

**DEFINIÇÃO DOS DINUCLEOTÍDEOS CpG
METILADOS NO PROMOTOR DO GENE *PLCG2* E DE
SUA INFLUÊNCIA NA REPRESSÃO
TRANSCRICIONAL EM TUMORES DE WILMS**

LETÍCIA ABIGAIL DE MOURA MARTINS

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro

**São Paulo
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Moura-Martins, Letícia Abigail

Definição dos dinucleotídeos CpG metilados no promotor do gene PLCG2 e de sua influência na repressão transcricional em Tumores de Wilms / Letícia Abigail de Moura Martins – São Paulo, 2011.

130p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Dirce Maria Carraro

Descritores: 1. TUMOR DE WILMS. 2. GENE *PLCG2*. 3. METILAÇÃO DO DNA. 4. HIPERMETILAÇÃO DE SÍTIOS CpG CANDIDATOS. 5. REGIÃO PROMOTORA DO GENE.

"Se você abre uma porta, você pode ou não entrar em uma nova sala. Você pode não entrar e ficar observando a vida. Mas se você vence a dúvida, o temor, e entra, dá um grande passo: nesta sala vive-se! Mas, também, tem um preço... São inúmeras outras portas que você descobre. Às vezes curte-se mil e uma. O grande segredo é saber quando e qual porta deve ser aberta. A vida não é rigorosa, ela propicia erros e acertos. Os erros podem ser transformados em acertos quando com eles se aprende. Não existe a segurança do acerto eterno. A vida é generosa, a cada sala que se vive, descobre-se tantas outras portas. E a vida enriquece quem se arrisca a abrir novas portas. Ela privilegia quem descobre seus segredos e generosamente oferece afortunadas portas. Mas a vida também pode ser dura e severa. Se você não ultrapassar a porta, terá sempre a mesma porta pela frente. É a repetição perante a criação, é a monotonia monocromática perante a multiplicidade das cores, é a estagnação da vida... Para a vida, as portas não são obstáculos, mas diferentes passagens!"

Içami Tiba

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

À minha família, em especial aos meus pais, meus exemplos de vida, caráter e luta, que se doaram para a criação dos filhos e para prepará-los para a vida, independentemente de suas escolhas, e que sempre nos apoiaram em nossas decisões.

Ao meu marido, Cairo, porto seguro da minha vida, que me apoia sem medir esforços pela minha estrada.

Aos meus mestres e orientadores, que participaram da minha construção como aprendiz, profissional e como ser humano.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram a desenvolver este trabalho.

A Deus, o criador de tudo, o maior dos mestres. Obrigada pela vida e tudo que tenho e terei.

Aos meus pais, Maria Herbene de Moura e Osvaldo Martins, meus mestres na terra, e aos meus irmãos, amigos de sangue. Obrigada pelo amor, pelos exemplos, críticas, questionamentos, apoio e convivência. Vocês foram e são fundamentais para a construção do meu caráter.

Ao meu marido, Cairo Mendes Sobrinho. Obrigada pelo amor, carinho, compreensão, companheirismo, também pelas conversas, questionamentos, críticas, elogios, por sempre acreditar em mim e pelo trabalho em conjunto na construção de nós dois.

Às mais novas integrantes de minha família, minha sogra Neci M. Rocha e Sheila M. Cavalcante. Obrigada pelo amor e carinho com que me receberam na sua família, agora nossa.

A todos os meus mestres escolares e acadêmicos de toda a vida, em especial, minha orientadora Dra. Dirce Maria Carraro por me aceitar em seu grupo, pelo apoio, confiança e ensinamentos no desenvolvimento desse trabalho.

A todos os amigos, colegas e funcionários do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular, que de variadas formas colaboraram para meu trabalho e crescimento, Carolina Abuázar, Giovana Torrezan, Márcia Figueiredo, Roberto Ferreira, Elisa Ferreira, Bruna Barros, Dra. Tatiana Ricca, Bianca Lisboa, Gustavo Molina, Felipe Carneiro, Dr. Alex Carvalho, Louise Mota, Vera Prescinoti, Eloisa Olivieri, Cristiane Gonçalves, Dr. Fábio Piccole, Solange Coelho e em especial a Dra. Mariana Maschietto. Obrigada pela colaboração e amizade. Cada um de vocês foi muito importante e sabe o quanto e como me ajudou nesse trabalho.

A todos os amigos, colegas e funcionários de outros laboratórios, Rodrigo Crespo, Marina Gomes, Luciane Kagohara, Karina Santiago, Marina Cannavan, Juliana Badke, Amanda Gonçalves, Dra Ana Krepischi, Dr Rafael Rocha, Ivan Neves, Fátima, Severino Ferreira, Carlos Nascimento. Obrigada pela colaboração e amizade.

Às funcionárias da Pós-Graduação, Ana Kuninari, Luciana Pitombeira e Vanuza Rodrigues. Obrigada pelas orientações e pela ajuda e paciência.

Aos funcionários da biblioteca especialmente Suely Francisco pela ajuda na formatação da dissertação.

A todos os outros funcionários do Hospital A.C. Camargo que também me ajudaram, mas que não citei, desculpem-me por esta falha.

A todos os amigos e familiares que não citei, mas que sabem o quanto foram e são importantes em todos os projetos da minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro durante o período de desenvolvimento do projeto.

Muitíssimo obrigada a todos vocês. Sem a presença de vocês ao meu lado, nada disso seria possível e qualquer conquista de nada valeria.

RESUMO

Moura-Martins LA. **Definição dos dinucleotídeos CpG metilados no promotor do gene *PLCG2* e de sua influência na repressão transcricional em tumores de Wilms.** São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O tumor de Wilms (TW) é um tumor renal embrionário que apresenta diversidade histológica e características moleculares que recapitulam a nefrogênese normal, sendo considerado um modelo apropriado para o estudo da relação biológica entre diferenciação do rim e tumorigênese. Esse tumor se origina da incapacidade das células nefrogênicas mesenquimais de completar a transição mesênquima-epitélio, resultando em um tumor composto por três componentes histológicos - blastema, epitélio e estroma. Nosso grupo vem estudando TW no contexto de diferenciação do rim com o objetivo de identificar os eventos precoces que desencadeiam o surgimento do tumor. Nesse sentido, o grupo identificou uma assinatura denominada TW e desenvolvimento do rim, composta de 25 genes envolvidos nesses eventos. Anotação funcional revelou um enriquecimento de genes pertencentes à via Wnt, representada por *APC*, *ROCK2* e *PLCG2*. A expressão do *PLCG2* mostrou-se diminuída/ausente na grande maioria dos tumores recapitulando os primeiros estágios de diferenciação do rim e sugerindo que a expressão de *PLCG2* é um evento importante na diferenciação do rim e sua inibição seja um fator importante para o surgimento do TW. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar o mecanismo de repressão transcricional do gene em amostras de TW. Uma análise da região promotora desse gene, revelou a existência de grande concentração de dinucleotídeos CpG, sugerindo a possibilidade desse gene sofrer regulação epigenética por metilação do DNA, sendo portanto necessária a definição dos dinucleotídeos CpGs potencialmente envolvidos na regulação da expressão de *PLCG2*. Para isso a linhagem HEK293, de

células renais embrionárias humanas normais, foi tratada com o agente desmetilante 5-aza-2'deoxicitidina apresentando a reativação da expressão de *PLCG2*, o que sugeriu fortemente que o gene é regulado por metilação. Em seguida o DNA das células foi tratado com bissulfito de sódio para definição dos sítios CpG envolvidos nessa regulação. Essa análise revelou 8 sítios CpG potencialmente envolvidos na regulação da expressão do gene. Os 8 sítios CpGs foram investigados em 55 amostras de TW e 12 amostras de RM, dos quais sete apresentaram-se mais metiladas em TW ($P < 0,05$). Correlação inversa ($P < 0,001$) foi observada entre o nível de metilação e de transcrição de *PLCG2*, confirmando ser a metilação desses 8 CpGs um dos principais mecanismos de repressão desse gene nos TW.

SUMMARY

Moura-Martins LA. **[Definition of methylated CpG sites in *PLCG2* gene promoter and its influence on transcriptional silencing in Wilms Tumors]**. São Paulo; 20011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Wilms tumor (WT) is an embryonic renal tumor that presents histological diversity and molecular features that recapitulate the normal nephrogenesis, and it is considered an appropriate model for studying the biological relationship between differentiation and tumorigenesis of the kidney. This tumor arises from the failure of nephrogenic mesenchymal cells to complete the mesenchyme-epithelium transition, resulting in a tumor composed of three histological components - blastema, epithelium and stroma. Our group has been studying WT in the context of differentiation of the kidney in order to identify the early events that trigger the origin of the tumor. Therefore, our group identified a signature denominated WT and kidney development, consisting of 25 genes involved in these events. Functional annotation revealed an overrepresentation of genes belonging to the Wnt pathway, represented by *APC*, *ROCK2* and *PLCG2*. The expression of *PLCG2* was reduced or absent in most tumors, recapitulating the early stages of kidney differentiation and suggesting that the expression of *PLCG2* is an important event in the differentiation of the kidney and that its inhibition is an important factor for the origin of TW. In this context, the aim of this study was to evaluate the mechanism of transcriptional repression of *PLCG2* in WT samples. An analysis of the promoter region of this gene revealed the presence of high CpG sites density, suggesting that this gene can be under epigenetic regulation by DNA methylation. For this reason, it becomes important to define the CpG sites potentially involved with the regulation of the expression of *PLCG2*. Thus, HEK293 cells, a human embryonic kidney cell line, was treated with 5-aza-2'deoxycitidina, a demethylating agent,

driving to *PLCG2* reactivation, which strongly suggested that this gene is regulated by methylation. Then the DNA of cells was treated with sodium bisulfite to define the CpG sites involved with this regulation. This analysis revealed eight CpG sites potentially involved with the regulation of gene expression. These CpGs sites were investigated in 55 WT samples and in 12 mature kidney (MK) samples, and seven of which showed to be more methylated in TW than in RM ($P < 0.05$). Significant inverse correlation ($P < 0.001$) was observed between the methylation level and *PLCG2* expression, confirming that the methylation of these eight CpGs is one of the principal mechanisms of *PLCG2* transcriptional repression in TW.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da via Wnt de sinalização celular.....	6
Figura 2	Imagens de HE dos três componentes do tumor de Wilms.....	12
Figura 3	Clusterização hierárquica não supervisionada baseada na expressão dos 25 genes da assinatura encontrada por MASCHIETTO et al 2008.....	15
Figura 4	Imagens de imunoistoquímica para a proteína PLCG2 nas fases do desenvolvimento normal e dos três componentes do tumor de Wilms.....	16
Figura 5	Expressão relativa por qRT-PCR do gene PLCG2 entre as amostras do componente blastematoso e dois pools de rim fetal.....	16
Figura 6	Resultado da busca por ilhas CpG no gene <i>PLCG2</i> com o auxílio da ferramenta BLAT.....	41
Figura 7	Esquema representativo das quatro CGIs presentes na região promotora, 1º éxon e 1º íntron do gene <i>PLCG2</i>	42
Figura 8	Análise comparativa dos resultados obtidos em 50 sequenciamento capilar e pirosequenciamento do gradiente a estabelecido entre DNA heterozigoto e selvagem.....	51
Figura 9	Esquema representativo da região avaliada, que se estende pela região promotora, 1º éxon e 1º íntron do gene <i>PLCG2</i>	55

Figura 10	Expressão relativa por qRT-PCR do gene <i>PLCG2</i> entre as amostras de TW e RM.....	68
Figura 11	Expressão relativa por qRT-PCR do gene <i>PLCG2</i> entre as amostras AZA e CT.....	70
Figura 12	Visualização em gel de acrilamida dos fragmentos I3P1, I3P2 e I3P3 do gene <i>PLCG2</i> amplificado de DNA tratado com bissulfito de sódio para mapeamento.....	72
Figura 13	Visualização em gel de agarose do fragmento do gene <i>ACTB</i> amplificado de DNA tratado com bissulfito de sódio para confirmação da conversão.....	76
Figura 14	Gráfico de barras das médias das leituras de pirosequenciamento do ensaio de reprodutibilidade.....	80
Figura 15	Visualização em gel de agarose do fragmento I3P3 do gene <i>PLCG2</i> amplificado de DNA tratado com bissulfito de sódio para o rastreamento.....	82
Figura 16	Nível de metilação dos sítios CpG rastreados entre as amostras de TW e RM.....	86
Figura 17	Expressão relativa por qRT-PCR do gene <i>PLCG2</i> e nível de metilação dos sítios CpG diferencialmente metilados entre amostras de TW e RM.....	88
Figura 18	Nível de expressão do gene <i>PLCG2</i> nos grupos 1, 2 e 3 de metilação.....	89
Figura 19	Correlação entre o nível de expressão e de metilação de <i>PLCG2</i>	90
Figura 20	Associação entre nível de metilação de <i>PLCG2</i> e recaída.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características dos iniciadores utilizados nas reações de qRT-PCR.....	39
Tabela 2	Características dos iniciadores para amplificação de fragmento do gene <i>ACTB</i>	47
Tabela 3	Características dos iniciadores utilizados para o mapeamento por sequenciamento capilar.....	56
Tabela 4	Características dos iniciadores utilizados para o rastreamento dos sítios CpG candidatos por pirosequenciamento.....	57
Tabela 5	Condições das reações de PCR para o mapeamento do status de metilação dos sítios CpG.....	59
Tabela 6	Classificação dos padrões de picos dos nucleotídeos C e T na posição analisada com atribuição de scores.....	61
Tabela 7	Valores da expressão de <i>PLCG2</i> relativa à média entre a expressão dos genes normalizadores GAPDH e <i>ACTB</i>	71
Tabela 8	Classificação e seleção dos sítios metilados nas amostras controle.....	74
Tabela 9	Leituras de pirosequenciamento do ensaio de reprodutibilidade e valores de variação absoluta dentro das duplicatas de PCR.....	79
Tabela 10	Estatística descritiva do ensaio de reprodutibilidade.....	80
Tabela 11	Nível de metilação nos sítios candidatos em 52 TW e 12 RM.....	84

Tabela 12	Estatística descritiva do rastreamento dos 11 sítios CpG.....	85
Tabela 13	Dados clínicos e de metilação das amostras de TW.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

16q	Braço longo do cromossomo 16
1p	Braço curto do cromossomo 1
5-azadC	5-aza-2'-deoxicitidina
5-mC	5-metilcitosina
ANOVA	Do inglês <i>Analysis Of Variance</i>
AZA	Células HEK293 submetidas ao tratamento com 5-azadC
BEB	Do inglês <i>Back Extraction Buffer</i>
cDNA	DNA complementar à fita de RNA
CGI	Ilhas CpG do inglês <i>CpG Islands</i>
COG	Do inglês <i>Children Oncology Group</i>
CpG	Dinucleotídeo ou sítio citosina-fosfato-guanina
Ct	Do inglês <i>Cycle threshold</i>
CT	Células HEK293 não submetidas ao tratamento com 5-azadC
ddNTP	Didesoxirribonucleosídeos trifosfatado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMT	DNA metil transferase
dNTP	Desoxirribonucleosídeos trifosfatado
DP	Desvio padrão
EDTA	Do inglês <i>Ethylene Diaminetetraacetic Acid</i>
HAT	Histona acetiltransferase
HDAC	Histona deacetilase
MET	Do inglês <i>Mesenchymal-Epithelial Transition</i>
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCBI	Do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NWTSG	Do inglês <i>National Wilms Tumor Study Group</i>
PBS	Do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
POG	Do inglês <i>Pediatric Oncology Group</i>
PPi	Pirofosfato
qRT-PCR	Do inglês <i>Quantitative Reverse Transcriptase-PCR</i>
RIN	Do inglês <i>RNA Integrity Number</i>
RM	Rim normal maduro

RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensageiro
r_s	Coeficiente de correlação de Spearman
SAM	S-adenosilmetionina
SIOP	Do francês <i>Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique</i>
SNP	Do inglês <i>Single Nucleotide Polymorfism</i>
TBE	Tampão Borato-EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
TW	Tumor de Wilms

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Tumor de wilms – aspectos epidemiológicos.....	1
1.2	Tumor de wilms – aspectos moleculares	4
1.3	Desenvolvimento do rim e tumorigênese do tumor de Wilms	10
1.4	Regulação epigenética – metilação do DNA.....	18
1.5	Justificativa	33
2	OBJETIVOS	35
2.1	Objetivos específicos	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1	Comitê de ética	36
3.2	Casuística	36
3.3	Reação de RT-PCR quantitativo (qRT-PCR).....	37
3.4	Avaliação <i>in silico</i> da região a montante do gene	41
3.5	Tratamento com 5-aza-2'-deoxicitidina (5-azadC)	43
3.6	Extração de DNA e RNA da linhagem HEK293.....	43
3.7	Tratamento com bissulfito de sódio	46
3.8	Teste de sensibilidade para avaliação quantitativa de alteração nucleotídica das metodologias de seqüenciamento.....	48
3.9	Desenho dos iniciadores para amplificação e análise de trechos das ilhas CpG (CGIs)	54
3.10	Mapeamento do perfil de metilação de trechos das ilhas CpG.....	58
3.10.1	Amplificação em reações de PCR do DNA tratado com bissulfito de sódio das células HEK293	58
3.10.2	Sequenciamento capilar	59
3.10.3	Crítérios para a seleção dos sítios CpG candidatos.....	60
3.11	Rastreamento dos sítios candidatos por Pirosequenciamento.	62

3.11.1	Verificação da qualidade da conversão das citosinas no DNA tratado com bissulfito de sódio das amostras da casuística	63
3.11.2	Ensaio de Reprodutibilidade	64
3.11.3	Amplificação em reações de PCR do DNA tratado com bissulfito de sódio das amostras da casuística deste trabalho e reações de pirosequenciamento.....	64
3.12	Análises estatísticas	65
4	RESULTADOS	67
4.1	Análise da expressão de <i>PLCG2</i> na casuística	67
4.2	Análise da expressão de <i>PLCG2</i> nas células da linhagem tratada e não tratada com agente desmetilante.....	68
4.3	Mapeamento do perfil de metilação de trechos das ilhas CpG.....	71
4.4	Rastreamento do nível de metilação dos CpGs nas amostras de TW e RM.....	75
4.5	Correlação inversa entre metilação e expressão nas amostras de TW e RM.....	87
4.6	Associação do nível de metilação e dado clínico.....	91
5	DISCUSSÃO	95
6	CONCLUSÕES.....	109
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

1 INTRODUÇÃO

1.1 TUMOR DE WILMS- ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

O câncer infanto-juvenil (até 19 anos) corresponde entre 2% e 3% de todos os tumores malignos e é considerado raro quando comparado com os tumores do adulto. No Brasil, em 2005, a mortalidade por câncer em crianças e adolescentes com idade entre 1 e 19 anos correspondeu a 8% de todos os óbitos, consistindo, assim, na segunda causa de morte nesta faixa etária, depois de morte por causas externas, como acidentes e violência, e portanto, na primeira causa de mortes por doenças nesta população (Câncer na Criança e no Adolescente no Brasil – dados dos Registros de Base Populacional e de Mortalidade – Ministério da Saúde – INCA, 2008). Esses índices se assemelham muito aos índices observados nos países desenvolvidos para as causas de óbito na população pediátrica (até os 14 anos), em que óbito por câncer fica em segundo lugar depois de acidentes (LITTLE 1999). Isso sugere que esse quadro seja reflexo das atuais políticas de prevenção em outras doenças infantis.

A maioria dos tumores pediátricos apresenta achados histológicos que se assemelham a tecidos fetais nos diferentes estágios de desenvolvimento, sendo considerados embrionários. Essa semelhança a estruturas embrionárias gera grande diversidade morfológica resultante das constantes transformações celulares, podendo apresentar um grau variado

de diferenciação celular. Os tumores embrionários diferem dos tumores de adultos em diversos aspectos tais como características anatomopatológicas, local de acometimento e comportamento clínico (KOESTERS 2003). Aproximadamente 30% das neoplasias malignas na infância são tumores decorrentes de erros no desenvolvimento, cujas características patológicas recapitulam aquelas do desenvolvimento do órgão ou tecido de origem (DEHNER 1998). Acredita-se que a principal diferença entre neoplasias embrionárias e de adultos seja o fato de os tumores embrionários serem neoplasias originárias de células primordiais que sofreram mutações espontâneas e não decorrentes de mutações adquiridas por ação ambiental, como ocorre com a maior parte das neoplasias de adultos (DEHNER 1998).

Dentre os tumores sólidos embrionários, os mais comumente encontrados são os retinoblastomas, hepatoblastomas (HB), neuroblastomas, nefroblastomas ou tumores de Wilms (TW), tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET) ou sarcoma de Ewing e os rabdomiossarcomas. Esses tumores mostram diversidade histológica, como é o caso do TW, o qual é objeto de estudo desse projeto.

O TW é o tumor renal maligno primário mais comum em crianças (BRODEUR e BRODEUR 1991; DOME et al. 2006) responsável por 7% de todos os tipos de câncer infantil (BRODEUR e BRODEUR 1991; DOME et al. 2006; STILLER e PARKIN 1990), correspondendo a 95% de todos os tumores renais pediátricos (BRESLOW et al. 1993; LITTLE 1999; PASTORE et al. 2006). A incidência anual é de uma em 10.000 crianças menores que 15 anos de idade no mundo inteiro (BRODEUR e BRODEUR 1991; DOME

et al.2006) com idade média de apresentação de 44 meses para pacientes com doença unilateral e 32 meses para bilateral sincrônica (BRODEUR e BRODEUR 1991), sendo a incidência semelhante em meninas e meninos (BRODEUR e BRODEUR 1991; DOME et al. 2006).

No Hospital do Câncer, em São Paulo, antes de 1970, a sobrevida em 5 anos de pacientes com TW não ultrapassava 8% mediante um tratamento aleatório e em 1971, com a formação de uma equipe multidisciplinar, passou para 34%. A partir de 1979, utilizando um protocolo baseado no grupo cooperativo norte-americano, *National Wilms Tumor Study Group* (NWTSG), a sobrevida atingiu 83% (DE CAMARGO 1987). Atualmente a sobrevida relatada na literatura é maior que 93% (RIES et al. 2008; DAVIDOFF 2009) mostrando-se uma das mais bem sucedidas da medicina moderna, resultado em parte da forma sistemática que a abordagem terapêutica desenvolveu, em que além da cirurgia, componente crítico da terapia, e do papel do cirurgião, o refinamento do tratamento quimioterápico e, em algumas circunstâncias, radioterápico tem importante parcela na melhora dessa taxa de sobrevida. (DAVIDOFF 2009).

E tendo em vista a alta taxa de sobrevida, atualmente visa-se identificar marcadores de bom e mau prognóstico que auxiliem na decisão de atenuar ou intensificar a terapia, reduzindo a morbidade, aumentando as taxas de sobrevida e de cura e reduzindo as sequelas da terapia.

1.2 TUMOR DE WILMS - ASPECTOS MOLECULARES

Assim como outros tipos de câncer, o TW se caracteriza por alterações em genes que regulam o crescimento celular, diferenciação e potencial proliferativo. A maior parte dos TW surge de mutações somáticas que se restringem ao tecido tumoral. Alguns, no entanto, se originam de mutações na linhagem germinativa, o que pode tanto ser herdado, como adquiridos (mutação *de novo*).

Muito do entendimento da relação entre TW e desenvolvimento do rim deriva de estudos sobre a proteína *Wilms Tumor 1*, a WT1 (GESSLER et al. 1990; HABER et al. 1990; HUANG et al. 1990), cujo gene está localizado em 11p13. WT1 tem função de fator de transcrição e apresenta um padrão de expressão finamente regulado durante a diferenciação do rim (PELLETIER et al. 1991; PRITCHARD-JONES et al. 1990). As propriedades transativacionais da WT1 têm sido extensivamente estudadas, e levaram à identificação de alvos transcricionais implicados na diferenciação renal ou gonadal, uma vez que o WT1 regula a expressão de fatores que mediam os sinais mesenquimais indutores da formação e da ramificação do broto uretérico (VAINIO e LIN 2002). Além disso, o WT1 também tem um papel fundamental na sobrevivência do mesênquima metanéfrico, (KREIDBERG et al. 1993), que dá origem aos glomérulos e túbulos renais, e foi observado ser essencial para o desenvolvimento renal de camundongos (GESSLER et al. 1990).

Além das mutações em *WT1*, alterações no gene *CTNNB1*, localizado em 3p21 e que codifica a proteína β -catenina, foram relatadas em dois estudos independentes com frequência de aproximadamente 15% dos TW (KOESTERS et al. 1999; MAITI et al. 2000). Em ambos os estudos as mutações afetavam sítios de fosforilação, responsáveis pelo controle da localização da proteína. Uma vez que esses sítios não podem mais ser fosforilados, a transferência da β -catenina para o núcleo em uma célula diferenciada não é mais impedida e ela pode então atuar como fator de transcrição, enquanto que fosforilados, a β -catenina fica localizada na membrana e no citoplasma, envolvida na formação de complexos protéicos responsáveis pela adesão celular. O processo de transcrição é importante para o desenvolvimento de um órgão e o processo de adesão é importante para a manutenção da célula diferenciada. Dessa forma, alterações na regulação dessa proteína são reconhecidamente importantes para os dois processos e uma alteração na sua regulação pode levar ao desenvolvimento de inúmeros tipos de tumores (SPARKS et al. 1998; MIYOSHI et al. 1998; HARRIS et al. 2005), que, com frequência, apresentam a β -catenina com localização nuclear, a qual pode, assim, voltar a ativar genes que deveriam permanecer silenciados. Ainda, a β -catenina é considerada o efetor da via de sinalização Wnt (*Wingless-type*). Assim, a regulação fina dessa via é essencial para a fisiologia da célula e distúrbios na sua regulação podem promover tanto doenças degenerativas quanto o câncer (LOGAN e NUSSE 2004).

