

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELAINE PROVENSÍ PEREIRA

METILAÇÃO DO DNA E METALOPROTEASES DA MATRIZ

CURITIBA

2010

ELAINE PROVENSÍ PEREIRA

METILAÇÃO DO DNA E METALOPROTEASES DA MATRIZ

Monografia apresentada ao curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* em Biologia Celular e Tecidual da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de especialista, Setor de Ciência Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dr^a. Maria Cristina Leme Godoy dos Santos

CURITIBA

2010



PÓS-GRADUAÇÃO *LATO SENSU* EM **BIOLOGIA CELULAR E TECIDUAL**



SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

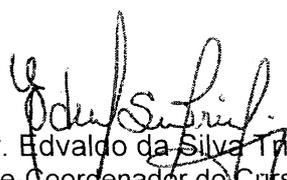
DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **ELAINE PROVENSI PEREIRA**, portadora da célula de identidade RG 67818237, foi aluna regularmente matriculada no **Curso de Especialização em Biologia Celular e Tecidual – Turma 2009**, oferecido pelo Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná, conforme autorização de funcionamento emitido pelo Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão, desta Universidade.

A referida aluna já cumpriu todos os requisitos para obtenção do grau de Especialista, ou seja, integralizou as disciplinas do Curso quanto à frequência e aproveitamento. Declaramos ainda que, como requisito fundamental para obtenção do Certificado de Especialista, **Elaine Provensi Pereira** submeteu à Avaliação de banca instituída por esta Coordenação, sua Monografia de Conclusão de Curso sob o título “Metilação do DNA e metaloproteases da matriz”, a qual foi julgada e aprovada. No momento, a aluna está no aguardo da tramitação dos documentos na UFPR para emissão do **Histórico e Certificado de Especialista em Biologia Celular e Tecidual**.

Por ser verdade, firmamos a presente.

Curitiba, 12 de Dezembro de 2011.



Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Vice-Coordenador do Curso

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Maria Cristina Leme Godoy dos Santos, orientadora desse trabalho, que pela sua prestimosa dedicação dignifica ainda mais esse distinto Programa de Pós-Graduação

Aos professores e em especial ao meu esposo e filho, por tudo...

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo descrever, através de uma revisão bibliográfica, aspectos importantes da metilação do DNA e analisar a influência da metilação na expressão de metaloproteases da matriz (MMP). Também foi investigada a influência da metilação em MMPs com diferentes processos patológicos. A metilação é uma alteração epigenética que consiste em uma modificação covalente do DNA na qual um grupamento metil (CH₃) é transferido da S-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina que geralmente precede uma guanina (dinucleotídeo CpG). A metilação do DNA ocorre em células diferenciadas e tem uma importante função na regulação da expressão genética e no silenciamento de elementos repetitivos no genoma. As MMPs são uma grande família de enzimas endopeptidases que coletivamente tem a capacidade de degradar praticamente toda a matriz extracelular, membrana basal e seus componentes, sendo responsáveis pela remodelação e degradação da matriz extracelular. As MMPs desempenham papel importante em vários processos de remodelação fisiológica e patológica. Metilação em genes que transcrevem MMPs parecem exercer um importante papel em diversos processos patológicos e está associada com diferentes doenças, inclusive o câncer.

Palavras-chave: Metilação; Metaloproteases da Matriz; Patologias.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema do processo de formação da 5-metilcitosina	14
FIGURA 2 – Esquema mostrando a aquisição de radical metil pelas fitas-filhas	15
FIGURA 3 – Mecanismo pelo qual a metilação de DNA inibe a transcrição gênica	18
FIGURA 4 – Organização dos domínios das MMPs	20
FIGURA 5 – Tabela com a nomenclatura e substratos específicos dos principais grupos MMPs	21

LISTA DE SIGLAS

- CH₃ - Grupamento metil
- CpA - Citosina/ ligação fosfodiéster/ adenina
- CpC - Citosina/ ligação fosfodiéster/ citosina
- CpG - Citosina/ ligação fosfodiéster/ guanina
- CpT - Citosina/ ligação fosfodiéster/ timidina
- DNA - Ácido desoxirribonucléico (*desoxirubonucleic acid*)
- DNMT - DNA metiltransferase
- MBP - Proteína ligada a metil (*methyl binding proteins*)
- MeCP - *Methyl cytosine binding protein*
- MMP - Metaloprotease da Matriz
- MT-MMP- metaloprotease associada à membrana
- OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man
- RNA - Ácido ribonucléico (*ribonucleic acid*)
- TIMP - Inibidores teciduais de metaloproteases (*tissue inhibitors of metalloproteinases*)

LISTA DE ABREVIATURAS

- et. al.* - e outros (abreviatura de *et alii*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	08
1.1 OBJETIVO GERAL.....	09
1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	09
2 METODOLOGIA	10
3 REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1 EPIGENÉTICA.....	11
3.2 METILAÇÃO DA MOLÉCULA DE DNA.....	14
3.2.1 Ilhas de CpG.....	16
3.3 METILAÇÃO E CONTROLE GENÔMICO	17
3.4 METALOPROTEASES DA MATRIZ.....	19
3.4.1 TIMPs, Inibidores teciduais das MMPs	22
3.5 METILAÇÃO, MMPs e PROCESSOS PATOLÓGICOS	23
4 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

Epigenética é o estudo das modificações do DNA e das histonas (cromatina); tais modificações são herdáveis e não alteram a seqüência de bases do DNA. A metilação consiste em uma modificação covalente do DNA na qual um grupamento metil (CH_3) é transferido da S-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina que geralmente precede uma guanina (dinucleotídeo CpG), pela ação de uma família de enzimas que recebem o nome de DNA-metiltransferases (DNMT).

A metilação do DNA ocorre quase exclusivamente em dinucleotídeos CpG em células diferenciadas e tem uma importante função na regulação da expressão genética e no silenciamento de elementos repetitivos no genoma. Os dinucleotídeos CpG aparecem esparsos pelos genomas eucariotos ou agrupados em regiões definidas como ilhas CpG. A literatura nos mostra que a maioria dos dinucleotídeos CpG esparsos estão metilados, ao contrário das ilhas CpG que estão desmetiladas.

Metilação do DNA controla várias funções do genoma. Entre estas funções citamos: recombinação durante meiose e mitose, controle da replicação, controle de DNAs “parasitas” que se inserem no genoma humano (ex.: DNA viral), estabilização e manutenção da expressão genética, regulação da diferenciação celular, inativação do cromossomo X, sendo essencial durante a morfogênese para que ocorra desenvolvimento normal.

Aberração no padrão de metilação do promotor de um gene pode levar a perda de função deste gene e pode ser muito mais freqüente que a mutação genética.

As metaloproteases da matriz (MMPs) são uma grande família de enzimas endopeptidases que coletivamente tem a capacidade de degradar praticamente toda a matriz extracelular, membrana basal e seus componentes, sendo, portanto, responsáveis pelo metabolismo da matriz extracelular e contribuindo para degradação e remodelação do colágeno de tecidos injuriados.

Metilações em genes que transcrevem MMPs podem estar associadas a diferentes patologias. Por exemplo, a literatura demonstra que a hipometilação do gene da MMP-3 tem sido associada com a degradação de cartilagem durante a osteoartrite. Dessa forma, faz-se necessários estudos para determinar a influencia de metilação na expressão gênica de diferentes MMPs.

1.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo descrever, através de uma revisão bibliográfica, aspectos importantes do processo da metilação do DNA e analisar sua influência na expressão de metaloproteases da matriz, bem como sua associação com processos patológicos.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar uma revisão bibliográfica sobre a metilação do DNA;

Analisar, através de revisão bibliográfica a influência dessa metilação na expressão das metaloproteases da matriz e sua associação com processos patológicos.

