

**AVALIAÇÃO DO ESTADO DE METILAÇÃO DO PROMOTOR
DE hTERT DE LINHAGENS CELULARES E DE PACIENTES
INFECTADAS COM HPV DE ALTO RISCO**

RODRIGO VELLASCO DUARTE SILVESTRE

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente
para a obtenção do título de Mestre em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dr^a. Luisa Lina Villa

**São Paulo
2004**

FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A. C. Camargo**

Silvestre, Rodrigo Vellasco Duarte

Avaliação do estado de metilação do promotor de hTERT de linhagens celulares e de pacientes infectadas com HPV de alto risco. Rodrigo Vellasco Duarte Silvestre– São Paulo, 2004.

78p.

Dissertação(mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Luisa Lina Villa.

Descritores: 1. PAPILOMAVIRUS. 2. TELOMERASE. 3. METILAÇÃO DE DNA. 4. REGIÕES PROMOTORAS (GENÉTICA). 5. TRANSCRIPTASE REVERSA.

*Nasceste no lar que precisavas, vestiste o
corpo físico que merecias, moras onde
melhor Deus te proporcionou, de acordo
com teu adiantamento, possuis os recursos
financeiros coerentes com as tuas
necessidades, nem mais, nem menos, mas o
justo para as tuas lutas terrenas.*

*Teu ambiente de trabalho é o que elegeste
espontaneamente para tua realização. Teus
parentes, amigos, são as almas que
atraíste com tua própria afinidade.
Portanto, teu destino está constantemente
sob teu controle, tu escolhes, recolhes,
eleges, atraís, buscas, expulsas, modificas
tudo aquilo que te rodeia a existência.*

*Teus pensamentos e vontades, são a chave
de teus atos, são as fontes de atração e
repulsão na tua jornada, não reclames nem
te faça de vítima, antes de tudo analisa e
observa. A mudança está em tuas mãos,
reprograma tua meta, busca o bem e
viverás melhor.*

*Embora ninguém possa voltar atrás e fazer
um novo começo, qualquer um pode
começar agora e fazer um novo fim.*

Chico Xavier

DEDICATÓRIA

Com enorme prazer eu dedico este trabalho a minha MÃE, que foi minha fonte de energia para lutar, ter perseverança, coragem e acima de tudo por ter me dado a vida. Ao meu PAI, que me deixou o exemplo de honestidade e dignidade como homem, que levarei para toda a vida.

Ao meu irmão Walter, que sempre vai ser a pessoa onde eu hei de buscar o exemplo a seguir.

Eu amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** acima de tudo, por toda a proteção provida a mim, por todos os dias nos quais eu tive capacidade para aprender com as dificuldades superadas, pela minha saúde e a daqueles que estiveram ao meu lado na realização desta conquista.

Agradeço aos meus pais, **Guilherme** e **Maria Terezinha**, por proporcionarem-me a oportunidade de desenvolvimento, pelo ensinamento da vida, por apresentarem-se como heróis diante das dificuldades sempre encontradas em nossas vidas e por terem plantado o amor que une nossa família.

Agradeço ao meu irmão **William**, que mesmo estando longe sempre foi um símbolo de luta pelo trabalho e pela vontade de vencer. A minha irmã **Teca**, que sempre foi parceira nas dificuldades, nos momentos de alegria e foi um suporte muito importante. Ao meu irmão **Walter**, que Deus colocou na minha família como um guia para todos nós, sempre me dando o privilégio de ser companheiro em todos os momentos. A minha irmã **Betânia**, que me deu o exemplo de sempre buscar o trabalho como engrandecimento de vida. Agradeço aos meus sobrinhos, **William**, **Gabriel**, **Guilherme Neto**, **Carla** e **Ana Beatriz** e ao meu afilhado **Gabriel**, que com seus sorrisos de criança, podem fazer o meu mundo melhor.

Agradeço enormemente a **Dra. Luisa L. Villa**, pela orientação neste trabalho, mostrando sempre o melhor caminho a seguir, por sua confiança na minha integração ao seu grupo, pela oportunidade de conhecer e vivenciar sua competência na gestão de um grupo vitorioso e sua companhia nos momentos de celebração com sua alegria contagiante.

Agradeço à minha namorada **Ricele R. Neves**, pelo seu amor verdadeiro e por me ajudar a aprender que o mais importante na união de duas pessoas é o amor e que não existe separação se o amor está sempre ao nosso lado. Aos seus pais, **Rinaldo** e **Celeste**, que são pessoas fantásticas, amigas e que tenho certeza torcem por mim.

Agradeço a minha madrinha, **Dra. Célia Yamada**, pelo apoio no meu estabelecimento em São Paulo.

Agradeço as Sras. **Elizabeth Cunha**, **Eurica** e **Antonina** aos Srs. **Haroldo Pontes** e **Eurides**, pelo prazer de tê-los como grandes amigos em momentos bons e difíceis de minha vida.

Agradeço aos amigos **Maurício** e **Bruno Toscano** e seus pais, **Maria José Fragoso** e **Raimundo Gondin**, pela torcida pelo meu sucesso e companhia em bons momentos durante minha vida.

Agradeço a **Dra. Lourdes Gomes**, por sua orientação no início da vida acadêmica e por suas palavras maternais durante o convívio dentro e fora do ambiente de trabalho.

Agradeço ao **Dr. Wyller Mello**, por me proporcionar o aprendizado profissional e por ter me dado a oportunidade de aplicá-los no seguimento de minha carreira.

Agradeço ao amigo, **Fabício Falconi**, que esteve sempre ao meu lado para ajudar a solucionar os problemas do trabalho e aos seus pais pela agradável companhia e amabilidade. Ao amigo **Newton Verbinsk**, pela ajuda no trabalho.

Agradeço aos amigos **Rodrigo Maia** e **Cristiano Remor**, por estarem ao meu lado nos momentos de estudo e partilharem de um dos momentos mais importantes de minha vida, fazendo com que esta conquista seja também deles.

Agradeço à amiga **Jane Kaiano**, pelos momentos de descontração, compartilhando sua alegria e suas histórias sempre com fins engraçados e por abrir sua casa para o nosso almoço.

Agradeço ao meu amigo **Fabinho**, que apesar de ser uma pessoa cheia de “defeitos” vai ser sempre meu amigo na hora do sushi e pela ajuda no trabalho.

Agradeço a minha amiga **Renata**, por estar sempre perto nas horas difíceis dando força e a boa companhia.

Agradeço a **Sra. Miyuki Fukuda**, pela ajuda nos cortes de fragmentos de NIC, aos amigos **Carlinhos**, **Chamberleim**, **Izabel** e **Leia**.

Agradeço ao **Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer**, na pessoa do **Dr. Ricardo Renzo Brentani**, pela oportunidade de dispor da estrutura desta instituição para a realização deste trabalho.

Agradeço às bibliotecárias do **Hospital do Câncer AC. Camargo, Suely Francisco, Maria Adriana M. Bassols, Francyne P. G. de Lima, Rosinéia A. Carneiro**, pela ajuda na edição desta dissertação.

Agradeço a **FAPESP** pelo suporte financeiro na concessão da bolsa e da reserva técnica, que ajudaram a tornar possível a realização deste trabalho.

Agradeço ao **Laboratório de Síntese de Peptídeos da Escola Paulista de Medicina**, na pessoa do **Dr. Luiz Juliano Neto**, bem como a **Dra. Maria Aparecida Juliano** e o **Dr. Pedro Francisco A. Júnior**, pela colaboração nas quantificações da atividade de telomerase.

Agradeço ao **Laboratório de Biologia Molecular e Genômica do ILPC**, na pessoa da **Dra. Anamaria Aranha Camargo**, pela atenção dispensada na avaliação dos relatórios preliminares e com toda a colaboração nos experimentos realizados, bem como ao **Raphael B. Parmigiani**.

Agradeço a **Dra. Karina Ribeiro**, pela ajuda nas análises estatísticas usadas neste trabalho.

Agradeço com muito apreço aos meus amigos do grupo de virologia, que sempre estiveram a disposição para ajudar em qualquer momento do trabalho e com os momentos descontração. **Aline** com sua calma quase inabalável, a **Totó** com jeito elétrico de ser, a **Andrea** e seu super cabelo vermelho, a **Ana Lepique** pelos conselhos e ajuda no trabalho, a **Cecília** com sua atenção e cuidado sempre redobrado, ao **Enrique** pelos momentos dedicados as conversas e ajuda com o trabalho e na companhia nos jogos de futebol, a **Iza** e a **Lenice** sempre com seus sorrisos largos, ao **Joãozinho** por ter se demonstrado um grande amigo dentro e fora do trabalho, ao **Zeão** por dividir inúmeras vezes idéias, experimentos e pela experiência transmitida, a **Katiana** com seu jeito fantástico de ser ao mesmo tempo distraída e muito competente, a **Laura** e seu jeito engraçado de ditar as “normas do grupo”, a **Lara** pela ajuda com os RNA's e com as brincadeiras no trabalho, a **Carol** por ter sido uma das pessoas responsáveis pela idealização deste trabalho e a quem guardo grande apreço, a **Mônica** com seu super microscópio adestrado, a **Neide** que dividiu muitos experimentos e muitos salgadinhos do “GREEN FINGER MAN”, a **Patty Sávio** que ajudou muito no trabalho e com as conversas do dia a dia, a **Patty Thomann** com sua serenidade, ao **Paulinho** com as conversas no café da manhã, a

Raquel com sua paciência e ajuda com as amostras de pacientes, ao **Rômulo** pela sua companhia no futebol, a **Stella** por sua paciência na espera dos relatórios mensais e a **Tatiana** com sua “Gato-Mania”. Obrigado a todos.

RESUMO

Silvestre, RVD. **Avaliação do estado de metilação do promotor de hTERT de linhagens celulares e de pacientes infectadas com HPV de alto risco.** São Paulo; 2004. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O carcinoma de colo uterino é uma das neoplasias mais comuns que afetam mulheres em todo mundo. Estas neoplasias estão causalmente relacionadas aos papilomavírus humanos (HPV) principalmente os de alto risco oncogênico. A expressão das oncoproteínas virais como E6 e E7, estão implicadas em processos de imortalização e proliferação celular como a ativação de telomerase nas células infectadas. A telomerase é um complexo ribonucleoprotéico responsável pela síntese dos telômeros, estando envolvida no programa de senescência celular. O complexo telomerase possui uma porção responsável pela atividade catalítica do mesmo conhecida como hTERT, que ainda está descrita como sendo fator limitante para expressão de telomerase. A regulação da expressão de hTERT por metilação, onde o promotor se localiza em uma região rica em CpG, poderia estar implicada na atividade de telomerase. Uma região do promotor de hTERT de 643pb (nucleotídeos -476 a +168), incluindo o “core promoter”, foi avaliada por PCR após digestão com *Hpa II* e *Msp I* e por sequenciamento após tratamento com bissulfito de sódio em linhagens tumorais de colo uterino, imortalizadas com o genoma viral e normais, assim como amostras de tecidos derivados de neoplasia intraepitelial cervical (NIC). A atividade de telomerase foi avaliada usando-se o kit “TRAPEze xl Telomerase Detection” e os níveis de expressão de hTERT foram avaliados usando-se RT-PCR. As linhagens derivadas de tumores apresentaram metilação na região do promotor com distribuição ao longo dos 75 dinucleotídeos CpG do fragmento avaliado, sendo observado na linhagem HPV 16 positiva CasKi um perfil totalmente metilado. Entretanto, a metilação deste promotor não parece estar relacionada à diminuição da atividade de telomerase, sendo que os maiores valores da atividade de telomerase foram obtidos com as linhagens que possuíam mais metilação. Além disso, a metilação parece não influenciar a atividade de telomerase. Assim, outros fatores podem estar atuando no controle da transcrição gênica e na atividade de telomerase.

SUMMARY

Silvestre, RVD. **[Evaluation of the methylation status of the hTERT promoter in cell lines and CIN samples infected with high risk HPV types]**. São Paulo; 2004. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Cervical carcinoma is one of the most prevalent types of neoplasia that affect women in worldwide. These neoplasias are casually associated to Human Papillomavirus (HPV) especially to the high-risk types. Expression of viral oncogenic proteins like HPV E6 and E7 are implicated in the process of immortalization and cellular proliferation, including telomerase activation in infected cells. Telomerase is a ribonucleoprotein complex responsible for telomere elongation, involved in proliferative senescence. The telomerase complex possesses a catalytic subunit, hTERT, that is the determinant of its enzymatic activity. We hypothesized that hTERT expression control by methylation of the hTERT promoter CpG island could be determinant of telomerase activity. A 644bp fragment of this promoter (nucleotides -476 to +168), including the core promoter, was evaluated by PCR after restriction with *Hpa II* e *Msp I* and by sequencing after sodium bisulfite modification in cell lines from cervical carcinoma, in HPV-immortalized cell lines and Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) biopsy samples. Telomerase activity was evaluated using the TRAPeze XL Telomerase Detection Kit and hTERT expression by RT-PCR. Cell lines derived from HPV positive (HeLa and SiHa) and negative (C33) tumors displayed positive promoter methylation along the 75 CpG nucleotides present in the fragment studied. Methylated nucleotides were evenly distributed along the analyzed fragment from different cell lines; the HPV-16 positive cell line CasKi exhibited an hypermethylated profile. The observed methylation patterns were not related with down regulation of telomerase activity. Although hTERT promoter methylation was detected in cell lineages with high telomerase activity, CIN samples had lower telomerase activity and less methylated CpG in the hTERT promoter. We conclude that promoter methylation does not play

a major role in hTERT expression control in these cell lines and tissues. Other transcription factors could overcome the methylation effect in the promoter region of hTERT leading to maintenance of hTERT expression and telomerase activity.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	O ciclo de vida dos Papilomavírus Hmanos	6
Figura 2	Seqüência da região promotora de hTERT	15
Figura 3	Deaminação promovida pelo bissulfito de sódio	24
Figura 4	Resistência ao tratamento com bissulfito de sódio	24
Figura 5	Seqüência do vetor utilizado para clonagem	28
Figura 6	Esquema de detecção da atividade de telomerase por fluorescência	33
Figura 7	Gel 1 com perfil de metilação definido por restrição	37
Figura 8	Gel 2 com perfil de metilação definido por restrição	37
Figura 9	Gel com fragmento de hTERT amplificado após tratamento com bissulfito de sódio	39
Figura 10	Perfil de metilação das linhagens	40
Figura 11	Gráfico de barras do perfil de metilação nas linhagens	46
Figura 12	Distribuição da metilação nas linhagens por região do promotor ⁴⁸	
Figura 13	Valores médios da atividade de telomerase nas linhagens	51
Figura 14	RT-PCR para hTERT nas linhagens	53
Figura 15	Diagrama de dispersão entre metilação e atividade de telomerase	55
Figura 16	Média dos valores de atividade de telomerase em tecidos derivados de NIC	58
Figura 17	Perfil de metilação dos tecidos derivados de NIC	60
Figura 18	RT-PCR para hTERT nos tecidos derivados de NIC	62
Figura 19	Mecanismos de controle transcricional de hTERT	64
Tabela 1	Valores quantitativos da atividade de telomerase nas linhagens derivadas de tumores e imortalizadas	51
Tabela 2	Valores quantitativos da atividade de telomerase nos tecidos derivados de neoplasia intraepitelial de cérvix uterina	58

LISTA DE ABREVIATURAS

CCU	CARCINOMA DE COLO UTERINO
C-DNA	DNA COMPLEMENTAR
CpG	CITOSINA MAIS GUANINA
D P	DESVIO PADRÃO
DNA	ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO
DNMT	DNA METIL TRANSFERASE
E6AP	PROTEÍNA ASSOCIADA A E6
EtOH	ETANOL
GAPDH	GLICERALDEIDO 3-FOSFATO DESIDROGENASE
HCl	ÁCIDO CLORÍDRICO
HFF	CULTURA PRIMÁRIA DE FIBROBLASTO DE PREPÚCIO HUMANO
HPV	PAPILOMAVÍRUS HUMANO
hTERT	SUBUNIDADE CATALÍTICA DA TELOMERASE HUMANA
hTR	RNA TELOMÉRICO HUMANO
IBCC	INSTITUTO BRASILEIRO DE CONTROLE DO CâNCER
INCA	INSTITUTO NACIONAL DO CâNCER
KCl	CLORETO DE POTÁSSIO
KSFM	MEIO SEM SORO PARA QUERATINÓCITOS
MgCl₂	CLORETO DE MAGNÉSIO
NaCl	CLORETO DE SÓDIO
NHK	QUERATINÓCITO HUMANO NORMAL
NIC	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL DA CERVICE UTERINA
P97	PROMOTOR DA REGIÃO PRECOCE DE HPV 16
pb	PARES DE BASES
PCR	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
pH	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO

RNA	ÁCIDO RIBONUCLEICO
RT-PCR	“REVERSE TRANSCRIPTASE – PCR”
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TRAP	TELOMERIC REPEAT AMPLIFICATION PROTOCOL

LISTA DE SÍMBOLOS

amol	concentração equivalente a 10^{-18} mol
μL	MICROLITRO
μM	MICROMOLAR
g	GRAMA
Kda	QUILO DALTON
M	MOLAR
ml	MILILITRO
mM	MILIMOLAR
ng	NANOGRAMA
nm	NANÔMETRO
rpm	ROTAÇÕES POR MINUTO
seg	SEGUNDOS
U	UNIDADES
URF	UNIDADES RELATIVAS DE FLUORESCÊNCIA

ÍNDICE

1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
2	INTRODUÇÃO	4
2.1	O Câncer de Colo Uterino e o Papilomavírus Humano (HPV)	4
2.2	Telomerase, HPV e o Câncer de Colo de Útero	7
2.3	Telômeros e Telomerase	9
2.4	O promotor de hTERT	11
2.5	Metilação	12
3	OBJETIVOS	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1	Linhagens Celulares e Espécimes de Pacientes	17
4.2	Análises com Enzimas de Restrição	19
4.2.1	Protocolo de digestão do DNA com as enzimas de restrição <i>Hpa</i> II e <i>Msp</i> I	20
4.2.2	Protocolo para amplificação de hTERT após restrição	22
4.3	Tratamento do DNA com Bissulfito de Sódio	23
4.3.1	Protocolo para reação de PCR após tratamento com bissulfito de sódio	25
4.3.2	Protocolo para reação de <i>NESTED</i> -PCR após tratamento com bissulfito de sódio	26
4.4	Clonagem e Sequenciamento do Fragmento Modificado	27
4.5	RT-PCR para hTERT	29
4.5.1	Protocolo para amplificação de GAPDH a partir de c-DNA	30
4.5.2	Protocolo para reação de RT-PCR específica para hTERT após síntese de c-DNA	31
4.6	Deteção e Quantificação da Atividade de Telomerase	31
4.6.1	Protocolo de extensão telomérica e PCR	34

4.7	Análise Estatísticas	35
5	RESULTADOS	36
5.1	Linhagens Celulares e Culturas Primárias	36
5.1.1	Análise com Enzimas de Restrição	36
5.1.2	PCR e Sequenciamento após Tratamento com bissulfito de sódio das Linhagens	38
5.1.3	Detecção e Quantificação da Atividade de Telomerase nas Linhagens	49
5.1.4	RT-PCR para Avaliação da Expressão de hTERT nas Linhagens	52
5.1.5	Correlação entre Atividade de Telomerase e Metilação no Promotor de hTERT	54
5.2	Tecidos Derivados de NIC e de esfregaços do colo do útero	56
5.2.1	Valores de Atividade de Telomerase para os Tecidos Derivados de NIC	57
5.2.2	Perfil de Metilação de NIC	59
5.2.3	RT-PCR para Avaliação da Expressão de hTERT nos Tecidos Derivados de NIC	61
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÕES	70
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Dentre as neoplasias mais comuns que afetam mulheres em todo mundo, o câncer de colo de útero é umas das mais comuns principalmente nos países subdesenvolvidos, sendo responsável por cerca de 500,000 novos casos anuais e 200,000 mortes a cada ano em todo o mundo (BOSCH *et al* . 1997), no Brasil estas mortes representam 7,22% do total de mortes segundo localização primária do tumor entre os anos de 1995 e 1999, o que classifica o câncer de colo uterino como o terceiro maior responsável por óbitos entre mulheres no país, sendo a região norte, a de maior incidência bruta de óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2003).