A via de sinalização Wnt, representada na Figura 1, é constituída por membros da família Wnt de proteínas de sinalização e sinaliza, basicamente, através de três braços: o braço Wnt/ β -catenina canônico e os não canônicos, jun kinase e Wnt/ Ca^{2+} .

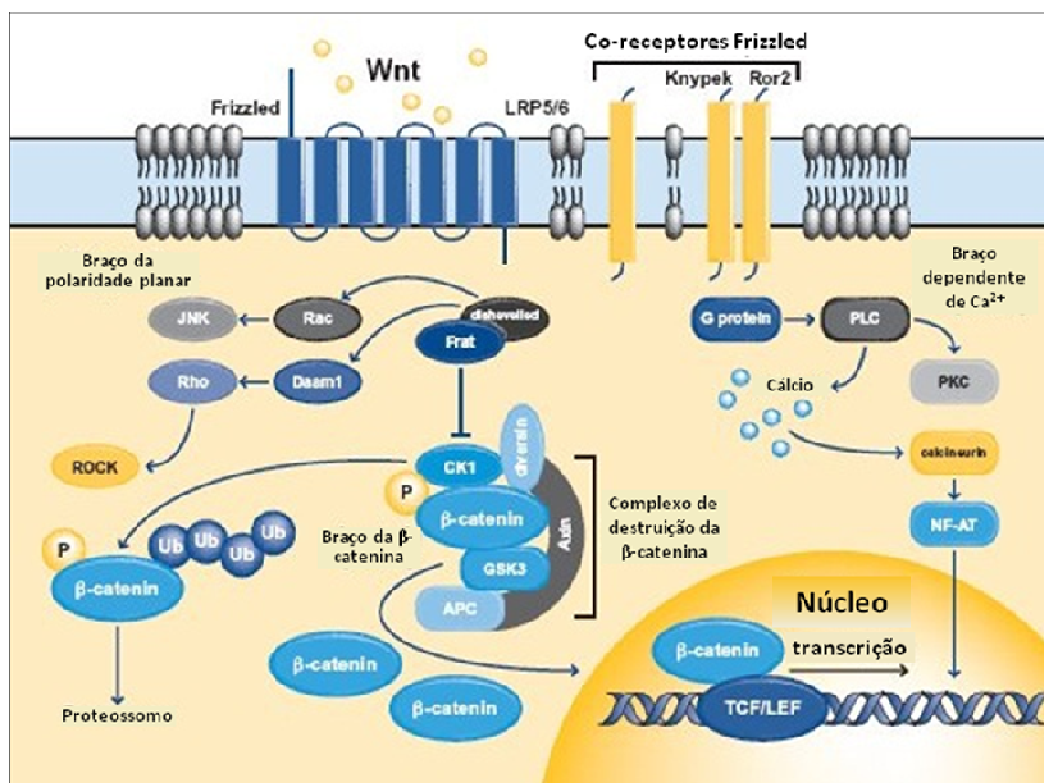


Figura 1 - Representação da via Wnt de sinalização celular. A via é composta por três braços: o braço canônico, o braço dependente de cálcio e o braço de polaridade planar. Imagem adaptada de www.abcam.com

O braço canônico, que envolve a β -catenina, é o mais estudado, tanto na diferenciação normal das células quanto em tumores. Acredita-se que mediante ativação da via Wnt durante a embriogênese, a β -catenina é impedida de ser degradada, sendo transportada para o núcleo, onde participa de complexos protéicos e regula a expressão de diversos genes.

Foi descrito, também, um gene supressor de tumor em TW, o *WTX*, sendo o primeiro gene supressor identificado no cromossomo X, com localização em Xq11.1 (RIVERA et al. 2007). Pelo fato do *WTX* estar localizado em uma região sujeita à inativação, homens e mulheres têm apenas uma cópia ativa do gene e, portanto, um único ponto de mutação é suficiente para sua inativação (SCHEDL 2007). O *WTX* forma um complexo com β -catenina, AXIN e APC (KIMELMAN 2006) responsável por sequestrar a β -catenina do citoplasma, bloqueando sua atividade de regulação gênica, antagonizando a sinalização Wnt/ β -catenina, enquanto que a inibição de *WTX* aumenta a atividade de β -catenina no núcleo (MAJOR et al. 2007).

O braço Wnt/ Ca^{2+} parece ter a função de suprimir a sinalização do braço Wnt/ β -catenina, através da ativação da proteína cinase C dependente de calmodulina (CaMKII) e da quinase Nemo-like (NLK) (KÜHL 2004; LOGAN e NUSSE 2004; SEIFERT e MLODZIK 2007), através da fosforilação dos fatores de transcrição TCF (ISHITANI et al. 1999, 2003).

Esse braço da via Wnt foi associado aos TWs através da diminuição da expressão de *WNT5A* observada em TWs em relação aos rins fetais (TAMIMI et al. 2008) e também através da ausência de *PLCG2* nos TWs, semelhantemente aos rins fetais, e presença nas células dos rins diferenciados (MASCHIETTO et al. 2008). O braço Wnt/ Ca^{2+} foi associado também à formação de tumores (LIANG et al. 2003; KREMENEVSKAJA et al. 2005; TAMIMI et al. 2008)

O braço Wnt/JNK é o braço da via Wnt menos estudado, mas sabe-se que está envolvido no processo de gastrulação e na migração das células da

crista neural e é ativado através do envolvimento das proteínas Wnt11 e Wnt5A (VEEMAN et al. 2003; MATSUI et al. 2005; DE CALISTO et al. 2005).

A via Wnt participa de múltiplos eventos do desenvolvimento durante a embriogênese, também está envolvida na homeostase em tecidos adultos (LOGAN e NUSSE 2004) e, no rim, a Wnt é crítica para a indução da diferenciação epitelial do mesênquima metanéfrico (transição mesênquima-epitélio, MET) (KISPERT et al. 1998). Desta forma, desequilíbrios na regulação dessa via podem ser críticos para o surgimento do TW.

Atualmente, acredita-se que mutações de *WTX*, *WT1* e *CTNNB1* juntas explicam por volta de 30% dos TWs (RUTESHOUSER et al. 2008), sugerindo que outros genes determinantes para o processo de tumorigênese de TW ainda não foram associados a essa patologia. No entanto, WEGERT et al. (2009) identificaram alterações genômicas em *WTX* em 17% casos de TW, mas não encontraram correlação significativa entre deleção ou nível de expressão de *WTX* e parâmetros clínicos, sugerindo que mutações em *WTX* tenham aparentemente pouco impacto direto no comportamento e apresentação do tumor. Ademais, a presença de deleções incompletas de *WTX*, apesar da frequência de perda alélica completa, sugere que não sejam alterações precoces e necessárias para o início da tumorigênese, e sim, eventos tardios que possam afetar apenas uma fração de células com relevância clínica pouco clara (WEGERT et al. 2009).

Na patologia do TW existem também casos de predisposição familiar, apesar de serem raras e afetarem de 1 a 2% dos pacientes com TW. Adicionalmente, a análise de duas famílias revelou *linkage* com cromossomo

17q, e um gene candidato nesse *locus* foi nomeado *FWT1* (RAHMAN et al. 1996, 1998). Análise de cinco outras famílias revelou um segundo *locus* predisponente de TW familiar no 19q, chamado *FWT2* (MCDONALD et al. 1998). No entanto, o fato de outras famílias com TW não apresentarem *linkage* com os *loci* cromossômicos *FWT1*, *FWT2* ou de *WT1*, implica na existência de outros genes de suscetibilidade familiar a TW (RAPLEY et al. 2000).

Estudos de citogenética também têm sido realizados em tumores de Wilms e um deles identificou LOH não-randômica no cromossomo 16q em 20% das amostras de TW avaliadas (MAW et al. 1992), no entanto, o número de amostras de tumor era pequeno (sete). Em 1994, o *Pediatric Oncology Group*, divulgou um trabalho com 232 crianças com TW registradas no NWTS (*National Wims Tumor Study*) -3 e -4, no qual foi avaliada a LOH para marcadores de DNA polimórficos no cromossomo 16q. Independentemente de histologia (favorável ou não), 17,2% dos tumores apresentaram LOH em 16q, proporção semelhante ao observado por MAW et al. (1992). Tumores de Wilms de histologia favorável são aqueles que não apresentam anaplasia e cuja chance de cura é excelente. Anaplasia refere-se à aparência anormal e bizzara da célula e ao núcleo grande e distorcido. Esses dados de LOH foram associados com uma sobrevida total e livre de doença em dois anos significativamente pobre, mesmo quando ajustado para os estágios e histologia (GRUNDY et al. 1994).

Também foi verificada LOH em 1p em 10% dos TW (GRUNDY et al. 1994). Estudos preliminares mostraram, ainda, que LOH em 16q e 1p foi

associada com prognóstico adverso, independente do estadio do tumor e da histologia, e ambas as perdas também foram associadas com outros tipos de câncer (GRUNDY et al. 1994, 1998). Em outro estudo realizado com mais de 2.000 pacientes, foi observado aumento do risco de recaída para os estadios I e II com histologia favorável daqueles tumores que apresentaram LOH em 16q e que a perda de ambos os *loci* se mostrou associada com aumento de risco de recaída do tumor e morte em pacientes de estadio I a IV com histologia favorável. Esses achados permitiram a inclusão da análise de LOH de 1p e 16q como fatores prognósticos para auxiliar na determinação da intensidade do tratamento visando à diminuição do risco de recaída do tumor (GRUNDY et al. 2005).

Diante do exposto, podemos afirmar que a diferenciação normal do rim é resultado de sucessivos eventos moleculares coordenadamente regulados e que mutação ou interrupção de qualquer passo crucial nessa sucessão de eventos pode levar à má formação do rim e doença.

1.3 DESENVOLVIMENTO DO RIM E TUMORIGÊNESE DO TUMOR DE WILMS

O início do desenvolvimento do rim é um processo complexo que envolve interações altamente reguladas entre os dois derivativos do mesoderma intermediário que compõem o mesênquima nefrogênico - o ducto de Wolffian (ou ducto mesonéfrico) e o mesênquima metanéfrico (ou blastema metanéfrico) (VAINIO e LIN 2002), que levarão ao processo de

MET do mesênquima metanéfrico formando as vesículas e os túbulos renais (condensação). O mesênquima metanéfrico dá origem, também, aos elementos estromais, que são células mesenquimais que não passaram pela MET (SCHEDL 2007). Estas células se desenvolvem na periferia do mesênquima nefrogênico e entre as ramificações do broto uretérico (SCHEDL 2007). A diferenciação normal do rim, então, é resultado de sucessivos eventos moleculares coordenadamente regulados. Mutações ou interrupção de qualquer passo crucial nessa sucessão de eventos pode levar à má formação do rim e doença (MASCHIETTO et al. 2008).

Os TWs, por se originarem de células precursoras embrionárias pluripotentes do rim, podem ser considerados uma falha da MET, resultando em tumores compostos por células semelhantes às células precursoras renais - componente blastematoso (BL) -, células estromais indiferenciadas e/ou ectópicas - componente estromal (ES) -, e estruturas epiteliais primitivas que lembram os túbulos e os corpos de “vírgula” e “S” do rim embrionário - componente epitelial (EP)(SCHEDL 2007). Essa estrutura trifásica é decorrente da incapacidade das células nefrogênicas mesenquimais de completar a MET (MIERAU et al. 1987; HASTIE 1994; LI et al. 2002), que deve ocorrer durante o desenvolvimento normal para a formação do néfron maduro, consistindo, então, na interrupção da diferenciação celular.

Na Figura 2, são apresentadas imagens de HE dos três componentes do tumor de Wilms separadamente e juntamente (TW), bem como de um rim

fetal, mostrando a semelhança morfológica existente entre o tumor de Wilms e o rim fetal.

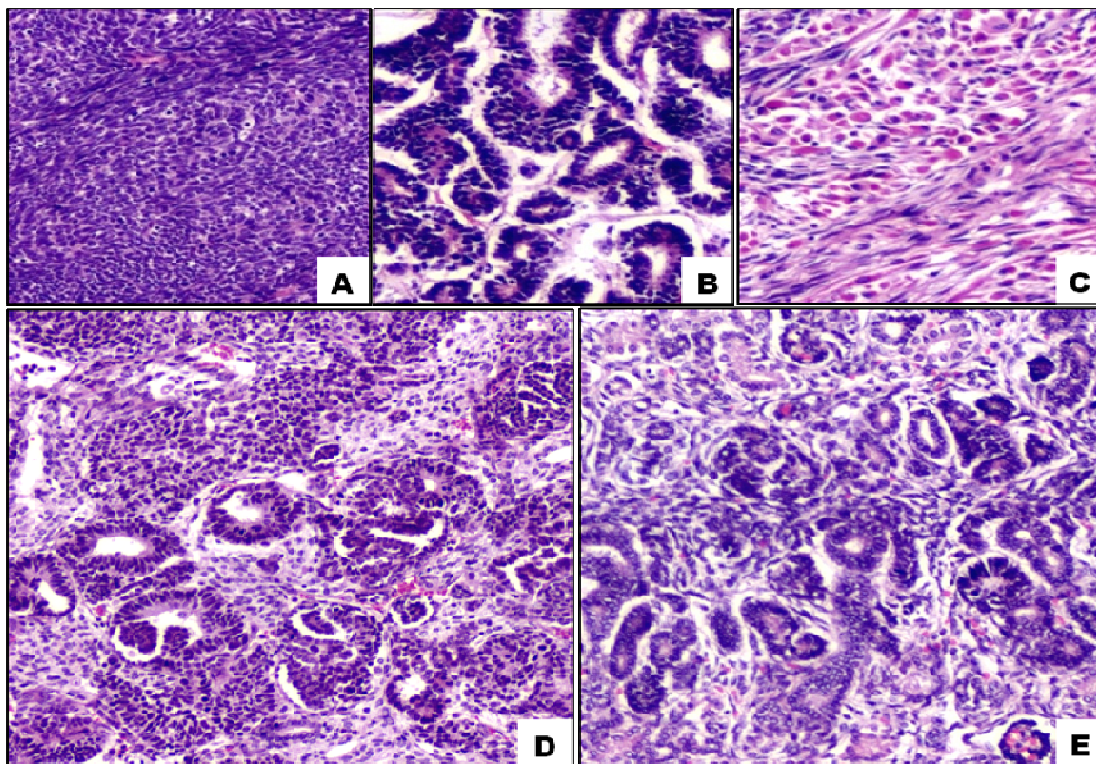


Figura 2 – Imagens de HE dos três componentes do tumor de Wilms: A - componentes blastematoso (BL), B - epitelial (EP) e C - estromal (ES); D - tumor de Wilms contendo os 3 componentes (TW); E - rim fetal (RF).

Além de sua aparente derivação de precursores pluripotentes, a associação do TW com células persistentes de tecido embrionário, os restos nefrogênicos, aponta também para uma conexão com o início do desenvolvimento do rim (BECKWITH et al. 1990). Os restos nefrogênicos consistem em células do blastema com graus variados de diferenciação (RIVERA e HARBER 2005) que persistem na vida pós-natal (DOME e COPPES 2002). São encontrados normalmente em aproximadamente 1%

de rins de recém nascidos e normalmente regridem ou se diferenciam na infância precoce (BECKWITH et al. 1990). Como são encontrados restos nefrogênicos no rim de aproximadamente 40% dos pacientes com TW unilateral e aproximadamente 100% dos pacientes com TW bilateral, presume-se que sejam precursores desse tumor. Por outro lado, alguns estudos mostram que a maioria dos restos nefrogênicos, incluindo alguns com mutações inativadoras bialélicas do WT1 nunca convertem para TW, sugerindo que eventos genéticos adicionais são necessários para completar o processo de transformação. (DOME e COPPES 2002).

Uma vez que o TW tem características histológicas comuns ao rim embrionário, a análise da biologia celular e molecular dessa patologia tem fornecido importantes pistas sobre a relação entre o desenvolvimento renal precoce e a biologia do TW (RIVERA e HABER 2005; MASCHIETTO et al. 2008).

Nesse sentido, foi observada uma correlação estreita entre o padrão gênico geral no tumor e os estágios iniciais da diferenciação normal do rim que forneceu suporte à hipótese da recapitulação da nefrogênese normal por esta patologia (LI et al. 2002, 2005). Nestes estudos, listas de genes mais expressos nos estágios iniciais da diferenciação normal do rim que no rim maduro, representativas de cinco diferentes estágios da expressão gênica temporal em rim de ratos (STUART et al. 2003) foram comparadas com uma lista de genes mais expressos em TW que no rim maduro, mostrando uma sobreposição significativa de genes com o estágio mais precoce avaliado do desenvolvimento do rim. Entretanto, esses dados são baseados no padrão

de expressão do tumor como um todo, e uma vez que o tumor é composto por populações mistas de células numérica e morfológicamente distintas, esse perfil de expressão tem um poder menor de refletir a relação entre o TW e o processo da nefrogênese.

Em uma análise semelhante, nosso grupo analisou os dados de expressão de aproximadamente 4.600 genes através de *microarray* dos três componentes dos TWs em separado e foi identificado que, preferencialmente, o componente blastematoso, e não o tumor como um todo, apresenta o padrão de expressão mais semelhante aos primeiros estágios de desenvolvimento do rim. Esse dado sugere que o componente blastematoso apresenta a informação molecular que reflete a interrupção na diferenciação das células conferindo, portanto, uma situação permissiva para o aparecimento do tumor (MASCHIETTO et al. 2008).

Além disso, assumindo que as características que definem TW consistem tanto na perda do controle do desenvolvimento, quanto no ganho do processo de malignidade, provavelmente de maneira sequencial, nosso grupo analisou separadamente genes provavelmente envolvidos na perda do controle do desenvolvimento do rim, somente no componente blastematoso. Esta análise resultou na identificação de uma assinatura de 25 genes modulados durante o desenvolvimento do rim e que estavam alterados no TW (Figura 3). Essa assinatura foi capaz de discriminar os rins fetais dos TW que por sua vez foram discriminados dos rins normais maduros.

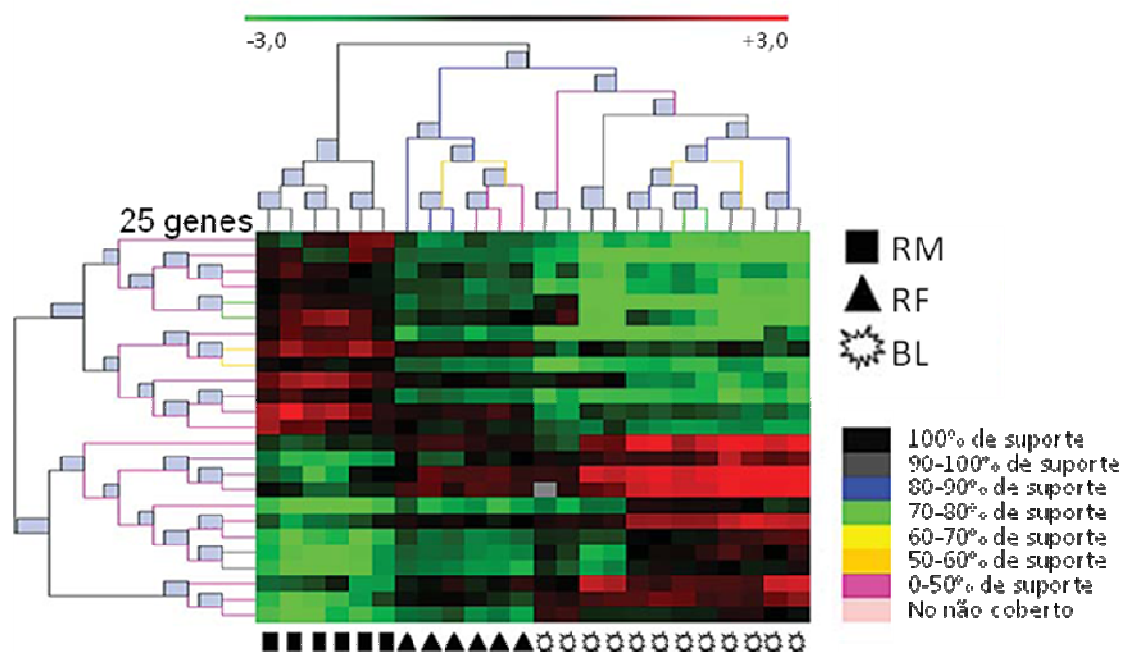


Figura 3 – Clusterização hierárquica não supervisionada baseada na expressão dos 25 genes da assinatura encontrada por MASCHIETTO et al 2008. Os símbolos representam amostras de rim normal maduro (RM), componente blastematoso (BL) e rim fetal (RF). As cores nas caixas representam a confiabilidade da análise de *bootstrap* utilizada na clusterização hierárquica não supervisionada.

Uma análise das vias funcionais relevantes nesse grupo de genes mostrou um enriquecimento da via Wnt, representada pelos genes *APC*, *ROCK2* e *PLCG2*, reforçando o envolvimento da via na diferenciação do rim normal e no aparecimento do tumor. Dentre os genes pertencentes à via Wnt destacamos o *PLCG2* localizado em 16q24.1, que codifica para a proteína PLCG2, cuja expressão nesse estudo foi encontrada baixa nos estágios iniciais do desenvolvimento normal, crescente até atingir a maturidade e diminuída ou ausente nas amostras de TW em todos os três componentes (Figura 4), com confirmação em nível de mRNA (Figura 5) e de proteína em grupos independentes de amostras de TW (MASCHIETTO et al. 2008).

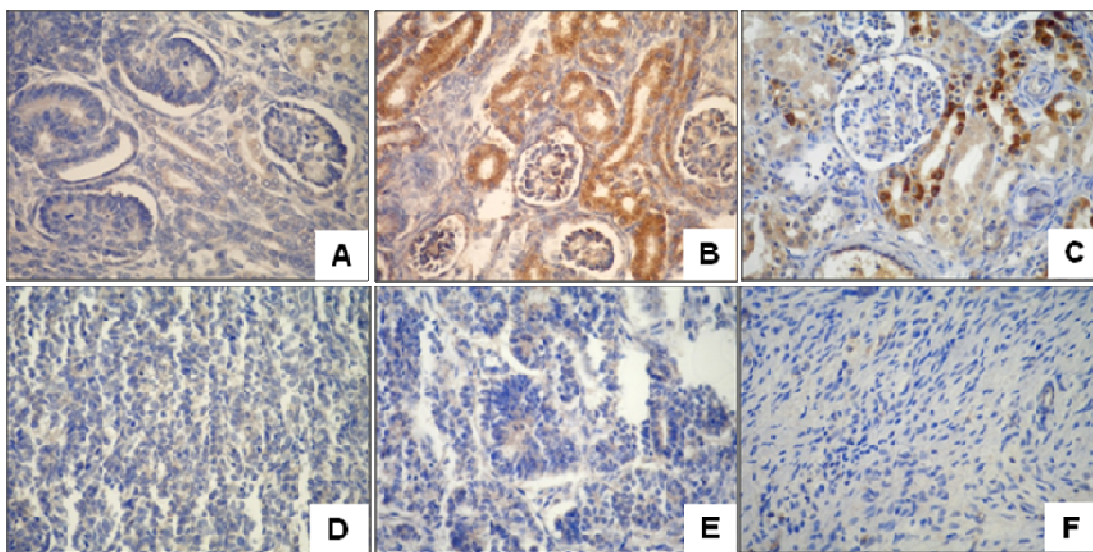


Figura 4 – Imagens de imunoistoquímica para a proteína *PLCG2* nas fases do desenvolvimento normal (A, B e C) e dos três componentes do tumor de Wilms (D, E e F). A – Rim fetal de 11 semanas; B- rim fetal de 22 semanas; C- rim normal maduro; D – componente blastematoso; E – componente epitelial; F – componente estromal. Expressão protéica de *PLCG2* ausente em 76,1% das amostras de componente blastematoso, 71,9 % das amostras de componente epitelial e 99,98% das amostras de componente estromal.