2. METODOLOGIA

Neste trabalho foi feita uma revisão bibliográfica sobre a metilação do DNA, seu papel no controle da expressão de metaloproteases da matriz e a influência da metilação em MMPs com diferentes processos patológicos. As bases consultadas foram: *Pubmed* e *Science Direct*. As palavras chaves utilizadas foram: “*epigenetic*” (epigenética), “*methylation*” (metilação), “MMP”, “TIMP”, “*cancer*” (câncer), “*pathological processes*” (processos patológicos) sendo pesquisadas isoladamente e agrupadas. Utilizamos, ainda, outras fontes bibliográficas como livros e sites.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 EPIGENÉTICA

O termo epigenética surgiu na metade do século 20 após estudos correlacionando bases genéticas e embriológicas. CONRAD WADDINGTON, estudioso dessas duas ciências, foi o primeiro a perceber a relação entre elas e acreditou que deveriam de alguma forma ser estudadas em conjunto (1942). Surgiu então a epigenética, nome derivado do termo grego *epigenesis* que descreve uma teoria da biologia do desenvolvimento que propõe que embriões em estágios iniciais são indiferenciados. A importância dos estudos de WADDINGTON reside na relação estabelecida entre genes, atividade genética e desenvolvimento, durante um período no qual o intercâmbio das informações geradas por geneticistas e pesquisadores da biologia do desenvolvimento não acontecia adequadamente.

Com o tempo, tornou-se claro que alguns aspectos fundamentais do desenvolvimento precisavam de explicações. Um deles era entender como células diferenciadas como fibroblastos ou linfócitos mantinham estáveis seus fenótipos após a divisão celular. Isso significava que genes relacionados com a especialização de determinados fenótipos celulares permaneciam “ligados” enquanto outros genes, ativos em outros tipos celulares, deveriam permanecer “desligados” e, de maneira lógica, esses controles celulares teriam que ser herdados após a divisão da célula.

Tradicionalmente herança refere-se à transmissão de genes de uma geração à outra ou de uma célula-mãe para uma célula-filha, a chamada herança mitótica que ocorre em células de organismos superiores. Mas a partir do instante que se entende que o mecanismo de “liga-desliga” genes também é herdado, torna-se necessário acrescentar a esta definição o conceito da herança da atividade genética. Em células tronco de organismos superiores a herança da atividade genética assume proporções ainda mais complexas, já que estas representam células indiferenciadas que se dividem produzindo outra célula indiferenciada ou se dividem produzindo células já diferenciadas. No caso das células tronco da medula óssea uma variedade de tipos celulares sanguíneos são produzidos, e nessa situação está claro que ocorre uma troca de atividade genética associada com a divisão celular.

Um outro exemplo é o cromossomo X de fêmeas de mamíferos eutérios. No desenvolvimento inicial dessas fêmeas um dos cromossomos X é aleatoriamente inativo em todas as células, enquanto o outro cromossomo X se mantém ativo. Se esses dois cromossomos possuem praticamente a mesma sequência de DNA e residem no mesmo local, então se acredita que a diferença na atividade genética deva ser intrínseca ao próprio cromossomo e independente da sequência de bases presentes. A inativação do cromossomo X também difere entre as células sendo ora inativado o herdado materno, ora o herdado paterno. Assim, fica evidente que ocorre uma troca na inativação do cromossomo X durante o desenvolvimento inicial e esta troca é aleatória, permanente e herdável em células que sofrerão mitose.

Se a herdabilidade ocorre, e não está envolvida com sequência de bases no DNA, qual o mecanismo pelo qual isto acontece? A explicação poderia residir em alterações químicas associadas à histonas e DNA. A primeira sugestão de que uma modificação química em bases do DNA poderia desempenhar importante papel biológico foi publicado em 1969 por GRIFFITH e MAHLER. Em 1975, estudos independentes mostraram um modelo molecular para a troca de atividade genética e também a herdabilidade da atividade ou inatividade genética. Os autores RIGGS (1975) e HOLLIDAY e PUGH (1975) sugeriram que a metilação da molécula de DNA poderia ter fortes efeitos na expressão genética, e as alterações no padrão de metilação do DNA poderiam explicar como genes estão “ligados” ou “desligados” em diferentes tipos celulares e como o sistema “liga-desliga” dos genes ocorre durante o desenvolvimento.

A identificação de uma enzima capaz de reconhecer DNA hemimetilado após a replicação e não atuar em DNA não metilado esclareceu a questão sobre o mecanismo para a herdabilidade do DNA metilado e não metilado e ainda, a herdabilidade de um padrão de atividade genética. Outro estudo sobre metilação de DNA concluído por SAGER e KITCHIN (1975) propôs que ocorrem enzimas em organismos eucariotos que digerem DNA não modificado. Eles exploraram a possibilidade de muitos exemplos de eliminação cromossômica ou silenciamento de genes ocorrerem por esse mecanismo.

Um pouco mais tarde, foi mostrado também por outros autores que a progressão de tumores malignos poderia estar associada com mudanças no padrão

de metilação do DNA da célula tumoral, devido a aberrantes alterações na distribuição de 5-metil-citosina em células cancerosas, o que resultaria na mudança da expressão genética. Entretanto, a palavra epigenética não foi usada em nenhum dos trabalhos sobre metilação de DNA e expressão genética possivelmente porque esse termo já tinha sido utilizado em trabalhos com contextos diferentes e o termo ainda permanecia indefinido.

Até então os modelos propostos para metilação de DNA não tinham evidências experimentais. Foi no final da década de 70 que as evidências começaram a surgir. Contudo, o termo epigenética ainda não estava definida, mas os estudos relacionados à modificações do DNA e atividade genética continuaram até que em 1987 um artigo introduziu a palavra “epimutação” para descrever alterações herdáveis em genes que não apresentavam diferenças na sequência do DNA (HOLLIDAY, 1987). Esta publicação foi importante para o início do uso da epigenética a qual explodiu na década de 90. Nesse período o imprinting genômico foi descoberto e novas definições de epigenética foram necessárias. Duas definições, sugeridas em 1994, excluíam um ou outro aspecto, mas já estavam mais pautadas em evidências experimentais.

Muito progresso foi feito nas duas últimas décadas do século 20 relacionando-se metilação de DNA e expressão genética numa variedade de contextos biológicos e o estudo experimental da epigenética foi estabelecido. Modificação do DNA não é o único objeto de estudo da epigenética, pois as histonas também podem sofrer modificações, dentre elas, metilação, fosforilação e acetilação.

Dessa maneira, podemos definir epigenética como sendo o estudo das modificações do DNA e das histonas (cromatina) que são herdáveis e não alteram a sequência de bases do DNA (HENIKOFF; MATZKE, 1997). O epigenoma é dinâmico e varia de célula para célula dentro de um mesmo organismo multicelular. Atualmente as pesquisas envolvendo metilação de DNA têm focado o estudo de genes relacionados ao desenvolvimento do câncer. Contudo é crescente o interesse por estudos envolvendo doenças inflamatórias e ultimamente o fator envelhecimento têm sido investigado.

3.2. METILAÇÃO DA MOLÉCULA DE DNA

A metilação consiste em uma modificação covalente do DNA na qual um grupamento metil (CH₃) é transferido da S-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina que geralmente precede uma guanina (dinucleotídeo CpG), pela ação de uma família de enzimas que recebem o nome de DNA-metiltransferases (DNMT) (Figura 1).

As DNA metil-transferases estão divididas em duas classes de representantes: aquelas envolvidas na metilação de fitas hemimetiladas do DNA (Figura 2), conhecidas como metilases de manutenção como a DNMT1, e um outro grupo responsável pela maioria dos processos de metilação de novo, que ocorrem em sítios sem nenhum tipo de indicação de metilação, ou seja sem a presença de metilação prévia, como as DNMT2, DNMT3A e DNMT3B (BESTOR, 2000). Os doadores de radical metil são obtidos da dieta e são principalmente o folato, a metionina, a colina e a vitamina B12 (WATERLAND; JIRTLE, 2003; WATERLAND, 2006).