Estudos epidemiológicos realizados nos últimos 15 a 20 anos, tem demonstrado que o Papilomavírus Humano (HPV), é o principal fator de risco associado a progressão de doença, além disso, os dados disponíveis sobre a evidência da associação entre a infecção por HPV e o câncer de colo de útero, satisfazem todos os critérios de determinação causal entre a infecção e o desenvolvimento de neoplasia do colo uterino (SCHIFFMAN *et al* .1993; FRANCO *et al* . 1995 e 2003).

Entre os tipos de HPV existentes, os tipos de alto risco oncogênico como 16 e 18, são os mais encontrados nos tumores malignos associados a infecção por HPV (BOSCH *et al* . 1995; WALBOOMERS *et al* . 1999). Uma importante particularidade, principalmente dos tipos de HPV de alto risco oncogênico, é a capacidade de integrar seu genoma de DNA ao genoma do hospedeiro (VILLA 1997), e a expressão de algumas oncoproteínas como E6 e E7, que são capazes de promover uma desregulação do ciclo celular, que pode levar estas células a imortalização e transformação.

As oncoproteínas E6 e E7, atuam principalmente sobre o produto de genes supressores de tumor como p53 e pRb respectivamente. A proteína E6 acelera a degradação de p53 e E7 por sua vez, se liga e degrada o produto do gene pRb (DUENSING e MUNGER 2002).

A proteína viral E6 por sua vez, tem a capacidade de reativar a expressão de telomerase (GEWIN e GALLOWAY 2001), uma enzima que é responsável pela síntese do telômero, que são estruturas localizadas nas extremidades dos cromossomos e que estão relacionadas com a sinalização da senescência celular (KOLQUIST *et al.* 1998). Em células transformadas e/ou imortalizadas é comum se detectar a reativação de telomerase, o que não ocorre em tecidos somáticos normais (KLINGELHUTZ *et al.* 1997)

A telomerase é um complexo enzimático ribonucleoprotéico que tem entre suas características uma atividade de transcriptase reversa, pois é capaz de sintetizar uma sequência de DNA telomérico a partir de um molde de RNA presente no complexo, codificado pelo gene hTR (GREIDER e BLACKBURN 1989). A subunidade catalítica da telomerase codificada pelo gene *hTERT*, por si só, tem a capacidade de restaurar a atividade da telomerase quando transfectada em células somáticas normais telomerase negativas (BODNAR *et al.* 1998).

A presença de um grande número de sítios CpG na região promotora de hTERT (HORIKAWA e BARRETT 2003), sugere que este promotor possa sofrer influências em sua regulação, pelo mecanismo de metilação. Diferentes mecanismos de metilação são importantes para a regulação de alguns genes, durante o desenvolvimento de alguns tumores, como por exemplo no caso de acúmulo de metilação em sítios randômicos no promotor de p16^{INK4a}, que é responsável pela perda da expressão deste gene em alguns casos (MERLO *et al.* 1995).

Alguns trabalhos realizados até então tem demonstrado uma heterogeneidade de resultados em relação a um possível controle de expressão de hTERT através da metilação do seu promotor e a atividade de telomerase. No trabalho de BECHTER *et al* . (2002), envolvendo linhagens de leucemia de células B células exibindo uma alta atividade de telomerase possuíam significativamente menos metilação no promotor de hTERT. Em WIDSCHWENDTER *et al* . (2004a) , a metilação do promotor de hTERT é significativamente mais freqüente nas amostras de tumores do colo uterino em relação aos tecidos normais. Além disso, estes autores não observaram correlação entre metilação e expressão de RNAm de hTERT.

Diferentes metodologias são empregadas nestes trabalhos para identificação do perfil de metilação deste promotor, onde algumas estratégias experimentais são baseadas em restrição do DNA genômico com enzimas sensíveis a metilação e posteriormente por PCR antes ou após o tratamento com bissulfito de sódio. Contudo, boa parte dessas estratégias experimentais consegue avaliar apenas sítios CpG, que estão sobrepostos aos sítios de cortes destas enzimas, deixando assim de avaliar os sítios CpG que não coincidem com os sites passíveis de restrição por estas enzimas.

Uma avaliação do estado de metilação global do promotor de hTERT, onde todos os sítios passíveis de metilação possam ser avaliados, nas amostras estudadas, poderia fornecer uma visão mais completa da importância da metilação no mecanismo de controle da transcrição da subunidade catalítica da telomerase, hTERT.

2 INTRODUÇÃO

2.1 O CÂNCER DE COLO UTERINO E O PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

O câncer de colo uterino (CCU) é a segunda causa de morte por câncer mais freqüente entre mulheres em todo mundo, (BEKKERS *et al* . 2004). Dado que se faz muito representativo nos países em desenvolvimento, onde as taxas de incidência de CCU podem chegar a 30/100.000.

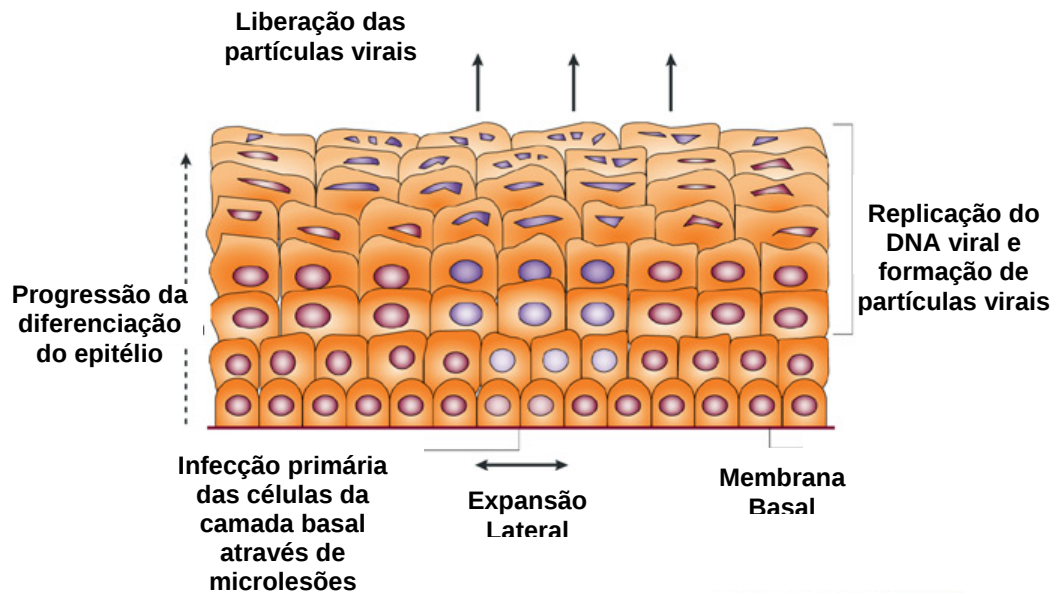
As lesões precursoras no epitélio do colo uterino recebem graduações de estadiamento de acordo com os achados morfológicos. Em relação à citologia, esta classificação foi definida pelo sistema de Bethesda que gradua os achados da seguinte maneira: células escamosas com atipia de significado indeterminado (ASCUS); lesões intra-epiteliais de baixo grau (LSIL); lesões intra-epiteliais de alto grau (HSIL). Enquanto a classificação histológica considera as seguintes categorias em estadio crescente de graduação: neoplasia intra-epitelial cervical de grau I ou NIC I, NIC II e NIC III, carcinoma *in situ* e o carcinoma invasivo de células escamosas (Kurman e Solomon, 1994).

Em meados dos anos 70 os pesquisadores começaram a postular e analisar a possibilidade de que o HPV estivesse envolvido na origem dos cânceres cervicais, (ZUR HAUSEN 2002). Em 1976, MEISELS e FORTIN publicaram um artigo destacando que o aparecimento de coilócitos em esfregaços cervicais, seria indicativo de infecção por papilomavírus.

Sendo uma patologia que tem o comportamento de uma doença sexualmente transmissível, o CCU possui vários fatores de risco, tanto para o carcinoma quanto para as lesões que o antecedem, como NIC I, II e III. Os principais fatores de risco associados ao CCU são: início precoce da vida sexual, número de parceiros sexuais, tabagismo, baixo nível sócio-econômico (SCHIFFMAN *et al.* 1993) e o uso de contraceptivos orais (HILDESHEIM *et al.* 1990). Contudo a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento desta neoplasia (SCHIFFMAN *et al.* 1993; FRANCO *et al.* 1995).

Com o avanço de estudos sobre o comportamento das infecções virais por HPV, pôde-se então identificar que apenas a infecção não seria suficiente para a progressão e o agravamento das lesões associadas ao HPV e sim uma fator fundamental nesse desenvolvimento seria a infecção persistente por um dos tipos de alto risco oncogênico como HPV 16 ou 18 (SCHLECHT *et al.* 2001 e 2003).

O sítio de infecção por HPV é a camada basal dos epitélios, que deve ter a capacidade de proliferar. Nestas células, apenas uma expressão limitada dos genes precoces do genoma viral, como E6 e E7, é observada, estes genes atuam no controle do ciclo celular e a expressão destes genes proporciona uma expansão lateral das células desta camada do epitélio. Após a passagem para a camada supra basal os genes conhecidos como tardios começam a ser expressos, ocorre a replicação do genoma viral e a formação de algumas proteínas estruturais, culminando com a formação e liberação das partículas virais nas camadas mais superiores deste epitélio (ZUR HAUSEN 2002), (Fig 1).



Fonte: Modificado de ZUR HAUSEN (2002)

Figura 1 O ciclo de vida dos Papilomavírus Humanos. A infecção pelo HPV se dá através de lesões na camada basal do epitélio, as células infectadas se dividem e se espalham no epitélio lateralmente, algumas dessas células passam para a camada supra-basal levando a ativação de alguns genes virais, o DNA viral é replicado e o capsídeo viral é formado, seguindo-se a formação da partícula viral com posterior liberação da mesma.

A expressão dos genes E6 e E7 dos HPV 16, tem seu controle realizado pelo promotor P97 viral. O produto da transcrição destes genes é um RNA Policistrônico que quando oriundo dos tipos de HPV de alto risco oncogênico, tem interferência no ciclo celular, sendo assim, estas proteínas colaboram com o processo de transformação celular. A expressão contínua destes genes, faz com que linhagens celulares normais, como as de queratinócitos primários, tenham seu período de senescência alterados.

Devido ao descontrole na identificação do período de parada de proliferação celular, estas células acumulam mutações que alteram significativamente suas características primárias, levando-as a fenótipos imortalizados ou transformados. (MATLASHEWSKI *et al.* 1988; SCHLEGEL *et al.* 1988; VILLA 1997).

A proteína E6 promove a degradação do produto do gene *p53*, que é um gene supressor de tumor (WERNESS *et al.* 1990). Além de interagir com *p53*, E6 também interage com E6AP, que é uma proteína ligase celular, que tem a finalidade de mediar o reconhecimento do substrato onde E6 deve se ligar (HUIBREGTSE *et al.* 1993). Sendo assim o complexo E6-E6AP precede a ligação à *p53*, redirecionando a especificidade de E6AP para *p53* (MANTOVANI e BANKS 1999). A proteína E6 liga-se a diversas outras proteínas celulares e a promotores diversos (DUENSING e MUNGER, 2001). Dentre suas múltiplas ações existe interesse no estudo da ativação de telomerase (BAEGE *et al.* 2002).

2.2 TELOMERASE, HPV E CÂNCER DE COLO DE ÚTERO

Múltiplos mecanismos estão envolvidos no processo de senescência celular em células de humanos, entre estes o principal mecanismo é o encurtamento dos

telômeros que ocorre a cada divisão celular. Isto ocorre através de um fenômeno conhecido como “End Replication Problem” que corresponde a perda de uma porção do DNA telomérico a cada divisão celular, ocasionando com isso a diminuição de cerca de 30 a 70 nucleotídeos do DNA telomérico a cada ciclo (LEVY *et al.* 1992).

A manutenção dos telômeros pode ser causada pela ativação de telomerase. Células germinativas e muitas células imortais, incluindo as células cancerosas tem telomerase ativa (COLLINS e MITCHELL 2002). Os cânceres associados as infecções por HPV como os de cérvix não são diferentes , onde de 80 a 100% possuem atividade de telomerase (WISMAN *et al.* 2001).

E6 é uma das proteínas precoces de HPV que está envolvida na imortalização e transformação mediada pelo vírus. E6 tem várias funções, incluindo a de aumentar a atividade de telomerase, quando expressa em uma variedade de tipos celulares, através da ativação transcricional de hTERT, (GEWIN e GALLOWAY 2001; OH *et al.* 2001).

O promotor de *hTERT* localiza-se em uma região onde se encontra uma ilha de CpG, sabidamente capaz de sofrer influência da metilação na regulação da transcrição. Contudo, muitos trabalhos tem demonstrado resultados controversos em relação a regulação da transcrição de hTERT mediada por metilação (DEVEREUX *et al.* 1999; WIDSCHWENDTER *et al.* 2004a e 2004b). Assim, este trabalho visa reforçar o que pode estar acontecendo com a regulação da transcrição de hTERT em células infectadas por HPV e o que a metilação significa para este promotor nestas células.

2.3 TELÔMEROS E TELOMERASE

Na porção terminal dos cromossomos humanos de células normais, existe uma estrutura conhecida como telômero. Os telômeros consistem em alguns quilobases de repetições “TTAGGG” juntamente com outras proteínas que estão associadas a essa estrutura (KIPLING 1995).

A existência dos telômeros é vital para o crescimento celular e para que a segregação dos cromossomos aconteça de maneira normal, na transmissão para as células filhas. A região 3' do DNA telomérico, consiste em uma fita simples de DNA na maioria dos organismos vertebrados, essa região de DNA simples fita poderia ser reconhecida como um DNA danificado e processado como tal, o que poderia levar a uma parada no ciclo celular ou a fusão de duas extremidades terminais de cromossomos diferentes, ou poderia também, ser degradada pela ação de exonucleases (McEACHERN *et al.* 2000).

Um importante grupo de proteínas está ligado a extremidade 3' do DNA telomérico de fita simples, essas proteínas contém duas subunidades, uma subunidade α de 56-Kda, que se liga a fita simples de DNA telomérico de acordo com uma sequência específica e uma unidade β de 41-Kda que se liga fracamente ao DNA mas é capaz de afetar a habilidade da subunidade α de interagir com o DNA (FROELICH-AMMON *et al.* 1998)

Interessantemente, algumas proteínas ligadas aos telômeros que somente são encontradas ligadas a essa estrutura, podem recrutar e ativar nucleases e outros fatores de reparo, dos quais a atividade é necessária para algumas funções teloméricas como a manutenção da porção 3' despareada e a ligação da telomerase. Contudo, essa atividade pode ser prejudicial à extremidade dos cromossomos se

deixadas sem checagem, por isso essas funções precisam ser fortemente controladas pelas proteínas específicas do telômero (FERREIRA *et al.* 2004).

A telomerase é um complexo ribonucleoprotéico formado basicamente de um componente de RNA (hTR) e uma sub-unidade catalítica conhecida como hTERT que pertence à família das transcriptases reversas. Esta enzima foi identificada inicialmente em células HeLa (MORIN 1989). Diferenças nos níveis de hTR e de hTERT, acumulados na célula, tem efeitos únicos na ativação do complexo telomerase. Pelo menos três passos devem ser considerados na montagem de um complexo biologicamente funcional: o acúmulo de RNA, ativação catalítica e o recrutamento do telômero (COLLINS e MITCHELL 2002).

A atividade desta enzima é indetectável em muitas células e tecidos normais, mas está presente na maioria das células imortalizadas e tecidos cancerosos (KOLQUIST *et al.* 1998). Estudos recentes tem demonstrado que o produto do gene E6 dos HPVs de alto risco oncogênico, tem a capacidade de aumentar a atividade de telomerase, predominantemente via ativação transcricional da subunidade catalítica da telomerase hTERT (BAEGE *et al.* 2002). Ainda que E6 seja capaz de induzir a atividade da telomerase, está claro que existam outros mecanismos celulares distintos atuando no processo de ativação da telomerase, culminando com a imortalização e transformação celular (BAEGE *et al.* 2002).

Muitos trabalhos tem mostrado que a expressão de hTERT por si só, é capaz de restaurar a atividade de telomerase em células telomerase negativas e que normalmente este evento acontece em fases iniciais da tumorigênese. A subunidade catalítica da telomerase pode por si só, ser a porção reguladora da atividade da enzima por duas razões:

1. a expressão do RNAm da subunidade catalítica é sempre paralela a atividade da enzima (KILIAN *et al.* 1997; NAKAMURA *et al.* 1997);
2. a introdução de hTERT em células somáticas normais e telomerase negativas é suficiente para restaurar a atividade enzimática nestas células (BODNAR *et al.* 1998; COUNTER *et al.* 1998).