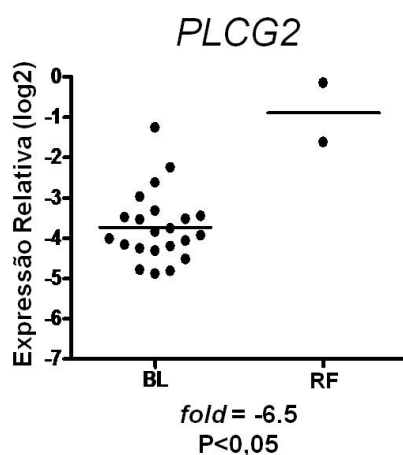


Figura 5 – Expressão relativa por qRT-PCR do gene *PLCG2* entre as amostras do componente blastematoso e dois pools de rim fetal. A expressão relativa é dada na escala de log na base 2 (log2) e se refere aos genes normalizadores *GAPDH* e *ACTB*. Os pontos no gráfico representam a média das duplicatas de cada amostra. A média das expressões é dada pelo traço maior BL: amostras de componente blastematoso do tumor de Wilms; RF: amostras de rim fetal. P: pvalor. F: *fold* calculado pelo método de PFAFFL (2001). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

As fosfolipases C gama (PLCG), pertencentes à família de proteínas fosfolipases C, quando ativadas, via receptor tirosina cinase, clivam fosfatidilinosítídeos de membrana para formar PIP3 (fosfatidilinositol-1,4,5-trifosfato) e DAG (diacilglicerol) resultando no aumento da concentração intracelular de cálcio livre e PKC (proteína cinase C). YU et al. (2005) mostraram que o aumento da sinalização do Plcy2, proteína do camundongo ortóloga ao PLCG2 do humano, *in vivo* levou a um aumento na entrada de Ca^{2+} no nível celular (YU et al. 2005). PATTERSON et al. (2002) mostraram que isoformas de Plcg são necessárias para entrada de Ca^{2+} induzida por agonista, uma vez que RNA de interferência para depletar Plcg2 inibiram essa entrada em células PC12 (células pequenas assimétricas de glândula adrenal) e células A7r5 (células de musculatura lisa de aorta de ratos). Essa entrada foi reestabelecida nas células DT40 (linfócitos B de frango) *knockout* para *PLCG2* por expressão transiente de *plcg2* de rato ou um mutante de *plcg2* com função lipase inativa. Isso indica um papel independente de lipase para PLCG2 na ativação fisiológica da entrada de Ca^{2+} induzida por agonista (PATTERSON et al. 2002).

Outra evidência da participação do PLCG2 na via do Ca^{2+} é pelo braço Wnt/ Ca^{2+} que está envolvido com o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} através da ativação da proteína *Frizzled* (Fz) que, por sua vez, pode ativar a fosfolipase C (PLC), a qual promove a liberação do Ca^{2+} . Uma grande variedade de processos do desenvolvimento, desde fertilização até formação e função do organismo, é dependente da dinâmica de liberação de íons Ca^{2+} (SLUSARSKI e PELEGRI 2007).

A modulação da expressão do *PLCG2* está ausente nos primeiros estágios do desenvolvimento do rim e a recapitulação dessa ausência de expressão pelo TW foi observada pela primeira vez por MASCHIETTO et al. (2008), sugerindo que esse gene tenha importante papel no processo de desenvolvimento normal do rim e no processo de tumorigênese do TW. Além disso, a localização desse gene em 16q24.1, contido no *locus* 16q cuja perda está associada com maior risco de recaída em TW faz desse gene um importante candidato a ser caracterizado no contexto dessa neoplasia.

1.4 REGULAÇÃO EPIGENÉTICA - METILAÇÃO DO DNA

O estudo da epigenética é definido como o estudo dos mecanismos que regulam a expressão gênica e que são transmitidos de célula mãe a célula filha, mas que não envolvem alterações na sequência de nucleotídeos do DNA. Em outras palavras, os mecanismos epigenéticos definem onde e quando a informação genética será utilizada. O padrão de informação epigenética é variável entre os tipos celulares (TREMBLAY e HAMET 2008) e, uma vez estabelecidos, nas células completamente diferenciadas, os sinais epigenéticos são estavelmente herdados através da mitose sendo essenciais para manter o perfil correto de expressão da célula durante a vida do organismo (WHITELAW e GARRICK 2006).

Por serem estas modificações reversíveis e mais prontamente alteradas que a sequência do DNA, a informação epigenética pode ser dinamicamente reprogramada durante a diferenciação celular, mas é

também propagada com fidelidade consideravelmente menor que a da informação genética. Estima-se, por exemplo, uma taxa de erro de 10^{-3} por dinucleotídeo CpG e divisão celular para a metilação do DNA (USHIJIMA et al. 2003), em contraste com valores na ordem de 10^{-8} de taxa de erro por par de base e divisão celular para as mutações genéticas (DRAKE et al. 1998), o que leva ao provável acúmulo de grande número de erros de metilação do DNA, herdáveis ao longo da vida. Dessa forma, o envelhecimento celular leva a heterogeneidade crescente dentro da população celular e pode contribuir para a perda do controle desse mecanismo e como consequência ao desenvolvimento de doenças tais como o câncer (FRAGA e ESTELLER 2007).

A maioria das modificações epigenéticas do DNA ou fatores associados em tecidos normais são alteradas no câncer e está associada com genes que afetam diversas vias reguladoras do crescimento celular, apoptose, sinalização celular e reparo de DNA (VOGELSTEIN e KINZLER 2004). Mais que isso, modelos mostraram recentemente que distúrbios epigenéticos na população de células tronco são a origem do câncer (FEINBERG et al. 2006).

A importância da epigenética na manutenção do desenvolvimento e da biologia normais é refletida pela observação de que muitas doenças se desenvolvem quando formas erradas de marcas epigenéticas são introduzidas ou adicionadas no momento ou lugar errado (ESTELLER 2002). Um exemplo disso é o claro papel causal da metilação do DNA para o câncer, com a hipermetilação de alguns genes como evento precoce na

tumorigênese, bem como um cenário de metilação tumor-específico (ESTELLER 2007b). Além disso, tem sido atribuído aos mecanismos epigenéticos, fundamental papel na regulação de muitos processos celulares importantes para o funcionamento normal da célula, incluindo expressão gênica e de microRNA (miRNA), interações DNA-proteínas, supressão da mobilidade de elementos transponíveis, diferenciação celular, embriogênese, inativação do cromossomo X e *imprinting* genômico (PORTELA e ESTELLER 2010).

Alterações epigenéticas são fortes candidatas a serem marcadores de patologias, mesmo antes de exibirem o fenótipo patológico, tendo em vista que já foram detectadas muitas alterações epigenéticas antes do aparecimento do câncer invasivo (FEINBERG e TYCKO 2004; FEINBERG et al. 2006). Essas alterações envolvem modificações de histonas, posicionamento de nucleossomos e metilação do DNA.

Histonas são estruturas protéicas altamente básicas, ao redor das quais o DNA, polímero negativamente carregado, se enrola, para possibilitar a neutralização das cargas, o dobramento do DNA e sua permanência no espaço restrito do núcleo. O DNA enrolado ao redor do núcleo de histona (formado por duas cópias de cada proteína histona H2A, H2B, H3 e H4) constitui a unidade básica da cromatina eucariótica, o nucleossomo (JIANG e PUGH 2009). Desse núcleo octamérico apontam as caudas amino-terminais das histonas, pelas quais os nucleossomos vizinhos interagem entre si (KOUZARIDES 2007) e cujas cadeias polipeptídicas podem sofrer diversos tipos de modificações covalentes pós-traducionais, denominadas

modificações de histonas, que incluem acetilação, metilação, fosforilação, sumoilação, ubiquitinação e ADP-ribosilação (para revisão BHAUMIK et al. 2007; KOUZARIDES 2007).

Estas modificações podem alterar as interações DNA-histona e têm impacto no mais alto nível de estrutura da cromatina por modular a sua afinidade de ligação ao DNA e por recrutar complexos remodeladores adicionais da cromatina (BOCK e LENGAUER 2008). Uma visão simplificada da cromatina reconhece dois estados básicos: a eucromatina, aberta e transcritionalmente competente e a heterocromatina, mais condensada e transcritionalmente silenciada (encontrada essencialmente nos centrômeros). Há ainda a heterocromatina facultativa, que pode variar entre uma conformação mais aberta e mais compacta. Essas transições são essenciais para estabelecer os diferentes padrões necessários durante a vida embrionária, desenvolvimento e estágios da idade adulta, e dependem principalmente do controle epigenético das modificações de histonas e metilação do DNA (GUIL e ESTELLER 2009).

Exemplos de modificações de histonas que colaboram para os estados da cromatina são a acetilação de resíduos de lisina que é catalizada pela histona acetiltransferase (HAT) e que, salvo exceções, tende a levar a uma cromatina mais aberta por reduzir a interação entre a cauda positivamente carregada da histona com o arcabouço de fosfato do DNA negativamente carregado (STRAHL e ALLIS 2000). Por outro lado a deacetilação desses resíduos, catalizada pela histona deacetilase, HDAC,

está associada com repressão transcricional em função de uma conformação mais fechada da cromatina.

Metilação de resíduos de lisina e arginina podem ocorrer nas histonas H3 e H4, na forma de mono-, di- ou tri-metilação, com metiltransferases específicas atuando em resíduos específicos, e dependendo do sítio e tipo de histona, o padrão de metilação resultará em diferentes resultados transcricionais. Nesse sentido, metilação do resíduo de lisina 9 e 27 da histona H3 (H3K9 e H3K27, respectivamente) e do resíduo de lisina 20 da histona H4 (H4K20) está geralmente associada com a formação de heterocromatina e presença de repressores transcricionais HP1 (*Heterocromatin Protein 1*), enquanto a metilação da lisina 4 e 36 da histona H3 (H3K4 e H3K36, respectivamente) está associada com regiões transcricionalmente ativas (BARSKI et al. 2007).

As modificações de histona podem influenciar umas as outras e também interagir com metilação do DNA, e é a presença combinada de uma miríade de modificações numa maneira temporal e controlada, que em última instância programa o perfil de expressão apropriado do genoma para cada identidade celular (TURNER 2007).

Associada às modificações de histonas está a modulação do posicionamento do nucleossomo. Essa unidade básica da cromatina eucariótica foi a solução evolucionária que permitiu o empacotamento do DNA no núcleo (JIANG e PUGH 2009). Em contrapartida, esse empacotamento leva a uma maior dificuldade para o acesso ao código genético, que por outro lado é compensada pelo fato de que as enzimas que

lêem, replicam e reparam o DNA podem reconhecer as histonas e ser direcionadas aos sítios de entrada apropriados. Nesse sentido, em condições normais, a RNA polimerase II (Pol II) inicia a transcrição no início do gene e não no meio, as DNA polimerases iniciam a replicação nas origens de replicação, e as enzimas de raparo do DNA são direcionadas aos sítios de dano no DNA (JIANG e PUGH 2009).

Mas para o devido reconhecimento, a acessibilidade do DNA, chave para a regulação gênica apropriada e para a fidelidade da transcrição, é também regulada pela combinação entre posicionamento do nucleossomo e suas modificações químicas (JIANG e PUGH 2009). A dinâmica dos nucleossomos é dirigida por complexos de remodelamento da cromatina ATP-dependentes de várias maneiras: ao criar *loopings* transientes de DNA na superfície do nucleossomo expondo sítios regulatórios do DNA (POLACH WIDOM 1995, 1996), ao mover os nucleossomos lateralmente para cobrir ou expor esses sítios, ao afastar ou remover os nucleossomos (JIANG e PUGH 2009) e pela substituição de subunidade de histonas por subunidades variantes (KROGAN et al. 2003; KOBOR et al. 2004; MIZUGUCHI et al. 2004).

Outro importante mecanismo epigenético que controla a expressão gênica é a metilação do DNA (GEIMAN e ROBERTSON, 2002; JONES e BAYLIN, 2002). A metilação do DNA é controlada por DNA metiltransferases (DNMTs), que catalizam a transferência do grupamento metil de uma molécula doadora, a S-adenosilmetionina (SAM), para a posição 5' do anel citosínico de um dinucleotídeo CpG, levando à formação de uma 5-

metilcitosina (5mC). Os dinucleotídeo CpG são também conhecidos como sítios CpG. Em mamíferos, três DNMTs cataliticamente ativas foram identificadas: DNMT1, DNMT3A e DNMT3B. As duas últimas podem adicionar grupos metil em sítios CpG que estiverem não-metidos na fita mãe e são eficientes na metilação *de novo*, enquanto a DNMT1 é responsável por manter o padrão de metilação da fita mãe durante a replicação do DNA ao copiá-la para a fita filha recém replicada (PRADHAN et al. 1997; OKANO et al. 1999). Esse mecanismo representa uma marca geralmente associada com repressão transcricional, seja por inibir a ligação de fatores de transcrição a seus sítios de ligação no DNA (EDEN e CEDAR, 1994), seja por recrutar proteínas ligantes de sítios CpG metilados (MeCPs e MBDs) juntamente a moléculas co-repressoras (BOYES et al. 1991; LEWIS et al. 1992).

O fato de ser a metilação herdável faz dela o mecanismo mais proeminente usado pelas células diferenciadas para passar padrões de transcrição tecido específicos para as células filhas na divisão celular (WU et al. 2010). E sabe-se, atualmente, que padrões de metilação também são criados durante a gametogênese e por modificações posteriores durante a embriogênese (SANFORD et al. 1987; MONK et al. 1987, YODER et al. 1997).

A metilação ocorre em locais específicos do genoma, as ilhas CpG (CGI). Saber a localização dessas ilhas é importante por marcarem *loci* epigenéticos de funcionalidade relevante tanto para o desenvolvimento normal quanto para os processos patológicos. A primeira definição de ilha

CpG surgiu da primeira análise computacional em grande escala usando sequências de vertebrados do *GenBank* realizada por GARDINER-GARDEN e FROMMER em 1987 definindo tais ilhas como sequências maiores que 200pb com um conteúdo de CG maior que 50% e razão de CpG observada-esperada (O/E) maior que 0,6 (GARDINER-GARDEN et al. 1987). No entanto, estudos posteriores e avanços nas técnicas de análise de metilação têm sugerido a necessidade de uma atualização desse conceito com critérios mais rigorosos. Diante disso, um estudo que analisou a sequência completa dos cromossomos 21 e 22, propôs a nova definição: sequências maiores que 500pb com conteúdo GC igual ou maior que 55% e razão de CpG observada-esperada (O/E) maior que 0.65 (TAKAI e JONES 2002). Segundo os autores, essa definição foi capaz de excluir a grande maioria de sequências repetitivas Alu e sequências desconhecidas e muitas ilhas CpG não localizadas em região promotora gênica. No entanto, diversos estudos ainda utilizam a definição inicialmente proposta.

As 5mC correspondem a apenas 1% dos nucleotídeos no DNA mamífero em função da alta taxa de deaminação espontânea da 5mC em timina levando o genoma humano a ser pobre em CpG (LANDER et al. 2001). Nesse sentido, acredita-se que as CGIs resultem de segmentos do genoma de certa forma protegidos desse mecanismo de deaminação espontânea (WU et al. 2010). Estas ilhas são encontradas principalmente na região 5' de genes *housekeeping* e em outros genes tecido-específicos (ANTEQUERA e BIRD 1993), associadas com frequência a promotores gênicos.

A predição de CGI se sobrepõe, de certa forma, à predição de região promotora uma vez que a maioria dos promotores em mamíferos se co-localiza com CGI (ANTEQUERA, 2003). No entanto, as CGIs têm papel mais geral como mediadores da estrutura aberta da cromatina e frequentemente sobrepõem-se a *enhancers* e outros elementos regulatórios (BOCK e LENGAUER 2008).

Em tecidos normais e na linhagem germinativa a maioria dessas CGIs associadas a promotores gênicos permanecem não metiladas. Consequentemente, não são sujeitas à deaminação espontânea, mantendo a frequência de sítios CpG na ilha (KALARI e PFEIFER 2010). Se ocorrer metilação nessas CGIs os genes a elas associados são silenciados (MACLEOD et al. 1999; BIRD 2002).

Sabe-se que o genoma das células de tumor passa por mudanças importantes na metilação do DNA (JONES e BAYLIN 2002). Hipometilação global do DNA e hipermetilação gene-específica estão entre as marcas mais importantes do genoma do câncer (EHRlich 2002; USHIJIMA 2005).

As células tumorais são, então, caracterizadas por uma perda massiva de metilação (GOELZ et al. 1985) (de 20 a 60%) nas sequências repetitivas promovendo instabilidade cromossômica, translocações, ruptura de genes e reativação de sequências endoparasitas (com LINE-1 [SCHULZ 2006]) nas sequências repetitivas (GOELZ et al. 1985; GAUDET et al. 2003). Paralelamente, com frequência ocorre a aquisição de padrões específicos de hipermetilação nas CGIs de certos promotores, que afetam genes envolvidos

em muitas vias celulares, como de reparo de DNA, controle do ciclo celular, via do p53 e apoptose, entre outros (ESTELLER 2007b).

Uma vez que a hipermetilação geralmente leva a inativação estável da expressão gênica e acredita-se ser menos reversível que as modificações de histonas, é considerada a via chave para o silenciamento gênico em longo prazo (KALARI e PFEIFER 2010).

Na literatura, a frequência de metilação em tumores que carregam alelos consideravelmente metilados varia geralmente de apenas alguns por centos em alguns genes para mais de 80% em outros genes (KALARI e PFEIFER 2010) e a comparação entre estádios do tumor pode revelar tendência de aumento da metilação, como foi observado em um estudo que comparou linhagens de passagens iniciais de melanoma e tecido fresco congelado, com melanócitos normais e nevos, indicando que a frequência de metilação de promotores confirmadamente hipermetilados (*COL1A2*, *NPM2*, *HSPB6*, *DDIT4L* e *MT1G*) aumenta moderadamente em estádios precoces e significativamente em estádios mais avançados em melanoma (KOGA et al. 2009).

Existem, também, evidências de que a metilação de genes que participam de vias celulares bem definidas possa contribuir com a tumorigênese. Por exemplo, muitos trabalhos demonstraram a ativação anormal da sinalização Wnt em vários tipos de câncer tais como colorretal, carcinoma de cabeça e pescoço, melanoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular, câncer de bexiga e leucemia (para revisão KALARI e PFEIFER 2010). A proteína secretada relacionada à proteína *frizzled* (SFRP)

atua como regulador negativo da sinalização Wnt por possuir domínio de ligação às proteínas *frizzled* do receptor WNT, o que permite a inibição desse receptor, influenciando a sua sinalização *downstream* durante a proliferação celular e apresentando importante atuação na tumorigênese. Notavelmente, metilação dos genes inibidores da via Wnt tais como a *SFRP* 1 e 2, cuja inativação acentua a sinalização Wnt, foi observada em lesões iniciais da carcinogênese do colon, os focos de criptas anormais (ACF) (SUZUKI et al. 2004). Metilação anormal do promotor de *SFRP* e a ativação da via de sinalização Wnt com acúmulo excessivo de β -catenina no núcleo mostrou-se proeminente em câncer colorretal (SUZUKI et al. 2004) e gástrico (NOJIMA et al. 2007). A metilação de outros antagonistas Wnt, incluindo Dickkopf 1 (*DKK1*) e fator inibitório Wnt-1 (*WIF-1*) é observada também em diversos tumores (TANIGUCHI et al. 2005; AGUILERA et al. 2006).

A metilação do DNA de promotores levando à expressão anormal de miRNA foi observada em vários tipos de tumor em humanos, e funções supressoras de tumor foram atribuídas a essa classe de RNAs regulatórios (KALARI e PFEIFER 2010). Recentemente, foi observado que miRNAs têm importante papel como alvos de hipermetilação de genes e silenciamento em células de câncer. Assim como com genes que codificam proteínas, um padrão anormal de metilação de CGIs próximo ou nos genes de miRNAs pode resultar na expressão desregulada de miRNAs chave, culminando em alterações patogênicas, incluindo a tumorigênese (JONES e BAYLIN 2002; DAVALOS e ESTELLER, 2010).

Evidências recentes associam, ainda, vias de sinalização do crescimento com padrões de metilação anormal. Um exemplo é a correlação significativa que foi reportada entre mutação no proto-oncogene *BRAF* e o fenótipo metilador de CGI (CIMP) em câncer colorretal (KAMBARA et al. 2004; WEISENBERGER et al. 2006). O mecanismo exato implícito a essa relação não é claro, mas a hipermetilação de alvos desconhecidos pode criar um contexto favorável para a aquisição de mutação em *BRAF* (V600E) em câncer colorretal CIMP-positivo (HINOUE et al. 2009). Esses achados levantam a importante e ainda não respondida questão se as lesões genéticas levam à metilação do DNA, ou a metilação do DNA promove ou favorece a seleção de lesões genéticas.

Os mecanismos da metilação anormal das CGIs em câncer são em sua maioria desconhecidos. Geralmente a hipermetilação das CGIs estão estreitamente ligadas a modificações da arquitetura local da cromatina servindo como um mecanismo pré-existente para o silenciamento transcricional (KALARI e PFEIFER 2010). Foi, também, proposto que a inativação gênica imposta por mudanças na estrutura da cromatina ou histonas predisporia à metilação do DNA (SONG et al. 2002; BACHMAN et al. 2003). Ainda, sequências específicas do DNA de CGIs podem estar associadas com o processo de metilação (FELTUS et al. 2003; KESHET et al. 2006), entretanto ainda não está claro se essas sequências estão associadas ou não a proteínas de ligação ao DNA *in vivo* que de alguma forma atraíam a metilação.

Há, ainda, evidências mais recentes de regiões próximas a CGIs (~2.000 pb) porém com menor densidade de sítios CpG. Essas regiões foram denominadas CGI *shores* (margens de CGI) e sua metilação está associada a silenciamento. Além disso, foi visto serem capazes de prever localizações genômicas diferencialmente metiladas entre diferentes tecidos e entre amostras normais e de câncer (IRIZARRY et al. 2009). Segundo o autor, a maior parte da metilação diferencial normal se localiza nos CGI *shores*.

Como a metilação do DNA e modificação de histonas atuam como mecanismo para o controle da diferenciação celular, permitindo a expressão apenas de genes tecido-específicos e endógenos nas células diferenciadas somáticas, é possível que uma (re)ativação inapropriada de genes tecido-específicos também tenha importante papel no câncer (FAN et al. 2008). Já os genes endógenos incluem um amplo espectro de genes essenciais ao metabolismo celular, tais como ciclo celular, RNA ribossômico, ou genes relacionados à defesa associada ao estresse. O mecanismo regulatório implícito aos diferentes padrões de expressão dos genes endógenos comparado aos genes tecido-específicos são também pouco conhecidos. Normalmente, os genes endógenos têm uma CGI não metilada estreitamente associada ao seu promotor (CAIAFA e ZAMPIERI, 2005). Uma vez que esses genes tendem a ser ubiquitariamente expressos e porque as CGIs autossômicas são geralmente pouco metiladas, acredita-se que os genes endógenos não sejam regulados por metilação (BERDASCO e ESTELLER 2010).

No entanto, essa teoria parece ser uma simplificação exagerada e sabe-se que vários genes que são considerados constitutivamente expressos nas células estão inativados por hipermetilação de CpGs no promotor em células de câncer, afetando uma diversidade de vias celulares, tais como ciclo celular, reparo do DNA, fatores de transcrição, enzimas epigenéticas, receptores, transdução de sinal, catabolismo tóxico e resistência a drogas, metástase e invasão celular, apoptose e angiogênese entre outros (para revisão COSTELLO e PLASS 2001; ESTELLER 2007a, 2008; JONES e BAYLIN 2007).

A gama de *loci* afetados por hipometilação do DNA no câncer também inclui genes regulatórios do crescimento, genes submetidos ao *imprinting*, genes críticos para o desenvolvimento, e genes tecido-específicos (BERDASCO e ESTELLER 2010). Dentre os últimos, os mais bem caracterizados são os genes de antígenos tumorais específicos da linhagem tumoral, tais como as famílias *MAGE*, *BAGE*, *LAGE* e *GAGE*. Se por um lado, a metilação do DNA leva à repressão desses genes específicos da linhagem germinativa em tecidos normais somáticos (DE SMET et al. 1999), por outro, a ativação transcricional desses genes em tipos histologicamente distinto de tumores humanos está correlacionada com hipometilação (WEBER et al. 2007; ALMEIDA et al. 2009). A principal consequência dessa reativação no câncer é a produção de antígenos tumor-específicos levando à rejeição imune.

Embora as causas primordiais da metilação precisem ainda ser determinadas, vários estudos mostraram que alterações no metiloma podem

ser diretamente afetadas pela dieta, substâncias químicas xenobióticas, e estímulos exógenos, tais como inflamação ou infecção viral/bacteriana (para revisão BERDASCO e ESTELLER 2010).

Diante do exposto, um dos mecanismos provavelmente responsáveis pela diminuição/ausência de expressão do *PLCG2* no TW e que modulam o nível de transcrição desse gene durante a nefrogênese pode ser a metilação de sítios CpG em seu promotor.

1.5 JUSTIFICATIVA

Em estudos realizados em nosso laboratório, foi observada diminuição ou ausência da expressão de *PLCG2* na grande maioria dos casos de TW, tanto em nível de RNAm quanto de proteína, recapitulando a ausência da proteínas nos primeiros estágios da nefrogênese. Essa ausência foi observada nos rins fetais até 18 semanas de idade, enquanto que os rins diferenciados mostraram forte marcação citoplasmática. Esse conjunto de fatos sugere que o *PLCG2* tenha um papel importante na diferenciação e sua ausência no TW seja um evento precoce e determinante para o seu surgimento.

São poucos os trabalhos na literatura a respeito do *PLCG2*, que parece ter um papel fundamental na homeostase óssea (MAO et al. 2006), e ser um gene induzido por radiação γ (PARK et al. 2002) e NFkB (DENEKAMP 1973; KAVANAGH et al. 1995). Sendo assim, esse trabalho avaliou a metilação da região promotora do gene *PLCG2*, um mecanismo que pode estar envolvido nessa regulação que resulta na diminuição ou ausência de expressão no TW.

Uma investigação inicial revelou a presença de alta concentração de CpG no primeiro éxon e na região 5' adjacente do *PLCG2*, o que sugere a existência de CGI e regulação por metilação. Considerando que os TWs apresentam expressão de *PLCG2* diminuída ou ausente, enquanto que os rins diferenciados mostram expressão de mRNA e protéica, a proposta do

atual trabalho foi a de avaliar a metilação do DNA nas amostras de TWs através de tratamento de bissulfito de sódio seguido de sequenciamento.