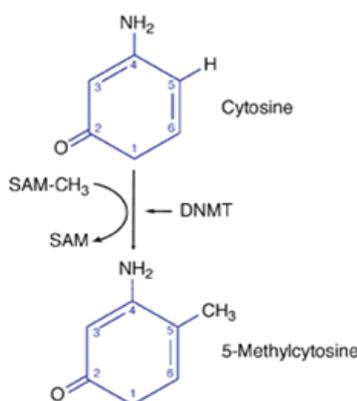


Figura 1. Esquema do processo de formação da 5-Metilcitosina (m5C) pela DNA metil transferase.

Fonte: Expert Reviews in Molecular Medicine, 2002. Cambrigde University Press.

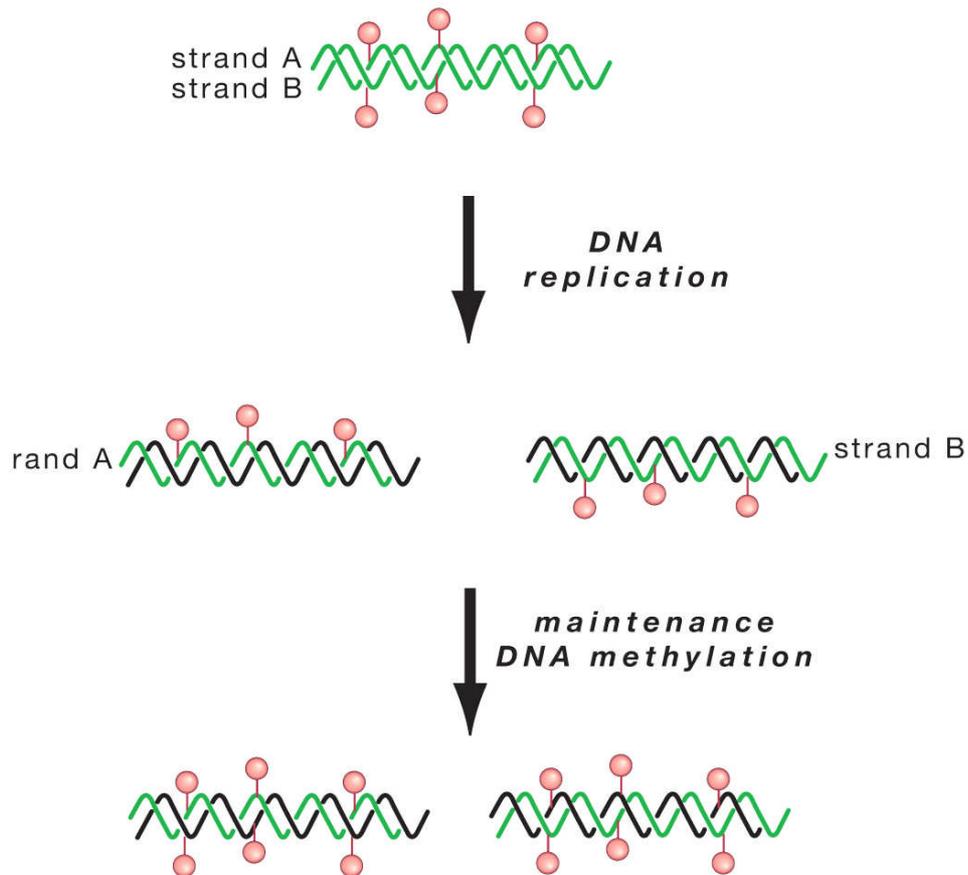


Figura 2. Esquema mostrando a aquisição de radical metil pelas fitas-filhas.
 Fonte: Epigenetics, 2006, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Um outro grupo de enzimas é responsável pela demetilação do DNA. O processo denominado de demetilação ativa envolve as demetilases e parece ser necessário para ativar genes específicos ou apagar a marca epigenética durante o desenvolvimento ou em respostas à perturbações ambientais. A demetilação ainda pode ser passiva, quando não há envolvimento de demetilases e ocorre quando a manutenção pelas metiltransferases são inativas durante o ciclo celular (ZHU, 2009). Assim o nível e padrão de 5-meC são determinados por ambos os processos de metilação e demetilação, e as enzimas envolvidas nesses processos devem estar altamente reguladas.

3.2.1. ILHAS DE CpG

A metilação do DNA ocorre quase exclusivamente em dinucleotídeos CpG em células diferenciadas e tem uma importante função na regulação da expressão genética e no silenciamento de elementos repetitivos no genoma (FEINBERG; TYCKO, 2004), sendo ela randômica ou sítio específica, sendo freqüente em genomas de eucariotos (POOLE, et al., 2001). Curiosamente, os pesquisadores do primeiro epigenoma recentemente sequenciado e publicado na revista *Nature* (LISTER et al., 2009) observaram que em células embrionárias indiferenciadas a porcentagem de metilação em CpA, CpT ou CpC é alta e isto poderia estar relacionado com a pluripotência destas células.

Os dinucleotídeos CpG aparecem esparsos pelos genomas eucariotos ou agrupados em regiões definidas como ilhas CpG. A literatura nos mostra que a maioria dos dinucleotídeos CpG esparsos estão metilados, ao contrário das ilhas CpG que estão desmetiladas. Estas ilhas são frequentes em regiões promotoras de certos genes, incluindo genes *housekeeping*. Definindo, “*ilhas CpG*” são regiões do DNA maior que 200 pares de base contendo aproximadamente 50% de bases C e G e com uma presença esperada de aproximadamente 60% de dinucleotídeos CpG (LI; DAHIYA, 2002).

Mas recentes ensaios de microarray mostraram que 3-4% das ilhas CpG do genoma humano são hipermetiladas numa variedade de tecidos somáticos e isto estaria associado ao conteúdo CpG desta ilha (WEBER et al., 2005; SHEN et al., 2007; WEBER et al., 2007). Assim, promotores com percentual reduzido de ilhas CpG são mais comumente vistos hipermetilados. WEBER et al. (2007), denominaram essas sequências com CpG reduzidas de “ilhas CpG fracas”. De acordo com esses pesquisadores um promotor denso em CpG, também chamado de “ilha CpG forte”, contém uma área de 500 pb, com razão C/G acima de 0,75 e conteúdo de CpG acima de 55%. Ilhas CpG que apresentam um ou mais parâmetros abaixo desses são chamadas de ilhas fracas. Ainda, uma ilha fraca pode ser dividida em pequena ilha CpG se apresentar parâmetros mínimos e ilha intermediária se apresentar parâmetros intermediários.

3.3. METILAÇÃO E CONTROLE GENÔMICO

Metilação do DNA controla várias funções do genoma. Entre estas funções citamos: recombinação durante meiose e mitose, controle da replicação, controle de DNAs “parasitas” que se inserem no genoma humano (ex.: DNA viral), estabilização e manutenção da expressão genética, regulação da diferenciação celular, inativação do cromossomo X, sendo essencial durante a morfogênese para que ocorra desenvolvimento normal (WOLFFE; MATZKE, 1999; SUTER et al., 2004). Entretanto, aberração no padrão de metilação do promotor de um gene pode levar a perda de função deste gene e pode ser muito mais freqüente que a mutação genética.

A transcrição genética pode ser fortemente inibida pela adição de radical metil. A presença de um “capuz” metil sobre uma citosina que precede uma guanina pode inibir a ligação de fatores de transcrição que se ligam a estas regiões. A figura a seguir mostra como isto pode acontecer (Figura 3). A não-ligação de fatores de transcrição aos seus sítios específicos resulta na ausência de transcrição genética. Padrão de hipermetilação aberrante em promotores de genes vem sendo considerado um dos principais mecanismos associados com a inativação de genes principalmente, supressores de tumores no câncer (FUKUSHIGE et al., 2009).