Um evento que poderia ter influência junto com a metilação no promotor de hTERT e na atividade de telomerase, seria a ocorrência de mutações dentro do promotor de hTERT. Este fato pode ser ilustrado em células SiHa, que são células derivadas de carcinoma de colo uterino HPV positivas, que mesmo com o promotor de hTERT totalmente ou parcialmente metilado, ainda existe atividade de telomerase (DEVEREUX *et al.* 1999). Portanto, seria importante saber se existe algum tipo de regulação epigenética, no controle da expressão de hTERT em células infectadas com HPV de alto risco oncogênico.

2.4 O PROMOTOR DE hTERT

O gene *hTERT*, está localizado no cromossomo 5p15.33 e é constituído de 16 exons e 15 introns se estendendo por aproximadamente 35Kb. O promotor de hTERT é rico em dinucleotídeos CG e não possui seqüências TATA e CAAT, que seriam seqüências sinalizadoras para ligação da maquinaria de transcrição. Análises iniciais, mostraram que uma região de 181pb a montante do sítio inicial de transcrição, correspondia a principal região ativadora do promotor então definida como “core promoter”, onde também foram descritos sítios de ligação dos fatores de transcrição, como Myc e Sp1. (TAKAKURA *et al.* 1999), (Fig 2). Os sítios de ligação de Myc localizados no promotor de hTERT, podem mediar a ativação da transcrição deste gene (WANG *et al.* 1998; WU *et al.* 1999).

2.5 METILAÇÃO

Um possível fator que pode estar atuando no aumento da expressão de hTERT, juntamente com a expressão de E6, é o fato de o promotor desta subunidade possuir inúmeros sítios de CpG, que podem estar sujeitos ao processo de metilação.

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 no dinucleotídeo CG, através de uma família de DNA-metiltransferases. A metilação do DNA ocorre quase exclusivamente nos dinucleotídeos CpG e tem uma importante função na regulação da expressão gênica e no silenciamento de elementos repetitivos no genoma (FEINBERG e TYCKO 2004), sendo ela randômica ou sítio específica. É muito freqüente em genomas de eucariotos (POOLE *et al.* 2001).

As DNA metil-transferases (*DNMT*) possuem duas classes de representantes: aquelas envolvidas na metilação de fitas hemimetiladas do DNA, conhecidas como metilases de manutenção com é o caso da *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, onde os exemplos são *DNMT2* e *DNMT3A* e *DNMT3B* (BESTOR 2000).

O processo de metilação está presente em casos de silenciamento de genes humanos. Frequentemente nos eucariotos superiores, os promotores de genes que estão sendo expressos, apresentam sítios de CpG desmetilados (EDEN e CEDAR 1994).

O proto-oncogene *c-myc*, que codifica um fator de transcrição envolvido no controle da proliferação e diferenciação celular, quando tem sua expressão

desregulada seja por amplificação gênica, inserção do genoma de um retrovírus ou por translocação cromossômica, está também envolvido na tumorigênese. A proteína Myc, tem um envolvimento direto na indução da expressão da atividade da subunidade catalítica da telomerase hTERT (WU *et al.* 1999). Tanto a expressão da subunidade catalítica da telomerase quanto a expressão de *c-myc* podem induzir a imortalização celular quando constitutivamente expressos em células transfectadas. O promotor de hTERT possui dois sítios de ligação de MYC que podem mediar a ativação da transcrição de hTERT (WANG *et al.* 1998; WU *et al.* 1999), conforme já mencionado.

DEVEREUX *et al.* (1999), estudaram um fragmento compreendido entre, 500pb a montante do sítio inicial de transcrição do gene e 50pb a jusante do sítio inicial de transcrição, gerando assim um fragmento de 550pb. No trabalho citado, a análise do grau de metilação é feita por MSP (Methylation Specific PCR) ou seja, nesta metodologia, cada fragmento a ser avaliado deve ser feito com dois conjuntos de iniciadores diferentes. O primeiro conjunto promove a amplificação dos fragmentos que estiverem com os dinucleotídeos CpG metilados no DNA tratado com bissulfito de sódio, já que estes quando metilados, não sofreram alteração no nucleotídeo “C” de um sítio ^mCpG, tendo assim sua seqüência mantida e reconhecida pelo iniciadores. O outro conjunto de iniciadores usado para avaliar o mesmo fragmento, agora com os sítios CpG desmetilados, deve ser capaz de reconhecer as alterações nestes sítios quando estes forem tratados com bissulfito de sódio, já que neste caso, todos os nucleotídeos “C” de um sítio CpG desmetilado sofrerão uma deaminação promovida pelo bissulfito de sódio e se tornaram timina após a amplificação pela polimerase.

No presente trabalho o fragmento analisado corresponde a 476pb a montante do sítio inicial de transcrição e 168pb a jusante, totalizando um fragmento de 644pb. A avaliação de sítios CpG na porção do 1º exon deste fragmento, foi avaliada por já ter sido mostrado que a metilação em regiões do 1º exon é importante na regulação gênica, (HUR et al. 2003). Esse fragmento foi então clonado e sequenciado para avaliação individual de cada um dos 75 dinucleotídeos CpG que existem dentro deste fragmento, através da observação da possível mudança nas citosinas dependendo da existência de metilação nessas bases.

Desta maneira, a questão estabelecida neste trabalho foi a de avaliar se a metilação no promotor de hTERT está associada com as infecções por HPV de alto risco oncogênico e com as alterações proliferativas desencadeadas por esta infecção.

```

-551 CCCC GCGTCC GGACCTGGAG GCAGCCCTGG GTCTCCGGCT -512
-511 CAGGCCAGCG GCCAAAGGGT CGCCGCACGC ACCTGTTCCC -472
-471 AGGGCTCCA CATCATGGCC CCTCCCTCGG GTTACCCAC -432
-431 AGCCTAGGCC GATTCGACCT CTCTCCGCTT GGGCCCTCGC -392
-391 TGGCGTCCCT GCACCCTGGG GAGCGCGAGC GGCCGCGGG -352
-351 CGGGGAAGCG CGGCCAGAC CCCGGGGT CGCCGGAGC -312
-311 AGCTGCGCTG TCGGGGCCAG GCCGGGCTCC AGTGGATTCTG -272
-271 CGGGCACAGA CGCCAGGAC CGCGCTTCC ACGTGGCGGA -232
-231 GGGACTGGGG ACCGGGGCAC CCGTCCTGCC CC TTCACCTT -192
-191 CCAGCTCCGC CTCCTCCGCG CGGACCCCGC CCCGTCCCGA -152
-151 CCCCTCCCGG GTCCCCGGCC CAGCCCCCTC CGGGCCCTCC -112
-111 CAGCCCCTCC CCTTCCTTTC CGCGGCCCCG CCCTCTCCTC -72
-71 GCGGCGCGAG TTTCAGGCAG CGCTGCGTCC TGCTGCGCAC -32
-31 GTGGGAAGCC CTGGCCCCGG CCACCCCGC GATGCCGCGC +9
+10 GCTCCCCGCT GCCGAGCCGT GCGCTCCCTG CTGCCAGCCA +49
+50 CTACCGCGAG GTGCTGCCGC TGGCCACGTT CGTGCGGCGC +89
+90 CTGGGGCCCC AGGGCTGGCG GCTGGTGAGC CGCGGGACCC +129
+130 GGCGGCTTTC CGCGGCGTGG TGGCCAGTG CCTGGTGTGC +169
+170 GTGCCCTGGG ACGCACGGCC GCCCCCGCC GCCCCCTCCT +209
+210 TCCGCCAGGT GGGCCTCCCC GGGGTCGGCG TCCGGCTGGG +249
+250 GTTGAGGGCG GCCGGGGGGA ACCAGCGACA TGCGGAGAGC +289
+290 AGCGCAGGCG ACTCAGGGCG CTTCCCCCGC AGGTGTCCTG +329
+330 CCTGAAGGAG CTGGTGG +346

```

- Iniciadores hTERT1F e 1R
- Iniciadores hTERT3F e 3R
- Sítios de ligação para o fator de transcrição **Sp1**
- Sítios de ligação para o fator de transcrição **c-Myc**
- ATG inicial
- Iniciadores hTERT2F e 2R
- Sobreposição do sítio de *Sp1* com os sítios de *Hpa II* e *Msp I*
- Sobreposição dos Iniciadores 2R e 3R
- sítios de *Hpa II* e *Msp I*
- Sobreposição entre os Iniciadores 2F e 3F

Figura 2 - Sequência da região promotora e de parte do 1º exon de hTERT, com os iniciadores usados no estudo, os sítios de ligação de fatores de transcrição **Sp1** e **c-Myc**, sítios de restrição das enzimas *Hpa II* e *Msp I*, ATG inicial e regiões sobrepostas destas sequências.

3 OBJETIVOS

- Identificar o estado de metilação do promotor de hTERT, em linhagens celulares derivadas de tumores de colo uterino e de tecidos oriundos de lesões precursoras (NIC) HPV positivos.
- Localizar dentro do promotor de hTERT, a metilação em alguns sítios específicos de ligação de fatores de transcrição.
- Avaliar se a metilação estaria alterando a expressão de hTERT e a atividade de telomerase.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS CELULARES E ESPÉCIMES DE PACIENTES

Para avaliar o grau de metilação do promotor de hTERT em linhagens celulares e ainda, a atividade de telomerase, foram escolhidas 4 linhagens humanas derivadas de carcinoma de colo do útero, sendo elas; SiHa, HeLa, CasKi e C33, onde as três primeiras linhagens citadas, são derivadas de tumores HPV positivos e a última, derivada de um tumor de colo uterino HPV negativo, estas linhagens foram adquiridas da “American Type Culture Collection” (ATCC) com o número de passagens desconhecido e mantidas continuamente por aproximadamente 2 anos.

Também foram estudadas duas linhagens de queratinócitos humanos imortalizados com genoma completo (GC) de HPV (BARBOSA e SCHLEGEL 1989), sendo 18Nco uma linhagem imortalizada com GC de HPV 18 e 698 uma linhagem imortalizada com GC de HPV 16. Uma cultura primária de queratinócitos normais, NHK, também foi submetida à mesma avaliação feita nas demais células.

Além das linhagens citadas acima, uma cultura primária de fibroblastos de prepúcio humano normais (HFF), foi incluída no estudo, como controle negativo para atividade de telomerase, tendo sido coletada na passagem 5. Estas linhagens foram cultivadas sob uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, em meio RPMI *Media* (SIGMA-ALDRICH), suplementado com 10% de soro bovino fetal.

As linhagens derivadas de carcinoma de colo uterino foram cultivadas em “Dulbeccos Modified Eagle’s Medium” (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal, nas mesmas condições de temperatura e CO₂ das anteriores, por no

mínimo três passagens. Já os queratinócitos normais (NHK) e os imortalizados com genoma de HPV, foram cultivados nas mesmas condições de temperatura e CO₂, com meio de crescimento para queratinócitos KSFM numa proporção de três partes de KSFM e uma de DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal. 2×10^5 células foram usadas para avaliação da atividade de telomerase.

O DNA destas linhagens foi extraído com “Trizol Reagent (Life Technologies Carlsbad, CA, UK). As amostras de tecidos derivados de NIC de pacientes que foram analisadas, foram obtidas junto ao Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC) e correspondem a lesões de diversos graus, desde NIC I até NIC III (mais severo) .

Estas amostras, foram coletadas, fixadas com gel “Tissue Tek” e armazenadas em nitrogênio líquido, até o momento do processamento para análise, onde foram feitos cortes em criostato. Estes cortes, assim como os “Pellets” das linhagens, foram submetidos a lise com tampão fornecido pelo kit para detecção da atividade de telomerase segundo descrição do fabricante, TRAPeze XL telomerase detection kit (Serologicals, Norcross, GA, USA), e o DNA dos tecidos derivados de NIC, foi extraído com digestão por proteinase K e purificação com Fenol-Clorofórmio, seguido de precipitação com etanol.

Paralelamente utilizaram-se amostras coletadas de esfregaços de colo de útero de pacientes atendidas em um estudo prospectivo LUDWIG – McGill, que há uma década avalia aproximadamente 2.500 mulheres quanto a presença de DNA de HPV em esfregaços e os riscos em relação ao desenvolvimento de doença, realizado no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer em colaboração com a Universidade McGill no Canadá. Estas amostras foram armazenadas em “Freezer” comum a

temperatura aproximada de -20°C, em Tris 10mM pH 7,4, EDTA 1mM, por diversos meses.

Todas as amostras de pacientes foram obtidas com consentimento expresso. Os diversos estudos foram aprovados pelos comitês de ética institucionais e foram conduzidas de acordo com todas as normas éticas.

4.2 ANÁLISES COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

O DNA submetido ao tratamento com enzimas de restrição para uma análise preliminar do estado de metilação da região promotora de hTERT foi quantificado e 500ng de DNA genômico obtido das linhagens referidas acima, foi submetido ao tratamento com 10 U das seguintes enzimas ***Hpa II*** e ***Msp I***, (New England Biolabs, Beverly, MA). Estas enzimas são isoesquizômeros, ou seja, são capazes de reconhecer o mesmo sítio de restrição só que com características diferentes: a enzima ***Hpa II***, reconhece a seqüência (5'CCGG 3'), não sendo capaz de cortar tal seqüência quando a citosina do dinucleotídeo ^mCpG estiver metilada; já a enzima ***Msp I***, corta este mesmo sítio ainda que a citosina esteja metilada. Uma alíquota do DNA extraído de cada linhagem, na concentração de 100ng/μL, foi submetido ao procedimento de restrição segundo o protocolo a seguir.

4.2.1 Protocolo de digestão do DNA com as enzimas de restrição *Hpa II* e *MspI*

***Hpa II* (10.000 U/ml) NEBuffer 1**

Digerido 8h a 37 °C

	1 reação (μL)	[] final
DNA	5μL DNA (100ng/μL)	0,5 μg
Tampão	2 μL	
Enzima	1μL *	10 U
H2O	12 μL	
V. final	20 μL	

* - em duplicata, omitindo-se a enzima nos tubos controle

***Msp I* (20.000 U/ml) NEBuffer 2**

Digerido 8h a 37 °C

	1 reação (μL)	[] final
DNA	5μL DNA (100ng/μL)	0,5μg
Tampão	2 μL	
Enzima	0,5 μL *	10U
H2O	12,5μL	
V. final	20 μL	

* - idem acima

NEBuffer 1: 10mM Bis Tris Propano-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, pH 7,0 a 25°C.

NEBuffer 2: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,9 a 25°C.

Na restrição do DNA das linhagens foi usada uma estratégia de adicionar nas primeiras 4 horas de restrição, a metade da quantidade de enzima para cada amostra, ou seja, 5 unidades foram usadas nas primeiras 4 horas e outras 5 unidades foram adicionadas após as 4 primeiras horas de restrição. Ao final da restrição as enzimas foram inativadas a 65°C por 20 minutos.

Após o tratamento com as enzimas, realizou-se uma reação de PCR com um conjunto de iniciadores que amplificam uma região de 650pb do promotor em estudo (hTERT3F e hTERT3R, Fig 2). O produto da digestão de cada linhagem foi diluído 1:5 e desta diluição foi usado 1 µL para PCR. O fragmento produzido nesta PCR foi clonado e seqüenciado para a confirmação da identidade do fragmento. As condições da reação estão demonstradas a seguir.

Os reagentes como MgCl₂ 50 mM , Tampão 10x e Taq DNA Polimerase recombinante, são fabricados pela “Invitrogen Life Technologies” (Carlsbad, CA, UK). O tampão 10x contém, 200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500mM KCl. Como este fragmento a ser amplificado corresponde a uma região rica em CG, é necessário que nesta reação seja adicionada a Betaína, que é uma sulfona de baixo peso molecular e juntamente com o dimetil-sulfóxido (DMSO), são os compostos mais usados na otimização de reações de PCR que buscam amplificar fragmentos ricos em CG (CHAKRABARTI e SCHUTT 2001).

4.2.2 Protocolo para amplificação de hTERT após restrição

Reagente	1 reação
H ₂ O	6,7 µL
tampão 10x	2,5 µL
MgCl ₂ 50 mM	1,0 µL
Iniciador hTERT3F (20 µM)	0,5 µL
Iniciador hTERT3R (20 µM)	0,5 µL
dNTP (2mM)	6,4 µL
Taq DNA Polimerase	0,4 µL
Betaína 5mM	6,0 µL
* DNA	1,0 µL
Vol. Final	25 µL

* - vide texto

Programa no termociclador:

94° C – 4 min

94° C – 1 min	} 35 ciclos
58° C – 1 min	
72° C – 1 min	
72°C – 7 min.	

4.3 TRATAMENTO DO DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO

O bissulfito de sódio promove uma modificação de $C \rightarrow U$, através da deaminação das citosinas desmetiladas que são convertidas em uracila e que posteriormente, após a PCR e clonagem, podem ser detectadas por sequenciamento. Caso a citosina do dinucleotídeo CpG esteja metilada, esta modificação não ocorrerá e a sequência de DNA será então mantida após o PCR específico para a região do promotor. A modificação das amostras de DNA com bissulfito de sódio está esquematizada nas Figuras 3 e 4.

Esta metodologia busca avaliar todos os dinucleotídeos CpG contidos dentro da sequência definida, através de uma reação de *NESTED* PCR. Um μ g de DNA de cada uma das linhagens celulares e das amostras de pacientes a serem estudadas, foi submetido ao tratamento com bissulfito de sódio, seguindo o protocolo padrão do kit comercial (CpGenome DNA modification Kit, Serologicals Norcross, GA). As condições para esta reação são apresentadas a seguir.

A PCR após o tratamento com bissulfito de sódio, foi feita com dois conjuntos de iniciadores, o primeiro par de iniciadores amplifica uma região de 883pb que se encontra entre -540pb até 343pb, que são hTERT1F e hTERT1R. (Figura 2). Como estes iniciadores só são usados após a modificação com bissulfito de sódio, os mesmos devem ter sua sequência modificada para que reconheçam o fragmento após o tratamento. No iniciador **hTERT1F** todos os nucleotídeos **C (citosina)** foram mudados para **T (timina)**, já no iniciador **hTERT1R**, todos os nucleotídeos **G (guanina)** da sequência original foram mudados para **A (adenina)**.