2 OBJETIVO

Avaliar a metilação da região promotora do gene *PLCG2*, um dos possíveis mecanismos envolvidos na diminuição/ausência de expressão de *PLCG2* em amostras de tumor de Wilms.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a reativação da expressão do gene *PLCG2* por tratamento de linhagem celular renal embrionária com agente desmetilante.
2. Identificar sítios CpGs potencialmente envolvidos na regulação da expressão de *PLCG2* em mapeamento por sequenciamento.
3. Avaliar o nível de metilação dos sítios selecionados em amostras de TW e RM.
4. Correlacionar o nível de expressão e de metilação desses sítios nas amostras.
5. Verificar a existência de associação entre o nível de metilação desses sítios e recaída do tumor.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COMITÊ DE ÉTICA

O presente projeto tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, sob número 1227/09.

3.2 CASUÍSTICA

Para trabalhar com amostras não previamente tratadas com quimioterapia, considerando-se que o Brasil adota o protocolo da SIOP (*Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique*) 2001, que preconiza o tratamento quimioterápico antes da cirurgia, foi estabelecida uma colaboração com o *Children Oncology Group* (COG). Esse grupo é coordenado pelo Dr. Paul Grundy e Dr. Jeff Dome, e tratamento adotado segue o protocolo do NWSTG (*National Wilms Tumor Study Group*), que preconiza a cirurgia como primeira opção de tratamento. Dessa colaboração, foram utilizadas 55 amostras de tecido fresco congelado de TW de histologia favorável, isto é, sem anaplasia, compostas exclusiva ou predominantemente pelo componente blastematoso. Para isso, lâminas com secções das respectivas amostras foram usadas como referência para identificação e isolamento de áreas compostas por mais de 80% de

componente blastematoso por microdissecção manual. Vinte dessas amostras são de pacientes que apresentaram recaída do tumor.

O RNA e o DNA dessas amostras foram fornecidos pelo Banco de Macromoléculas do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do Hospital A.C. Camargo – Fundação Antônio Prudente. Amostras de DNA e RNA de 12 rins maduros morfológicamente normais (RM) enriquecidas para córtex foram incluídas na análise.

3.3 REAÇÃO DE RT-PCR QUANTITATIVO (qRT-PCR)

Todas as amostras de RNA total tiveram sua qualidade avaliada pelo equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)* utilizando o RNA 6000 Nano LabChip. O resultado de qualidade do RNA é representado pela razão 28S/18S e pelo número de integridade do RNA (*RIN - RNA Integrity Number*). O RIN vai de 1 a 10, sendo que o 1 representa integridade ruim e o 10, excelente integridade (SCHROEDER et al. 2006). O RNA foi quantificado no equipamento NanoDrop e armazenado a -80°C. Apenas amostras de RNA com RIN > 5 ou RIN entre 3 e 5 com razão 28S/18S de 2:1 foram utilizadas na análise.

O protocolo utilizado para a obtenção do cDNA foi como segue: quatro microgramas de RNA total foram tratados com DNase seguindo o protocolo da fabricante (*Ambion*). Em seguida, as amostras foram quantificadas no NanoDrop e PCRs com iniciadores para região intrônica do gene *ACTB* foram realizadas para verificação da eficiência do tratamento.

Somente as amostras que não apresentaram amplificação nessas reações seguiram para a síntese de cDNA. Para síntese de cDNA, desenho de iniciadores para reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR *real time*) e suas condições, seguiram-se protocolo dos fabricantes e condições descritas por MASCHIETTO et al. (2008).

Para síntese de cDNA, a partir de RNA total, todo o RNA tratado com DNase foi submetido a reação de transcriptase reversa (RT-PCR) seguindo protocolo da IMPROM (*Promega*), adicionando-se a este 0,25µg de iniciadores Oligo-dT(24) para um volume final de 10,1µL, e incubado a 70°C por 5 minutos seguidos de 4°C por mais 5 minutos e adicionados os reagentes do *kit* IMPROM (*Promega*), seguindo-se as recomendações do fabricante. Após a reação, foi realizada PCR de confirmação da transcrição com iniciadores que anelam em éxons diferentes do *GAPDH*.

Os iniciadores para as reações de qRT-PCR foram desenhados conforme descrito por MASCHIETTO et al. (2008), em que foram seguidas as recomendações sugeridas pelo fabricante (*Applied Biosystems*), como temperatura de pareamento entre 60°C e 70°C, 40 a 60% de conteúdo G+C, tamanho do iniciador entre 16 e 20 bases, que pareiem em éxons diferentes para monitorar eventual contaminação genômica e tamanho de fragmento amplificado entre 80 e 150 bases. Os iniciadores (apresentados na Tabela 1) foram avaliados quanto à existência de estruturas secundárias pelo programa *OligoTech* versão 1.0 e o alinhamento único no genoma humano para cada par de iniciadores foi avaliado através da ferramenta PCR *in silico* disponibilizada pela Universidade Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/>).

Tabela 1 - Características dos iniciadores utilizados nas reações de qRT-PCR.

Gene	Iniciador <i>Forward</i> 5'-3'	Iniciador <i>Reverse</i> 5'-3'	Tamanho do cDNA amplificado (pb)	Tamanho do amplificado genômico (pb)	Eficiência
<i>ACTB</i>	CAGGATGCAGAAGGAG	CTGCTGGAAGGTGGAC	130	187	100%
<i>GAPDH</i>	CTTTGTCAAGCTCATTCC	CTTACTCCTTGGAGGCC	92	196	100%
<i>PLCG2</i>	GTACCAGGAGGAAATGCAAC	CAGAGTGTGAATAGGGCAC	149	1225	80%

Sequências dos iniciadores utilizados, com seus respectivos tamanhos de amplificados e eficiência de amplificação. *GAPDH* e *ACTB* : genes normalizadores.

As reações de qRT-PCR foram realizadas no aparelho ABI Prism® 7900 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems), conforme descrito por MASCHIETTO et al. (2008), em volume final de 20 µl, contendo 1X *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 200 nM a 400 nM de iniciadores e volume de cDNA referente a 20ng do RNA total. Para as reações de qRT-PCR para as células da linhagem HEK293 foi utilizado volume de cDNA referente a 30ng de RNA total. As reações foram realizadas nas condições universais de ciclagem que consistem em 10 minutos a 95°C para a ativação da enzima *AmpliTaq Gold DNA Polymerase*, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos e um minuto a 60°C para o pareamento dos iniciadores e extensão. Ao final da amplificação foi adicionada uma etapa de 20 minutos de duração, na qual a temperatura aumenta gradualmente de 60°C para 95°C a 0,2°C por segundo com a contínua aquisição da fluorescência (MORRISON et al. 1998), a partir da qual se obtém uma curva de dissociação, na qual a presença de um pico único confirma a especificidade da amplificação

Uma vez que a cada ciclo da reação novas moléculas de fita dupla são formadas, o nível de fluorescência emitida aumenta gradualmente, sendo que quanto menor o ciclo em que a fluorescência atinge um determinado limite, maior é o nível de expressão do transcrito analisado (MORRISON *et al.* 1998).

As quantidades de iniciadores já haviam sido padronizadas pelo nosso grupo, considerando-se a utilização da menor concentração dos mesmos, a fim de se evitar a formação de estruturas secundárias, obtendo-se os menores valores de Cts. A expressão diferencial do gene *PLCG2* foi determinada pela quantificação relativa à média dos normalizadores *GAPDH* e *ACTB*, como previamente estabelecido. Para cálculo da medida relativa de expressão foi utilizado o modelo matemático proposto por PFAFFL (2001) que leva em consideração a eficiência de amplificação de cada par de iniciadores.

O parâmetro utilizado na análise dos resultados das reações de qPCR *real time* é o Ct (*Cycle Threshold* ou ciclo limite), uma linha fixa na região exponencial das reações e usada para determinar o ciclo em que cada amostra atinge determinado valor de fluorescência (LIVAK *et al.* 2001). Valores de diferença de ciclo entre reações em duplicata até 1,0 foram considerados aceitáveis.

3.4 AVALIAÇÃO *IN SILICO* DA REGIÃO A MONTANTE DO GENE *PLCG2*

A pesquisa realizada no GenBank para o gene *PLCG2* forneceu a sequência REFSEQ NM_002661.2. Com o auxílio da ferramenta BLAT, foi constatada a provável presença de uma CGI no início da sequência fornecida (Figura 6).

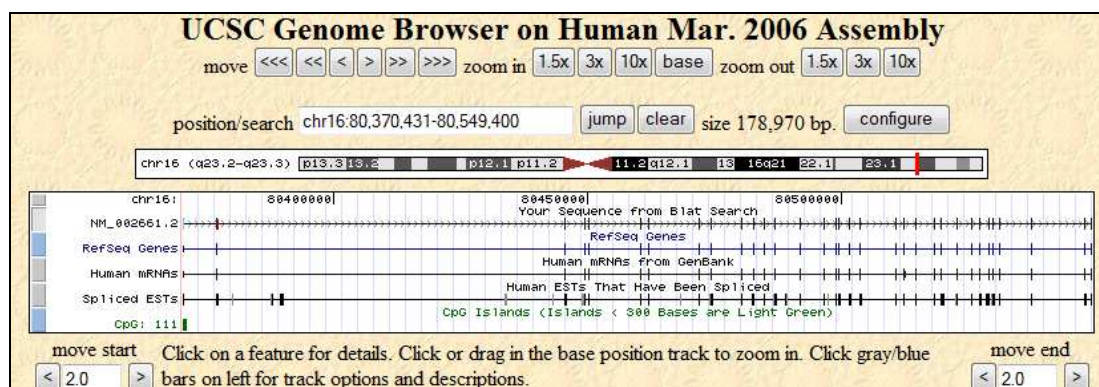


Figura 6 – Resultado da busca por CGI no gene *PLCG2* com o auxílio da ferramenta BLAT. A seta indica a direção da transcrição, a linha representa os íntrons e os blocos representam os éxons do gene *PLCG2*. Em verde, a provável CGI na porção 5' do gene. A ferramenta BLAT foi desenhada para rapidamente localizar no genoma referência sequências de no mínimo 25 bases com 95% ou mais de similaridade, além de agregar à sequência encontrada diversas informação, como p.ex. os mRNAs transcritos e CGIs.

EM seguida, sequências que se estenderam de aproximadamente 3.000 pb a 5' e 3.000pb a 3' do sítio de início de transcrição do gene *PLCG2* foram submetidas à análise pelo programa *Methprimer* (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>), seguindo os parâmetros propostos por GARDINER-GARDEN et al. 1987, que identificou a posição de quatro prováveis CGIs, conforme na representação a seguir (Figura 7). A

primeira ilha identificada está localizada entre -3,026pb e -2,885, a segunda ilha está localizada entre -469 e -323, a terceira ilha, entre -227 e +777 e a quarta ilha entre +2.512 e +2.723 (distâncias referentes ao sítio de início de transcrição de *PLCG2*). A maior delas, a terceira, contém 1.004 pb.

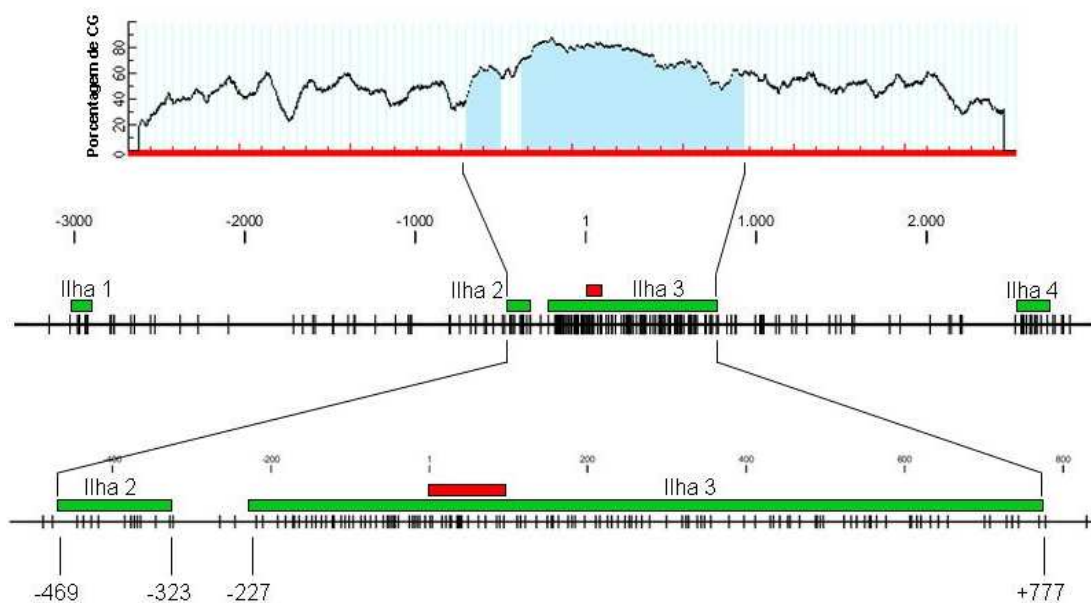


Figura 7 - Esquema representativo das quatro CGIs presentes na região promotora, 1º éxon e 1º íntron do gene *PLCG2*. As barras verdes indicam as CGIs, a barra vermelha indica o 1º éxon do gene e os traços verticais indicam os sítios CpG. No diagrama fornecido pelo *software Methprimer* estão representadas apenas as ilhas 2 e 3 (azul claro), que estão em maior aumento na parte inferior. Para as ilhas 2 e 3, são indicadas as posições de início e fim da ilha.

3.5 TRATAMENTO COM 5-AZA-2'-DEOXYCITIDINA (5-AZADC)

A droga foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Biologia Molecular e Genômica do Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre O Câncer de São Paulo.

Células da linhagem HEK293 (linhagem de células embrionárias renais humanas normais, com potencial tumoral) foram plaqueadas na concentração de 5×10^5 células por placa, em placas de 10mm em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 mg/ml, e deixadas aderir de um dia para o outro. Após a adesão, o meio de cultura foi diariamente trocado por 5 mL de meio com as mesmas suplementações, na presença e na ausência de 5 μ M do agente desmetilante 5-AzaC (Sigma-Aldrich; 10mM; ácido acético: água 1:1), totalizando 5 dias de tratamento. O tratamento foi realizado em duplicata, sendo uma duplicata para as células tratadas (AZA1 e AZA2) e uma para as não tratadas (CT1 e CT2) e seguiu-se com a extração de DNA e RNA.

3.6 EXTRAÇÃO DE DNA E RNA DA LINHAGEM HEK293

Para a extração de RNA, as células foram lavadas com PBS 1X, 2 mL de TRIzol foram adicionados por placa e a placa foi raspada com *cell scraper*, o volume foi transferido para um microtubo estéril, homogeneizado, e incubado por 5 minutos entre 15 e 30°C. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 12.000g por 10 minutos a 4°C. A fase sobrenadante foi transferida para novo microtubo de 1,5mL (a fase restante

foi reservada para posterior extração de DNA), foram adicionados 200µL de clorofórmio 100%, os tubos foram agitados por inversão por 1 minuto e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos para início da separação de fases. As amostras foram centrifugadas a, no máximo, 12.000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para novo microtubo de 2,0mL e foram adicionados 1µL de glicogênio e volume de isopropanol equivalente ao do sobrenadante transferido. Novamente, a fase restante foi reservada para posterior extração de DNA. Os tubos foram então agitados por inversão durante 1 minuto, incubados em temperatura ambiente para precipitação por 15 minutos e em seguida centrifugados a 18.000g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão e o pellet formado foi lavado com 1mL de etanol 70% gelado, diluído em H₂O DEPC seguido de centrifugação a 18.000g por 2 minutos a 4°C, por 4 vezes. Após a última lavagem, os pellets foram secos a 300rpm a 42°C por menos de 1 minuto, ressuspensos em 150 a 250 µl H₂O DEPC e deixados em banho-maria a 55°C por 10 minutos, homogeneizados cuidadosamente com micropipeta durante a incubação e levados imediatamente ao gelo para avaliação da qualidade do RNA e posterior armazenamento a -80°C.

À fase de TRIzol reservada para extração de DNA, adicionou-se 600µL de tampão BEB (*Back Extraction Buffer* – 4,0 M de isotiocianato de guanidina, 50mM de citrato de sódio dihidratado pH 8,5 e 10M de Tris-HCl pH 8,0) a temperatura ambiente, agitou-se por inversão durante 1 minuto e incubou-se a 25°C sob agitação de 500rpm durante o processo de extração de RNA. Em paralelo, a fase reservada da centrifugação após adição

clorofórmio, foi novamente centrifugada a 18.000g por 5 minutos a 4°C para retirada do excesso de RNA que fica na fase líquida sobrenadante, enquanto a fase orgânica restante foi homogeneizada para ser adicionada ao respectivo lisado com tampão BEB ao fim de sua incubação. A mistura foi, então, homogeneizada por inversão por 1 minuto, incubada de 30 a 45 minutos a 25°C sob agitação de 500rpm e, em seguida, centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa sobrenadante contendo DNA foi transferida para novo microtubo de 2,0mL, e foram adicionados 2µL de glicogênio (20µg/µL) e volume de isopropanol 100% equivalente ao do sobrenadante transferido. As amostras foram vigorosamente misturadas por inversão durante 1 minuto, incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e, então, centrifugadas por 30 minutos a 18.000g a 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão e o pellet formado foi lavado com 1mL de etanol 70% gelado, preparado com água destilada e deionizada, seguido de centrifugação a 14.000g por 2 minutos a 4°C, etapas repetidas por 3 vezes. Após a última lavagem, os pellets foram secos a 300rpm a 42°C por menos de 1 minuto, ressuspensos em TE pH 8,0 (100mM Tris-HCl pH 8.0; 10mM EDTA pH 8.0) e incubados em banho-maria a 55°C entre 10 a 30 minutos e levados, em seguida, para incubação *overnight* a 4°C. Após a incubação, as amostras foram incubadas, novamente em banho-maria a 55°C até a dissolução completa do material, quantificadas e armazenadas.

A qualidade do RNA total foi avaliada conforme exposto no item 3.3. As amostras de DNA foram quantificadas no equipamento NanoDrop e a

integridade foi avaliada em gel de agarose 0,8% e armazenadas a -20°C, para posterior utilização.

3.7 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

Para a reação de tratamento do DNA genômico humano e de células de linhagem em cultura com bissulfito de sódio, foi utilizado o *kit* fornecido pela ZYMO, *EZ DNA Methylation-Gold™ Kit*, recomendado para avaliação de metilação por sequenciamento. O DNA das amostras de TW e RM deste estudo já se encontrava extraído. A homogeneização dos tecidos foi realizada com o auxílio do equipamento Precellys e o protocolo de extração utilizado foi de extração simultânea de DNA e RNA por TRIzol.

O tratamento com bissulfito de sódio promove a conversão das citosinas não metiladas (seguidas ou não de guaninas) em uracilas, que após reação de PCR dão lugar às timinas. Dessa forma, o sequenciamento permite diferenciar as citosinas originalmente metiladas, por permanecerem inalteradas, daquelas que não estavam metiladas e deram lugar às timinas. O tratamento com bissulfito de sódio compromete em parte a integridade do DNA.

Neste estudo, de 300 a 2.000ng de DNA (quantificados no aparelho NanoDrop) foram tratados de acordo com as especificações do fabricante. Após o tratamento, para a verificação da qualidade do material recuperado, foram realizadas reações de PCR com iniciadores específicos para amplificação em DNA convertido por bissulfito (Tabela 2), de um fragmento

de 133pb do gene *ACTB*, e para o cálculo da quantidade de DNA modificado por bissulfito a ser adicionado nas reações de PCR, assume-se que a recuperação da amostra é de 75% da quantidade inicial de DNA tratado, conforme indicado no protocolo do fabricante do *kit* de tratamento.

Tabela 2 - Características dos iniciadores para amplificação de fragmento do gene *ACTB*.

Gene	Iniciador	Sequência dos iniciadores 5'-3'	T par (°C)	Tamanho do fragmento gerado (pb)
ACTB-bis	<i>Forward</i>	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT	60	133
	<i>Reverse</i>	AACCAATAAAACCTACTCCTCCTTAA	60	

Sequência e características dos iniciadores utilizados para amplificação de um fragmento de 133 pb do gene *ACTB* em DNA convertido por bissulfito de sódio. Iniciadores desenhados seguindo os preceitos do item 3.9; T par: Temperatura de pareamento dos iniciadores ao DNA molde; O tamanho do fragmento gerado é dado pelo par formado entre os iniciadores.

As reações de PCR para o gene *ACTB* foram realizadas com 20ng de DNA tratado com bissulfito, 1X tampão de reação, 2,0mM Mg^{2+} , 200 μ M dNTP, 400nM de cada iniciador, 1U *Taq DNA Polimerase Platinum* (Invitrogen Brasil), e H₂O MilliQ para volume final de 20 μ L. As reações foram submetidas a um passo de 95°C por 5 minutos para ativação da polimerase, seguida de 35 repetições da ciclagem de denaturação a 95°C por 1 minuto, temperatura de pareamento de 60°C por 1 minuto e de extensão a 72°C por 1 minuto, finalizando com um passo de extensão de 72°C por 7 minutos.

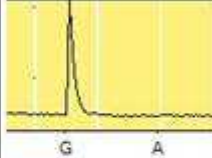
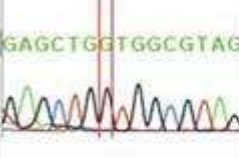
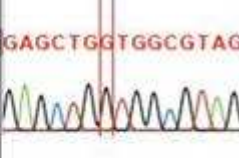
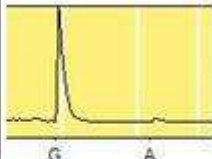
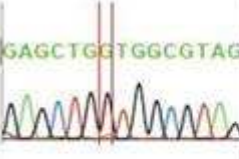
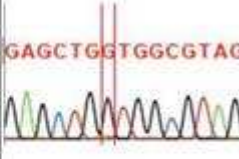
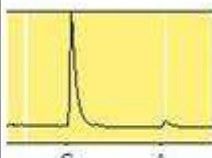
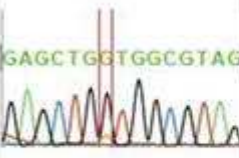
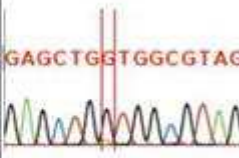
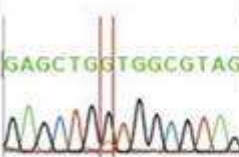
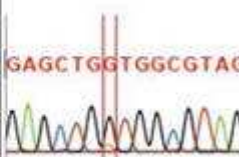
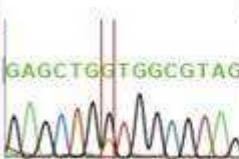
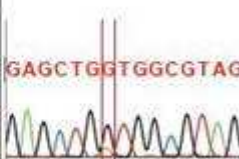
3.8 TESTE DE SENSIBILIDADE PARA AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE ALTERAÇÃO NUCLEOTÍDICA DAS METODOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO

O pirosequenciamento realizado no equipamento PyroMarkTMID System (*Qiagen*) vem sendo usado como método de referência na validação de outros métodos (WHITE et al. 2006; IRIZARRY et al. 2008; NARASIMHAN et al. 2009) por oferecer boa especificidade e sensibilidade na avaliação quantitativa de alterações pontuais no DNA (WIEDERHOLD et al. 2008; BORDONI et al. 2008; SÁNCHEZ et al. 2009). No entanto, a obtenção de boas reações, avaliação e interpretação do pirograma não são triviais para a sua utilização em longas extensões sem o conhecimento prévio das posições onde as alterações podem ser encontradas. Dessa forma, para essa etapa do estudo esse método se mostrou extremamente complexo e pouco preciso para ser utilizado na identificação do nível de metilação dos sítios CpGs em regiões extensas e muito ricas em sítios CpG.

Nesse sentido, inicialmente testamos a sensibilidade de dois métodos de sequenciamento, sequenciamento capilar e pirosequenciamento, ao compararmos os resultados obtidos para cada um na análise de um gradiente de mistura entre o DNA genômico da linhagem LS 147T, heterozigota para mutação no códon 12 do segundo éxon do gene *Kras* (50% de alelo mutado, 50% de alelo selvagem) e da linhagem WIDR, selvagem para o gene (100% selvagem). Ambas são linhagens de adenocarcinoma colorectal humano e foram gentilmente cedidas por Rodrigo

Crespo, do Laboratório de Patologia Molecular Diagnóstico. A mutação é pontual e consiste na troca de uma base de guanina por uma de adenina no alelo mutado. O gradiente foi estabelecido de forma a obtermos 0, 5, 10, 15, 25, 40 e 50 % de presença do nucleotídeo mutado em cada mistura, uma vez que a mistura LS 147T:WIDR na proporção de 1:0 resultou em 50%, 0:1 em 0% de presença do nucleotídeo mutado, 1:1 em 25% de presença do gene mutado e assim por diante.

A análise do cromatograma obtido no sequenciamento capilar baseou-se da inferência da proporção da altura de picos dos dois nucleotídeos diferentes na mesma posição e sua correspondência ao respectivo gradiente. Já a análise do pirograma baseou-se da própria porcentagem fornecida pelo *software* PSQ 96MA SNP (*Qiagen*) (quadro azul ou laranja) utilizado para análise de mutação (Figura 8).