Proteínas chamadas MBPs (*Methyl Binding Proteins*) com afinidade pelo grupo metil se ligam às regiões CpGs localizadas nas regiões promotoras e impedem o acesso dos fatores de transcrição aos seus sítios (ATTWOOD et al., 2002). As primeiras MBP foram isoladas no final dos anos 80 por BIRD et al. (1986). Família de proteína composta por pelo menos 5 membros sendo que as mais estudadas são a MeCP1 e MeCP2 (*Methyl cytosine binding protein*) (DHASARATHY; WADE, 2008). A MeCP1 que se liga ao grupo metil necessita de múltiplos sítios CpG próximos para se ligar e assim promover a condensação da cromatina para a forma inativa, e a proteína MeCP2 pode se ligar a apenas um simples sítio CpG, promovendo alterações na cromatina semelhantes às promovidas pela proteína MeCP1.

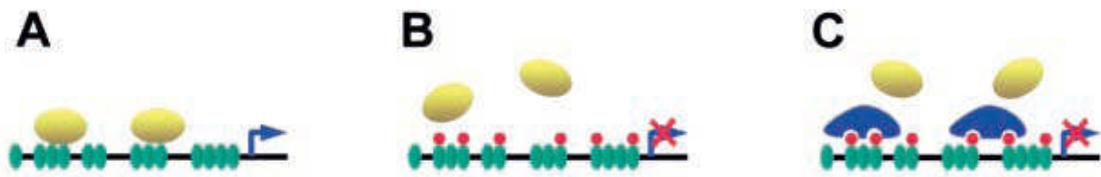


Figura 3. Mecanismo pelo qual a metilação de DNA inibe a transcrição gênica. **A.** Região promotora demetilada permitindo a ligação dos fatores de transcrição. **B.** Metilação impedindo a ligação dos fatores de transcrição. **C.** A presença de proteínas que se ligam à metilcitosina em ilhas CpG bloqueiam a ligação dos fatores de transcrição.

Fonte: ATTWOOD et al., 2002.

Aberrações epigenéticas provocam síndromes (Prader-Willi [OMIM #176270], Angelman [OMIM #105830], Beckwith-Wiedemann [OMIM #130650], Rett [OMIM #312750]) e podem predispor ao câncer (LAIRD. 2003).

Metilação no DNA é uma alteração freqüente em muitos tumores humanos e têm crescido o número de genes relacionados a tumores que apresentam metilação da base citosina em seqüências ricas em CG, normalmente não metiladas. Metilação em regiões ricas em CG pode ocorrer em genes implicados com diferentes funções durante o desenvolvimento do câncer como supressão do tumor (*p14*, *p15*, *p16*, *p73* e *BRCA1*), reparo do DNA (*hMLH1* e *MGMT*), invasão e metástase (*CDH1*, *ECAD*, *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* e *DAPK*) (RUSSO et al., 2005).

Além da dieta, outros fatores ambientais têm sido implicados na modulação da metilação, incluindo poluentes, tais como os íons metálicos cromo (SHIAO et al., 2005), cádmio (TAKIGUCHI et al., 2003) e níquel (SALNIKOW; COSTA, 2000), além de medicamentos (VEURINK et al., 2005) e fungicidas (ANWAY et al., 2006).

Existe uma forte semelhança entre os mediadores químicos que agem no desenvolvimento do câncer e da inflamação, principalmente da inflamação crônica, (VALINLUCK; SOWERS, 2007). A associação entre polimorfismos genéticos e tumores ou doença inflamatórias crônicas tem sido exaustivamente investigada e do mesmo modo a associação entre alterações epigenéticas, tumores e inflamação deve ser estudada pois estas alterações podem propiciar o desenvolvimento de um tumor e podem também modular a inflamação.

Como exemplo, a hipometilação do gene do receptor *Toll-like-2* tem sido associada com o aumento da resposta pró-inflamatória durante infecção pulmonar em pacientes com fibrose cística (SHUTO et al., 2006) e também a hipometilação do gene da MMP-3 tem sido associada com a degradação de cartilagem durante a osteoartrite (ROACH et al., 2005).

3.4. METALOPROTEASE DA MATRIZ

As metaloproteases da matriz (MMPs) são uma grande família de enzimas endopeptidases que coletivamente tem a capacidade de degradar praticamente toda a matriz extracelular, membrana basal e seus componentes (BIKERDAL-HANSEN et al., 1993).

As MMPs são secretadas na forma de zimógeno e como um complexo enzima-inibidor (STRICKLIN et al., 1983; EMONARD; GRIMAUD, 1990), sendo que sua ativação se dá em duas etapas. Inicialmente o zimógeno sofre clivagem proteolítica que resulta na remoção da porção amino-terminal. A clivagem pode ser feita por várias enzimas como a tripsina, plasmina, catepsina B e elastase. Numa segunda etapa, a enzima sofre autodigestão que resulta na sua forma ativada (VAN WART; BIRKEDAL-HANSEN, 1990). Acredita-se que a ativação é causada pela ruptura da ponte existente entre o aminoácido cisteína e o íon zinco, que bloqueia o sítio ativo da molécula.

Outra característica comum entre as metaloproteases é a dependência dos íons zinco e cálcio. A interação do zinco com dois resíduos de histidina, presentes no domínio catalítico da molécula, tem importância crucial para o funcionamento adequado das metaloproteases (SOUZA et al., 2000). Os dois átomos de cálcio conferem estabilidade à estrutura terciária da proteína (DIOSZEGI et al., 1995).

A família das metaloproteases é formada por pelo menos vinte e seis membros em humanos que exibem similaridades estruturais e funcionais. Para ser classificada como uma MMP, a proteína deve ter pelo menos um pró-domínio e um domínio catalítico, ligado a um sítio de zinco. Adicional as MMPs possuem regiões ricas em prolínas e um domínio C-terminal hemopexin (Figura 4).