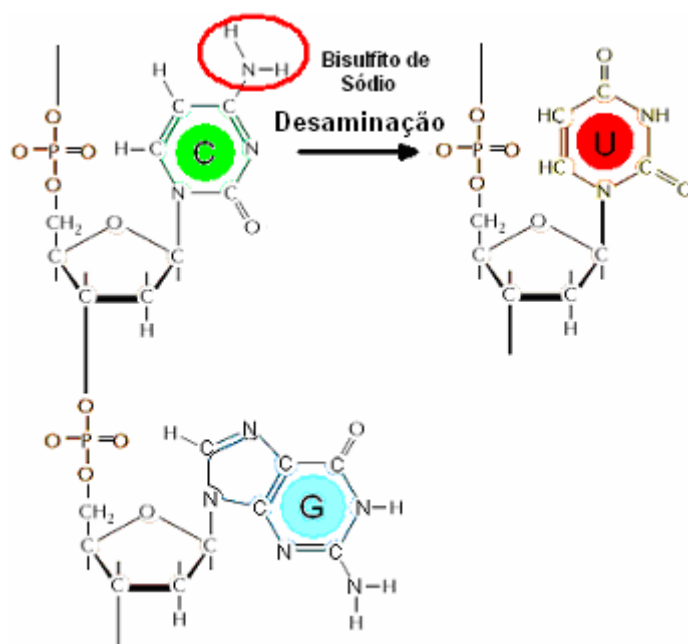


Figura 3 - Deaminação promovida pelo tratamento com bissulfito de sódio em sítios CpG não metilados.

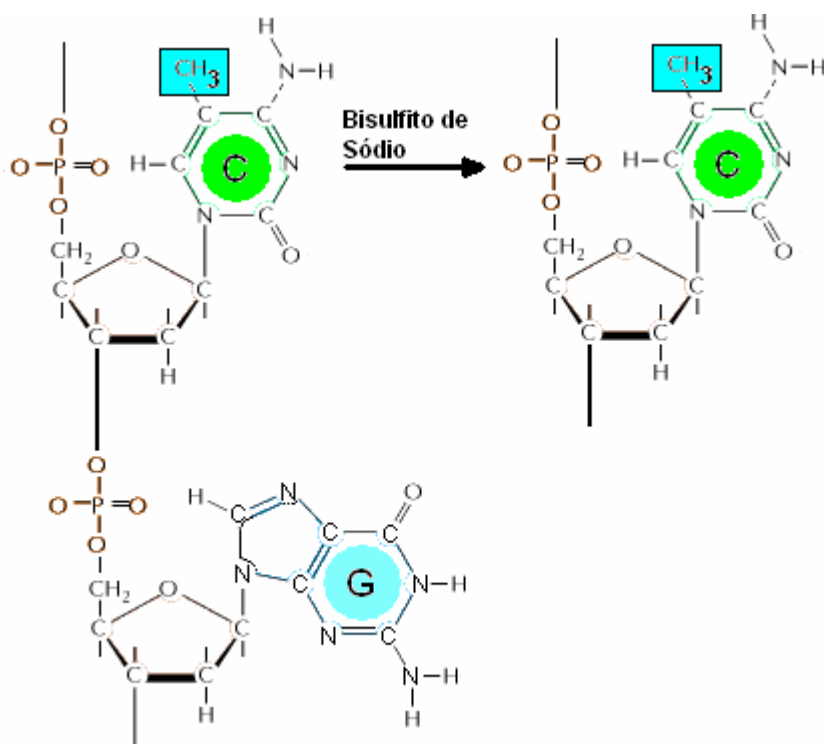


Figura 4 - Os sítios CpG metilados, não sofrem alteração após o tratamento com bissulfito de sódio, mantendo assim a sequência original dos nucleotídeos.

4.3.1 Protocolo para reação de PCR após tratamento com bissulfito de sódio

Programa Step up. Reação 1

	1 reação
Tampão 10 x	2,5 µL
MgCl ₂ 25 mM	1,5 µL
dNTPs (2mM)	3,0 µL
Taq Gold (5U/µL)	0,2 µL
Iniciador hTERT1F (20µM)*	0,4 µL
Iniciador hTERT1R (20µM)*	0,4 µL
H ₂ O	15,0 µL
DNA tratado	2,0 µL
Total	25 µL

* - vide Figura 2

Reação de PCR “STEP UP”

94°C – 12’

94°C – 3’	} 1 x	94°C – 3’	} 5 x	94°C – 1’	} 35 x
55°C – 3’		58°C – 3’		60°C – 1’	
72°C – 2’		72°C – 2’		72°C – 1’	

72°C – 7’

Hold at 4°C

O segundo conjunto de iniciadores amplifica agora um fragmento interno partindo-se da reação anterior, este fragmento possui 644pb a partir de -476pb até 168pb, onde os iniciadores são: hTERT2F e hTERT2R, (Figura 2), também modificados como os iniciadores externos.

Os reagentes como MgCl₂ 25 mM , Tampão 10x contendo 100mM Tris-HCl, pH 8,3, 500mM KCl e AmpliTaq DNA Polimerase Gold, são fabricados pela “Applied Biosystems”(Foster City, CA).

Na segunda reação, foi usado como molde o produto da reação 1, pelo fato de o DNA sofrer grandes danos no tratamento com bissulfito de sódio e a quantidade de DNA recuperado após o tratamento ser pequena, a reação 1 tem como objetivo aumentar o número de cópias de DNA que podem servir de molde para a reação 2.

4.3.2 Protocolo para reação de *NESTED*-PCR após tratamento com bissulfito de sódio Programa Step up. Reação 2

	1 reação
Tampão 10 x (Roche)	2,5 µL
MgCl ₂ 25 mM (Roche)	1,5 µL
dNTPs (2mM)	3,0 µL
Taq Gold (5U/µL) (Roche)	0,2 µL
Iniciador hTERT2F (20µM)	0,4 µL
Iniciador hTERT2R (20µM)	0,4 µL
H ₂ O	15,0 µL
Produto da reação 1	2 µL
Total	25 µL

Reação de PCR “STEP UP”

94°C – 12’

$\left. \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} - 3' \\ 53^{\circ}\text{C} - 3' \\ 72^{\circ}\text{C} - 2' \end{array} \right\} 1 \times \quad \left. \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} - 3' \\ 55^{\circ}\text{C} - 3' \\ 72^{\circ}\text{C} - 2' \end{array} \right\} 5 \times \quad \left. \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} - 1' \\ 57^{\circ}\text{C} - 1' \\ 72^{\circ}\text{C} - 1' \end{array} \right\} 35 \times$

72°C – 7’

Hold at 4°C

Para que uma amostra fosse considerada como inadequada e por isso necessitasse de um novo tratamento do DNA com bissulfito de sódio, uma nova tentativa de amplificação foi feita com o DNA da amostra que foi concentrado através de centrifugação a vácuo em centrífuga “Speed Vac Concentrator, SAVANT” até que o volume observado fosse aproximadamente metade do volume inicial da amostra. Além disso, as seqüências onde as citosinas não constituintes de sítios CpG, que não apresentavam alteração após o tratamento, foram descartadas.

O produto da segunda reação amplificado foi avaliado por migração eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Após a visualização do fragmento, este produto foi clonado e sequenciado para a avaliação do perfil de metilação do promotor em estudo.

4.4 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO MODIFICADO

O fragmento gerado após a reação 2 com os iniciadores **hTERT2F** e **hTERT2R**, foi clonado com metodologia comercial do Kit (TOPO TA Cloning Invitrogen, Paisley, UK) segundo protocolo do fabricante, que possibilita clonagem de fragmentos gerados por PCR diretamente em um vetor de escolha. Neste caso o vetor usado foi **pCR4-TOPO** contido no Kit, as bactérias usadas para produção das colônias, foram também do Kit e são *E. coli* DH5 α TM-T1 cultivadas em meio Luria – Bertani (10g de Triptona, 5g de extrato de levedura e 10g de NaCl, dissolvidos em 950 ml de água destilada tendo seu pH ajustado para 7.0).

Inicialmente, 4 colônias isoladas de cada amostra foram coletadas para análise do perfil de metilação da região em estudo, posteriormente estas colônias foram crescidas em 5ml de meio líquido Luria – Bertani por 16 horas e então feita a extração do DNA plasmidial das colônias crescidas, com kit (Wizard Plus SV DNA Purification System, Promega USA). Este DNA então foi submetido a reação de sequenciamento com um conjunto de iniciadores do vetor usado para clonagem.

A determinação de 4 colônias a serem seqüenciadas, foi definida de maneira aleatória. As seqüências foram analisadas e repetidas sempre que houvessem discrepância. Finalmente o perfil predominante foi adotado nas análises.

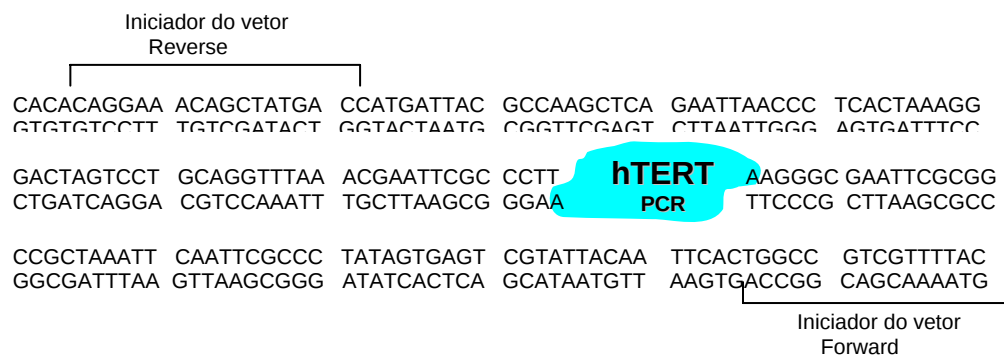


Figura 5 - Sequência do vetor utilizado para clonar o fragmento a ser avaliado quanto ao perfil de metilação, após tratamento com bissulfito de sódio, mostrando os iniciadores do vetor e o sítio de inserção do produto de PCR(azul).

4.5 RT-PCR PARA hTERT

Uma reação de RT-PCR tanto para GAPDH quanto para hTERT foi realizada em condições de ciclagem progressiva para que pudéssemos ter uma avaliação semi-quantitativa da expressão desses genes.

O RNA das linhagens e dos tecidos derivados de NICs avaliados, foi extraído segundo o protocolo do “TRIZOL reagents, Invitrogen, Life technologies”. Inicialmente 2µg de RNA total das linhagens foi submetido a síntese da primeira fita de c-DNA usando o sistema de oligo dT “primers” Invitrogen, (Life Technologies), segundo especificações do fabricante, onde foi usada SuperScript™ II Reverse Transcriptase, para a síntese do c-DNA. Para as amostras de tecidos derivados de NIC, 200ng de RNA foi usado devido as limitações das amostras, cujos fragmentos variavam em tamanho, sendo em geral diminutos e limitantes para esta extração. Contudo, a mesma quantidade de c-DNA estimada em volume de reação foi usado para a PCR específica para hTERT.

A avaliação da qualidade da síntese foi feita por PCR específica para o gene constitutivo GAPDH, onde foram usados iniciadores para o gene humano com a seguinte sequência: **GAPDH1F 5' - CTG CAC CAC CAA CTG CTT A - 3'** e **GAPDH2F 5' - CAT GAC GGC AGG TCA GGT C - 3'**, que amplificam um fragmento de 290 nucleotídeos contidos nos exons 6 e 7 deste gene. O resultado da reação foi avaliado em gel de agarose 1%. O protocolo para esta reação está demonstrado a seguir.

4.5.1 Protocolo para amplificação de GAPDH a partir de c-DNA

	1 reação
Tampão 10 x	2,0 µL
MgCl ₂ 50 mM	0,6 µL
dNTPs (2mM)	2,0 µL
Taq (5u/uL)	0,2 µL
Iniciador GAPDHP1F (10µM)	0,8 µL
Iniciador GAPDHP2R (10µM)	0,8 µL
H ₂ O	11,6 µL
c-DNA	2,0 µL
Total	20 µL

94°C – 5'

94°C – 30"
 62°C – 45"
 72°C – 45"

} 16, 20 e 24 ciclos

72°C – 4' Hold at 4°C

Para avaliar a expressão de hTERT, empregamos as condições da reação descritas no protocolo a seguir, onde os iniciadores para hTERT usados foram previamente descritos (SNIJDERS *et al* . 1998). Os iniciadores são os seguintes: hTERTRT1F 5'GAA GGC ACT GTT CAG CGT GCT CAA C 3'e hTERTRT2R 5' GGT TTG ATG ATG CTG GCG ATG ACC 3'. Estes oligonucleotídios são complementares a sequência presente nos exons 5 e 6 respectivamente, o produto desta reação é de 230pb e foi avaliado em gel de poliacrilamida 8% e corado com prata.

4.5.2 Protocolo para reação de RT-PCR específica para hTERT após síntese de c-DNA

Reação

	1 reação
Tampão 10 x	2,0 µL
MgCl ₂ 25mM (Roche)	1,6 µL
dNTPs (2mM) (Roche)	1,0 µL
Taq Gold (5U/µL) (Roche)	0,2 µL
RThTERT 1F (20µM)	0,4 µL
RThTERT 2R (20µM)	0,4 µL
H ₂ O	9,4 µL
c-DNA	50ng (xµL)
Total	20 µL

Amostras de c-DNA

94°C – 12'

94°C – 45'' 62°C – 45'' 72°C – 45''	}	28, 32 e 36 ciclos
---	---	--------------------

72°C – 5 min

4°C ∞

4.6 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE TELOMERASE

O princípio desta metodologia, consiste na extensão de um substrato, pela telomerase contida no extrato celular, após esta extensão, segue-se uma reação de PCR para amplificação numérica dos fragmentos estendidos pela telomerase do extrato celular. A detecção fluorimétrica da atividade de telomerase bem como a quantificação desta atividade nas amostras analisadas, foi feita através do Kit TRAPeze XL (telomerase detection kit, Chemicon International, CA. USA), usando-se um espectrofluorômetro (RF 1501, SHIMATZU), capaz de medir a emissão de fluorescência das amostras.

O sistema usado pelo kit TRAPeze XL telomerase detection, consiste em um iniciador que foi desenhado para possibilitar a emissão de fluorescência, apenas quando este estiver incorporado a um produto de PCR, logo o aumento da emissão de fluorescência está diretamente correlacionado a quantidade de produto gerado nesta reação, onde o fluoróforo (doador de energia) e o acceptor DABSYL [4-(dimetilamina)azo benzeno ácido sulfônico] estão próximos na estrutura de “hairpin” e quando o iniciador estiver incorporado no produto de PCR de fita dupla, a estrutura de “hairpin” é desenrolada através da atividade da polimerase. Nesta conformação estendida, a distância entre o doador de energia e o acceptor é aumentada gerando assim a emissão de fluorescência, (Figura 6).

A quantidade de extrato celular usada para avaliação da atividade de telomerase foi de 1,5µg de proteína total quantificada usando-se sistema de Bradford.

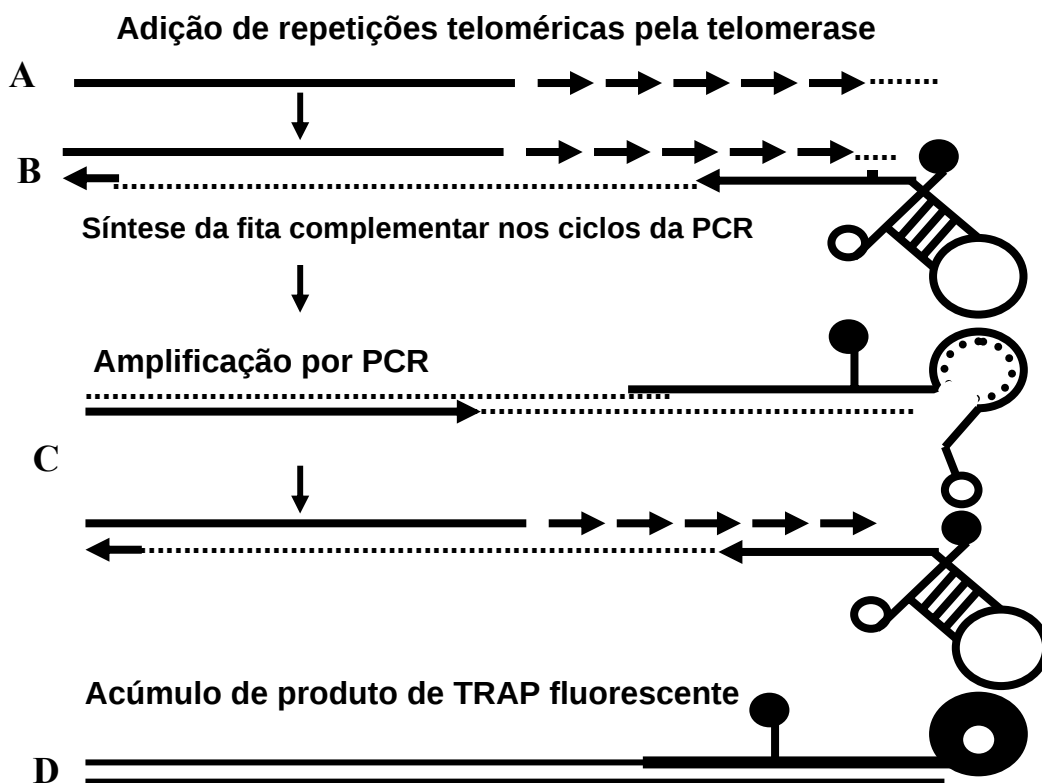


Figura 6 - Esquema de funcionamento do Kit. Cada seta pequena na linha A, representa os 6 nucleotídeos da repetição telomérica (TTAGGG), os círculos pequenos pintados de preto representam o acceptor (DABSYL) e os círculos abertos representam o fluoróforo capturado pelo DABSYL.

A fluorescência gerada pelo Kit usado, pode ser medida por vários métodos. Neste trabalho optamos por usar um espectrofluorômetro sendo as medidas feitas em cubetas. Como recomendado pelo fabricante, neste caso os produtos gerados na reação de PCR devem ser diluídos trinta vezes, com uma solução de 10 mM de Tris-HCl pH 7.4, 0.15M de NaCl e 2 mM de MgCl₂. Os comprimentos de onda para as medidas foram de 495nm (excitação) e 516nm (emissão) para fluoresceína, (emitidos pelos fragmentos estendidos pela telomerase) e 600nm (excitação) e 620nm (emissão) para sulforodamina, (emitido pelos fragmentos do controle interno fornecido no kit). O protocolo usado para extensão telomérica e PCR, foi o seguinte.