Gradiente	Pirograma	Cororomatograma	
		Forward	Reverse
0% de presença de mutação	G96.2% A0.0%  G A	 GAGCTGGTGGCGTAG	 GAGCTGGTGGCGTAG
5% de presença de mutação	G95.1% A4.8%  G A	 GAGCTGGTGGCGTAG	 GAGCTGGTGGCGTAG
10% de presença de mutação	G91.5% A8.4%  G A	 GAGCTGGTGGCGTAG	 GAGCTGGTGGCGTAG
15% de presença de mutação	G86.0% A13.9%  G A	 GAGCTGGTGGCGTAG	 GAGCTGGTGGCGTAG
20% de presença de mutação	G80.4% A19.5%  G A	 GAGCTGGTGGCGTAG	 GAGCTGGTGGCGTAG

Cont/ Figura 8

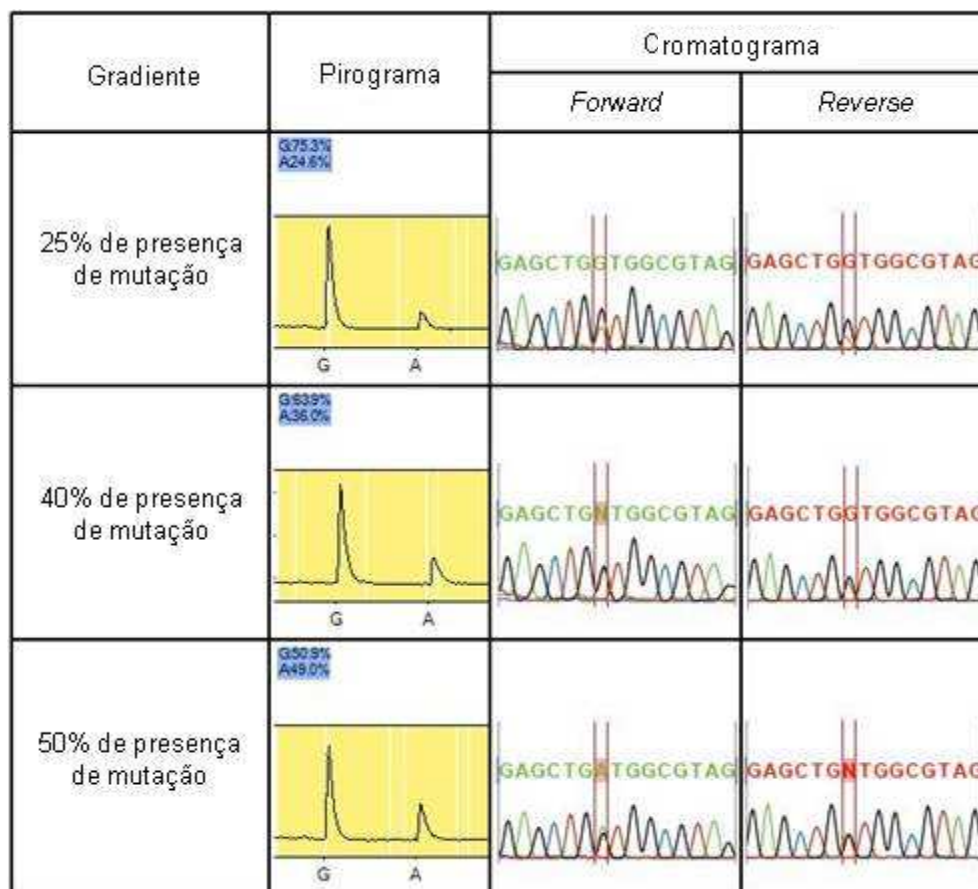


Figura 8 - Análise comparativa dos resultados obtidos em sequenciamento capilar e pirosequenciamento do gradiente estabelecido entre DNA heterozigoto e selvagem. Leituras obtidas nas metodologias de sequenciamento capilar (cromatograma) e pirosequenciamento (pirograma) para o gradiente de diluição estabelecido entre DNA heterozigoto (50% de alelo mutado) e selvagem (100% selvagem). Na coluna de gradiente, o valor é dado pela proporção de presença de alelo mutado, que varia de 0 a 50%. Na coluna de pirograma, o quadro azul ou laranja fornece a porcentagem de guanina (alelo selvagem) e adenina (alelo mutado) incorporadas na mesma posição. A coluna cromatograma divide-se em *Forward* e *Reverse*, representando as sequências obtidas com os respectivos iniciadores, de forma a confirmarem um o outro. Barras vermelhas evidenciam o *locus* de mutação, em que o pico verde representa adenina e o preto, guanina. É importante observar que a posição analisada é precedida por uma guanina (vide cromatograma) e que por isso, o pico de guanina no pirograma para a proporção de 50% do alelo mutação, é o triplo do pico de adenina.

Da análise dos pirogramas verificou-se que a porcentagem de adenina (alelo mutado) corresponde, aproximadamente, à porcentagem de presença deste no gradiente. E da análise dos cromatogramas verificou-se que a partir de 10% de presença do alelo mutado já se observa a formação do pico visível de adenina, que aumenta gradativa e proporcionalmente conforme maior a porcentagem do alelo mutado, até se igualar ao alelo selvagem na proporção de 50%, tendo os cromatogramas realizados em ambos os sentidos (*Forward* e *Reverse*) se confirmado. As duas metodologias, de forma independente, demonstraram boa correspondência entre o resultado obtido e o valor do gradiente, validando a utilização do sequenciamento capilar para a análise de alteração pontual de forma confiável, ressaltando, no entanto, que a sensibilidade do pirosequenciamento para valores de gradiente próximos é maior que a do sequenciamento capilar.

Uma vez que o tratamento com bissulfito de sódio codifica o *status* de metilação do DNA conforme já mencionado no item 3.7, a análise admite um caráter de alteração pontual, como a do protocolo do teste de sensibilidade padronizado. Considerando ainda que, se o agente 5-AzaC ao desmetilar o DNA promovendo a ativação da expressão do gene *PLCG2*, o tenha feito pela desmetilação de determinados sítios CpG que controlem a expressão desse gene em linhagem HEK293, o caráter dessa alteração será de grande amplitude. Ou seja, se essa metilação é suficiente para causar o silenciamento do *PLCG2* visto em HEK293 no ensaio de expressão e sua remoção ou considerável diminuição permite a expressão do gene, essa

alteração será maior que a sensibilidade mínima tanto para o sequenciamento capilar quanto para o pirosequenciamento, e a detecção desses sítios poderia ser realizada pelos dois métodos de sequenciamentos, pois ambos são capazes de identificar a presença da alteração com confiabilidade.

Por outro lado, na análise por pirosequenciamento não é possível obter uma visualização de picos individuais. Nesse sentido, nesse trabalho optamos por usar o método de sequenciamento capilar para mapear os sítios CpG com metilação alterada e o pirosequenciamento para quantificação da metilação dos CpGs selecionados em um rastreamento nas amostras do estudo.

Ademais, a finalidade desta etapa não é obter medidas quantitativas, e sim, mapear o perfil de metilação dos sítios CpG nas células de linhagem HEK293 com a finalidade de filtrar dentre todos os sítios mapeados, aqueles com alteração nesse perfil de metilação de maior amplitude. Assim, o sequenciamento capilar se mostrou mais adequado à proposta de mapeamento por proporcionar essa filtragem dos sítios de interesse de maneira menos laboriosa e dispendiosa.

A partir daí, as medidas quantitativas foram realizadas na fase de rastreamento por pirosequenciamento, metodologia própria para investigações direcionadas em fragmentos curtos, para estes sítios selecionados nas amostras da casuística do estudo, que apresentam níveis variáveis de expressão e para cuja detecção exige-se maior sensibilidade e

precisão, necessidade esta satisfeita pelo pirosequenciamento, técnica mais compatível para análise de fragmentos curtos.

3.9 DESENHO DOS INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO E ANÁLISE DE TRECHOS DAS ILHAS CpG (CGIs).

Todos os iniciadores para o estudo de metilação foram desenhados manualmente, já considerando a conversão de citosinas não seguidas de guaninas em timinas pelo tratamento com bissulfito de sódio. Estruturas secundárias e homodímeros foram avaliados usando o programa OligoTech versão 1.0. A necessidade de buscar regiões que originalmente não contenham CpGs para o pareamento dos iniciadores advém do fato de que os iniciadores devem se parear ao DNA independentemente do *status* de metilação deste, uma vez que o intuito da análise é determinar quantitativamente esse *status*. Devido a essa necessidade de regiões sem CpG, o desenho de iniciadores é dificultado em região rica em CpG, uma vez que permite apenas iniciadores curtos, aumentando a chance de gerar fragmentos inespecíficos.

A partir destas considerações, para a primeira fase desse trabalho (mapeamento por sequenciamento capilar) foram desenhados iniciadores (Figura 9 e Tabela 3) que amplificaram três fragmentos que cobriram de -634 a +1.181. A partir desse mapeamento, sítios CpG foram selecionados para a segunda fase (rastreamento por pirosequenciamento) de acordo com critérios estabelecidos pelo grupo (item 3.10.3) e novos iniciadores foram

desenhados (Figura 9 e Tabela 4), tanto para a amplificação em reações de PCR de um fragmento mais curto (337pb), quanto para a reação de pirosequenciamento propriamente dita. Uma molécula de biotina foi adicionada na extremidade 5' de um dos iniciadores para as reações de PCR, para permitir o isolamento de uma fita simples que servirá de molde para a reação de pirosequenciamento.

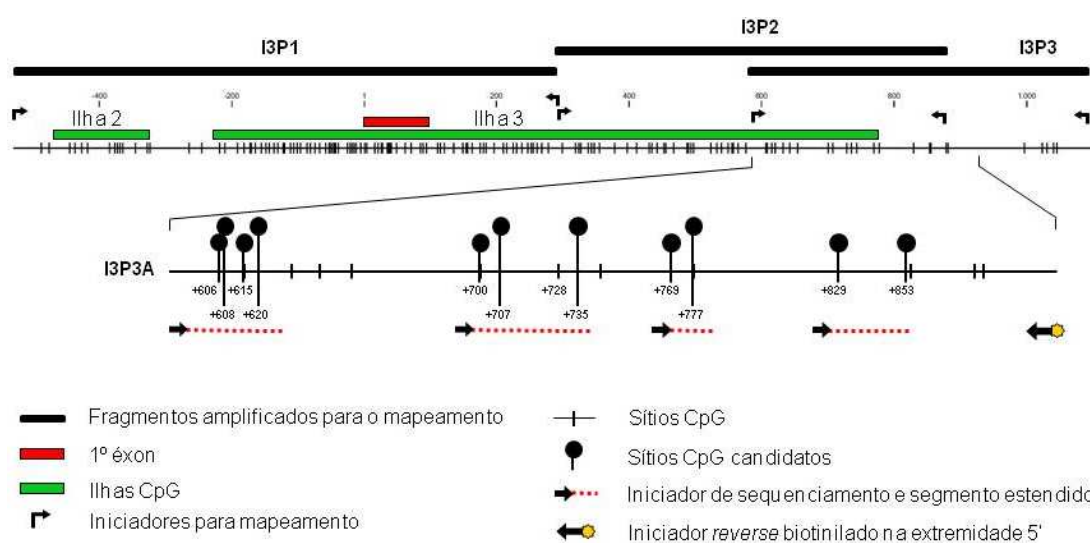


Figura 9 - Esquema representativo da região avaliada, que se estende pela região promotora, 1º éxon e 1º íntron do gene *PLCG2*. Na parte superior estão os três fragmentos amplificados para o mapeamento (I3P1, I3P2 e I3P3) e os respectivos iniciadores utilizados (setas em L), e na parte inferior, o segmento (I3P3A) contendo os sítios CpG candidatos selecionados pelo mapeamento (círculos preenchidos) e as sequências estendidas em reações de pirosequenciamento (pontilhado vermelho) para a análise destes sítios e os respectivos iniciadores (setas simples). I3P1: Ilha 3 Parte 1; I3P2: Ilha 3 Parte 2; I3P3: Ilha 3 Parte 3; Barras verdes: CGIs; barra vermelha: 1º éxon do gene *PLCG2*; traços verticais: sítios CpG; I3P3A: Ilha 3 Parte 3A. Posições dos sítios CpG dadas em relação ao sítio de início de transcrição do gene.

Nas Tabela 3 e 4, estão representadas as sequências dos iniciadores e suas posições relativas ao início do primeiro éxon.

Tabela 3 - Características dos iniciadores utilizados para o mapeamento por sequenciamento capilar.

Fragmento	Iniciador	Sequência dos iniciadores 5'-3'	T par (°C)	Início	Fim	Tamanho do fragmento gerado (pb)
I3P1	<i>Forward</i>	GGTTTGTTTAAGGTAG TAGTAAG	66,4	-634	-612	932
	<i>Reverse</i>	ACTAAACCAAAATCCC TAC	61,1	298	280	
I3P2	<i>Forward</i>	GTAGGGATTGTTT AGT	61,1	280	298	593
	<i>Reverse</i>	AACCACCTATTTCCCTC	61,1	872	856	
I3P3	<i>Forward</i>	GAGATTTTGGAGAGT TTG	61,1	578	596	604
	<i>Reverse</i>	CTACTTAAACTAACA TAAAC	59,1	1.181	1.161	

Sequência e características dos iniciadores utilizados no mapeamento da região promotora, primeiro éxon e primeiro íntron, suas características e o tamanho dos fragmentos gerados. T par: temperatura de pareamento do iniciador ao DNA molde; Início e Fim: posições da primeira e última bases no sentido 5'-3' da região em que se pareiam os iniciadores, referentes ao sítio de início de transcrição. O tamanho do fragmento gerado é dado pelo par formado entre os iniciadores, que variou de 593 a 932 pb. I3P1: Ilha 3 Parte 1; I3P2: Ilha 3 Parte 2; I3P3: Ilha 3 Parte 3. Posições dadas em relação ao sítio de início de transcrição do gene.

Tabela 4 - Características dos iniciadores utilizados para o rastreamento dos sítios CpG candidatos por pirosequenciamento.

Fragmento	Sequência dos iniciadores 5'-3'	T par (°C)	Início	Fim	Iniciador de sequenciamento	T par (°C)	Sequência para análise
I3P3A	<i>Forward</i> GAGATTTTGG AGAGTTTG	61,1	+578	+596	GGAGAGTTTGTA GG	53,8	ATATTC/TGC/TGATGTTT/TGT TTC/TGTAG
					GGAATTTTAAAG AGG	50,2	GTATTATTC/TGTATAGC/TGTA AGAGTTTAGGTTAAAGAC/TGT GTTTC/TGTTTG
	<i>Reverse</i> CCACTAATAAA ACTAAAATTC	59,1	+914	+894	GGAGTTTTTGGAT TTTAGTAG	63,0	GAC/TGGTGGGGC/TGGGGT
	Biotinilado				GGTGAGAAATTA TGG	52,9	GGGGC/TGGGGTGGTAAAGGG GTGATATGGC/TGC/TG

Sequência e características dos iniciadores utilizados no rastreamento dos sítios CpG candidatos selecionados pelo mapeamento. Sublinhado, na sequência para análise, estão assinalados os sítios CpG candidatos. Na reação de pirosequenciamento, o fragmento que foi amplificado por PCR é estendido (não há amplificação) após o pareamento do iniciador de sequenciamento propriamente dito; T par: temperatura de pareamento do iniciador ao DNA molde. Início e fim: posições da primeira e última bases no sentido 5'-3' da região em que se pareiam os iniciadores, referentes ao sítio de início de transcrição. O tamanho do fragmento gerado, dado pelo par formado entre os iniciadores *forward* e *reverse*, é de 337pb. Na reação de pirosequenciamento a análise limitou-se a 60pb em função das limitações do método, para garantir a qualidade e confiabilidade das leituras. I3P3A: Ilha 3 Parte 3A. Posições dadas em relação ao sítio de início de transcrição do gene.

3.10 MAPEAMENTO DO PERFIL DE METILAÇÃO DE TRECHOS DAS ILHAS CpG

3.10.1 Amplificação em reações de PCR do DNA tratado com bissulfito de sódio das células HEK293

As amostras de DNA tratado com bissulfito de sódio da linhagem HEK293 submetida ao tratamento com 5-azadC, foram submetidas a reações de PCR para amplificação de três fragmentos que cobriram desde -634 a +1.181, compreendendo 148 sítios CpG, seguidas de sequenciamento capilar. As características dos iniciadores são dadas no item 3.9 e na Tabela 3.

As reações de PCR foram realizadas com 20ng de DNA tratado com bissulfito de sódio, 1X tampão de reação, 1,5mM Mg^{2+} , 200 μ M dNTP, 200nM de cada iniciador, 1U *Taq DNA Polimerase Platinum* (Invitrogen Brasil), e H₂O MilliQ para volume final de 20 μ L. As reações foram submetidas a um passo inicial de 94°C por 2 ou 4 minutos para ativação da polimerase, seguida de ciclagem de denaturação a 94°C por 30 ou 45 segundos, temperatura de pareamento por 30 segundos ou 1 minuto e de extensão a 72°C por 45 segundos ou 1 minuto, finalizando com um passo de extensão de 72°C por 3 ou 7 minutos. As condições das reações utilizadas estão esquematizadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Condições das reações de PCR para o mapeamento do *status* de metilação dos sítios CpG.

Fragmento	Δt d	Ciclagem			
		T par (°C)	Δt par	Δt ex	Δt ex final
		Touchdown			
I3P1	45 s	10x 64°C, 10x 62°C, 10x 60°C e 30x 58°C	1 min	1 min	7 min
I3P2	30 s	Normal 55x 60°C	30 s	45 s	3 min
I3P3	30 s	Normal 55x 53°C	30 s	45 s	3 min

Condições das reações de PCR utilizadas para a amplificação dos fragmentos mapeados. I3P1: Ilha 3 Parte 1; I3P2: Ilha 3 Parte 2; I3P3: Ilha 3 Parte 3; Δt d: tempo de denaturação no início de cada ciclo; T par e Δt par: temperatura e tempo de pareamento do iniciador à fita molde, respectivamente; Δt ex: tempo de extensão ao final de cada ciclo; Δt ex final: tempo de extensão ao final da ciclagem; *Touchdown*: formato de PCR que consiste em decréscimos da T par após um número de ciclagem para a obtenção de fragmentos mais específicos, em que o número total de ciclos corresponde à soma do número de ciclos em cada T par; Normal: formato de PCR com apenas uma T par, em que o número de ciclos na T par corresponde ao número total de ciclos; min: minutos; s: segundos.

3.10.2 Sequenciamento capilar

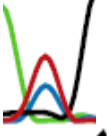
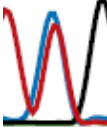
Os produtos amplificados foram, em seguida, tratados com *ExoSAP-IT*® (*For PCR Product Clean-Up - USB Corporation*) conforme protocolo do fabricante, para eliminação de iniciadores, dNTPs e sequências incompletas. Seguiu-se então, ao sequenciamento, utilizando os mesmos iniciadores da amplificação em reações individuais para iniciador *forward* e *reverse*, contendo 4,5µL H₂O MilliQ, 0,75X de tampão de reação *Save Money 5x*, 500nM de iniciador *forward* ou *reverse*, 1µL de *BigDye* e 2,5µL da reação tratada com *ExoSAP-IT*®, para um volume final de reação de 10µL. As reações foram submetidas a uma ciclagem padrão de 95°C por 2 minutos,

seguida de 40 repetições de denaturação a 95°C por 18 segundos, temperatura de pareamento (até 60°C) por 18 segundos e de extensão a 60°C por 1 minuto. O sequenciamento foi realizado no equipamento *3130xl Sequence analyser (Applied Biosystems)* e a análise do sequenciamento foi realizada com o auxílio do *software CLC Main Workbench (CLCbio)*.

3.10.3 Critérios para a seleção dos sítios CpG candidatos

Para a seleção dos sítios CpG candidatos, ou seja, aqueles sítios putativos a estarem envolvidos na regulação da expressão do gene por apresentarem-se metilados nas células HEK293 sem o tratamento com o agente desmetilante, foi feita uma classificação dos padrões de picos observados no cromatograma fornecido pelo sequenciamento capilar. A estes padrões de picos foram atribuídos *scores* de acordo com o nucleotídeo presente na posição analisada, citosina (C) ou timina (T), e a altura do pico correspondente. Essa classificação de padrões de picos e *scores* pode ser vista na Tabela 6.

Tabela 6 - Classificação dos padrões de picos dos nucleotídeos C e T na posição analisada com atribuição de *scores*.

	Score	Símbolo	Altura do pico	Equivale aproximadamente aos seguintes <i>status</i>
	0		Pico exclusivo de T	Desmetilado
	1		Pico de T > pico de C	Pouco metilado
	2		Pico de T = C pico de	Parcialmente metilado
	3		Pico de C > pico de T	Fortemente metilado
	4		Pico exclusivo de C	Totalmente metilado

Atribuição de *scores* e símbolos aos diferentes padrões de picos dos nucleotídeos C e T na posição analisada, qual seja a posição a montante do nucleotídeo G dos sítios CpG. Na coluna “Legenda” são dados os *scores* que variam de 0 (não metilado) a 4 (totalmente metilado). Na coluna “Símbolo” são apresentadas imagens que simbolizam o *score* atribuído para melhor visualização em que cada quarto do círculo corresponde a um ponto. Na coluna “Altura do pico” são dados os parâmetros de comparação entre os picos observados nas figuras, que serviram de base para a classificação do *status* de metilação (última coluna) dos sítios CpG e seleção dos sítios considerados candidatos pelo estudo. Pico em azul: nucleotídeo citosina (C); Pico em vermelho: nucleotídeo timina (T).

Esta classificação serviu de base para o estabelecimento dos critérios utilizados para a seleção dos sítios candidatos a estarem metilados e por consequência envolvidos no controle da expressão do gene:

1. O sítio CpG deve estar predominantemente metilado na linhagem controle (apenas *scores* 3 e 4);
2. Tal sítio deve apresentar, após o tratamento com 5-azadC, perda de metilação de pelo menos 2 níveis de *score* quando comparado com a linhagem controle;

Dessa forma, o sítio que apresentou *score* 3 e passou para 1 ou 0, ou que apresentou *score* 4 e passou para 2, 1 ou 0, respectivamente na linhagem controle e tratada, foram selecionados. As reações de PCR da linhagem HEK293 controle e tratada com 5-azadC foram realizadas em duplicatas, e da comparação de cada sítio individualmente entre as replicatas, o *score* que melhor representasse o *status* de metilação daquele sítio na amostra foi escolhido. Os CpGs selecionados foram submetidos a análise por pirosequenciamento nas amostras TW e RM.

3.11 RASTREAMENTO DOS SÍTIOS CANDIDATOS POR PIROSEQUENCIAMENTO

As amostras de DNA da linhagem HEK293 tratada com 5-azadC convertidas pelo tratamento de bissulfito de sódio foram amplificadas em reações de PCR. Essa reação é realizada com um dos iniciadores de PCR biotilado na extremidade 5'. Isso é necessário para a obtenção de DNA molde simples fita a partir do produto de PCR, de forma que o iniciador possa se ligar a esse molde e dar início a extensão em tempo real que

ocorre sem ciclagem e sem amplificação. O equipamento utilizado foi o PyroMarkTMID System (*Qiagen*), a análise das sequências foi feita com o auxílio do *software* Pyro Q-CpG e os parâmetros para avaliação da qualidade da corrida foram seguidos conforme o *default* do *software* de análise.

3.11.1 Verificação da qualidade da conversão das citosinas no DNA tratado com bissulfito de sódio das amostras da casuística.

A averiguação da eficiência da conversão pelo tratamento é fundamental para estudos de metilação que utilizam esse tratamento, e deve ser feita antes de qualquer análise. Nesse sentido o próprio *software* do pirosequenciador possibilita essa averiguação, ao sugerir, em algumas posições de timinas da sequência fornecida, a inserção de adição de citosinas antes ou depois dessas timinas, de forma que se a conversão tiver sido satisfatória não deve ocorrer formação de pico mediante adição da citosina e o pico na adição de timina é completo.

O próprio *software*, após definidas as posições do controle de conversão já avalia a eficiência da conversão nessas posições seguindo próprio parâmetro *default*, cuja taxa mínima aceita é de 96% de conversão.

3.11.2 Ensaio de Reprodutibilidade

Uma vez que fatores como variações no tratamento com bissulfito de sódio e PCR podem afetar a reprodutibilidade do nível de metilação determinado pelo pirosequenciamento, avaliamos a variação que esses fatores imputavam às medidas. Para tanto, utilizamos o quarto fragmento utilizado no rastreamento, que contém 3 CpGs avaliáveis (+829, +853 e +855, posições dadas em relação ao sítio de início de transcrição do gene).

Trezentos nanogramas do mesmo DNA de quatro diferentes amostras (dois TW e dois RM) foram submetidos a tratamento com bissulfito de sódio em dois dias diferentes para avaliação da variação por tratamentos diferentes. Todos os DNAs convertidos por bissulfito de sódio foram, então, submetidos a reações de PCR simultaneamente em duplicatas, para avaliação da variação entre replicatas de PCR. Dessa forma foram obtidas quatro leituras de metilação por CpG pra cada amostra. A partir desse ensaio foi definida a variação máxima de valor absoluto entre leituras diferentes para a mesma amostra aceita no estudo.