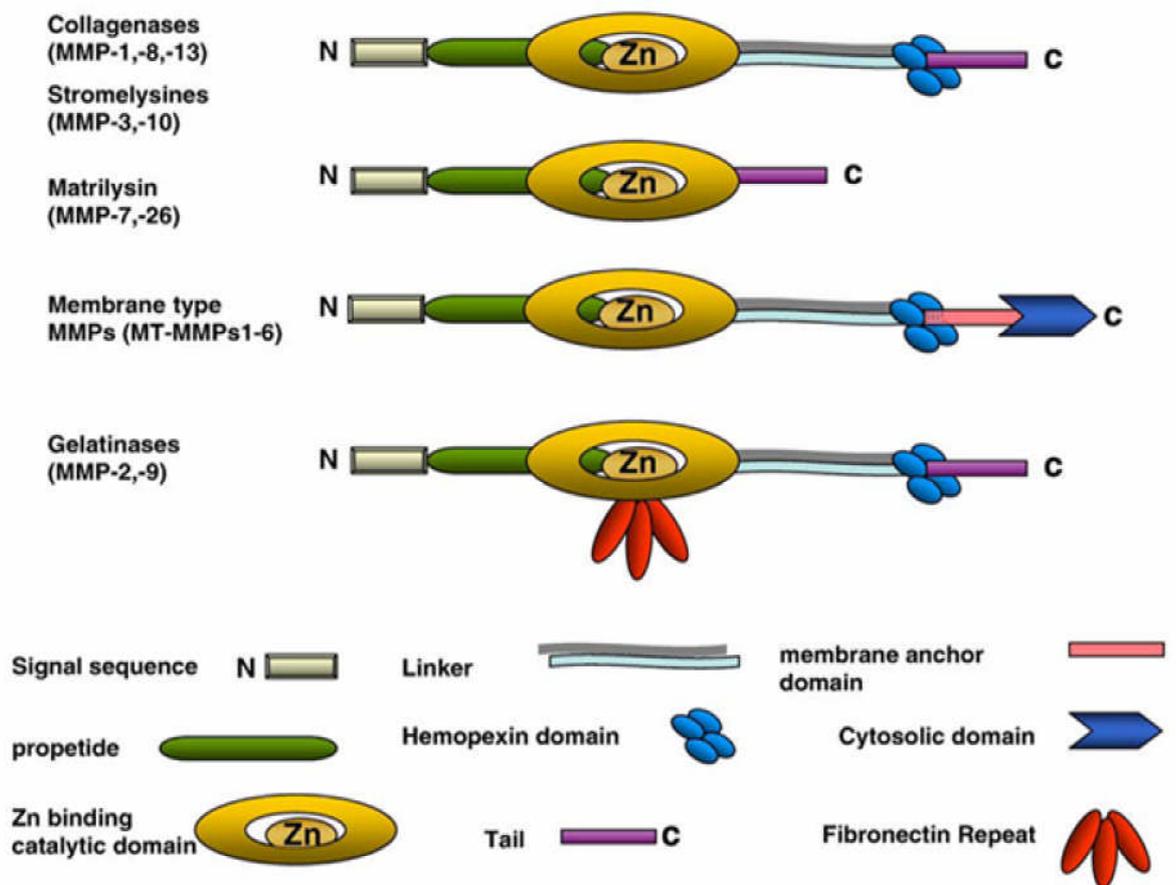


Figura 4: Organização dos domínios das MMPs.

Fonte: N. SELA-PASSWELL et al. (2009) / Biochimica et Biophysica Acta

Todas as MMPs possuem um arranjo genético similar, sugerindo que elas foram duplicadas de um gene ancestral comum. Pelo menos oito dos genes das MMPs humanas, estão no cromossomo 11, entre elas MMP-1, 3 e 8. Outros genes de MMPs estão entre os cromossomos 1, 8, 12, 14, 16, 20 e 22 (SHAPIRO, 1998).

As metaloproteases da matriz se organizam em três distintos e bem conservados domínios estruturais: pró-peptídios amino terminal, domínio catalítico e domínio Carboxi-terminal e apesar de possuírem grande semelhança estrutural apresentam diferentes subclasses, como: colagenases intersticiais, gelatinases, estromelinas, MMP de membrana, além da matrilisina, metaloelastase e enamelisina. Esta classificação baseia-se na especificidade ao substrato

(KERRIGAN et al., 2000). A figura 5 mostra uma tabela resumindo os principais tipos de MMP.

Tabela 1. Nomenclatura e alguns substratos específicos dos principais grupos das metaloproteinases da matriz

Proteína	MMP	Alguns substratos específicos
Colagenases		Colágenos I, II e III
Colagenase 1	MMP-1	
Colagenase 2	MMP-8	
Colagenase 3	MMP-13	
Gelatinases		Gelatina e colágeno IV
Gelatinase A	MMP-2	
Gelatinase B	MMP-9	
Estromelisinases		Fibronectina e proteoglicanas
Estromelisinase 1	MMP-3	
Estromelisinase 2	MMP-10	
Matrilisinases		Fibronectina e colágeno IV
Matrilisinase 1	MMP-7	
Matrilisinase 2	MMP-26	
MMP ligadas à membrana		
MT1-MMP	MMP-14	Colágenos I, II e III, gelatina e fibronectina
MT2-MMP	MMP-15	Fibronectina e laminina
MT3-MMP	MMP-16	Colágeno III e fibronectina
MT4-MMP	MMP-17	Gelatina e fibronectina
MT5-MMP	MMP-24	Proteoglicanas
MT6-MMP	MMP-25	Gelatina

MMP: metaloproteinase da matriz, MT-MMP: MMP ligadas à membrana

Figura 5: Tabela com a nomenclatura e substratos específicos dos principais grupos de MMPs.

Fonte: http://www.inca.gov.br/rbc/n_52/v03/pdf/revisão.pdf

As MMPs são secretadas por células inflamatórias em resposta a estímulos como citocinas e lipopolisacarídeos (BRIKEDAL-HANSEN, 1993) e desempenham papel importante em vários processos de remodelação fisiológica, como no desenvolvimento embrionário, na involução pós-parto, remodelação óssea e cicatrização de feridas (WOESSNER, 1991). Alterações nas atividades das MMPs têm sido relatadas em diversos processos patológicos, como destruição de cartilagem e osso na artrite reumatóide (YE et al., 2007), osteoartrite (BARLAS et al., 2008), infarto agudo do miocárdio (KOH et al., 2007), na inflamação através da migração leucocitária (KNAUPER et al., 1993), no crescimento e expansão de tumores benignos e metástase (EGEBLAD; WERB, 2002; BASSET et al., 1997;

JOHNSEN et al., 1998), na doença periodontal (SOUZA et al., 2003) e na reabsorção óssea (OKADA et al., 1995).

As MMPs são sintetizadas em baixos níveis até sua transcrição em células inflamatórias ser induzida por sinais como lipopolisacarídeos, citocinas, fatores de crescimento e estresse mecânico. A atividade das MMPs é regulada em múltiplos níveis, incluindo conversão da pró-enzima na sua forma ativa, regulação da transcrição (como metilação), inibição por inibidores teciduais de MMPs, os TIMPs (*Tissue inhibitors of metalloproteinases*).

3.4.1. TIMPs, INIBIDORES TECIDUAIS DAS MMPs

Os TIMPs, inibidores teciduais das MMPs, estão distribuídos pelos tecidos e fluidos e são secretados por diversos tipos celulares. Quatro membros da família dos TIMPs têm sido descritos e partilham seqüências estruturais homólogas ao nível protéico (BAKER et al., 2002).

A estrutura dos TIMPs tem basicamente dois domínios: um domínio N-terminal que consiste de seis resíduos de cisteína conservados formando três pontes de dissulfureto, o qual possui atividade inibitória de MMP, e um domínio C-terminal, que possui seis resíduos de cisteína conservados e três pontes dissulfureto (TUUTTILA et al., 1998).

Por definição, todos os membros da família TIMP inibem a atividade das MMPs, através da uma competição pelo íon de zinco entre o sítio ativo da MMP e grupos amino e carbonil do domínio N-terminal dos TIMPs. No entanto, a inibição seletiva de alguns membros do MMPs tem sido observada, por exemplo: o TIMP-1 tem uma maior afinidade para a MMP-1 e -9, enquanto TIMP-2 tem afinidade para a MMP-2 e -8. (STETLER-STEVENSON, 2008). Além disso, muitos MMPs e TIMPs são regulados na sua transcrição por uma variedade de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (YAN; BOYD, 2007).

Embora inicialmente caracterizada pela sua capacidade de inibir a atividade das MMPs, os TIMPs também apresentam atividades biológicas, tais como regulamentação de uma série de processos celulares, incluindo o crescimento celular, migração e apoptose (MASSAROTTI et al., 2002).

De acordo com RIBEIRO et al. (2009), a expressão dos TIMPs é observada durante a remodelação tecidual fisiológica, contribuindo para a manutenção do equilíbrio metabólico e estrutural da matriz extracelular. Alterações nos níveis de síntese entre TIMPs e MMPs podem levar a um desequilíbrio na taxa de degradação da matriz extracelular, podendo causar destruição anormal (MACNAUL et al., 1990), e, dessa maneira, favorecer invasões tumorais.

O desequilíbrio entre as MMPs e os TIMPs tem sido relacionado a doenças associadas à renovação não-controlada da matriz extracelular, como artrite, doenças cardiovasculares, nefrites, desordens neurológicas e fibroses (RIBEIRO et al., 2009) e pode desempenhar um papel significativo no fenótipo invasivo dos tumores malignos (WOJTOWICZ-PRAGA et al., 1997).