4.6.1 Protocolo de extensão telomérica e PCR

Diluições do molde fornecido pelo kit TSR8, para curva de calibração

tubo 1	tubo 2	tubo 3	tubo 4
10µL → 2µL →	+ 8µL → 2µL →	+ 8 µL → 2µL →	+ 8 µL
0,2 amol	0,04 amol	0,008 amol	0,0016 amol

Montagem da reação

	1 reação	(x) total
5x Trapeze reaction Mix	10 µL	
Taq Polimerase recombinante (invit)	0,4 µL	
dH ₂ O	29,6 µL	
Extrato Celular	x	1,5 µg
Volume total	50 µL	

1ª etapa

extensão telomérica por telomerase → 30' - 30°C

2ª etapa

PCR após extensão

94°C – 5'

94°C – 30" 55°C – 30" 72°C – 1'	} 36 ciclos
---------------------------------------	-------------

72°C – 4'

4° ∞

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de atividade de telomerase foram comparados nos grupos com e sem metilação, através do teste de MANN-WHITNEY, para avaliação da existência de diferença entre as médias da atividade de telomerase nos grupos com e sem metilação. Além disso o coeficiente de correlação de SPEARMAN, foi usado para determinar se havia correlação linear entre metilação e atividade de telomerase. Para todos os testes estatísticos foi usado nível de significância de $p < 0,05$.

Análise da distribuição de metilação ao longo da região estudada foi feita dividindo-se o promotor em 5 regiões, cada uma com 15 dinucleotídeos CpG. Esta variável foi analisada em relação a atividade de telomerase através do teste de MANN-WHITNEY.

5 RESULTADOS

5.1 LINHAGENS CELULARES E CULTURAS PRIMÁRIAS

5.1.1 ANÁLISE COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

As Figuras 7 e 8 mostram os resultados de PCR após restrição com as enzimas *Hpa II* e *Msp I* para o fragmento de hTERT em estudo. Para cada uma das linhagens a primeira coluna no gel, representa o DNA desta linhagem tratado com a enzima *Hpa II*, na segunda coluna de cada linhagem, o DNA é submetido as mesmas condições de restrição, só que na ausência da enzima. Já na última coluna de cada linhagem, este DNA é submetido a restrição com a enzima *Msp I*.

Observando os resultados de restrição, verificamos que apenas a linhagem CasKi possui os sítios das enzimas totalmente metilados, já que observamos a amplificação do fragmento do promotor em estudo nesta linhagem, mesmo quando tratada com a enzima *Hpa II* (Figura 7). Vale destacar que, no fragmento do promotor de hTERT em estudo, existem 75 sítios possíveis de serem metilados e com estas enzimas, apenas 7 sítios podem ser avaliados. Portanto esta metodologia serve para mostrar um padrão inicial da metilação neste promotor, além de servir como comparação para os dados de sequenciamento.

Nas demais linhagens, SiHa, HeLa, C33, 698, 18Nco, NHK e HFF, podemos observar que apenas a coluna que corresponde ao DNA não tratado com as enzimas, apresenta o fragmento do promotor de hTERT. Isto deve ser interpretado como indicativo de que as condições de PCR são adequadas. Para amplificação do fragmento de interesse. A ausência de um fragmento na altura esperada deve indicar, portanto, que pelo menos um dos sítios das enzimas se encontra desmetilado.

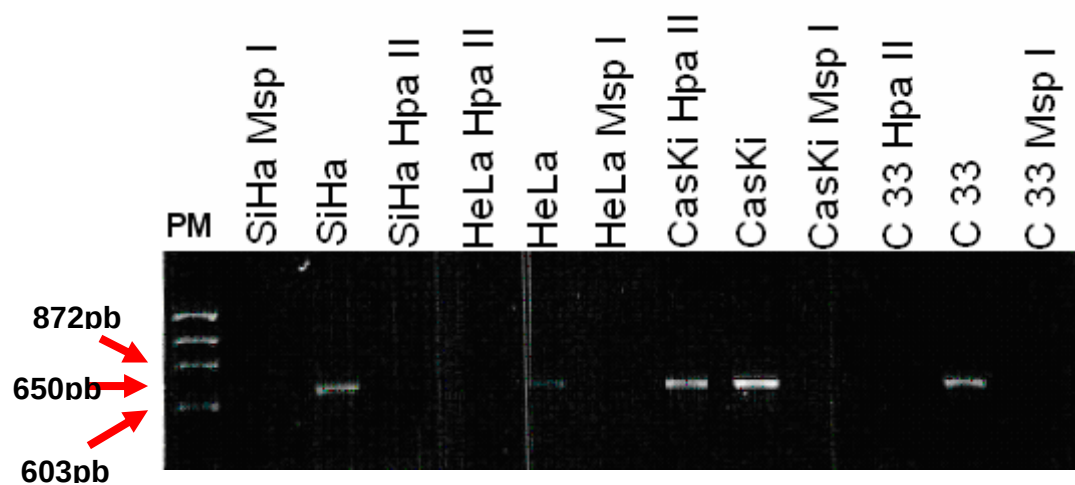


Figura 7 - Gel de agarose 1%, mostrando reação de PCR com o DNA das linhagens indicadas no gel, para o promotor de hTERT após restrição dos mesmos, com as enzimas indicadas.

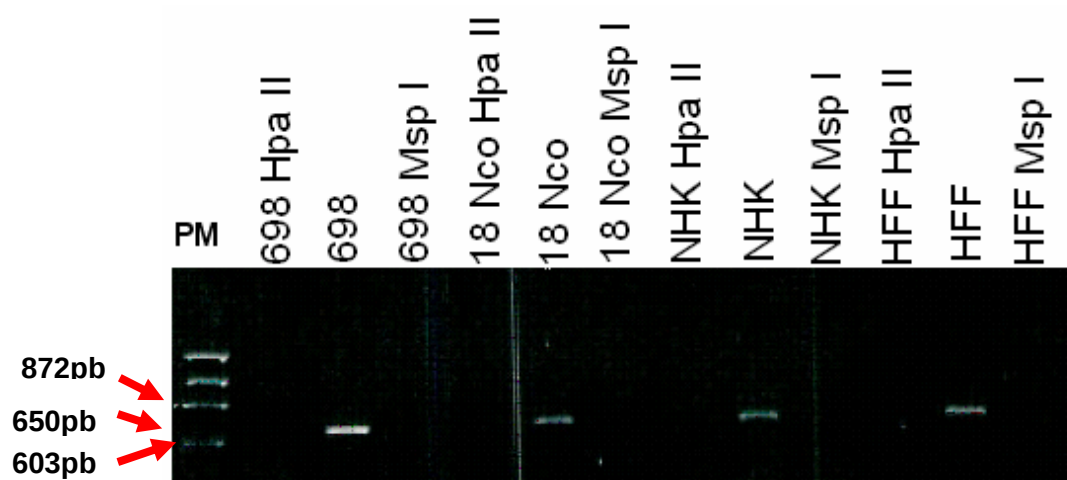


Figura 8 - Gel de agarose 1%, onde observamos o produto de PCR do DNA das linhagens indicadas no gel para o promotor de hTERT, após restrição destas amostras com cada uma das enzimas indicadas.

5.1.2 PCR E SEQUENCIAMENTO APÓS TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO DAS LINHAGENS

A padronização da reação de PCR após o tratamento com bissulfito de sódio foi definida, utilizando-se um DNA de uma linhagem de mama normal, 220N conforme (COSTA *et al* . 2004), pelo fato de ser sabido que esta amostra estava viável para amplificação por PCR após o tratamento com bissulfito de sódio. (dados não apresentados).

Na Figura 9, observamos os fragmentos amplificados após a modificação do DNA com bissulfito de sódio possuem o mesmo tamanho. Estes produtos de PCR, foram usados para clonagem e sequenciamento do promotor em análise. Em seguida observamos a figura 10 com os perfis de metilação para cada uma das linhagens estudadas.

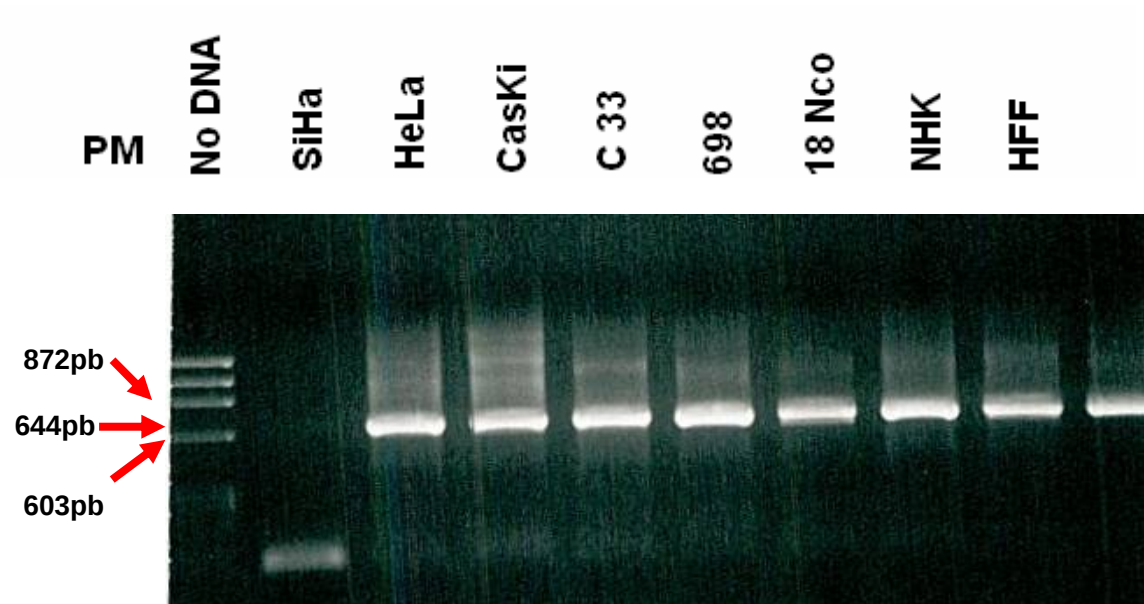
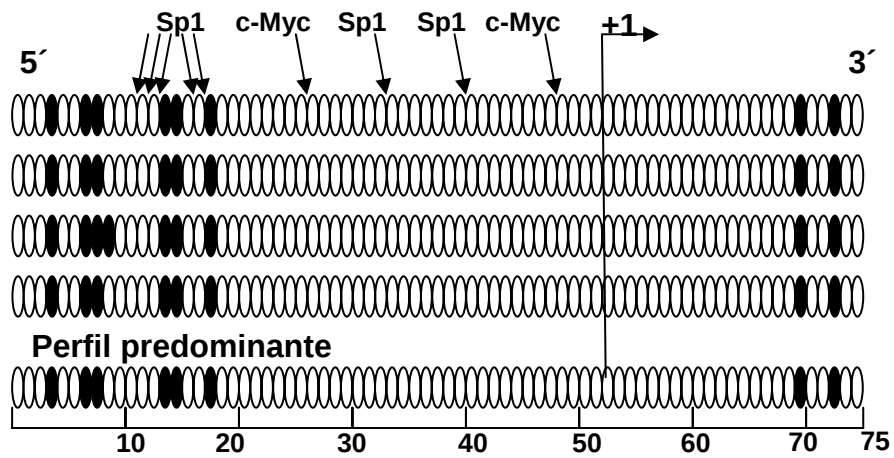
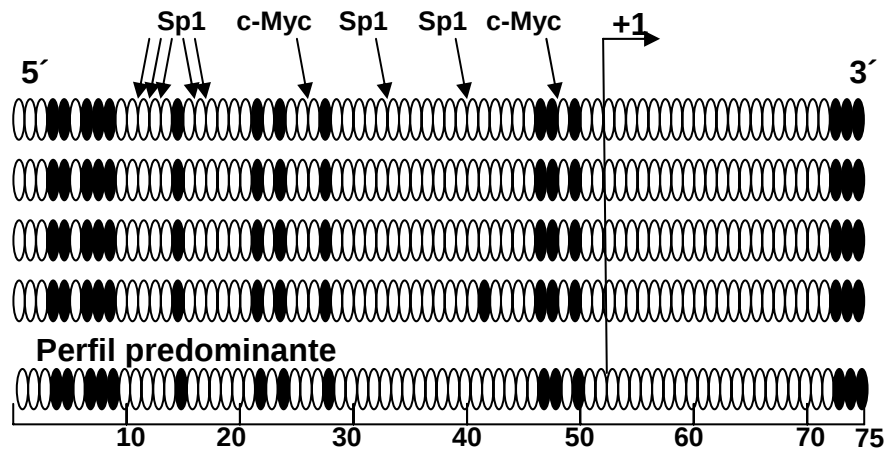


Figura 9 - Gel de agarose 1%, com os produtos da reação de *NESTED* PCR após tratamento com bissulfito de sódio.

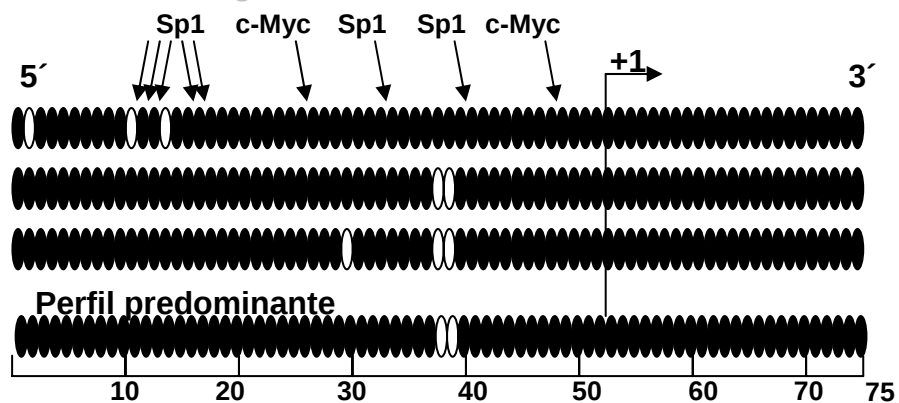
SiHa Linhagem tumoral HPV 16+



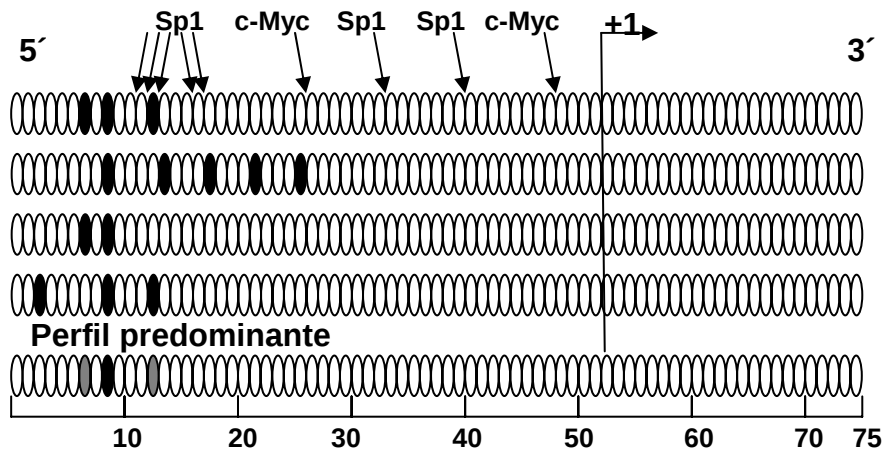
HeLa Linhagem tumoral HPV 18+



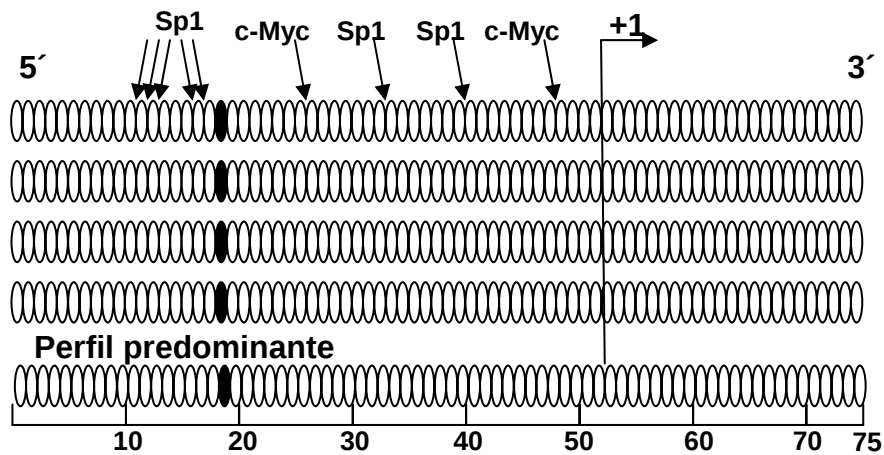
CasKi - Linhagem tumoral HPV 16 +



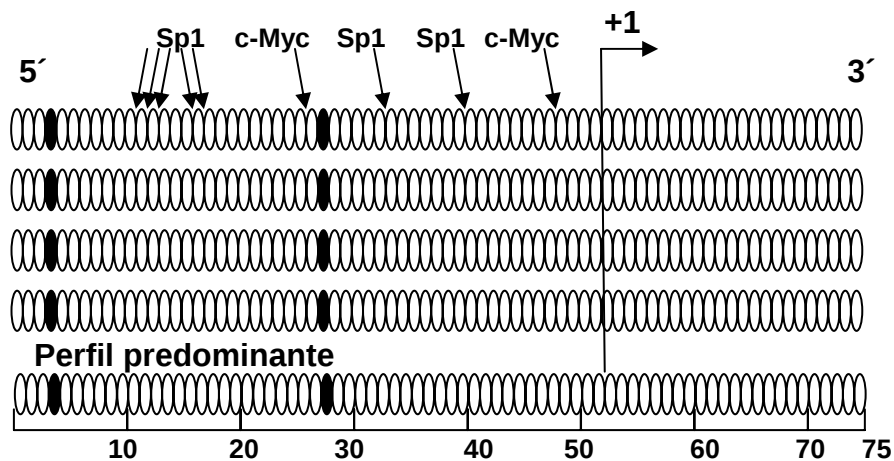
C33 Linhagem tumoral HPV (-)



698 Queratinócito imortalizado com GC de HPV 16



18Nco Queratinócito imortalizado com GC de HPV 18



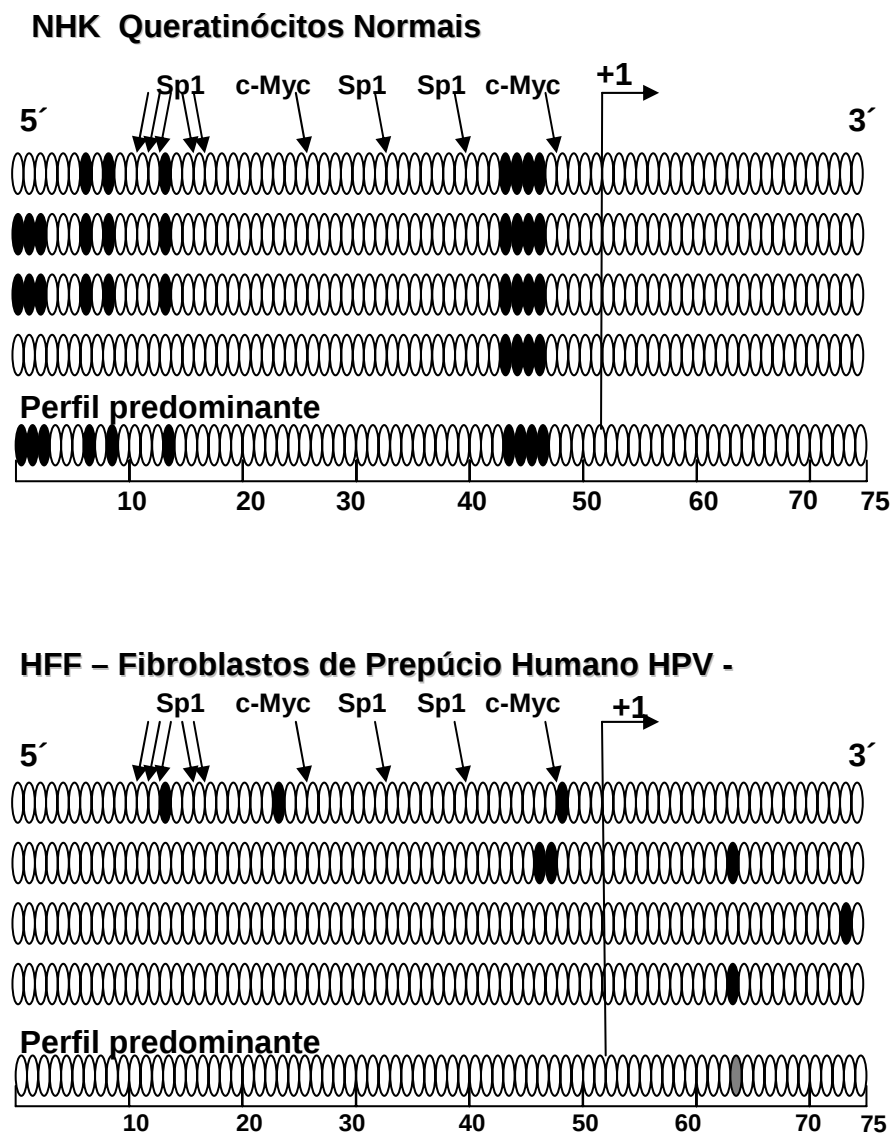


Figura 10 - representação do perfil de metilação no promotor de hTERT com os 75 sítios CpG. As elipses pretas, são os sítios metilados, as coloridas de cinza são sítios parcialmente metilados, as elipses vazias são os sítios sem metilação e a seta com a indicação +1 representa a localização do ATG inicial em relação a região promotora.

