, A ; LOLVE, J. . **Patologia**. Manole: 2^a ed. São Paulo: 1998. Pg 34-42.

STONE K.R.; MICKEY, D.D.; WUNDERLI, H.; MICKEY, G.H.; PAULSON, D.F. **Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145)**. Int J Cancer Mar 15 ; 21 (3): 274-81. 1978.

TRUE, L.; COLEMAN, I.; HAWLEY, S.; HUANG, C-Y.; GIFFORD, D.; COLEMAN, R.; BEER, T.M.; GELMANN, E.; DATTA, M.; MOSTAGHEL,E.; KNUDSEN, P.; LANGE,P.; VESSELLA, R.; LIN, D.; HOOD,L.; NELSON, P.S. **A molecular correlate to the Gleason grading system for prostate adenocarcinoma**. PNAS. Vol. 103. 29:10991-10996.

UNIGENE. Disponível no site: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=unigene>>. Acesso em: nov 2006.

WEI, S.H.; CHEN, C.M.; STRATHDEE, G.; HARNSOMBURANA, J.; SHYU, C.R.; RAHMATPANA, F.; SHI, H.; NG, S.W.; YAN, P.S.; NEPHEW, K.P.; BROWN, R. AND HUANG, T.H. **Methylation microarray analysis of late-stage ovarian**

carcinomas distinguishes progression-free survival in patients and identifies candidate epigenetic markers. Clin. Cancer Res., 8: 2246-2252, 2002.

WIDSCHWENDTER, M. AND JONES,P.A. **DNA methylation and breast carcinogenesis.** Oncogene 21. 5462-5482, 2002.

VERMA, M.; SRIVASTAVA, S. **Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention.** The Lancet Oncology, Vol. 3. 12: 755-763.

ZENG, L.; KYPRIANOU, N. **Apoptotic regulators in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): value in prostate cancer detection and prevention.** Prostate Cancer and Prostatic Diseases. 8: 7-13, 2005.