3.5. METILAÇÃO, MMPs E PROCESSOS PATOLÓGICOS

Para determinar se a metilação do DNA pode modular a expressão de gene das MMP, COULARD et al. (2006) utilizou uma linhagem celular geneticamente modificada para ambos os genes chaves da metiltransferase do DNA, DNMT-1 e DNMT-3B. Os pesquisadores descobriram que as células silenciadas induziram a expressão de MMP-3, e não expressaram MMP-1 e MMP-2. Além disso, o tratamento de células selvagens com inibidores de metilação, 5-aza-DC e zebularina, também induziram a expressão de MMP-3. Por outro lado, a metilação *in vitro* do promotor MMP-3 suprimiu sua atividade transcricional. Os autores mostraram que a indução da expressão da MMP-3 e MMP-10 por hipometilação foi célula-específica, sugerindo que mudanças epigenéticas podem predispor a expressão de MMPs.

ILIOPOULOS et al. (2007) demonstrou que os mecanismos epigenéticos que regulam a expressão de leptina em condrócitos afetam a expressão de MMP-13. Enquanto, ROACH et al. (2005) forneceu a primeira evidência de que a degradação por condrócitos em estágios avançados de osteoartrite podem resultar de mudanças epigenéticas no status da metilação de MMPs (MMP-3, MMP9 e MMP-13). Essas mudanças são transmitidas cronologicamente às células filhas, podendo contribuir para o desenvolvimento da osteoartrite.

A possível associação entre metilação e câncer surgiu da observação de que grande parte dos genes supressores de tumor contem ilhas de CpG nas suas regiões promotoras e geralmente apresentavam alterações nos padrões de metilação nas células transformadas em relação ao tecido normal (TEODORIDIS et al., 2004).

Estudos mostram que a expressão MMP-9 em tecidos do linfoma está relacionada como o estágio, a classe, ou o prognóstico do tumor e evidências indicam que a metilação promove a regulação da expressão gênica da MMP-9. Segundo CHICONE et al. (2002) há uma correlação inversa entre o nível de metilação do promotor MMP-9 e o nível da expressão MMP-9 em linfoma. Quando as células do linfoma são tratadas com um inibidor da metilação do DNA, ocorre a diminuição da metilação do promotor MMP-9 e aumento da secreção de RNA mensageiro e da proteína. Experiências *in vitro* usando promotor metilado da MMP-9, confirmaram o fato de que a metilação do DNA exerce a supressão da atividade transcricional. Os resultados indicam que a metilação pode alterar a atividade transcricional do promotor MMP-9 (CHICONE et al., 2002).

A MT1-MMP é um ativador de MMP-2 solúvel. A atividade de ambas as MMPs é regulamentado pelo seu inibidor fisiológico TIMP-2. O equilíbrio entre MT1-MMP, MMP-2 e TIMP-2 desempenha um papel fundamental no comportamento invasivo de vários tipos celulares. CHERNOV et al. (2009) analisando a epigenética da expressão gênica de MT1-MMP, MMP-2 e TIMP-2 em células altamente migratórias de glioblastoma e em células de baixo potencial migratório de carcinoma de mama, determinou que o controle epigenético leva ao silenciamento da transcrição de ambas as MMPs e inclui hipermetilação das regiões CpG correspondentes. O padrão de regulação epigenética da TIMP-2 é distinto das MMPs e envolve metilação e desmetilação das duas regiões CpG de seu promotor. Os autores sugerem que o controle epigenético desempenha um papel importante tanto na regulação do equilíbrio entre MT1-MMP, MMP-2 e TIMP-2, quanto no comportamento invasivo do câncer. Em outro estudo CHERNOV et al. (2010) sugere que os mecanismos epigenéticos permitirem, em gliomas, um depósito de colágeno enriquecido com matriz e, em seguida, essa matriz é usada para migração rápida do câncer através do tecido cerebral.

Os inibidores teciduais de MMPs têm um efeito inibitório sobre o desenvolvimento do tumor, crescimento e metástase. Pesquisa investigando a influência da metilação no TIMP-3 em carcinoma de esôfago mostrou que a hipermetilação foi associada com redução da sobrevida (NINOMIYA et al., 2008). Níveis de expressão de TIMP-3 e de várias MMPs também foram analisados, sendo que a expressão de MMP-2, MMP-7 e MMP-9 no tumor foram significativamente maiores que em tecido saudável; enquanto a expressão de TIMP-3 no tumor foi significativamente inferior ao do tecido saudável. Tumores que apresentavam hipermetilação no gene da TIMP-3 expressam níveis mais baixos da proteína. Os resultados demonstram que a hipermetilação de TIMP-3 está associado com alteração no nível TIMP-3 e MMPs em carcinoma de esôfago e com a sobrevida dos pacientes (NINOMIYA et al., 2008). Outro estudo mostrou que o aumento da expressão de TIMP-1 durante a transformação de melanócitos malignos esta associada com desmetilação do gene (RICCA et al., 2009).

De modo geral, a análise do padrão global de metilação em diferentes tipos de tumores tem demonstrado que a metilação de algumas ilhas de CpG acontece em vários tipos de tumores enquanto outras são metiladas apenas em tipos de tumores específicos (PARRELLA et al., 2004). Estudos envolvendo inibidores de metilação *in vivo* e *in vitro* e análises de camundongos deficientes em DNA-metiltransferases indicam a importância da hipometilação na tumorigênese (EHRLICH, 2002).

A hipermetilação de regiões específicas na célula tumoral contribui na progressão da doença por estar relacionada principalmente com o seu potencial na inativação gênica. As regiões que se tornam metiladas são, normalmente, ilhas de CpG de promotores de certos genes envolvidos na regulação do ciclo celular, no reparo de DNA, na resistência a drogas, na diferenciação celular, na apoptose e no desenvolvimento de metástase (CLARK; MELKI, 2002).

Diferente das mutações de ponto e cromossômicas, as mudanças epigenéticas são reversíveis, aumentando a possibilidade do desenvolvimento de terapias baseadas na restauração do estado normal de genes associados a doenças.

Tem sido proposta a ação anti-tumoral de agentes desmetilantes, principalmente os derivados da molécula 2-deoxicitidina, partindo do princípio de que estes agentes podem reativar a expressão de genes supressores de tumor e da observação de que estes agentes podem restaurar a sensibilidade de tumores a alguns agentes quimioterápicos (EGGER et al., 2004; ESTELLER; ALMOUZNI, 2005). Os agentes desmetilantes são moléculas fosforiladas, análogas a nucleotídeos e são incorporados à fita do DNA durante a replicação. Uma vez incorporados, eles complexam com as DNMTs e as inativam impedindo a metilação do DNA (ESTELLER; ALMOUZNI, 2005). Apesar de alguns desses agentes, tais como 5-aza-2'-deoxicitidina, já estarem sendo usados clinicamente, é preciso ter muita cautela sobre seus efeitos, tendo em vista que as modificações epigenéticas causadas por estas drogas são globais e podem levar à ativação de muitos genes.

Além das possibilidades terapêuticas, a identificação de mudanças no padrão de metilação em tumores pode gerar marcadores moleculares para o diagnóstico e prognóstico de muitas doenças. Uma vantagem clara do estudo da metilação de genes como marcadores moleculares é que normalmente 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 as perdas de heterozigose ou deleções homozigóticas não são facilmente detectadas nesse contexto (ESTELLER et al., 2002).