Observamos na Figura 10 que cada uma das linhagens estudadas apresentam um perfil diferente em relação a metilação na região do promotor de hTERT. Essa diferença se dá tanto na localização dos sítios metilados, quanto no número de sítios metilados ao longo do promotor.

Na linhagem SiHa, os dinucleotídeos CG metilados se encontram principalmente na região inicial do fragmento do promotor estudado, exibindo um padrão bem uniforme de distribuição nessa região, assim como os dois sítios metilados encontrados na porção final do fragmento para esta linhagem, característica encontrada nos 4 clones seqüenciados. Um único sítio metilado, encontrado no 3º clone desta linhagem, não está presente nos demais clones seqüenciados, por isso este sítio foi considerado como sendo um sítio desmetilado, pois para a definição do padrão de metilação, deve prevalecer a média de sítios onde é encontrada metilação.

Quando temos dois sítios metilados nos quatro clones este é considerado parcialmente metilado. Entretanto, estas análises não permitem fazer inferências funcionais diretas, uma vez que deve-se considerar eventuais erros do método. Podemos observar também que apenas um dinucleotídeo correspondente a fatores de transcrição encontra-se metilado, é o de número 18 e corresponde a *Sp1*.

Na linhagem HeLa, o padrão de metilação se mostra mais distribuído ao longo de toda a região analisada. Nesta linhagem também, os sítios metilados estão em concordância entre todos os clones analisados. Outro único dinucleotídeo CG, 50º, está metilado em um sítio de restrição para as enzimas usadas, já em relação aos sítios correspondentes aos fatores de transcrição, nenhum destes se encontra metilado, tanto para *Sp1* quanto para os sítios de *c-Myc*.

Observando o perfil de metilação para a região avaliada na linhagem CasKi, notamos um perfil diferente em relação aos até então comentados, nesta linhagem podemos perceber que existe uma abundância de metilação ao longo da região do promotor de hTERT. Nos clones avaliados, podemos identificar a ocorrência de metilação nos diversos sítios referentes as enzimas utilizadas, sendo que nos três clones apresentados, todos os sítios para essas enzimas estão metilados, bem como os sítios para ligação dos fatores de transcrição Sp1 e Myc.

Na análise feita com os clones da linhagem C33, um perfil variado é encontrado, mas com predominância de sítios desmetilados. Nota-se um perfil difuso de metilação, principalmente na porção inicial do fragmento estudado, onde dois sítios estão parcialmente metilados, sendo que um deles (nº 13) corresponde a um sítio de ligação de Sp1. Nenhum sítio para o fator de transcrição Myc está metilado nos clones estudados.

A maior quantidade de CpG desmetilados é encontrada nos clones da linhagem 698: esta possui apenas um dinucleotídeo metilado nos quatro clones estudados, sendo este o sítio de número 19, onde não há coincidência nem com sítios de restrição das enzimas nem com os sítios dos fatores de transcrição identificados neste promotor.

Assim como na linhagem 698, a análise dos clones da linhagem 18Nco demonstrou uma quantidade de sítios metilados bem pequena, sendo apenas dois em toda região estudada, estes são os dinucleotídeos 4 e 28, que também não coincidem com nenhum sítio de corte das enzimas ou de ligação dos fatores de transcrição.

Na linhagem de queratinócitos normais NHK, os três dinucleotídeos iniciais da porção 5' do fragmento estudado encontram-se parcialmente metilados, mas novamente, nenhum dos sítios metilados corresponde a algum sítio de restrição das

enzimas ou de ligação dos fatores de transcrição tendo predominante metilação na região 5' deste fragmento e na região central do mesmo.

Na última linhagem avaliada, de fibroblastos normais HFF, o perfil de metilação desse fragmento se apresenta hipometilado, tendo apenas um dinucleotídeo parcialmente metilado, o de número 63, o qual não corresponde a nenhum sítio de restrição ou de ligação dos fatores descritos neste fragmento

Nos gráficos seguintes, estão exibidos os perfis de metilação no promotor de hTERT, entre dinucleotídeos metilados e não metilados, para cada uma das linhagens avaliadas, a fim de comparar as diferenças entre o grau de metilação nas linhagens normais, tumorais e imortalizadas.

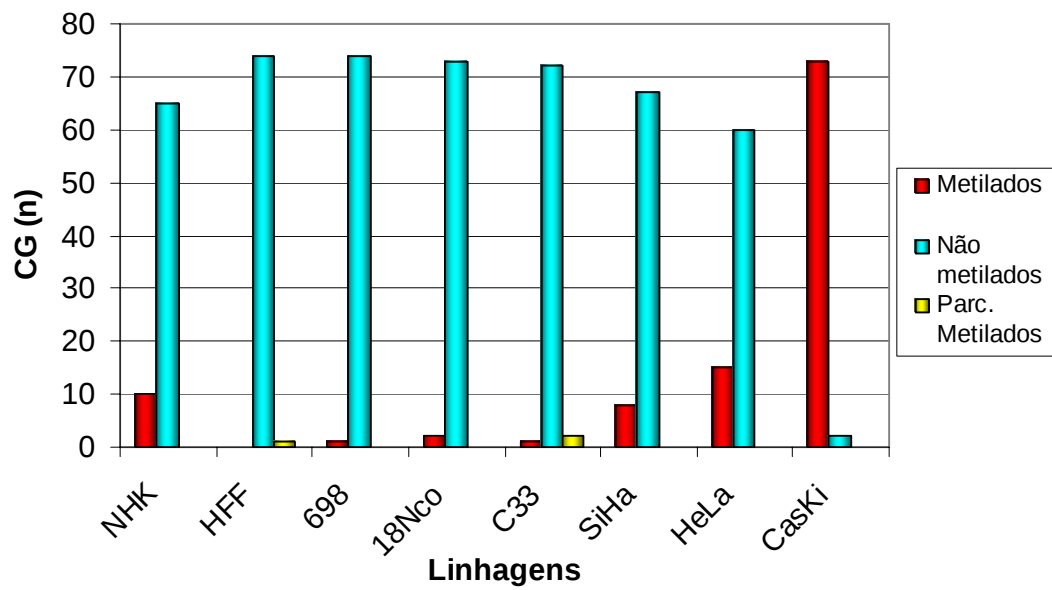


Figura 11 - Gráfico do perfil predominante de metilação do promotor de hTERT.

O Gráfico mostrado na Figura 11, expressa claramente que nas linhagens utilizadas, sejam elas tumorais, imortalizadas ou normais, o perfil de metilação predominante é de hipometilação nesta região estudada, entretanto uma exceção se nota na linhagem CasKi, que possui nos diversos clones um percentual de metilação amplamente superior a cada um destes clones estudados nas demais linhagens. Além disso, podemos notar também que os dinucleotídeos CpG sobrepostos aos sítios de ligação para os fatores de transcrição, só estão metilados na linhagem CasKi.

Uma constatação com relação ao perfil de metilação desta região é que nas linhagens tumorais, parece haver mais metilação nesse fragmento estudado, que em relação àquelas consideradas normais (com exceção dos NHK) ou imortalizadas, como mostra a Figura 12.

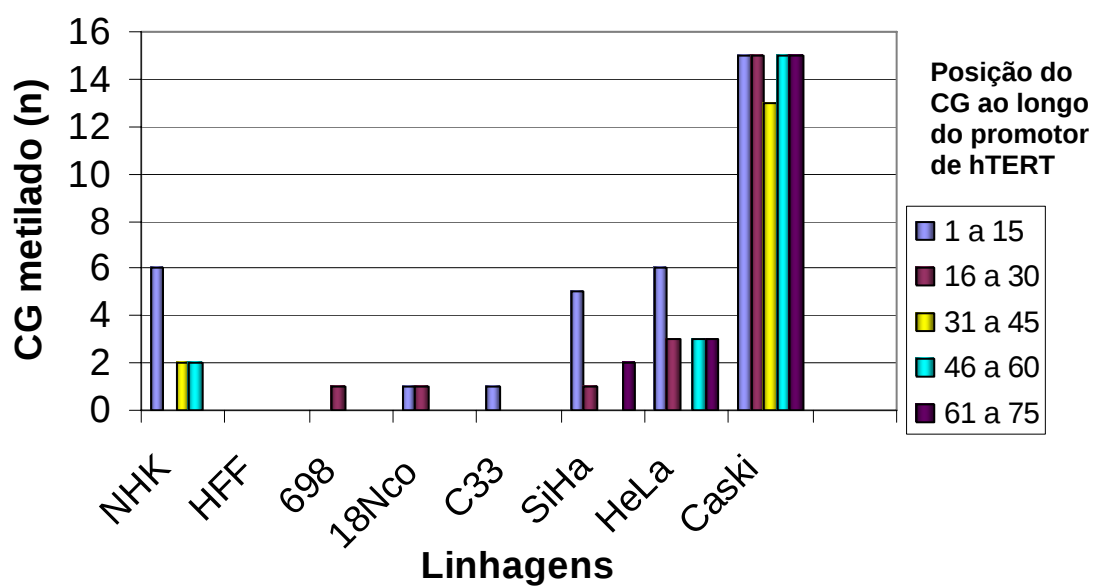


Figura 12 - Distribuição da metilação na região do promotor estudada nas diferentes linhagens.

5.1.3 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE TELOMERASE NAS LINHAGENS

Dois experimentos foram realizados, em relação a detecção da atividade de telomerase, onde podemos observar que para as linhagens tumorais como, SiHa, HeLa, CasKi e C33, o valor médio da atividade de telomerase, se apresenta acima do valor de definição para uma amostra ser considerada positiva. Nas linhagens imortalizadas utilizadas no estudo, 698 e 18Nco, os valores da atividade média são considerados também positivos e parecidos entre ambas.

A definição de positividade para telomerase foi determinada de duas maneiras. A primeira onde foram usados os valores de NHK para se estabelecer um valor de corte funcional (cut-off func.), usando o valor da média de atividade da linhagem normal (NHK) com maior valor médio de atividade, mais três vezes o desvio padrão desta linhagem, sendo assim temos:

Telo+ func. = > 8,00 URF + 3 desvios padrão. NHK URF (Unidades Relativas de Fluorescência).

Sendo assim temos que o valor de corte funcional para as linhagens é de 22,24 URF, determinado na Figura 13 pela linha vermelha pontilhada.

Um outro valor de corte, sendo agora determinado pelo controle negativo de cada experimento foi definido para as linhagens, onde foi usado o valor médio do controle negativo dos experimentos que se utiliza apenas do tampão de lise no lugar de um extrato inativo. Este foi definido como:

Telo + Exp. => 18,91 + 3 desvios padrão URF.

Desta maneira temos que o valor de corte experimental para as linhagens é de 18,91 URF, determinado na Figura 13 pela linha contínua azul. Todos os valores para estes experimentos estão na Tabela 1.

Escolheu-se utilizar os valores de NHK para definição de um valor de corte, apesar de ter valores basais de atividade de telomerase, uma vez que as demais linhagens utilizadas, tanto as derivadas de tumores quanto as imortalizadas, são de origem epitelial.

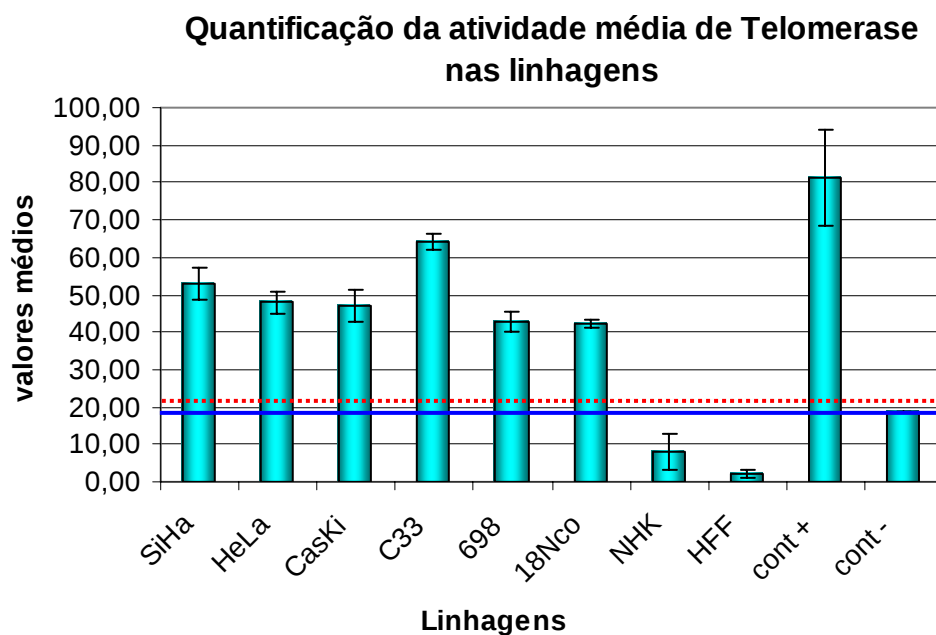


Figura 13 - Perfil de atividade de telomerase e seus valores médios, para dois experimentos independentes e o respectivo desvio padrão. A linha pontilhada vermelha representa o “cut-off” funcional e a linha contínua azul representa o “cut-off” experimental, (vide texto).

Tabela 1 - Distribuição dos valores quantitativos da atividade de telomerase, mostrando a variação entre os dois experimentos, os valores de média e desvio padrão para cada uma destas linhagens, bem como para os controles negativo e positivo.

	Média	Desvio Padrão	1° experimento	2° experimento
SiHa	53,00	4,28	49,975	56,032
HeLa	47,98	2,99	45,866	50,096
CasKi	47,15	4,31	44,106	50,2
C33	64,05	2,04	65,49	62,607
698	42,74	2,78	40,771	44,707
18Nco	42,18	1,08	42,94	41,416
NHK	8,00	4,74	4,649	11,358
HFF	2,19	0,95	1,52	2,865
cont +	81,47	12,77	72,441	90,494
cont -	18,91	0,00	18,903	18,909

5.1.4 RT-PCR PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE hTERT NAS LINHAGENS

De um modo geral, estes experimentos não foram satisfatórios, e portanto, os resultados devem ser avaliados com cautela. Apesar do fragmento específico para hTERT ser amplificado, não se observa um aumento da intensidade do produto ao longo dos ciclos, o que inviabiliza qualquer inferência quantitativa.

O problema parece estar na amplificação específica do c-DNA de hTERT, uma vez que os resultados do controle (GAPDH) são satisfatórios.

Apesar do exposto, observar-se para a linhagem C33, a qual possui o maior valor de atividade de telomerase, a amplificação do fragmento hTERT específico se dá quatro ciclos antes do que todas as demais linhagens. Na linhagem CasKi o fragmento observado no gel não possui intensidade condizente com a atividade de telomerase apresentada por esta linhagem. Entretanto, pelo exposto, estes resultados não podem ser considerados conclusivos.

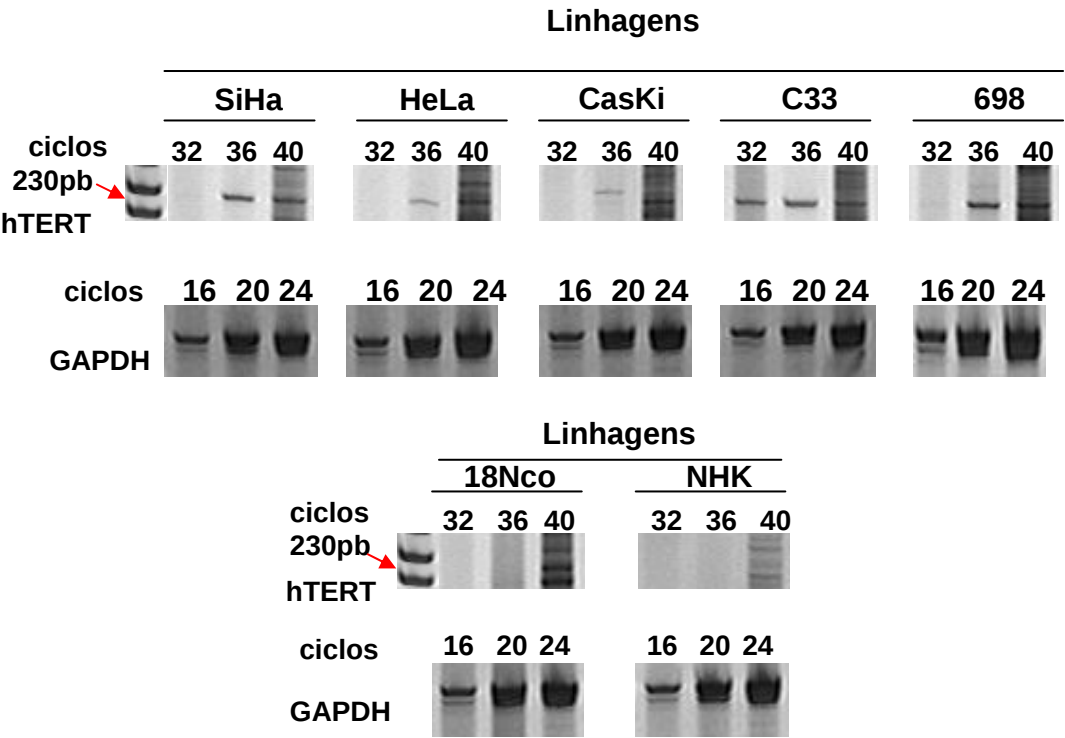


Figura 14 – Perfil eletroforético dos produtos de RT-PCR com o c-DNA das linhagens, esquema de semi-quantificação feito com três ciclos diferentes para as linhagens e três temperaturas para GAPDH, usado como normalizador para o experimento.