3.11.3 Amplificação em reações de PCR do DNA tratado com bissulfito de sódio das amostras da casuística deste trabalho e reações de pirosequenciamento

As reações de PCR para amplificação do fragmento I3P3A foram realizadas em duplicata com 30ng de DNA tratado com bissulfito, 1X CoralLoad, 3,0mM Mg^{2+} , 200nM de iniciador *forward*, 180nM de iniciador *reverse*, 1X PyroMark PCR Master Mix, e H₂O MilliQ para volume final de

25µL. As reações foram submetidas a um passo inicial de 95°C por 15 minutos para ativação da enzima, seguida de 50 repetições da seguinte ciclagem: denaturação a 94°C por 30 segundos, temperatura de pareamento de 56°C por 30 segundos e de extensão a 72°C por 30 segundos; finalizada com um passo de extensão de 72°C por 10 minutos. As características dos iniciadores são dadas no item 3.9 e na Tabela 4.

Em seguida a reação seguiu para o pirosequenciamento conforme instruções do fabricante, incluindo um passo de lavagem após o pareamento dos iniciadores ao DNA molde para remoção de ligações inespecíficas. A análise das reações de pirosequenciamento foi realizada com o auxílio do *software Pyro Q-CpG* e a análise dos dados foi realizada com o auxílio dos *softwares Microsoft Office Excel* e *GraphPad Prism 4*.

3.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a comparação do nível de expressão entre as amostras de TW e RM foi utilizado o teste não paramétrico para grupos não pareados (Mann-Whitney). Para a comparação do nível de expressão entre a linhagem não tratada e tratada, foi utilizado teste t de *student* não pareado. Para a identificação dos sítios diferencialmente metilados entre amostras de TW e RM, foi aplicado o teste de Mann-Whitney. Para verificar a diferença entre o nível de expressão de *PLCG2* de acordo com o nível de metilação, os valores de somatória de metilação dos CpGs diferencialmente metilados de todas as amostras foram divididos pelos percentis P33 (1º tercil) e P66 (2º

tercil). Percentil é o valor que divide a amostra em duas partes. Nessa divisão o valor do percentil diz qual a porcentagem da amostra que apresenta valores igual ou menor que o do percentil (GUEDES et al. 2005). Desta forma o P33 e o P66 juntos dividem o conjunto de amostras em 3 partes iguais. O teste estatístico para avaliar essa diferença foi a análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis (ANOVA de Kruskal-Wallis) com teste de comparações múltiplas de Dunnett (*post hoc*). Para avaliação da correlação entre o nível de metilação e de expressão foi utilizado teste estatístico de correlação de Spearman, para os valores de expressão em log2 e da somatória do nível de metilação dos oito sítios diferencialmente metilados. Para a associação entre o nível de metilação e recaída do tumor, as amostras foram divididas tanto pela mediana (P50) quanto pelos percentis P33 e P66 da somatória do nível de metilação dos sítios diferencialmente metilados. Dividindo, pela mediana obtivemos dois grupos com o mesmo número de amostras em cada, e dividindo pelos tercís, obtivemos três grupos, também com aproximadamente o mesmo número de amostras. O teste aplicado foi o qui-quadrado. Para todos os testes, valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE *PLCG2* NA CASUÍSTICA

Com a finalidade de verificar e confirmar a diferença de expressão de *PLCG2* entre amostras de TW e RM observada por MASCHIETTO et al. (2008), realizamos RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) com a casuística deste trabalho, uma vez que as amostras utilizadas nestes dois trabalhos são diferentes, embora sejam do mesmo grupo de pesquisa.

Pode-se observar que assim como as amostras do trabalho de MASCHIETTO et al. 2008, as amostras do presente trabalho também mostraram diferença significativa da expressão do gene (*fold* = 13,3; $P < 0,0001$), corroborando a evidência de diferença na expressão desse gene e dando suporte para prosseguirmos com a proposta do atual estudo (Figura 10). Os genes normalizadores utilizados foram o *GAPDH* e o *ACTB*.

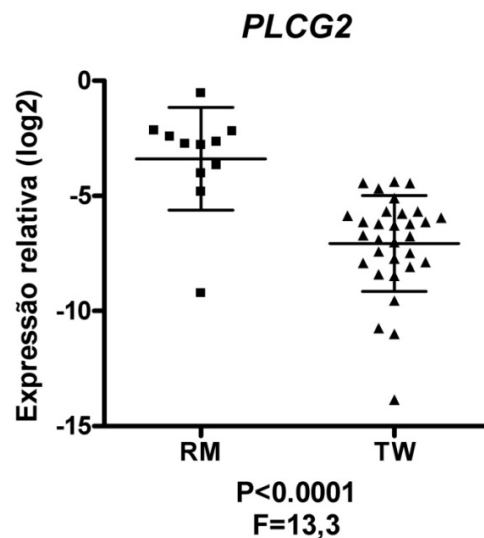


Figura 10 - Expressão relativa por qRT-PCR do gene *PLCG2* entre as amostras de TW e RM. A expressão relativa é dada no eixo Y na escala de log na base 2 (log2) e se refere aos genes normalizadores *GAPDH* e *ACTB*. Os pontos no gráfico representam a média das duplicatas de cada amostra. A média das expressões é dada pelo traço maior e a barra de erros representa os desvios-padrão (média = -3,39; desvio-padrão = 2,24 e média = -7,14 e desvio-padrão = 2,08 para RM e TW, respectivamente). TW: amostras de tumor de Wilms; RM: amostras de rim normal maduro. P: pvalor pelo teste de Mann-Whitney. F: *fold* calculado pelo método de PFAFFL (2001). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE *PLCG2* NAS CÉLULAS DA LINHAGEM TRATADA E NÃO TRATADA COM AGENTE DESMETILANTE

5-aza-2'-deoxicitidina é um agente desmetilante do DNA que age através da inibição das enzimas responsáveis pela transferência do grupamento metil à citosina em eucariotos, as DNMTs, impedindo a transferências da herança epigenética após seguidos ciclos de divisão celular. As marcas de metilação são apagadas do material genético,

promovendo, dessa forma, a ativação da expressão de genes que estivessem silenciados por metilação.

Células da linhagem HEK293 (linhagem de células embrionárias renais humanas normais, com potencial tumoral) foram submetidas a tratamento com esse fármaco com o intuito de verificarmos se ocorre alteração do nível de expressão de *PLCG2*, e em caso positivo, de avaliar como o nível de metilação de *PLCG2* pode estar determinando essa mudança, ou seja, determinar quais são os sítios CpG potencialmente envolvidos na regulação de expressão nessa linhagem. Essa determinação foi realizada por um mapeamento do nível de metilação dos sítios CpG nas células da linhagem HEK293, para posterior rastreamento desses sítios selecionados na casuística do estudo.

O RNA total das células da linhagem celular HEK293 com e sem tratamento com o agente desmetilante (CT1, CT2, AZA1 e AZA2) apresentou razões de intensidade das bandas 28S/18S >1,6, consideradas de ótima qualidade. O valor de RIN para cada amostra foi maior que 8,9, indicando que o RNA estava íntegro.

O DNA extraído das amostras de HEK293 apresentou uma quantidade que variou de 67 a 110µg e razão 260/280 acima de 1,95, indicando boa pureza. A qualidade foi avaliada em gel de agarose 0,8% indicando que o DNA estava íntegro.

Para a análise quantitativa da expressão de *PLCG2* por qRT-PCR, quatro microgramas de RNA total de CT1, CT2, AZA1 e AZA2 foram tratados

com DNase e quantificados para cálculo do rendimento, que variou de 1,3 a 2,9 µg.

As amostras de cDNA seguiram para as reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR - real time) que não mostraram amplificação para o *PLCG2* na linhagem HEK293 não tratada (CT). Na linhagem tratada com o agente desmetilante, o RNAm passou a ser expresso, (*fold* de 9544, $P < 0,0001$) sugerindo que a expressão deste gene é regulada por metilação (Figura 11). Na Tabela 7 estão representados os valores da expressão de *PLCG2* das duplicatas das amostras, normalizados para a média entre a expressão dos genes normalizadores *GAPDH* e *ACTB*. Os valores mostrados foram utilizados na construção do gráfico de expressão da Figura 11.

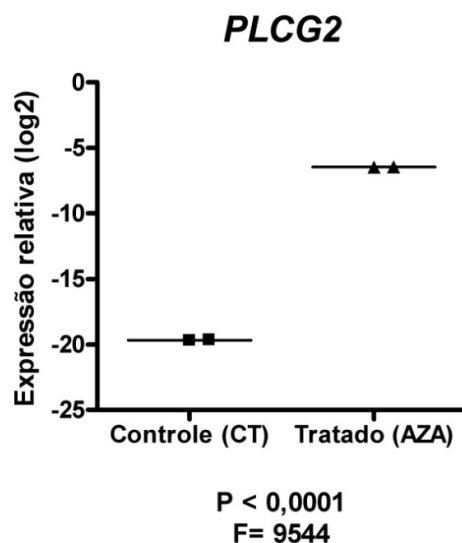


Figura 11 - Expressão relativa por qRT-PCR do gene *PLCG2* entre as amostras AZA e CT. A expressão relativa é dada no eixo Y na escala de log na base 2 (log2) e se refere aos genes normalizadores *GAPDH* e *ACTB*; Os pontos no gráfico representam a média das duplicatas de cada amostra. AZA: células tratadas com 5-azadC; CT: células não tratadas. P: pvalor pelo teste t não pareado e F: *fold* calculado pelo método de PFAFFL (2001). Valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Tabela 7 - Valores da expressão de *PLCG2* relativa à média entre a expressão dos genes normalizadores *GAPDH* e *ACTB*.

Amostra	Expressão relativa
CT1	1,21E-06
CT2	1,18E-06
AZA1	1,13E-02
AZA2	1,15E-02

Valores de expressão de *PLCG2* nas duplicatas das amostras CT e AZA, relativos à média entre a expressão dos genes normalizadores *GAPDH* e *ACTB*. E: potência na base 10.

Para efeitos de cálculo, o Ct das amostras controle foi considerado como sendo 40, e a partir dos dados obtidos observou-se que o RNAm de *PLCG2* é 9544 vezes mais expresso nas amostras tratadas com 5-AzadC do que nas amostras controles.

4.3 MAPEAMENTO DO PERFIL DE METILAÇÃO DE TRECHOS DAS ILHAS CpG

Uma vez observado que a linhagem HEK293, que não expressa *PLCG2*, ao ser submetida a tratamento com agente desmetilante passa a expressar o gene, fez-se necessário investigar as alterações no nível de metilação nessa linhagem que possam estar levando a fenômeno. Para tanto, realizamos o mapeamento de uma região que se estendeu de -634 a +1181 bases (posição dada em relação ao sítio de início de transcrição), contemplando duas CGIs, pela amplificação de três fragmentos, I3PI, I3P2 e I3P3. Os produtos da padronização das reações foram submetidos a corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (Figura 12).

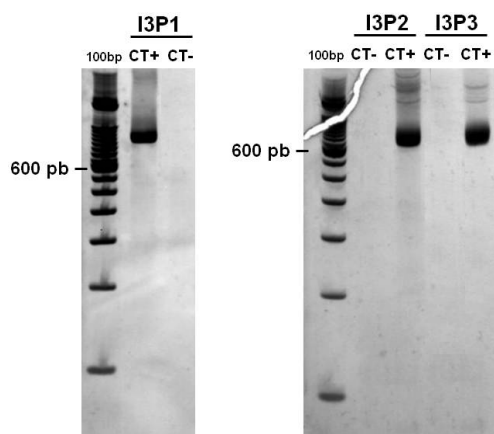


Figura 12 - Visualização em gel de poliacrilamida 8%, corado com AgNO₃ 4,5% dos fragmentos I3P1, I3P2 e I3P3 do gene *PLCG2* amplificado de DNA tratado com bissulfito de sódio para mapeamento. I3P1: Ilha 3 Parte 1; I3P2: Ilha 3 Parte 2; I3P3: Ilha 3 Parte 3; CT-: controle negativo de reação na ausência de DNA. Tamanho dos fragmentos: I3P1: 932pb; I3P2: 593pb; I3P3: 604pb; 100bp: marcador de peso molecular 100bp DNA *Ladder* (Invitrogen). Os iniciadores foram desenhados seguindo os preceitos apresentados no item 3.9. Apesar de as bandas estarem a cima da altura esperada, o sequenciamento confirmou serem as sequências esperadas.

A metodologia utilizada neste mapeamento foi sequenciamento capilar que, conforme o exposto anteriormente, fornece dados confiáveis para a detecção de alterações de grandes amplitudes no nível de metilação entre as células tratadas e não tratadas.

O sequenciamento capilar consiste na extensão de um fragmento com apenas um dos iniciadores e incorporação de dNTPs e ddNTPs pela polimerase à fita em extensão. Os ddNTPs contêm uma molécula de -H no lugar de -OH no carbono de posição três, o que encerra a reação de extensão, além de uma marcação fluorescente para cada ddNTP que permite ao sequenciador a identificação da última base de cada fragmento estendido, determinando a sequência.

A análise do sequenciamento foi realizada com o auxílio do *software CLC Main Workbench (CLCbio)* e *Microsoft Office Excel*, para a comparação dos nucleotídeos inseridos nas posições de sítios de metilação, entre as amostras das células tratadas com 5-AzadC e controle, sendo que, na análise das posições correspondentes aos sítios CpG, a presença de um nucleotídeo C a montante de um nucleotídeo G indica que o sítio estava metilado, a presença de um nucleotídeo T a montante de um nucleotídeo G indica que o sítio estava não metilado e a presença simultânea destes dois nucleotídeos indica metilação parcial.

Da região previamente selecionada como ilhas 2 e 3 (-634 a +1181), 1.232 pb (67,9%) mostraram-se avaliáveis. Esse mapeamento permitiu a análise com qualidade de 122 dos 148 sítios CpG previamente selecionados (82,4%, dos sítios -543 a +238 e +442 a +1045, exceto sítios -488, +135 e +467). Na Tabela 8 estão representados os sítios que apresentaram algum nível de metilação nas amostras controle (CT) e os *scores* de metilação atribuídos a eles nas amostras CT e AZA, representados pelos símbolos, de acordo com a classificação mencionada no item 3.10.3. A partir desses *scores* foram aplicados os critérios desse mesmo item para a seleção dos sítios candidatos.

Seguindo esses critérios foram selecionados 15 sítios CpG, dentre os 122 sítios avaliados que se mostraram hipermetilados ou totalmente metilados nas células não tratadas e que perderam grande parte dessa metilação mediante o tratamento com o agente desmetilante (Tabela 8), mostrando-se assim putativamente envolvidos na regulação da expressão.

Tabela 8 - Classificação e seleção dos sítios metilados nas amostras controle

Posição do sítio CpG	CT	AZA	1º critério (≥ 3)	2º critério (2 ou +)
...	...	...	...	...
-543			Não	-
...	...	...	...	...
-385			Não	-
...	...	...	...	...
+442			Não	-
+452			Não	-
+455			Não	-
+467	-	-	-	-
+487			Não	-
+489			Não	-
+493			Não	-
+497			Não	-
+523			Não	-
+532			Sim	Sim
+539			Sim	Não
+549			Sim	Sim
+555			Não	-
+557			Não	-
+564			Sim	Não
+576			Não	-
+606			Sim	Sim
+608			Sim	Sim
+615			Sim	Sim
+620			Sim	Sim
+632			Sim	Não
+642			Sim	Não
+654			Sim	Não
+700			Sim	Sim
+707			Sim	Sim
+728			Sim	Não
+735			Sim	Sim
+743			Sim	Não
+769			Sim	Sim
+777			Sim	Sim
+829			Sim	Sim
+853			Sim	Sim
+855			Sim	Não
+878			Sim	Não
+881			Sim	Não
+996			Sim	Sim
+1023			Sim	Não
+1030			Sim	Não
+1040			Sim	Não
+1045			Sim	Sim
+1116	-	-	-	-
...	...	...	...	...

Classificação e representação dos *scores* atribuídos aos sítios CpG mapeados que apresentaram algum nível de metilação nas amostras controle. Na coluna das posições dos sítios CpG a posição é dada em relação ao sítio de início de transcrição do gene, e nas colunas dos símbolos é representado o *score* de cada sítio, obtido por comparação entre as replicatas da amostra controle (CT) e da amostra tratada (AZA) conforme mencionado no item 3.10.3. Em seguida, são apresentadas as colunas dos critérios, sendo o 1º que o sítio deve estar predominantemente metilado (*score* 3 ou 4) e o 2º, que o sítio da amostra tratada deve apresentar perda de 2 pontos ou mais quando comparada com o da amostra controle. O “Sim” em negrito assinala os sítios cujos *scores* satisfizeram o critério em questão. Evidenciados em salmon estão os sítios que satisfizeram os dois critérios estabelecidos, e que foram selecionados como sítios candidatos a reguladores da expressão de *PLCG2*.

4.4 RASTREAMENTO DO NÍVEL DE METILAÇÃO DOS CpGs NAS AMOSTRAS DE TW E RM.

Para o estudo de metilação, o DNA de 55 amostras de TW e 12 amostras RM foram tratados com bissulfito de sódio, que promove a conversão das citosinas não metiladas (seguidas ou não de guaninas) em uracilas, que dão lugar às timinas após reação de PCR, permitindo diferenciar as citosinas originalmente metiladas, por permanecerem inalteradas, daquelas que não estavam metiladas e deram lugar às timinas.

Para verificação da qualidade do DNA convertido por bissulfito das amostras da casuística deste trabalho, as amostras após o tratamento foram submetidas a reações de PCR com iniciadores específicos para DNA convertido por bissulfito (Tabela 2), para amplificação de um fragmento do gene *ACTB* de 133pb. Na Figura 13 é possível ver uma imagem obtida por fotodocumentação de corrida de eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de reações de PCR de algumas amostras.

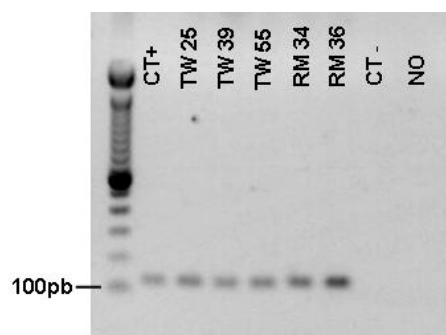


Figura 13 - Imagem obtida por fotodocumentação de corrida de eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos das PCRs para o fragmento do gene *ACTB* amplificados com iniciadores específicos para DNA convertido por bissulfito, em amostras da casuística. CT+: reação com DNA da amostra CT convertido por bissulfito; TW e RM: amostras de tumor de Wilms e rim maduro, respectivamente; CT -: reação com DNA não convertido por bissulfito; NO: controle negativo de reação na ausência de DNA. Tamanho dos fragmentos 133pb; 100bp: marcador de peso molecular 100bp DNA *Ladder* (Invitrogen). Os iniciadores foram desenhados seguindo os preceitos apresentados no item 3.9. Corante fluorescente utilizado: SYBR Safe™ (Invitrogen) (1X).

Na casuística, todas as amostras mostraram amplificação do fragmento, com exceção do controle negativo de reação na ausência de DNA (NO) e do controle negativo de reação na presença de DNA não convertido por bissulfito, o que demonstra que os iniciadores amplificam apenas DNA convertido pelo tratamento com bissulfito de sódio.

Na fase de rastreamento foi utilizada a técnica de pirosequenciamento, que consiste no lançamento e detecção indireta de pirofosfato (PPi) liberado quando da incorporação de nucleotídeo durante a síntese de DNA. A reação de polimerização ocorre a partir de uma fita simples de DNA sem ciclagem ou amplificação, a fita é apenas estendida, mediante o pareamento do iniciador de pirosequenciamento e incorporação das bases complementares à fita molde. É uma metodologia de

sequenciamento em tempo real, e para tanto, previamente à realização da reação, o *software* de análise projeta a sequência de liberação de nucleotídeos individualmente de acordo com a sequência a ser analisada de forma que se sabe qual a base incorporada quando da detecção do pico. Iniciada a reação, de acordo com a liberação sequencial mencionada, ocorre a incorporação dos nucleotídeos, resultando na liberação de moléculas de PPI em quantidade equimolar à do nucleotídeo incorporado. O PPI liberado é convertido em adenosina trifosfato (ATP) por uma ATP sulfúrilase na presença de adenosina 5'-fosfosulfato (APS), liberando energia para que uma luciferase oxide luciferina em oxiluciferina, que gera um sinal luminoso de intensidade proporcional à quantidade de ATP. Sendo assim, essa emissão de luz é proporcional ao número de incorporações de nucleotídeos conhecidos, e por meio do *software* Pyro Q-CpG o sinal é visualizado na forma de picos proporcionais à incorporação, e interpretado na forma de dado quantitativo. O equipamento utilizado foi o PyroMarkTMID System (Qiagen).

No programa de análise, a 5mC e a citosina da sequência original são representadas como picos de citosina e timina, respectivamente. Esses picos são proporcionais ao número de alelos metilados em cada sítio CpG, fornecendo um valor em porcentagem para cada sítio pesquisado que representa o nível de metilação, p. ex. 0% representa totalmente não metilado e 100%, totalmente metilado. Os parâmetros para avaliação da qualidade da corrida foram seguidos conforme o *default* do *software* de análise.

A verificação da qualidade da conversão do DNA tratado com bissulfito de sódio das amostras é possível na própria sequência fornecida pelo *software* que estabelece 96% como taxa mínima de conversão atingida e o DNA das amostras que não satisfizeram esse parâmetro passaram por novo tratamento com bissulfito de sódio.

Além disso, foi realizado um ensaio de reprodutibilidade para avaliar a variação que o tratamento com bissulfito de sódio e reações de PCR poderiam imputar nas leituras fornecidas pelo pirosequenciamento. Para tanto foram realizadas duplicata de tratamento e duplicata de PCR. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 9 e 10 e no gráfico da Figura 14.

Tabela 9 - Leituras de pirosequenciamento do ensaio de reprodutibilidade e valores de variação absoluta dentro das duplicatas de PCR.

A				B			
Amostra	Sítios CpG			Amostra	Sítios CpG		
	+829	+853	+855		+829	+853	+855
RM 33-1A	26,95	23,80	16,66	RM 33-1	26,57	25,84	14,21
RM 33-1B	26,18	27,87	11,75	Abs	0,77	4,07	4,91
RM 33-2A	33,88	31,04	12,87	RM 33-2	32,57	30,59	13,41
RM 33-2B	31,25	30,14	13,95	Abs	2,63	0,90	1,08
RM 46-1A	29,26	29,37	16,63	RM 46-1	28,38	30,49	14,83
RM 46-1B	27,50	31,60	13,02	Abs	1,76	2,23	3,61
RM 46-2A	28,91	30,03	13,07	RM 46-2	29,02	32,01	14,18
RM 46-2B	29,12	33,98	15,28	Abs	0,21	3,95	2,21
TW 17-1A	47,64	37,79	30,47	TW 17-1	45,07	36,43	29,09
TW 17-1B	42,50	35,06	27,71	Abs	5,14	2,73	2,76
TW 17-2A	43,83	29,53	30,13	TW 17-2	45,80	34,27	31,87
TW 17-2B	47,76	39,00	33,60	Abs	3,93	9,47	3,47
TW 28-1A	47,69	49,43	33,24	TW 28-1	45,97	50,00	33,54
TW 28-1B	44,25	50,57	33,83	Abs	3,44	1,14	0,59
TW 28-2A	49,02	39,99	33,12	TW 28-2	48,55	47,12	31,70
TW 28-2B	48,08	54,25	30,28	Abs	0,94	14,26	2,84

Leituras em porcentagem das reações de pirosequenciamento de duas amostras de rim maduro (RM 33 e 46) e duas de tumor de Wilms (TW 17 e 28). A: o DNA dessas amostras foi submetido a tratamento com bissulfito de sódio em dois dias diferentes (1 e 2) e em seguida submetidos a reação de PCR em duplicata (A e B), fornecendo 4 leituras de cada sítio CpG para cada amostra (p.ex. RM 33-1A, RM 33-1B, RM 33-2A, RM 33-2B). Sítios analisados: +829, +853 e +855, posições dadas a partir do início de transcrição do gene. B: Médias e variações absolutas dentro das duplicatas de PCR (Abs), referentes a cada um dos tratamentos de cada amostra. O valor de Abs corresponde ao valor da maior leitura menos o valor da menor leitura e informa a variação imputada pelas condições experimentais analisadas às leituras de pirosequenciamento. Sítios analisados: +829, +853 e +855, posições dadas em relação ao sítio de início de transcrição do gene.

Tabela 10 - Estatística descritiva do ensaio de reprodutibilidade

Amostra	Sítios CpG			Amostra	Sítios CpG		
	+829	+853	+855		+829	+853	+855
RM 33	29,57	28,21	13,81	TW 17	45,43	35,35	30,48
DP	3,64	3,23	2,10	DP	2,67	4,21	2,42
Abs	7,70	7,24	4,91	Abs	5,26	9,47	5,89
RM 46	28,70	31,25	14,50	TW 28	47,26	48,56	32,62
DP	0,81	2,05	1,77	DP	2,08	6,07	1,59
Abs	1,76	4,61	3,61	Abs	4,77	14,26	3,55

Médias, desvios-padrão (DP) e variações absolutas dentre todas as leituras pra cada sítio de cada amostra (Abs). O valor de Abs corresponde ao valor da maior leitura menos o valor da menor leitura e informa a variação imputada pelas condições experimentais analisadas às leituras de pirosequenciamento. Sítios analisados: +829, +853 e +855, posições dadas em relação ao sítio de início de transcrição do gene.