Mudança no perfil epigenético representa um mecanismo central no desenvolvimento de muitas doenças humanas, incluindo o câncer. Dinucleotídeos CpG potencialmente "metiláveis" não estão aleatoriamente distribuídos pelo genoma, aparecem em regiões isoladas ou em regiões onde se concentram e são denominados ilhas CpG. Geralmente estas ilhas estão presentes no promotor de muitos genes que normalmente estão desmetilados em células normais (ESTELLER, 2007). Em genes que transcrevem MMPs essas ilhas CpG apresentam alterações no padrão de metilação e estão associadas a diferentes patologias.

4. CONCLUSÃO

A possível associação entre metilação e alteração na expressão de metaloproteases, claramente influencia diversos processos patológicos. A utilização de padrões de metilação de DNA em genes de metaloproteases como marcadores genéticos é de um valor clínico inestimável, uma vez que possibilitaria uma melhor compreensão da doença e estratégias de prevenção e terapêutica individualizadas poderiam ser desenvolvidas.

REFERÊNCIAS

- ANWAY, M.D.; LEATHERS, C.; SKINNER, M.K. (2006) Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology.*, 147(12): 5515–5523.
- ATTWOOD, J.T.; YUNG, R.L. (2002). Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci.*, 59(2): 241-257
- BAKER, A.H; EDWARDS, D.R.; MURPHY, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell. Science.* 115: 3719-3727.
- BARLAS, I.O.; SEZGIN, M.; ERDAL, M.E.; SAHIN, G.; ANKARALI, H.C.; ALTINTAS, Z.M.; TÜRKMEN, E. (2009). Association of (-1,607) 1G/2G polymorphism of matrix metalloproteinase-1 gene with knee osteoarthritis in the Turkish population (knee osteoarthritis and MMPs gene polymorphisms). *Rheumatol. Int.*, 29:383-388.
- BASSET, P.; OKADA, A.; CHENARD, M.P.; KANNAN, R.; STOLL, I.; ANGLARD, P.; BELLOCQ, J.P.; RIO, M.C. (1997) Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications; *Matrix Biol* 15 535–541.
- BESTOR, T.H. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet.* 2000; 9(16): 2395-402.
- BIRD, A.P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature.*, 321(6067): 209-213.
- BRIKEDAL-HANSEN, H. (1993). Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J. Periodontol.*, 64:474-484.
- CHERNOV, A.V.; BARANOVSKAYA, S.; GOLUBKOV, V.S., WAKEMAN, D.R.; SNYDER, E.Y.; WILLIAMS, R., STRONGIN, A.Y. (2010) Microarray-based transcriptional and epigenetic profiling of matrix metalloproteinases, collagens and related genes in cancer. *J Biol Chem.*
- CHERNOV, A.V.; SOUNNI, N.E.; REMACLE, A.G.; STRONGIN, A.Y. (2009). Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells. *J Biol Chem.*, 284(19):12727-12734.
- CHICOINE, E.; ESTÈVE, P.O.; ROBLEDO, O.; VAN THEMSCHE, C.; POTWOROWSKI, E.F.; ST-PIERRE, Y. (2002) Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.*, 297(4):765-772.
- CLARK, S.J.; MELKI, J. (2002). DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene.*, 21(35):5380-5387

COUILLARD, J.; DEMERS, M.; LAVOIE, G.; ST-PIERRE, Y. (2006). The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.*, 342(4):1233-1239.

DHASARATHY, A.; WADE, P.A. (2008). The MBD protein family—Reading an epigenetic mark? *Mutat. Res.*, 647(1-2): 39-43.

DIOSZEGI, M.; CANNON, P.; VAN WART, H. (1995). Vertebrate Collagenases. *Methods. Enzymol.*, 248:413-449.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. 2002 New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 2: 161–174.

EGGER, G.; LIANG, G.; APARICIO, A.; JONES, P.A. (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.*,429(6990):457-463

EHRlich, M.; JIANG, G.; FIALA, E.; DOME, J.S.; YU, M.C.; LONG, T.I.; YOUN, B.; SOHN, O.S.; WIDSCHWENDTER, M.; TOMLINSON, G.E.; CHINTAGUMPALA, M.; CHAMPAGNE, M.; PARHAM, D.; LIANG, G.; MALIK, K.; LAIRD, P.W. (2002). Hypomethylation and hypermethylation of DNA in Wilms tumors. *Oncogene.* 21(43):6694-6702.

EMONARD, H.; GRIMAUD, J.A. (1990). Matrix Metalloproteinases. *Cell. Molec. Biol.*, 36:131-153.

ESTELLER, M.; ALMOUZNI, G. (2005). How epigenetics integrates nuclear functions. Workshop on epigenetics and chromatin: transcriptional regulation and beyond. *EMBO Rep.*, 6(7):624-628.

ESTELLER, M.; GUO, M.; MORENO, V.; PEINADO, M.A.; CAPELLA, G.; GALM, O.; BAYLIN, S.B.; HERMAN, J.G. (2002) Hypermethylation-associated Inactivation of the Cellular Retinol-Binding-Protein 1 Gene in Human Cancer. *Cancer Res.*, 62(20):5902-5905.

ESTELLER, M. (2007). Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylation. *Hum Mol Genet.*,16:R50-R59.

FEINBERG, A.P.; TYCKO, B. (2004) The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*, 4(2): 143-153.

FUKUSHIGE, S.; KONDO, E.; HORII, A. (2009). Methyl-CpG targeted recruitment of p300 reactivates tumor suppressor genes in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 379(4): 1021-1026.

GRIFFITH, J.S.; MAHLER, H.R. (1969) DNA ticketing theory of memory. *Nature.*, 223(5206): 580-582.

HENIKOFF, S.; MATZKE, M.A. (1997). Exploring and explaining epigenetic effects. *Trends Genet.*, 13(8): 293-295.

HOLLIDAY, R.; PUGH, J.E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. 187(4173): 226-232.

HOLLIDAY, R. (1987). The Inheritance of Epigenetic Defects. *Science*., 238(4824):163–170.

ILIOPOULOS, D.; MALIZOS, K.N.; TSEZOU, A. (2007). Epigenetic regulation of leptin affects MMP-13 expression in osteoarthritic chondrocytes: possible molecular target for osteoarthritis therapeutic intervention. *Ann Rheum Dis*., 66(12):1616-1621.

JOHNSEN, M.; LUND, L.R.; ROMER, J.; ALMHOLT, K.; DANO, K. (1998). Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr Opin Cell Biol*.,10:667–671.

KERRIGAN, J.J.; MANSELL, J.P.; SANDY, J.R. (2000). Matrix turnover. *J. Orthod*., 27: 227- 33.

KNAUPER, V.; OSTHUES, A.; DECLERCK, Y.A.; LANGLEY, K.E.; BLASER, J.; TSCHESCHE, H. (1993). Fragmentation of human polymorphonuclear-leucocyte collagenase. *Biochem J*., 291; 847-854.

KOH, Y.S.; CHANG, K.; KIM, P.J; SEUNG, K.B; BAEK, S.H.; SHIN, W.S; LIM, S.H.; KIM, J.H.; CHOI, K.B. (2008). A close relationship between functional polymorphism in the promoter region of matrix metalloproteinase-9 and acute myocardial infarction. *Int. J. Cardiol*.,127: 430-432.

LAIRD, P.W. (2003). The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer*. 3(4): 253-266.

LI, Q.; VERMA, I.M. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*., 2(10): 725-734.

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. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*., 462(7271):315-322.

MACNAUL, K.L.; CHARTRAIN, N.; LARK, M.; TOCCI, M.J.; HUTCHINSON, N.I. (1990). Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *J. Biol. Chem*., 265:17238-17245.

MASSAROTTI, M.; MARCHESONI, A.; BIONDI, M.L.; MARASINI, B. (2002). Polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter gene and severity of rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol*., 29:15-20.