5.1.5 CORRELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE DE TELOMERASE E METILAÇÃO NO PROMOTOR DE hTERT.

Observa-se na Figura 15, que existe uma grande dispersão dos pontos dos valores de atividade de telomerase em relação à metilação. Podemos observar ausência de correlação entre atividade de telomerase e metilação.

A avaliação feita com a metilação nas diferentes regiões desse promotor, não demonstrou significância estatística para cada uma destas regiões, nem nos sítios CpG correspondentes a ligação dos fatores de transcrição onde os valores de “p” para cada uma destas regiões de 1 a 5 são os seguintes: $p_1 = 0,81$; $p_2 = 0,15$; $p_3 = 0,95$; $p_4 = 0,13$ e $p_5 = 0,79$.

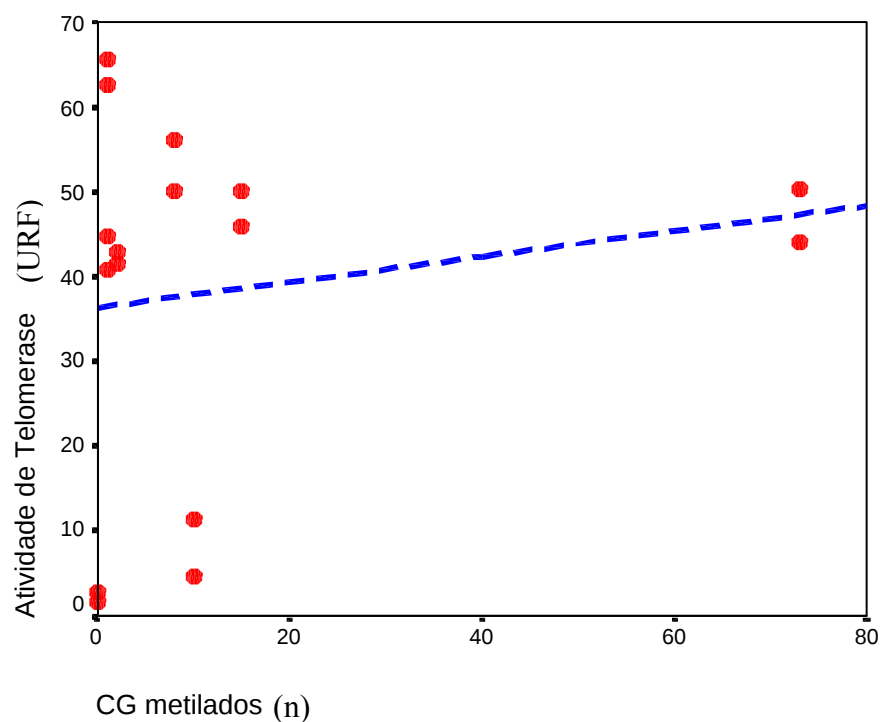


Figura 15: Diagrama de dispersão entre metilação e atividade de telomerase.

Foram empregados na análise, os valores absolutos de atividade para cada uma das medidas. Portanto, existem no gráfico dois pontos relativos a cada valor dessa medida de atividade por amostra. O valor do coeficiente de correlação foi de $r = 0,26$ e o valor de significância estatística foi de $p = 0,321$.

5.2 – TECIDOS DERIVADOS DE NIC E DE ESFREGAÇOS DO COLO DO ÚTERO

Inicialmente foram analisados tecidos derivados de NIC de 17 pacientes obtidos junto ao IBCC e esfregaços de colo uterino de 17 mulheres participantes do estudo prospectivo LUDWIG – McGill, que avalia aproximadamente 2.500 mulheres quanto a presença de DNA de HPV em esfregaços e os riscos em relação ao desenvolvimento de doença.

A tentativa de amplificação após o tratamento com bissulfito de sódio por PCR, resultou em apenas 8 amplificações para os tecidos derivados de NIC e 13 para os esfregaços de colo uterino. Dos materiais oriundos de NIC que tiveram o fragmento amplificado, 2 deles não geraram colônias viáveis ao sequenciamento, portanto em apenas 6 amostras foi possível obter o perfil de metilação da região em estudo.

Posteriormente, às análises do perfil de metilação, foram feitas análises da expressão de telomerase nas amostras de esfregaço cervical, onde foi observada uma variação dos valores muito discrepante entre as repetições dos experimentos com estas amostras. Devido a este fato optou-se por excluir estas amostras das análises.

5.2.1 VALORES DE ATIVIDADE DE TELOMERASE PARA OS TECIDOS DERIVADOS DE NIC

Na Tabela 2, encontram-se os valores obtidos na quantificação da atividade de telomerase dos tecidos derivados de NIC, bem como os valores da média e do desvio padrão em cada experimento. Tais valores foram usados na construção da Figura 16.

Para que a amostra fosse considerada telomerase positiva, tomou-se o valor médio do controle negativo do kit e adicionou-se três vezes o desvio padrão, sendo assim, temos que os tecidos derivados de NIC telomerase positivos, serão aqueles que tiverem valores superiores a 34,61 URF, obedecendo a fórmula:

$$\text{Telo} + = > 22,29 + 3 \text{ desvios padrão. URF.}$$

Para estas amostras não se utilizou controle de linhagem telomerase negativa.

Tabela 2 - Valores médios de atividade de telomerase para os tecidos derivados de NIC analisados, onde são mostrados pelo menos dois experimentos para cada amostra e os valores preenchidos com X, não foram avaliados.

		Média	1° experimento	2° experimento	3° experimento	4° experimento	Desvio Padrão
Baixo grau (NIC I)		NIC 4	11,745	11,479	12,01	x	0,38
Alto grau	NIC II	NIC 1	21,77	21,255	22,031	22,025	0,45
	NIC II	NIC 2	19,605	17,599	18,49	22,725	2,74
	NIC III	NIC 3	8,536	10,929	6,143	x	3,38
		NIC 6	21,137	12,92	19,158	31,334	9,37
		NIC 8	8,305	3,48	3,877	14,216	5,45
		NIC 9	59,294	57,393	64,321	56,167	4,4
	"	NIC 10	35,728	79,528	20,38	7,276	38,49

**Média dos valores de atividade de Telomerase em
NIC**

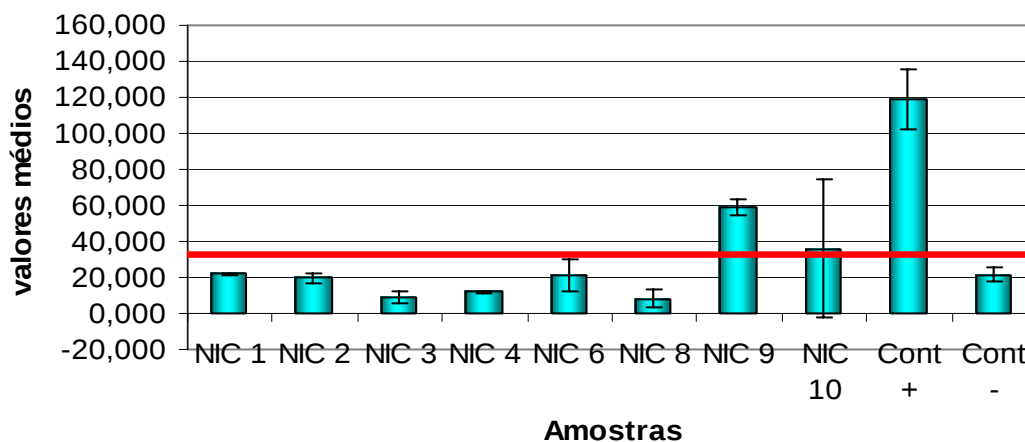


Figura 16 - Média dos valores de atividade de telomerase para tecidos derivados de NIC. Os valores apresentados são valores médios de pelo menos dois experimentos independentes para cada uma das amostras e seus respectivos desvios padrão, onde a linha vermelha representa o “cut-off” experimental definido para as análises.

5.2.2 PERFIL DE METILAÇÃO DE NIC

No momento em que as biópsias foram cortadas para obtenção de RNA, uma nova avaliação foi feita em relação a graduação histológica destas amostras. Por se tratarem de lesões diminutas, constatamos com pesar que a maioria perdeu parte do epitélio que caracterizava a lesão descrita anteriormente. Com isso, restaram as seguintes: amostras 1 e 4 ainda restava epitélio que caracterizava essas amostras com o mesmo grau histológico quando coletado para avaliação de telomerase e o perfil de metilação do promotor; a amostra 6, que havia sido classificada como NIC II, passou então a ser classificada como NIC I com possível infiltrado inflamatório. Assim, apenas destas amostras é mostrado o perfil de metilação (Figura 17).

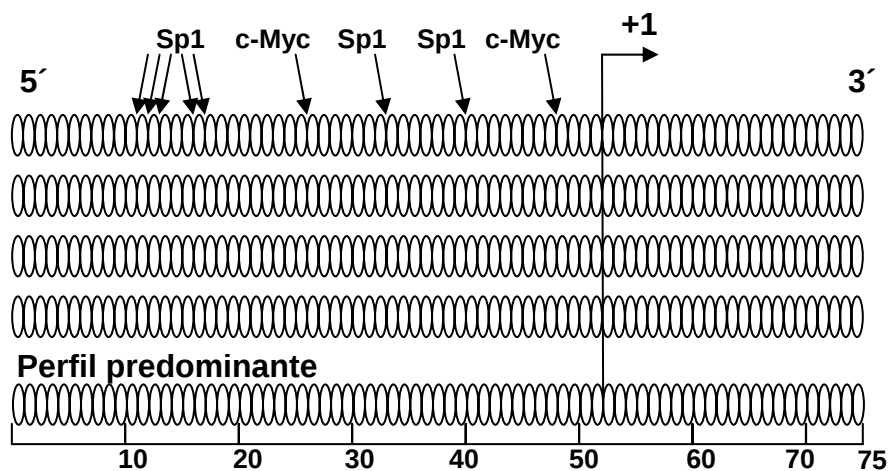
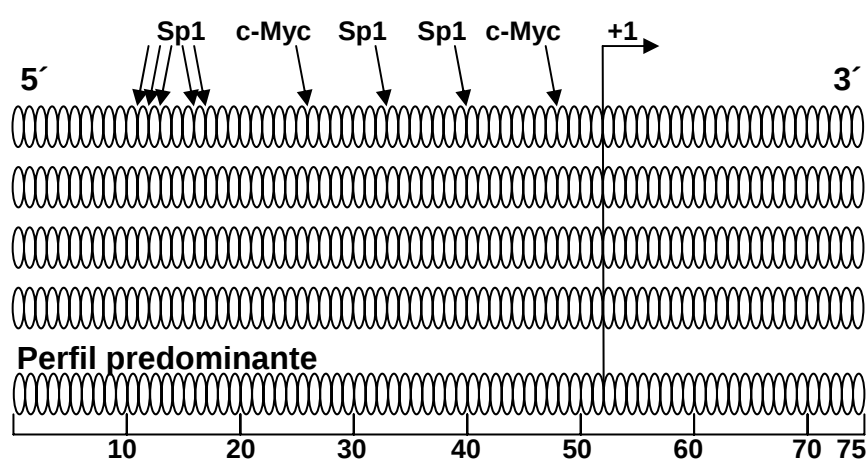
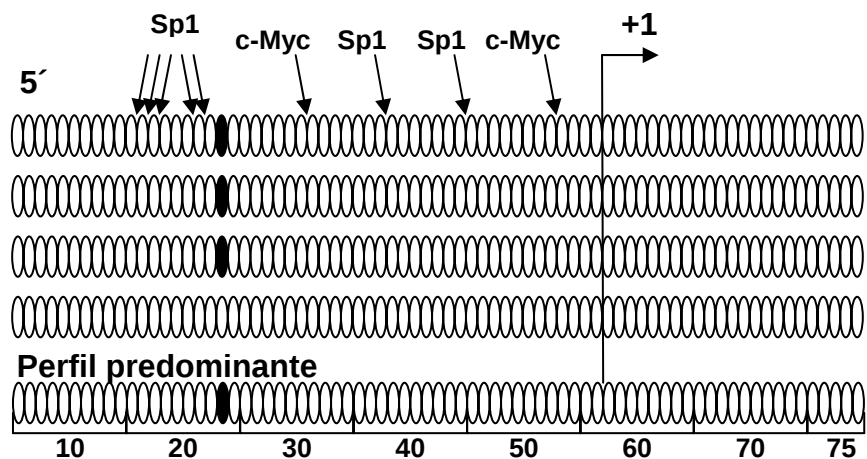
Amostra 4 NIC I**Amostra 6 NIC II****Amostra 1 NIC III**

Figura 17 - Perfil de metilação dos tecidos derivados de NIC. As elipses vazias, correspondem aos dinucleotídeos sem metilação, as coloridas de preto, aos dinucleotídeos metilados e as coloridas de cinza os dinucleotídeos parcialmente metilados. A seta com indicação +1 corresponde ao ATG inicial.

5.2.3 RT-PCR PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE hTERT NOS TECIDOS DERIVADOS DE NIC

Notamos nos experimentos de RT-PCR para os casos derivados de NIC que não houve amplificação do fragmento específico de hTERT após a PCR. Acredita-se que o problema esteja na qualidade e eventual quantidade dos RNAs extraídos. Já o fragmento observado na amostra de número 7 corresponde ao tamanho esperado para esta reação. Infelizmente não foi possível obter o perfil de metilação desta amostra.

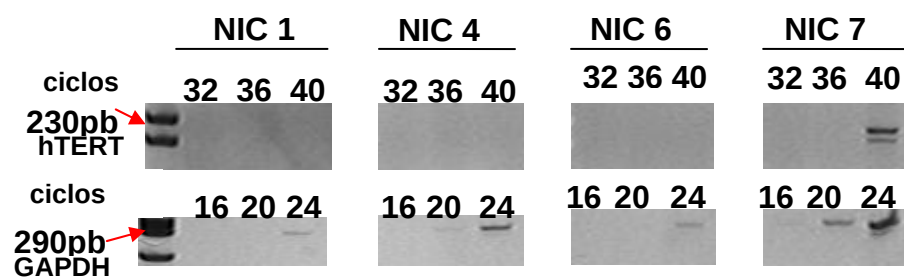


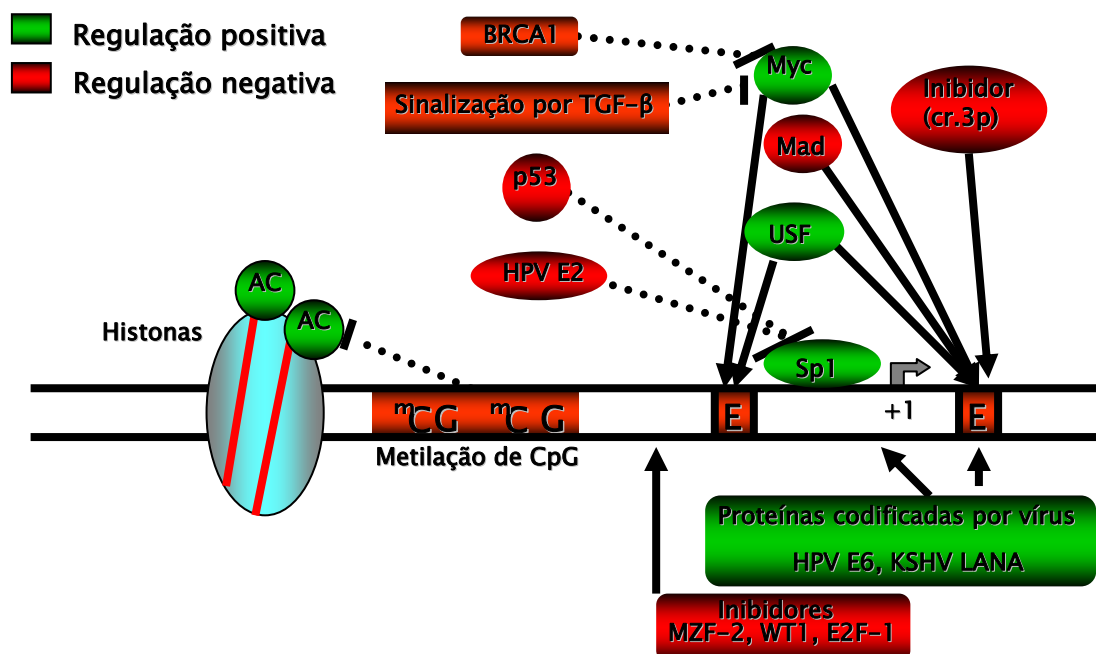
Figura 18 – Perfil eletroforético dos produtos de RT-PCR com o c-DNA dos tecidos derivados de NIC. Esquema de semi-quantificação feito com três temperaturas diferentes para cada uma das amostras e três temperaturas para GAPDH. (Materiais e Métodos).

6 DISCUSSÃO

O controle da transcrição de hTERT é influenciado por uma grande variedade de mecanismos, que ativam ou reprimem os processos carcinogênicos em humanos, sobretudo, entres os mecanismos candidatos a regulação transcricional de hTERT, sugeridos por evidências como a ilha de CpG na região promotora deste gene, necessitam ainda serem provados como reguladores endógenos ou fisiológicos, dos quais as alterações durante a carcinogênese, desempenhem uma função causal na ativação de hTERT nas células cancerosas, (HORIKAWA e BARRETT 2003) (Figura 19).