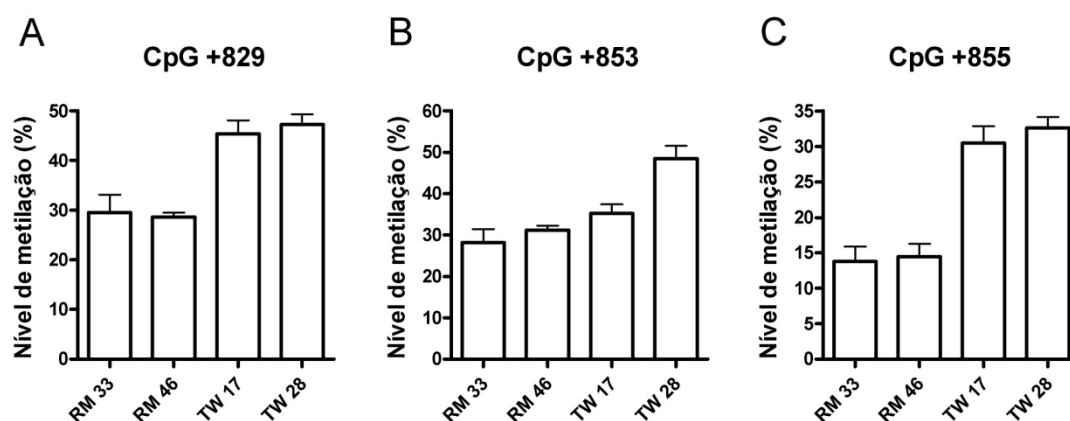


Figura 14 - Gráfico de barras das médias das leituras de pirosequenciamento do ensaio de reprodutibilidade. As barras representam as médias das leituras de pirosequenciamento (em porcentagem no eixo Y) com barras de erro (desvio-padrão) de cada sítio CpG para cada amostra (eixo X). A: sítio +829; B: sítio +853; C: sítio +858. Posições dos sítios CpG dadas em relação ao sítio de início de transcrição do gene. Os valores dos desvios-padrão são apresentados na Tabela 10.

Os resultados desse ensaio mostram que as variações entre as duplicatas de PCR são baixas, sendo a média dessas variações de 3,29, com apenas dois valores ultrapassando 5. Ademais, quando avaliamos as variações entre todas as leituras de cada sítio para cada amostra, o que inclui a duplicata de tratamento, elas se mantêm baixas, agora com quatro valores acima de 7 e dois entre 5 e 7. A média de todas as variações é de 4,24 e os desvios-padrão são pequenos, valores muito baixos que não comprometeriam a comparação entre as amostras de TW e RM, uma vez que a diferença de metilação que buscamos é muito maior que essas pequenas variações.

Considerando ainda que leituras de 0 a 5% de metilação por pirosequenciamento têm sido consideradas ruído (JONES et al. 2005; SHAW et al. 2006), e que as variações em valor absoluto que obtivemos estão próximas desse valor, estabelecemos como aceitável a variação máxima entre duplicata de PCR de 5, um limite suficiente para dar uma margem adequada à comparação realizada.

Os sítios selecionados na fase de mapeamento foram avaliados por pirosequenciamento para obtenção de medidas quantitativas do nível de metilação na casuística deste trabalho e comparadas entre as amostras de TW e RM. Todas as análises por pirosequenciamento do rastreamento foram realizadas com o produto de PCR de apenas um fragmento, nomeado I3P3A (+578 a +914) de 337pb, que contemplava 11 dos 15 sítios CpG selecionados como candidatos (item 4.3, Tabela 8) pelo mapeamento. No entanto, a qualidade das reações de pirosequenciamento cai à medida que a

corrida se prolonga, em função de suas limitações, que envolvem redução de atividade das enzimas, saturação e inibição por metabólitos, entre outros (MASHAYEKHI e RONAGHI 2007). Desta forma, priorizar sequências curtas favorece melhores resultados pela metodologia do pirosequenciamento.

Assim, para contemplar estes 11 sítios CpG candidatos, foram desenhadas quatro corridas de sequenciamento com extensão de no máximo 60 base, sendo necessário um iniciador para cada reação. As características dos iniciadores são dadas no item 3.9 e Tabela 4.

Os produtos de PCR do fragmento utilizado no rastreamento (I3P3A) foram submetidos a corridas de eletroforese em gel de agarose 1%, para verificação da presença do fragmento amplificado e sua especificidade. Na Figura 15 há um exemplo de reação de PCR de quatro amostras da casuística e do controle positivo (CT1).

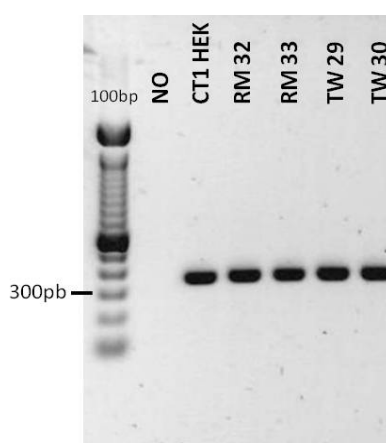


Figura 15 – Visualização, por fotodocumentação, em gel de agarose 1% do fragmento I3P3A do gene *PLCG2* amplificado de DNA tratado com bissulfito de sódio para o rastreamento de 11 dos 15 sítios CpG candidatos. NO: controle negativo de reação, sem DNA; CT1 HEK: controle positivo de reação; RM e TW: amostras de rim maduro e Tumor de Wilms, respectivamente. Tamanho do fragmento: 337pb; Corante fluorescente utilizado: SYBR Safe™ (Invitrogen) (1X).

A média das leituras obtidas entre as duplicatas foi considerada (Tabela 11). Foram aceitos valores de duplicatas com variação absoluta de até 5. Foram obtidas reações de pirosequenciamento dos 11 sítios CpG candidatos para 52 de 55 amostras de TW e para todas as 12 amostras de RM.

Tabela 11 - Nível de metilação nos sítios candidatos em 52 TW e 12 RM

Amostra	Sítios CpG (posição em relação ao sítio de início de transcrição)										
	+606	+608	+615	+620	+700	+707	+735	+769	+777	+829	+853
RM 32	1,90	2,11	5,53	6,64	7,23	7,75	5,24	10,87	32,49	24,32	23,94
RM 33	3,27	1,28	2,59	6,32	9,25	5,96	3,70	8,20	30,38	26,22	26,16
RM 34	1,30	3,79	4,44	4,58	7,21	8,38	5,35	17,25	33,57	30,04	35,68
RM 36	2,49	4,16	4,32	5,80	9,08	11,76	4,39	14,75	44,14	26,84	37,03
RM 37	3,53	2,82	6,30	6,30	5,05	8,49	5,00	14,94	40,53	31,99	27,06
RM 40	3,88	4,92	3,99	6,70	7,65	11,08	0,00	11,83	36,39	18,65	34,23
RM 42	4,38	3,71	4,20	7,98	7,99	6,93	4,33	10,36	30,82	20,37	23,27
RM 43	2,65	3,02	3,14	4,48	6,47	7,98	1,92	14,10	39,62	23,50	34,09
RM 44	0,00	3,47	5,13	4,54	6,00	8,13	2,04	12,43	25,76	22,37	19,12
RM 46	3,53	3,97	5,17	3,90	8,77	10,30	1,75	12,20	30,78	29,97	30,79
RM 47	1,19	3,41	2,73	3,60	6,09	5,70	1,91	9,68	20,65	19,16	20,96
RM 48	1,47	4,11	3,77	6,67	8,37	6,76	3,27	10,53	20,08	22,69	23,29
TW 01	0,00	1,39	3,20	7,11	13,19	18,14	3,27	22,39	54,37	59,44	51,46
TW 02	2,36	0,00	3,34	5,92	24,56	55,03	10,16	57,66	74,62	83,74	82,78
TW 03	1,28	0,00	1,64	1,89	12,12	17,19	7,67	20,53	52,43	64,48	66,84
TW 04	6,71	7,57	12,29	30,16	44,75	58,81	19,96	50,71	67,42	71,54	70,75
TW 05	1,16	0,00	2,31	3,58	6,98	14,98	0,00	10,49	29,73	61,02	74,08
TW 06	3,89	2,22	3,96	4,26	13,70	12,85	3,09	16,47	48,86	57,89	58,71
TW 07	0,00	1,27	3,05	6,25	5,45	9,46	6,00	25,18	44,92	63,16	46,17
TW 08	1,15	0,00	4,15	1,87	6,83	13,30	2,82	22,69	45,74	51,86	45,50
TW 09	3,95	1,04	2,73	3,88	13,47	28,35	2,42	21,73	41,49	70,45	75,00
TW 10	2,16	0,00	7,81	7,65	44,87	69,83	26,59	66,03	81,59	76,41	79,80
TW 11	2,83	2,33	3,75	5,10	13,14	17,62	6,81	17,99	44,07	72,66	77,07
TW 12	4,60	1,12	2,87	2,76	13,55	22,06	6,56	32,05	55,85	62,80	73,01
TW 13	3,61	0,00	4,67	4,66	9,83	20,88	2,14	14,94	37,22	49,27	49,64
TW 14	2,62	1,24	4,53	5,68	29,09	50,54	17,89	53,87	80,28	74,10	79,71
TW 15	1,45	0,00	5,01	1,15	8,22	5,77	6,87	17,66	36,71	44,44	40,49
TW 16	2,76	1,28	5,03	7,83	20,28	26,42	8,05	32,37	64,83	83,34	85,63
TW 17	1,84	0,00	3,79	2,38	10,81	11,32	4,94	18,75	43,13	43,96	36,52
TW 18	0,00	0,00	4,41	3,43	15,19	20,52	6,34	26,01	59,19	68,90	59,53
TW 19	1,14	1,82	2,58	4,11	15,55	36,66	8,85	16,85	51,92	69,54	72,47
TW 20	3,23	1,13	3,70	7,32	36,24	57,32	11,74	46,13	70,95	77,46	76,03
TW 21	3,75	1,45	4,97	5,12	22,70	40,41	14,22	53,23	72,34	72,25	74,23
TW 23	0,00	1,16	2,96	2,27	7,70	6,45	1,80	10,69	39,01	54,99	59,55
TW 24	2,82	2,10	3,82	7,69	18,70	25,21	1,92	26,98	46,60	69,22	69,19
TW 25	0,00	1,81	2,16	6,16	25,31	27,94	12,66	34,09	63,36	84,03	82,90
TW 26	1,45	2,08	4,27	6,78	12,68	8,13	6,74	9,41	32,85	53,43	57,66
TW 27	1,16	5,02	1,80	8,14	24,58	34,41	8,15	31,86	67,04	71,46	32,43
TW 28	0,00	1,89	0,00	1,48	6,26	12,28	4,30	22,75	46,60	43,19	51,56
TW 29	2,14	0,00	1,42	0,00	5,55	9,73	4,78	26,05	52,36	71,61	73,96
TW 30	1,07	0,00	0,00	5,14	9,60	14,76	5,93	17,02	33,70	54,68	45,94
TW 31	1,83	1,95	3,68	4,07	6,78	7,41	3,41	13,88	42,77	65,08	57,14
TW 32	2,29	3,14	0,00	5,74	27,41	43,10	5,97	46,05	67,44	72,00	78,55
TW 34	2,65	0,00	1,75	1,68	8,23	14,24	3,82	16,58	32,01	35,28	58,33
TW 35	0,00	4,30	0,00	0,00	5,73	7,08	2,10	10,15	34,70	47,17	36,55
TW 36	4,52	4,46	6,75	17,00	51,23	66,68	32,89	54,39	74,92	81,10	85,78
TW 37	1,75	1,63	3,43	8,44	21,91	38,41	10,01	50,48	75,61	78,30	76,09
TW 38	0,99	0,00	5,53	3,87	7,57	9,12	9,28	10,14	20,82	65,14	81,33
TW 39	5,53	3,55	2,59	7,37	35,99	70,38	12,94	63,14	80,10	79,26	83,77
TW 40	2,63	2,73	5,81	10,84	34,80	54,16	11,80	40,86	71,80	75,45	84,12
TW 41	2,69	2,38	1,75	3,15	5,37	10,02	6,15	16,31	46,81	44,22	38,92
TW 42	1,04	0,00	3,95	3,61	6,90	6,87	4,72	14,91	33,77	48,78	60,65
TW 43	0,00	2,63	3,10	5,42	20,87	39,51	14,32	41,81	50,46	75,32	77,42
TW 44	0,00	2,10	3,40	0,00	9,21	7,96	5,03	8,79	23,38	41,53	54,87
TW 45	0,00	3,03	3,96	4,62	6,86	18,55	4,70	43,19	70,89	80,88	74,86
TW 46	1,05	0,00	5,82	12,13	31,03	33,19	8,44	26,78	53,49	67,42	67,85
TW 47	0,00	4,17	1,94	7,54	14,41	31,52	4,48	11,94	46,05	53,28	76,39
TW 48	0,00	1,38	4,12	2,60	13,37	18,74	5,40	19,34	47,67	65,22	56,82
TW 49	2,66	2,80	2,94	4,10	8,23	11,94	4,60	18,58	45,78	63,02	54,57
TW 50	0,97	1,49	2,65	5,26	31,07	39,72	15,56	37,47	66,82	75,17	80,73
TW 51	1,45	2,22	4,35	11,09	32,41	47,32	12,37	50,76	67,56	78,87	80,55
TW 52	1,46	1,74	1,76	4,04	12,98	26,19	6,24	23,07	52,34	61,54	78,16
TW 54	1,33	0,00	1,14	4,12	12,60	19,06	3,28	24,02	55,51	69,80	76,17
TW 55	0,00	2,73	3,51	2,18	17,47	25,71	7,01	20,59	43,76	71,90	65,08

Médias das leituras obtidas em duplicata das reações de pirosequenciamento de 52 amostras de Tumor de Wilms (TW) e de 12 amostras de rim normal maduro (RM), para os sítios candidatos (+606, +608, +615, +620, +700, +707, +735, +769, +777, +829, +853) individualmente. Valores dados em porcentagem.

Amostras de rim embrionário humano emblocadas em parafina também foram submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio e a reações de PCR para o rastreamento. No entanto, tanto as reações de PCR controle de conversão (*ACTB*-bis), quanto a PCR para *I3P3A* não funcionaram.

O resultado da análise estatística para identificação dos sítios diferencialmente metilados está apresentado na Tabela 12, e os gráficos do nível de metilação de cada sítio individualmente (+606, +608, +615, +620, +700, +707, +735, +769, +777, +829, +853, posições dadas em relação ao sítio de início de transcrição do gene) comparado entre amostras de TW e RM são apresentados na Figura 16.

Tabela 12 - Estatística descritiva do rastreamento dos 11 sítios CpG

		+606	+608	+615	+620	+700	+707	+735	+769	+777	+829	+853
RM	Média	2,46	3,39	4,27	5,62	7,43	8,27	3,24	12,26	32,10	24,68	27,97
	DP	1,31	0,98	1,13	1,36	1,34	1,92	1,70	2,59	7,48	4,41	6,16
TW	Média	1,81	1,66	3,46	5,55	17,56	26,79	8,02	28,57	52,76	64,94	66,02
	DP	1,58	1,58	2,07	4,73	11,58	18,21	6,17	15,75	15,61	12,58	14,92
P valor		0,160	0,004	0,126	0,453	0,004	0,0002	0,003	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Médias e desvio padrão (DP) das leituras obtidas por pirosequenciamento das 52 amostras de Tumor de Wilms (TW) e das 12 amostras de rim maduro (RM), para cada sítio candidato (+606, +608, +615, +620, +700, +707, +735, +769, +777, +829, +853, posições dadas em relação ao sítio de início de transcrição do gene). Valores dados em porcentagem. P valor dado pelo teste de Mann-Whitney. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

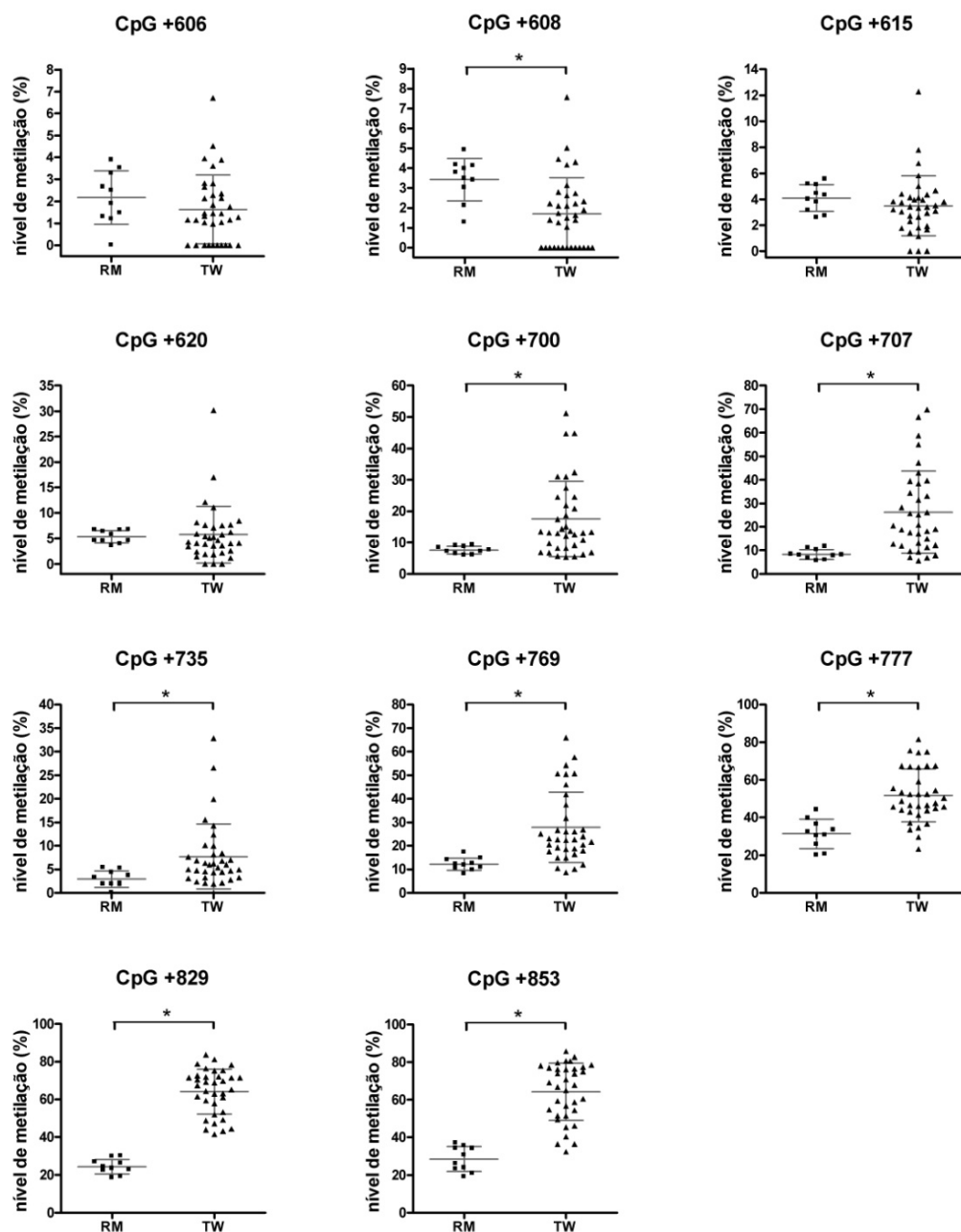


Figura 16 - Nível de metilação dos sítios CpG rastreados entre as amostras de TW e RM. Nível de metilação dos sítios rastreados (+606, +608, +615, +620, +700, +707, +735, +769, +777, +829, +853, posições dadas em relação ao sítio de início de transcrição do gene). RM: amostras de rim maduro. TW: amostras de TW. Cada ponto no gráfico representa a média das leituras da duplicata de PCR de cada amostra em porcentagem. A média do nível de metilação de cada sítio é dada pelo traço maior e a barra de erros representa o desvio-padrão, cujos valores são apresentados na Tabela 12. Os sítios com diferença de metilação estatisticamente significativa estão assinalados com o asterisco. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Importante observar as escalas do eixo Y (nível de metilação) que variam entre os gráficos de cada sítio CpG.

Dos 11 sítios CpG rastreados, oito apresentaram diferença de metilação estatisticamente significativa entre as amostras de TW e RM, sugerindo que estes sítios possam ser, pelo menos parcialmente, responsáveis pela regulação da expressão de *PLCG2* nas amostras de tumor de Wilms. O sítio +608 apresentou um padrão inverso ao dos outros sítios, estando as amostra de MK mais metiladas que as de TW. No entanto, observando a escala do eixo y (nível de metilação), constatamos que apesar da diferença ser estatisticamente significativa, o nível de metilação de quase todas as amostras se apresenta próximo a 5%, que é um valor extremamente baixo e muito sujeito a ruído experimental. No entanto, como foi detectada diferença estatisticamente significativa para esse sítio, ele foi incluído na nossa análise.

4.5 CORRELAÇÃO INVERSA ENTRE METILAÇÃO E EXPRESSÃO NAS AMOSTRAS DE TW E RM

Em uma primeira análise verificamos se o nível de metilação dos sítios diferencialmente metilados e o nível de expressão de *PLCG2* ao comparar as amostras de TW com as de RM, poderiam apresentar uma relação inversa, conforme o esperado. Para tanto comparamos o esses níveis separadamente entre as amostras de TW e RM que apresentavam ambos os dados. Dessa forma, avaliamos 30 amostras de TW e 11 de RM. As comparações são apresentadas na Figura 17.

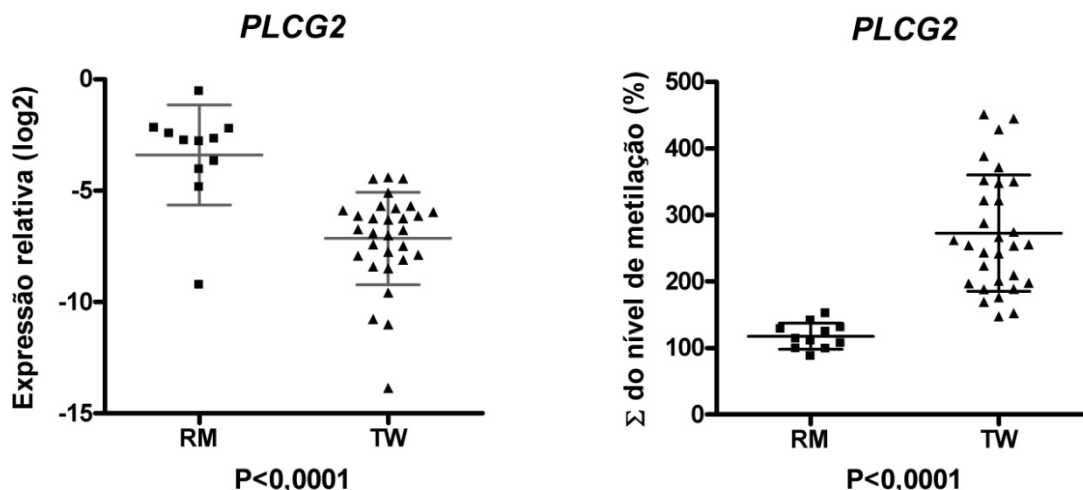


Figura 17 - Expressão relativa por qRT-PCR do gene *PLCG2* e nível de metilação dos sítios CpG diferencialmente metilados entre amostras de TW e RM. A: A expressão relativa é dada na escala de log na base 2 (log2) e se refere aos genes normalizadores *GAPDH* e *ACTB*. Os pontos no gráfico representam a média das duplicatas de cada amostra. A média das expressões é dada pelo traço maior e a barra de erros representa os desvios-padrão (média = -3,39; desvio-padrão = 2,24 e média = -7,14 e desvio-padrão = 2,08 para RM e TW, respectivamente). B: Os pontos no gráfico representam a média das somatórias (Σ) do nível de metilação dos sítios diferencialmente metilados de cada amostra em porcentagem. A média da somatória de todas as amostras é dada pelo traço maior e a barra de erros representa o desvio-padrão (média = 117,82 e desvio-padrão = 19,56; e média = 267,46 e desvio-padrão = 87,54, para RM e TW, respectivamente). P: pvalor pelo teste de Mann-Whitney. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. TW: amostras de Tumor de Wilms; RM: amostras de rim maduro.

Como se pode observar, existe uma inversão na distribuição dos pontos entre os gráfico de nível de expressão e de metilação. Isso sugere que a expressão de *PLCG2* é regulada por metilação desses sítios diferencialmente metilados. Nesse sentido, avaliamos se essa relação inversa poderia ter significância estatística. Para tanto, as 30 amostras de TW e as 11 amostras de RM foram avaliadas juntamente, divididas em 3 grupos de 13 ou 14 amostras cada pelo P33 e P66 da somatória do nível de

metilação dos sítios diferencialmente metilados. Os valores do P33 e P66 são respectivamente 170,84 e 258,30 (em porcentagem de metilação). Assim o primeiro grupo foi definido como aquele com valores de metilação menor que 170,84, o segundo grupo, como aquele com valores de metilação entre 170,84 e 258,30 e o terceiro grupo, aquele com valores de metilação maiores que 258,30. O primeiro grupo apresenta, então, os menores níveis de metilação, o terceiro apresenta os maiores e o segundo apresenta os valores intermediários.

Foi observada diferença estatisticamente significativa ($P = 0,0004$) entre os parâmetros avaliados, e que a diferença se encontra entre o grupo 1 (menor nível de metilação) e o grupo 3 (maior nível de metilação), com $P < 0,001$ (Figura 18).