NINOMIYA, I.; KAWAKAMI, K.; FUSHIDA, S.; FUJIMURA, T.; FUNAKI, H.; TAKAMURA, H.; KITAGAWA, H.; NAKAGAWARA, H.; TAJIMA, H.; KAYAHARA, M.; OHTA, T. (2008). Quantitative detection of TIMP-3 promoter hypermethylation and its

prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.*, 20(6):1489-1495.

OKADA, Y.; NAKA, K.; KAWAMURA, K.; MATSUMOTO, T.; NAKANISHI, I.; FUJIMOTO, N.; SATO, H.; SEIKI, M. (1995). Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab Invest.*, 72: 311-322.

PARRELLA, P.; POETA, M.L.; GALLO, A.P.; PRENCIPE, M.; SCINTU, M.; APICELLA, A.; ROSSIELLO, R.; LIGUORO, G.; SERIPA, D.; GRAVINA, C.; RABITTI, C.; RINALDI, M.; NICOL, T.; TOMMASI, S.; PARADISO, A.; SCHITTULLI, F.; ALTOMARE, V.; FAZIO, V.M. (2004). Nonrandom distribution of aberrant promoter methylation of cancer-related genes in sporadic breast tumors. *Clin Cancer Res.* 10(16):5349-5354.

POOLE, J.C.; ANDREWS, L.G.; TOLLEFSBOL, T.O. (2001). Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene.* 269(1-2): 1-12.

RIBEIRO, B.F.; IGLESIAS, D.P.; NASCIMENTO, G.J.; GALVÃO, H.C.; MEDEIROS, A.M.; FREITAS, R.A. (2009). Immunoexpression of MMPs-1, -2, and -9 in ameloblastoma and odontogenic adenomatoid tumor. *Oral Dis.*, 15(7):472-477.

RICCA, T.I.; LIANG, G.; SUENAGA, A.P.; HAN, S.W.; JONES, P.A.; JASIULIONIS, M.G. (2009). Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 expression associated with gene demethylation confers anoikis resistance in early phases of melanocyte malignant transformation. *Transl Oncol.*, 2(4):329-340.

RIGGS, A.D. (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet.* 14(1): 9-25.

ROACH, H.I.; YAMADA, N.; CHEUNG, K.S.; TILLEY, S.; CLARKE, N.M.; OREFFO, R.O.; KOKUBUN, S.; BRONNER, F. (2005). Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum.*, 52(10): 3110-3124.

RUSSO, A.L.; THIAGALINGAM, A.; PAN, H.; CALIFANO, J.; CHENG, K.H.; PONTE, J.F.; CHINNAPPAN, D.; NEMANI, P.; SIDRANSKY, D.; THIAGALINGAM, S. (2005). Differential DNA hypermethylation of critical genes mediates the stage-specific tobacco smoke-induced neoplastic progression of lung cancer. *Clin Cancer Res.*, 11(7): 2466-2470.

SAGER, R.; KITCHIN, R. (1975). Selective silencing of eukaryotic DNA. *Science.*, 189(4201): 426-433.

SALNIKOW, K.; COSTA, M. (2000). Epigenetic mechanisms of nickel carcinogenesis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 19(3): 307-318.

SHAPIRO, S.D. (1998). Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 10: 602-608.

SHEN, L.; KONDO, Y.; GUO, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, L.; AHMED, S.; SHU, J.; CHEN, X.; WATERLAND, R.A.; ISSA, J.P. (2007). Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genet.*, 3(10): 2023-2036

SHIAO, Y.H.; CRAWFORD, E.B.; ANDERSON, L.M.; PATEL, P.; KO, K. (2005). Allele-specific germ cell epimutation in the spacer promoter of the 45S ribosomal RNA gene after Cr(III) exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 205(3): 290–296.

SHUTO, T.; FURUTA, T.; OBA, M.; XU, H.; LI, J.D.; CHEUNG, J.; GRUENERT, D.C.; UEHARA, A.; SUICO, M.A.; OKIYONEDA, T.; KAI, H. (2006). Promoter hypomethylation of Toll-like receptor-2 gene is associated with increased proinflammatory response toward bacterial peptidoglycan in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *FASEB J.*, 20(6): 782-784.

SOUZA, A.P.; TREVILATTO, P.C.; SCAREL-CAMINAGA, R.M.; BRITO, R.B.; LINE, S.R. (2003) MMP-1 promoter polymorphism: association with chronic periodontitis severity in a Brazilian population; *J Clin Periodontol.* 30: 154-158.

SOUZA, A.P.; GERLACH, R.F.; LINE, S.R. (2000) Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent. Mater.*, 16:103-108.

STETLER-STEVENSON, W.G. (2008). Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci. Signal.*, 1:re6.

STRICKLIN, G. P.; JEFFREY, J.J.; ROSWIT, W.T.; EISEN, A.Z. (1983). Human skin fibroblast procollagenase: mechanisms of activation by organomercurials and trypsin. *Biochemistry.* 22:61-68.

SUTER, C.M.; MARTIN, D.I.; WARD, R.L. (2004). Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet.*, 36(5): 497-501.

TAKIGUCHI, M.; ACHANZAR, W.E.; QU, W.; LI, G.; WAALKES, M.P. (2003). Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp. Cell Res.*, 286: 355–365.

TEODORIDIS, J.M.; STRATHDEE, G.; BROWN, R. (2004). [Epigenetic silencing mediated by CpG island methylation: potential as a therapeutic target and as a biomarker.](#) *Drug Resist Updat.*, 7(4-5):267-278.

TUUTTILA, A.; MORGUNOVA, E.; BERGMANN, U.; LINDQVIST, Y.; MASKOS, K.; FERNANDEZ-CATALAN, C.; BODE, W.; TRYGGVASON, K.; SCHNEIDER, G. (1998). Three-dimensional structure of human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 284:1133-1140.

VALINLUCK, V.; SOWERS, L.C. (2007) Inflammation-Mediated Cytosine Damage: A Mechanistic Link between Inflammation and the Epigenetic Alterations in Human Cancers. *Cancer Res.*, 67(12): 5583-5586.

VAN WART, H. E.; BIRKEDAL-HANSEN, H. (1990). The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinases activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:5578-5582.

VEURINK, M.; KOSTER, M.; BERG, L.T. (2005). The history of DES, lessons to be learned. *Pharm. World Sci.*, 27(3): 139–143.

WADDINGTON, C. (1942). The epigenotype. *Endeavour*. 118–120.

WATERLAND, R.A.; JIRTLE, R.L. (2003). Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol. Cell Biol.*, 23(15): 5293–5300.

WATERLAND, R.A. (2006). Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. *J. Nutr.*, 136(6):1706S–1710S.

WEBER, M.; DAVIES, J.J.; WITTIG, D.; OAKELEY, E.J.; HAASE, M.; LAM, W.L.; SCHÜBELER, D. (2005). Chromosomewide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet.*, 37(8): 853-862.

WEBER, M.; HELLMANN, I.; STADLER, M.B.; RAMOS, L.; PAABO, S.; REBHAN, M.; SCHÜBELER, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet.*, 39(4): 457-466.

WOESSNER, J. F. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.*, 5:2145-2154.

WOJTOWICZ-PRAGA, S. (2003). Reversal of tumor-induced immunosuppression by TGF-beta inhibitors. *Invest New Drugs.*, 21(1):21-32.

WOLFFE, A.P.; MATZKE, M.A. (1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science.*, 286(5439): 481-486.

YAN, C.; BOYD, D.D. (2007). Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J. Cell. Physiol.*, 211:19-26.

YE, S.; PATODI, N.; WALKER-BONE, K.; READING, I.; COOPER, C.; DENNISON, E. (2007). Variation in the matrix metalloproteinase-3, -7, -12 and -13 genes is associated with functional status in rheumatoid arthritis. *Int. J. Immunogenet.*, 34:81-85.

ZHU, J.K. (2009). Active DNA Demethylation Mediated by DNA Glycosylases. *Annu. Rev. Genet.*, 43:143–166.