Análises iniciais do promotor de hTERT, mostraram que uma região de 181pb, a montante do sítio inicial de transcrição, correspondia a principal região ativadora deste promotor. Nesta região também foram descritos sítios de ligação dos fatores de transcrição, como Myc e Sp1, através de reconhecimento de anticorpos adsorvidos ao extrato nuclear de células C33A (TAKAKURA *et al.* 1999). No mesmo trabalho foi então sugerido que esta região do promotor com os sítios de ligação para estes fatores de transcrição, seria importante na ativação transcricional do promotor de hTERT

O trabalho de Kyo *et al.* (2000) avaliou a influência dos fatores de transcrição Sp1 e Myc na transcrição de hTERT, em diferentes células como SiHa, HeLa e C33. A mutação de alguns destes sítios, como o de Myc localizado a 150pb a montante do sítio inicial de transcrição, teve um efeito de redução da ativação transcricional de hTERT de 60% na linhagem C33, medido através da atividade de ensaios com luciferase. Por outro lado, apenas efeitos marginais na diminuição desta atividade e da expressão de hTERT foram observados na linhagem SiHa, sugerindo que a influência dos fatores de transcrição citados varia de acordo com o tipo de célula.



Fonte: Modificado de HORIKAWA e BARRETT (2003)

Figura 19 - Esquema representativo mostrando alguns dos mecanismos de controle que podem influenciar a regulação transcricional de hTERT, atuando no promotor. Os sítios demonstrados na figura não estão em escala. E, são os dois sítios de ligação para c-Myc (CACGTG), AC, acetilação de histonas e outros fatores a montante e a jusante do sítio inicial de transcrição.

Um dos primeiros relatos de um mecanismo de regulação negativa de hTERT foi a descrição de um sítio de ligação do gene supressor de tumor WT1 neste promotor, onde o nível de mRNA de hTERT foi reprimido em células 293T, que é uma linhagem derivada de epitélio renal imortalizada com atígeno T de SV 40. Contudo, o efeito inibidor não foi observado em células HeLa no mesmo trabalho, sugerindo que o sistema de repressão transcricional de hTERT por WT1 seja tecido ou célula específico (OH *et al.* 1999).

Outros fatores foram relacionados a repressão de hTERT e por consequência a atividade de telomerase, já que hTERT é considerado o fator limitante para a atividade de telomerase. Entre estes fatores, p53 foi mostrado como um repressor que atuaria possivelmente influenciando a ligação do fator de transcrição Sp1, no seu sítio no promotor de hTERT, por estar ligado a esta porção do DNA. Entretanto a inibição da atividade de telomerase em células SiHa, não foi seguida de diminuição na proliferação nem resultou em apoptose, como nas demais células testadas, ME180, TSU-PR1 e DU145 (KANAYA *et al.* 2000).

Devido aos muitos relatos sobre alguns mecanismos de regulação positiva e negativa de hTERT ser influenciada por Sp1 ou Myc, foi dada uma importância em se observar os sítios de ligação para estes fatores neste trabalho. Além da possível influência dos fatores de transcrição na regulação de hTERT, trabalhos que mostraram a influência de elementos responsivos a estrógeno localizados na porção 5' que flanqueia o gene de hTERT, capazes de se ligar a porção α de receptores de estrógeno e com isso, serem capazes de alterar a conformação da cromatina nesta região, favorecendo a transcrição de hTERT e a ativação de telomerase (MISITI *et al.* 2000).

Eventos epigenéticos tem sido avaliados como de grande importância na regulação da expressão de alguns genes (SHI *et al.* 2003). Um dos principais eventos epigenéticos avaliados em vários estudos sobre controle de expressão gênica é a metilação de regiões conhecidas como ilhas de CpG, que são regiões de 0,5 a 4Kb, normalmente localizadas nas proximidades de regiões promotoras de quase a metade dos genes de mamíferos (JONES e BAYLIN 2002)

A hipermetilação das regiões promotoras de alguns genes, com função comprovadamente de regulação do ciclo celular (P16^{INK4a}) e de reparo do DNA (hMLH1), está diretamente relacionada a perda de tais mecanismos de controle na replicação celular (ESTELLER 2002). Por outro lado a hipometilação de regiões promotoras de genes que conferem vantagem proliferativa para alguns tipos celulares, tem demonstrado que este mecanismo é importante na progressão de algumas neoplasias (DE CAPOA *et al.* 2003).

A análise do perfil de metilação através de restrição com as enzimas *Hpa II* e *Msp I*, foi corroborada pelos dados de sequenciamento, onde a metilação de hTERT em linhagens derivadas de tumores de colo uterino foi avaliada e os resultados demonstram um perfil de metilação diferente para cada uma destas linhagens.

Todas as análises estatísticas usadas para testar uma possível relação entre a metilação e a inibição da expressão de hTERT e da atividade de telomerase, não demonstraram correlação, dado que já foi observado por outros autores, (DEVEREUX *et al.* 1999). A análise inicial foi realizada com enzimas de restrição na tentativa de se ter um indicativo preliminar, do perfil de metilação de uma parte importante do promotor de hTERT, onde existem sítios de ligação para fatores de transcrição como *c-Myc* e *Sp1* que já foram descritos como sendo importantes no

mecanismo de ativação de hTERT em outras linhagens celulares (TAKAKURA *et al.* 1999).

A análise por restrição com as demais linhagens, demonstra que nenhuma apresenta o fragmento esperado após a amplificação por PCR dessas linhagens, indicando que pelo menos um dos sítios referentes as enzimas está desmetilado.

Quando analisamos os dados obtidos por seqüenciamento após tratamento com bissulfito de sódio da região promotora de hTERT, podemos notar que tanto para as linhagens consideradas telomerase negativas, NHK e HFF, quanto para aquelas consideradas telomerase positivas, SiHa, HeLa, CasKi, não existe um perfil de metilação definido para este promotor. Isto pode ser indicativo de que a atividade de telomerase nestas linhagens não dependa exclusivamente da metilação nessa região, ou que a metilação desse promotor é um evento secundário na regulação da atividade de telomerase.

Estes resultados estarão em contraste com o conceito de repressão da expressão gênica mediada por metilação, dado este que já foi observado em outros estudos envolvendo análise do promotor de hTERT com relação a metilação e a atividade de telomerase (GUILLERET e BENHATTAR 2003; WIDSCHWENDTER *et al.* 2004a). Portanto nossos achados são condizentes com a literatura.

É possível observar também que não existe um padrão no perfil de metilação para esta região promotora nas linhagens telomerase positivas aqui estudadas. Notamos, também, que a distribuição da metilação nesta região varia em cada uma das linhagens analisadas, conforme relatado em outro estudo, (DEVEREUX *et al.* 1999).

A manutenção da expressão de hTERT e da atividade de telomerase nas linhagens usadas, principalmente naquelas em que o fragmento estudado encontra-se

amplamente metilado, pode ser induzida pela presença contínua nestas linhagens da oncoproteína viral E6 de HPV de alto risco, que já foi mostrado ser capaz de promover ativação de telomerase em células telomerase negativas, (BAEGE *et al.* 2002). Isto pode ser mais um indício de que a metilação, na presença de outros fatores indutivos da ativação deste gene, não é determinante na regulação da hTERT.

Da mesma maneira, não foi observada uma correlação positiva entre a metilação do promotor nos tecidos derivados de NIC estudados, com a atividade de telomerase apresentada por estas amostras. Entretanto, estes resultados são prejudicados pela não correlação entre as quantidades de materiais observados nos diferentes experimentos, impedindo qualquer correlação com grau de lesão nos tecidos derivados de NIC.

Além disso, nos tecidos derivados de NIC, como não pode ser feito nenhum tipo de separação das células do epitélio do colo do útero do tecido conjuntivo presente nas biópsias, não é possível dizer que tanto o perfil de metilação apresentado como das amostras e a atividade de telomerase referente a estas, seja exclusivamente de tecido epitelial e representativo destas células.

A metilação em sítios específicos para ligação de fatores de transcrição como c-Myc e Sp1 bem como em regiões adjacentes, parece não afetar a expressão de hTERT e por consequência a atividade de telomerase nas linhagens analisadas, assim como nas linhagens telomerase negativas. O perfil hipometilado dessa região promotora, não está associado com a atividade de telomerase.

Os dados obtidos através da detecção de RNAm de hTERT nas linhagens estudadas, estão associados com a atividade de telomerase, observando-se uma maior expressão deste gene nas linhagens com maior valor de atividade de telomerase como C33. Entretanto uma diminuição na intensidade do fragmento específico para

hTERT observada nas linhagens CasKi e 18Nco não se relaciona com os níveis de atividade de telomerase observados nestas células. Estes dados estão de acordo com a literatura recente, onde ocorre maior atividade de telomerase em lesões e linhagens derivadas de carcinoma de colo uterino (WINDSCHWENDTER *et al.* 2004a).

Este trabalho, portanto, corrobora a maioria dos achados existentes na literatura sobre a metilação do promotor de hTERT em linhagens derivadas de tumores do colo do útero. Entretanto, foi frustrada a tentativa de medir tal atividade em esfregaços cervicais. Isto impediu que testássemos nossa hipótese inicial de que a metilação em hTERT pudesse servir como marcador de progressão tumoral no colo do útero.

Recentemente publicou-se artigo onde demonstrou-se a viabilidade da proposta e, de acordo com os autores, sua utilidade como um marcador de progressão tumoral (WIDSCHWENDTER *et al.* 2004b)

7 CONCLUSÕES

- o As maiores atividades de telomerase foram observadas nas linhagens celulares derivadas de tumores de colo uterino e naquelas imortalizadas por HPV 16 e 18.
- o Culturas primárias de queratinócitos ou de fibroblastos, não apresentaram atividade de telomerase.
- o Apenas um caso de lesão precursora do carcinoma do colo uterino de alto grau (NIC III), apresentou atividade de telomerase em relação aos outros 7 casos de NIC de diferentes graus histológicos.
- o Não houve correlação entre os resultados de atividade de telomerase e o perfil de metilação observado nos 75 sítios CpG do fragmento que inclui o promotor de hTERT.
- o Foi possível detectar a expressão de hTERT por RT-PCR apenas nas linhagens tumorais. Entretanto a falta de consistência das medidas semi-quantitativas impediu que se fizesse qualquer correlação com a atividade de telomerase.
- o Nas células e tecidos infectados por HPV outros fatores, além da metilação da região de hTERT, podem estar influenciando a atividade de telomerase.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baege AC, Berger A, Schlegel R, Veldman T. Cervical epithelial cells transduced with the papillomavirus E6/E7 oncogenes maintain stable levels of oncoprotein expression but exhibit progressive, major increases in hTERT gene expression and telomerase activity. **Am J Pathol** 2002; 160:1251-7.

Barbosa MS, Schlegel R. The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. **Oncogene** 1989; 4:1529-32.

Bechter OE, Eisterer W, Dlaska M, Kuhr T, Thaler J. CpG island methylation of the hTERT promoter is associated with lower telomerase activity in B-cell lymphocytic leukemia. **Exp Hematol** 2002; 30:26-33.

Bekkers RL, Massuger LF, Bulten J, Melchers WJ. Epidemiological and clinical aspects of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. **Rev Med Virol** 2004; 14:95-105. [Review]

Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. **Hum Mol Genet** 2000; 9:2395-402.

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, *et al* . Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. **Science** 1998; 279:349-52.

Bosch FX, Manos MM, Munoz N, *et al* . Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. international biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87:796-802.

Bosch FX, Munoz N, de Sanjose S. Human papillomavirus and other risk factors for cervical cancer. **Biomed Pharmacother** 1997; 51:268-75.

Chakrabarti R, Schutt CE. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones. **Gene** 2001; 274:293-8.

Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism. **Oncogene** 2002; 21:564-79.

Costa FF, Verbisck NV, Salim AC, et al. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene** 2004; 23:1481-8.

Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, *et al* . Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. **Oncogene** 1998; 16:1217-22.

de Capoa A, Musolino A, Della Rosa S, et al. DNA demethylation is directly related to tumour progression: Evidence in normal, pre-malignant and malignant cells from uterine cervix samples. **Oncol Rep** 2003; 10:545-9.

Devereux TR, Horikawa I, Anna CH, Annab LA, Afshari CA, Barret JC. DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. **Cancer Res** 1999; 59:6087-90.

Duensing S, Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. **Cancer Res** 2002; 62:7075-82.

Eden S, Cedar H. Role of DNA methylation in the regulation of transcription. **Curr Opin Genet Dev** 1994; 4:255-9.

Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. **Oncogene** 2002; 21:5427-40.

Feinberg AP, Tycko B. Timeline: the history of cancer epigenetics. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:1-11.

Ferreira MG, Miller KM, Cooper JP. Indecent exposure: when telomeres become uncapped. **Mol Cell** 2004; 13:7-18.

Franco EL, Villa LL, Ruiz A, Costa MC. Transmission of cervical human papillomavirus infection by sexual activity: differences between low and high oncogenic risk types. **J Infect Dis** 1995; 172:756-63.

Franco EL, Schlecht NF, Saslow D. The epidemiology of cervical cancer. **Cancer J** 2003; 9:348-59.

Froelich-Ammon SJ, Dickinson BA, Bevilacqua JM, Schultz SC, Cech TR. Modulation of telomerase activity by telomere DNA-binding proteins in *Oxytricha*. **Genes Dev** 1998; 12:1504-14.

Gewin L, Galloway DA. E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. **J Virol** 2001; 75:7198-201.

Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. **Nature** 1989; 337:331-7.

Guilleret I, Benhattar J. Demethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter reduced hTERT expression and telomerase activity and shortened telomeres. **Exp Cell Res** 2003; 289:326-34.

Hildesheim A, Reeves WC, Brinton LA, et al. Association of oral contraceptive use and human papillomaviruses in invasive cervical cancers. **Int J Cancer** 1990; 45:860-4.

Horikawa I, Barrett JC. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. **Carcinogenesis** 2003; 24:1167-76. Epub 2003 May 22.

Huibregtse J, Scheffner M, Howley P. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. **Mol Cell Biol** 1993; 13:4918-27.

Hur K, Song SH, Lee HS, Ho Kim W, Bang YJ, Yang HK. Aberrant methylation of the specific CpG island portion regulates cyclooxygenase-2 gene expression in human gastric carcinomas. **Biochem Biophys Res Commun.** 2003 Oct 24;310(3):844-51.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet** 2002; 3:415-28.

Kanaya T, Kyo S, Hamada K, *et al* . Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. **Clin Cancer Res** 2000; 6:1239-47.

Kilian A, Bowtell DD, Abud, H.E, *et al* . Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. **Hum Mol Genet** 1997; 6:2011-9.

Kipling D. Telomerase: immortality enzyme or oncogene? **Nat Genet** 1995; 9:104-6.

Klingelhutz AJ. Telomerase activation and cancer. **J Mol Med.** 1997;75:45-9.

Kolquist KA, Ellisen LW, Counter CM, *et al* . Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues. **Nat Genet** 1998; 19:182-6.

Kurman RJ and Solomon D. The Bethesda system for reporting cervical / vaginal cytologic diagnoses: definitions, criteria and explanatory notes for terminology and specimen adequacy. 1994 **Springer-Verlag** NY, Inc.

Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. **J Mol Biol** 1992; 225:951-60.

Mantovani F, Banks L. The interaction between p53 and papillomaviruses. **Semin Cancer Biol** 1999; 9:387-95.

Matlashewski G, Osborn K, Banks L, Stanley M, Crawford L. Transformation of primary human fibroblast cells with human papillomavirus type 16 DNA and EJ-ras. **Int J Cancer** 1988; 42:232-8.

McEachern MJ, Krauskopf A, Blackburn EH. Telomeres and their control. **Ann Rev Genet** 2000; 34:331-58.

Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I: cytologic patterns. **Acta Cytol** 1976; 20:505-9.

Merlo A, Herman JG, Mao L, *et al* . 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. **Nat Med** 1995; 1:686-92.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2003. Estimativa para o câncer de colo uterino; p.21-2.

Misiti S, Nanni S, Fontemaggi G, *et al*. Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. **Mol Cell Biol** 2000; 20:3764-71.

Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. **Cell** 1989; 59:521-9

Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, *et al* . Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. **Science** 1997; 277:955-9.

Oh S, Song Y, Yim J, Kim TK. The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. **J Biol Chem** 1999; 274:37473-8.

Oh ST, Kyo S, Laimins LA. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. **J Virol** 2001; 75:5559-66.

Patel D, Huang S, Baglia L, McCance DJ. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. **EMBO J** 1999; 18:5061-72.

Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). **Gene** 2001; 269:1-12.

Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, *et al* . Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85:958-64.

Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, *et al*. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. **JAMA** 2001; 286:3106-14.

Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, *et al*. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:1336-43.

Schlegel R, Phelps WC, Zhang YL, Barbosa M. Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma. **EMBO J** 1988; 7:3181-7.

Shi H, Wei SH, Leu YW, *et al*. Triple analysis of the cancer epigenome: an integrated microarray system for assessing gene expression, DNA methylation, and histone acetylation. **Cancer Res** 2003; 63:2164-71.

Snijders PJ, van Duin M, Walboomers J, *et al* . Telomerase activity exclusively in cervical carcinomas and a subset of cervical intraepithelial neoplasia grade III lesions: strong association with elevated messenger RNA levels of its catalytic subunit and high-risk human papillomavirus DNA. **Cancer Res** 1998; 58:3812-8.

Takakura M, Kyo S, Kanaya T, *et al*. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. **Cancer Res** 1999; 59:551-7.

Villa LL Human papillomaviruses and cervical cancer. **Adv Cancer Res** 1997; 71:321-41.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, *et al* . Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol** 1999; 189:1-3.

Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ. MYC activates telomerase. **Genes Dev** 1998; 12: 1769-74.

Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science** 1990; 248:76-9.

Widschwendter A, Muller HM, Hubalek MM, *et al*. (a). Methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase in ovarian and cervical cancer. **Gynecol Oncol** 2004; 93:407-16.

Widschwendter A, Gattringer C, Ivarsson L, *et al*. (b). Analysis of aberrant DNA methylation and human papillomavirus DNA in cervicovaginal specimens to detect invasive cervical cancer and its precursors. **Clin Cancer Res**. 2004 May 15;10(10):3396-400.

Wisman GB, Knol AJ, Helder MN, et al. Telomerase in relation to clinicopathologic prognostic factors and survival in cervical cancer. **Int J Cancer** 2001; 91:658-64.

Wu KJ, Grandori C, Amacker M, *et al* . Direct activation of TERT transcription by c-MYC. **Nature Genet** 1999; 21:220-4.

Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, O'Connor MJ. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. **J Virol** 1999; 73:6209-19.

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:342-50.