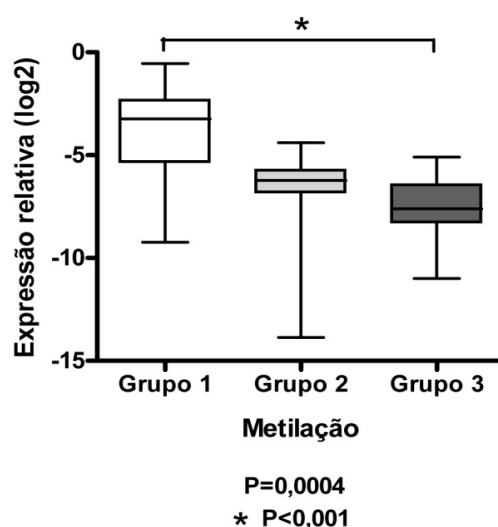


Figura 18 - Nível de expressão do gene *PLCG2* nos grupos 1, 2 e 3 de metilação. Box plot com a distribuição dos valores de expressão relativa (eixo Y) das 30 amostras de TW e 11 de RM divididas em três grupos (1, 2 e 3) pelos percentis P33 e P66 dos valores de somatória de metilação dos 8 sítios CpG diferencialmente metilados (eixo X). $P = 0,0004$ corresponde ao teste de Kruskal-Wallis e $P < 0,001$ corresponde ao teste *post hoc*. O asterisco indica que entre os grupos 1 e 3 houve diferença estatisticamente significativa $P < 0,001$ – *post hoc* de Dunnett).

Observado que há diferença estatisticamente significativa entre o terço das amostras com maior nível de metilação e o terço com menor nível de metilação, e que essa diferença se dá no sentido do terço menos metilado das amostras ter nível de expressão maior que o terço mais metilado, pode-se dizer que existe, então, uma associação inversa entre o nível de metilação desses oito sítios CpG e expressão de *PLCG2*, e que a metilação desses sítios está ao menos parcialmente envolvida na regulação dessa expressão.

Confirmando a diferença observada, o teste de correlação mostrou uma correlação inversa regular e significativa entre o nível de metilação e de expressão ($r_s = -0,58$, $P < 0,0001$) (Figura 19).

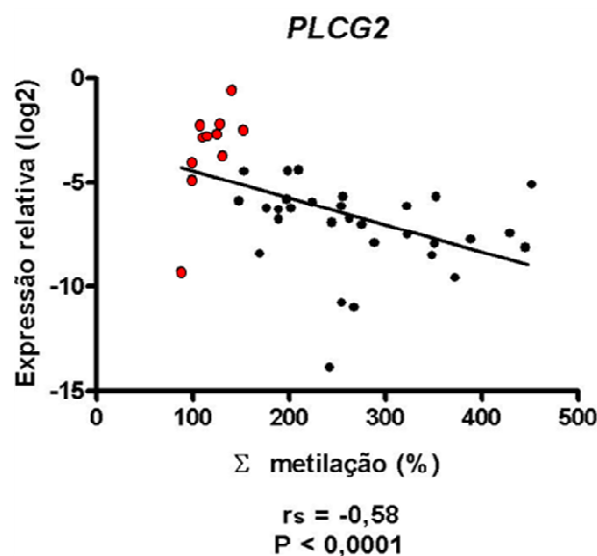


Figura 19 – Correlação entre o nível de expressão e de metilação de *PLCG2*. Expressão relativa (log2) representa a expressão de *PLCG2* relativa aos genes normalizadores *GAPDH* e *ACTB*. Σ metilação (%) representa a somatória das leituras de metilação dos oito sítios diferencialmente metilados nas amostras. Cada ponto preto no gráfico representa cada uma das 30 amostras de tumor de Wilms e cada ponto vermelho representa cada uma das 11 amostras de rim normal maduro em que no eixo Y é dado seu valor de expressão de *PLCG2* e no eixo X é dado o nível de metilação. r_s representa o coeficiente de Spearman. P: pvalor pelo teste de correlação de Spearman. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos

4.6 ASSOCIAÇÃO DO NÍVEL DE METILAÇÃO E DADO CLÍNICO.

Avaliamos também a ocorrência de associação entre o nível de metilação e recaída até 3 anos após o tratamento, tornando-a uma variável numérica temporal em categórica nominal (recaiu ou não recaiu). Para essas análises iniciais foram consideradas 52 amostras de TW, das quais 18 apresentaram recaída no período. Os percentis P50, P33 e P66 que dividiram as amostras para as análises foram, respectivamente, 254,08; 208,45 e 283,68.

Conforme pode ser observado na Figura 20A e 20B, a divisão respectivamente, em dois e três grupos, não revelou associação entre o nível de metilação e recaída do tumor.

Diante disso, em uma segunda análise, pra determinar se o nível de metilação seria um marcador para recaída em amostras de TW sem LOH 16q e/ou 1p, selecionamos apenas as amostras que não apresentavam LOH de 16q (40 amostras das quais 11 são de pacientes que recaíram) e, em paralelo, aquelas que não apresentavam LOH nem de 1p nem de 16q (38 amostras das quais 11 são de pacientes que recaíram), uma vez que essas características já vêm sendo utilizadas na clínica, mas são pouco sensíveis para a detecção de recaída. A divisão das amostras se deu pela mediana (P50, ambas iguais a 252,80) do nível de metilação separando-as em dois grupos com o mesmo número de amostra. Da mesma forma, essa análise não revelou associação entre metilação e recaída (figuras 15C a E). Os gráficos de todas essas análises são apresentados na Figura 15.

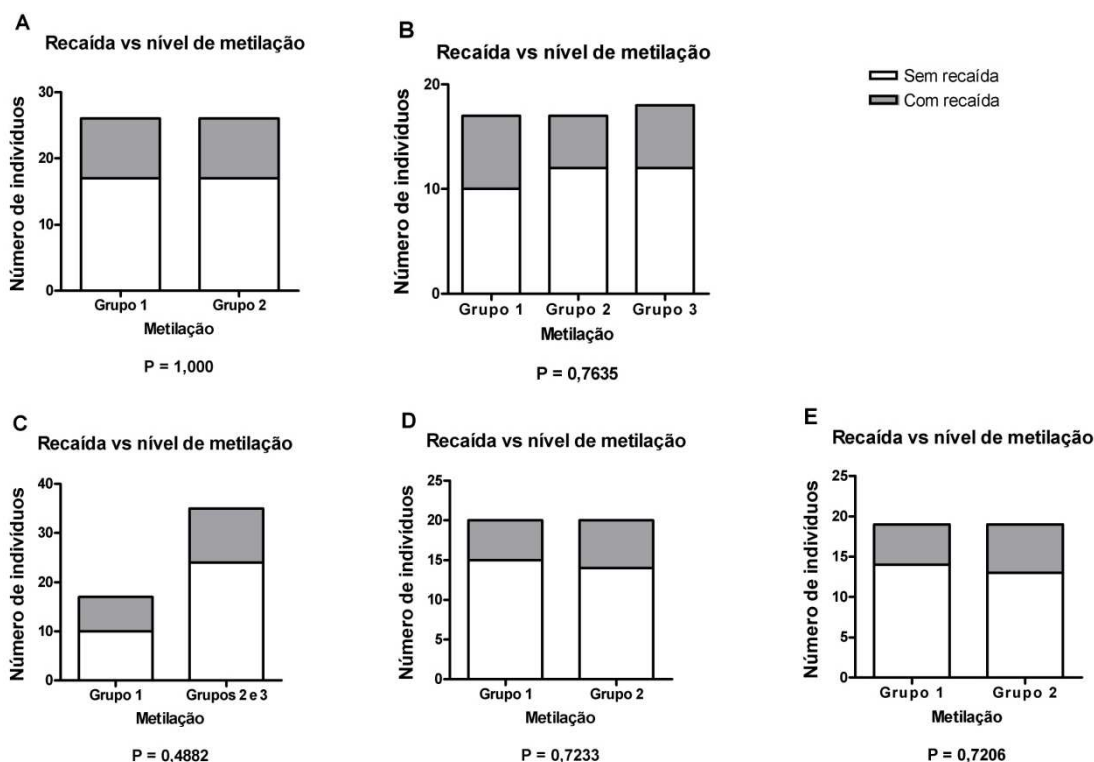


Figura 20 – Associação entre nível de metilação e recaída. Gráficos de barras do confronto de duas variáveis. No eixo Y são dados os números de indivíduo (amostras) que recaíram (cinza) e que não recaíram (branco). No eixo X são dados os grupos de divisão das amostras pelo nível de metilação. A: Todas amostras são divididas em dois grupos pela mediana do nível de metilação. B: Todas as amostras são divididas em três grupos pelos tercís P33 e P66 do nível de metilação. C; O grupo 1 do gráfico B é comparado aos grupos 2 e 3 juntamente. D: As amostras que não apresentaram perda de heterozigose (LOH) de 16q foram divididas em dois grupos pela mediana do nível de metilação. E: As amostras que não apresentaram perda de 1p e/ou 16q foram divididas em dois grupos pela mediana no nível de metilação. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos

Na Tabela 13 são dados os dados clínicos dos pacientes do estudo.

Tabela 13 - Dados clínicos e de metilação das amostras de TW

Amostra	LOH 1p/16q	Estadio	Recaída	Metilação
TW 01	não/não	III	não	223,64
TW 02	não/não	III	sim	388,54
TW 03	não/não	IV	não	241,25
TW 04	não/sim	III	não	391,49
TW 05	não/não	III	não	197,27
TW 06	não/não	IV	sim	213,77
TW 07	não/não	III	sim	201,60
TW 08	não/não	IV	não	188,72
TW 09	não/não	III	sim	253,93
TW 10	não/não	III	sim	445,10
TW 11	não/não	III	não	251,67
TW 12	não/não	II	sim	266,97
TW 13	não/sim	IV	não	183,90
TW 14	não/não	IV	não	386,70
TW 15	não/não	II	sim	160,15
TW 17	não/não	IV	sim	169,41
TW 18	não/não	III	não	255,67
TW 19	não/sim	III	sim	273,64
TW 20	não/não	IV	sim	376,97
TW 23	não/não	II	sim	181,32
TW 24	não/não	IV	não	259,90
TW 25	não/sim	II	sim	332,09
TW 26	não/sim	III	sim	182,96
TW 27	não/não	IV	não	274,93
TW 28	não/não	III	não	188,82
TW 29	não/não	IV	não	244,03
TW 30	não/não	IV	não	181,62
TW 31	sim/não	III	não	198,41
TW 32	não/não	III	não	343,64
TW 34	não/sim	II	sim	168,46
TW 35	não/não	IV	não	147,77
TW 36	não/não	III	não	451,43
TW 37	não/não	IV	não	352,42
TW 38	sim/sim	III	sim	203,39
TW 39	não/não	IV	não	429,10
TW 40	não/não	III	não	375,71
TW 41	não/não	III	não	170,15
TW 42	não/não	III	não	176,58
TW 43	não/não	III	não	322,31
TW 44	não/sim	IV	não	152,85
TW 46	sim/sim	III	sim	288,19
TW 47	não/não	III	não	242,22
TW 48	não/não	IV	não	227,92
TW 49	não/não	III	não	209,49
TW 50	sim/não	III	não	348,02
TW 51	não/não	IV	não	372,04
TW 52	não/não	III	não	262,24
TW 54	não/não	III	não	260,43
TW 55	não/não	III	sim	254,22

Tabela contendo os valores de metilação e dados de perda de heterozigose (LOH) para 1p/16q, estadio e recaída para as amostras de TW com as informações disponíveis. TW representa as amostras de tumor de Wilms. LOH para 1p/16q representa a perda ou não das regiões citadas em que “sim” significa que houve perda da região e “não” significa que não houve perda da região. Essa informação é dada pra cada amostra na sequência para 1p à esquerda e para 16q à direita separadas pela barra. 1p: braço curto do cromossomo 1p; 16q: braço longo do cromossomo 16; II, III e IV: estadios dos tumores ao diagnóstico da doença; Na coluna Recaída, “não” significa que o paciente não apresentou recaída e “sim” significa que o paciente apresentou recaída, onde recaída significa recaída do tumor em até três anos após o tratamento. Metilação é dada pela somatória das medidas de metilação dos oito sítios CpG diferencialmente metilados.

Vale observar que a casuística desse trabalho estava enriquecida para os estadios mais avançados, mais propensos a recaída, havendo poucos representantes do estadio II e nenhum do estadio I. Diante disso, a inclusão de representantes desses estadios permitiria uma melhor visualização da relação entre o nível de metilação nos diferentes estadios. Caso fosse observado menor nível de metilação nos estadios iniciais, poderia haver uma melhor distinção na frequência de recaída entre os grupos mais e menos metilados, a qual não foi possível observar na casuística utilizada.

5 DISCUSSÃO

O gene *PLCG2* é um gene ainda pouco estudado e não existem estudos na literatura que investiguem o papel da metilação no controle da sua expressão. Esse gene foi recentemente associado com a tumorigênese do tumor de Wilms, em um estudo do nosso grupo (MASCHIETTO et al. 2008), que mostrou diminuição/ausência de expressão do gene na maioria dos casos de TW e ausência nos rins fetais até 18 semanas de idade, diferentemente dos rins maduros, sugerindo que a modulação da expressão de *PLCG2* é um evento importante tanto nos diferentes estágios da nefrogênese, em que a proteína se mostra altamente regulada, quanto no aparecimento do TW, sendo um evento precoce e altamente frequente nessa neoplasia. Esse dado aliado à frequência de LOH do 16q, que contém o *locus* do *PLCG2* (16q24.1), em aproximadamente 20% dos casos de TW e que é um evento associado com aumento do risco de recaída e óbito em pacientes com tumor de Wilms, torna esse gene de grande interesse para ser estudado no contexto dessa doença.

Corroborando esses dados, no atual estudo, as amostras de rim normal maduro apresentaram expressão de RNAm de *PLCG2* 13,3 vezes maior do que as amostras de TW enriquecidas para blastema ($P < 0,0001$) e a ausência de expressão em rins fetais foi representada em reações de qRT-PCR em linhagem renal embrionária humana normal (HEK293), a qual passou a expressar o RNAm de *PLCG2* ao ser tratada com o agente

desmetilante 5-azadC ($P < 0,0001$). Tal linhagem representa o desenvolvimento renal embrionário, que conforme o esperado e de acordo com MASCHIETTO et al (2008), não expressa o *PLCG2* em condições normais, mas passa a expressar ao sofrer desmetilação do seu DNA. Isso sugere que o gene tem sua expressão regulada por metilação e que um potencial alvo de estudo é a sua região promotora.

Diante disso, fez-se necessário realizar um mapeamento do perfil de metilação na linhagem estudada, para determinar os sítios possivelmente envolvidos nessa regulação por metilação, para então, investigar de forma direcionada os sítios candidatos em amostras de TW. O mapeamento de uma região de 1.815pb contendo duas CGIs localizadas na região promotora, 1º éxon e 1º íntron do gene *PLCG2* selecionou 15 sítios CpG metilados em amostras controle, que perdiam consideravelmente a metilação mediante tratamento com bissulfito, mostrando-se candidatos a reguladores da expressão do gene.

O rastreamento por pirosequenciamento do nível de metilação de 11 desses sítios em amostras de TW e RM indicou que oito apresentaram-se diferencialmente metilados quando comparadas as amostras de TW às amostras de RM ($P < 0,05$), sendo que sete apresentavam-se mais metilados nas amostras de TW, e um deles apresentou uma diminuição muito pequena nas amostras de TW.

Diante disso, pudemos observar que existe uma relação inversa entre a expressão relativa de *PLCG2* e o nível de metilação dos oito sítios diferencialmente metilados. Essa inversão foi confirmada por uma ANOVA

de Kruskal-Wallis ($P = 0,0004$), cujo teste *post-hoc* revelou que a diferença se encontra, quando comparamos o nível de expressão, entre o grupo menos e o grupo mais metilado do conjunto de todas as amostras.

Foi realizado então teste estatístico de correlação de Spearman, que mostrou haver correlação inversa regular e significativa entre o nível de expressão e metilação de *PLCG2* ($r_s = -0,58$, $P < 0,0001$), fornecendo indícios do possível papel da metilação desses sítios no controle da expressão do *PLCG2*. Isso sugere fortemente que o *PLCG2* seja importante para a tumorigênese, uma vez que sua expressão (dados obtidos com a linhagem HEK293) está de acordo com o esperado nas fases iniciais do desenvolvimento e que tanto a metilação quanto a expressão do gene no tumor recapitulam essas fases iniciais, com ambos os padrões de expressão e metilação inversos aos do rim normal maduro.

No entanto, a investigação do nível de metilação em amostras de rim fetal poderia fornecer um importante reforço a essa hipótese, na medida em que fosse identificado um padrão de perda de metilação desses sítios ao longo da diferenciação normal do rim, que pudesse explicar a expressão protéica e transcricional crescente de *PLCG2* nesse período.

Valeria também avaliar o nível de expressão e metilação de *PLCG2* nos outros dois componentes, uma vez que também mostraram ausência da expressão protéica de *PLCG2*. Isso seria na tentativa de observar se a ausência de expressão nesses componentes estaria também associada com a hipermetilação.

Por outro lado, é importante sempre ter em mente a interação entre os fatores epigenéticos, uma vez que o resultado observado é sempre a soma de suas interações, e os muitos mecanismos de *feedback* positivo e negativo (PORTELA e ESTELLER 2010). Isso de certa forma explicaria a correlação inversa regular ($r_s = -0,58$) observada neste estudo. Por outro lado, uma vez que a hipermetilação geralmente leva à inativação estável da expressão gênica, acredita-se que ela seja menos reversível que modificações de histonas alteradas e, portanto, a alteração epigenética considerada chave para o silenciamento de genes a longo prazo (KALARI e PFEIFER 2010).

Ademais, não foi observada associação entre nível de metilação desses sítios diferencialmente metilados e frequência de recaída na casuística desse trabalho, que é enriquecida para os estadios III e IV, o que indica que o nível de metilação não é um marcador de recaída entre amostras de estadios mais avançados.

Em suma, pudemos observar que a expressão do RNAm do gene *PLCG2* é regulada, pelo menos parcialmente, via metilação do DNA e que oito sítios CpG localizados no início do primeiro íntron, ao final de uma CGI, são fortes candidatos a moduladores da expressão do gene no rim humano normal e em tumor de Wilms e que essa modulação pode ser um evento chave para o desencadeamento do tumor de Wilms.

Os achados desse trabalho foram alcançados, em parte, pelo delineamento experimental objetivo e original que adotamos, o qual nos permitiu resumir uma busca extensa, que é a avaliação da metilação do DNA de uma região promotora, aos sítios mais provavelmente envolvidos na

regulação transcricional de um gene, por sequenciamento capilar, e então dedicar a esses sítios selecionados a análise quantitativa almejada. Essa abordagem possibilita a economia de recursos ao passo que destina a complexidade da análise quantitativa a um número reduzido de sítios CpG ao invés de aplicá-la a uma região extensa inteira.

Outros métodos são também utilizados para análise de regiões específicas de genes individualmente. A maioria necessita do tratamento prévio do DNA com bissulfito de sódio, que permite a fixação o código da metilação na sequência de bases do DNA.

Para citar alguns exemplos e seus princípios de forma resumida além dos dois métodos usados neste trabalho (sequenciamento direto em sequenciador capilar, do DNA tratado com bissulfito de sódio e pirosequenciamento) temos bissulfito sequenciamento, MSP-PCR, MethyLight, COBRA, MS-SnuPE, MS-CA, MS-HRM, SMART-MSP, entre outros.

O bisulfito sequenciamento consiste na amplificação do fragmento de interesse com iniciadores que pareiam em regiões livres de CpG e clonagem para isolamento de moléculas individuais. O sequenciamento de vários clones fornecerá um perfil aproximado do nível de metilação da região estudada sendo, portanto um método não quantitativo. Esse método já foi bastante utilizado na literatura, mas por ser muito laborioso e implicar numa série longa e demorada de experimentos, já não é mais a preferência nos estudo de metilação. Por outro lado, o sequenciamento direto sem clonagem, realizado no atual trabalho, fornece uma estimativa do nível de

metilação da população de moléculas para cada sítio CpG (FROMMER et al. 1992) de forma mais rápida.

O MSP-PCR (*Methylation-Specific PCR*) consiste no desenho de iniciadores que pareiam em regiões contendo sítios CpG, de forma que um par de iniciadores anelará no DNA quando os sítios em questão estiverem metilados e o outro quando estiverem não metilados (HERMAN et al. 1996). Essa análise não deve ser usada para análise de regiões de perfil de metilação desconhecido, uma vez que é direcionada a poucos sítios CpG e não informa o nível de metilação individual dos sítios pesquisados por estarem contidos na sequência dos iniciadores, apenas restringindo a amplificação do fragmento de acordo com o nível de metilação do material, de forma não quantitativa. Possui, no entanto, grande sensibilidade na detecção da metilação.

O *MethyLight* é uma versão do MSP-PCR que permite a detecção da metilação em tempo real de forma quantitativa, pela introdução de sondas fluorescentes específica para sítios metilados e não metilados, que são hidrolisadas mediante a incorporação na fita em extensão, e também é um método utilizado para análise de poucos sítios CpG (EADS et al. 2000).

O COBRA (*Combined Bisulfite Restriction Analysis*) consiste tratamento do DNA com bissulfito de sódio e amplicação em PCR, seguida de digestão com enzimas de restrição capazes de distinguir entre o sítio metilado e inalterado pelo bissulfito e o sítio não metilado que foi convertido pelo bissulfito, seguidas de separação do produto em gel de agarose

hibridação quantitativa, apresentando sensibilidade média (XIONG e LAIRD 1997).

O MS-SnuPE (*Methylation-Sensitive Single-Nucleotide Primer Extension*) consiste na amplificação de um fragmento do DNA com iniciadores que pareiam em regiões livres de CpG para isolamento do fragmento que contém o sítio de interesse em eletroforese em gel. Esse fragmento é então submetido a nova PCR com iniciador interno que iniciará a extensão exatamente no sítio analisado pela incorporação de dCTP radioativamente marcado ou de dTTP normal, e são necessário tantos iniciadores quantos forem os sítios CpG a serem analisados. A análise é feita em gel de poliacrilamida para visualização da proporção relativa dos dois nucleotídeos (GONZALGO e JONES 1997) de forma quantitativa e tem a desvantagem de utilizar material radioativo.

O MS-MCA (*Methylation-Sensitive Curve Analysis*) permite a identificação do nível de metilação de uma região de acordo com a proporção dos sítios CpG que estiverem metilados, em função do tratamento com bissulfito de sódio que mantém as citosinas metiladas e converte em timina as citosinas não metiladas, ao passo que na fita estendida em PCR as posições de sítio CpG com citosina apresentam ligação com guanina que é mais forte que as posições de sítios CpG com timina que se ligam com adenina. Dessa forma, quanto mais metilados estiverem os sítios, maior será a proporção de citosinas mantidas e maior será a temperatura de denaturação da dupla fita amplificada em reações de PCR. Essa reação utiliza iniciadores que pareiam em regiões livres de CpG e ocorre na

presença de marcador fluorescente que intercala no DNA dupla fita e acusará quando (em que temperatura) a dupla fita denaturou, indicando indiretamente o nível de metilação do fragmento (WORM et al. 2001).

Já o MS-HRM (*Methylation-Sensitive High-Resolution Melting*) permite a análise de mais sítios seguindo o mesmo princípio do MS-MCA e de forma mais sensível (WITTWER et al. 2003), mas ambos continuam sendo métodos não quantitativos.

O SMART-MSP (*Sensitive Melting Analysis after Real Time-Methylation-Specific PCR*) faz uso da tecnologia do MS-HRM utilizando marcadores fluorescentes que intercalam DNA dupla fita para uma análise quantitativa, e iniciadores que pareiam em regiões contendo sítios CpG de forma a favorecer a amplificação de fitas com padrão pouco representado dentro da população, com a finalidade p.ex. de detectar níveis de metilação tão baixos quanto 0,1%, sendo, portanto um método bastante sensível. Pode ser usado também para a identificação de resultados falso-positivos e de conversão incompleta do DNA por bissulfito de sódio (KRISTENSEN et al. 2008).

Os métodos para investigação em pequena escala são muitos, alguns deles são até mesmo compatíveis com análise em grande escala. Muitas são, também, as razões para os *loci* metilados associados com câncer serem usados como biomarcadores, dentre elas o fato da molécula de DNA ser facilmente isolada de tecidos e fluidos corporais, de poder ser isolada de tecidos emblocados em parafina e pelo fato do sinal a ser detectado ser

positivo, ao contrário do que ocorre com deleções ou mudanças de expressão (COTTRELL e LAIRD 2003).

Dentre todos os métodos disponíveis, o sequenciamento direto do DNA tratado com bissulfito de sódio se mostrou a melhor opção para obtenção de um perfil aproximado da metilação de sítios individuais e seleção de sítios candidatos, enquanto que a quantificação da metilação nesses sítios selecionados foi satisfatoriamente obtida pelo pirosequenciamento, mostrando assim, que o delineamento experimental deste trabalho lançou mão de uma combinação de duas metodologias de forma eficiente e adequada à proposta inicial, e é uma das melhores estratégias para estudos como este.

Muito do que se sabe atualmente sobre a importância da metilação do DNA no câncer foi obtido por estudos que lançaram mão de diversos métodos em pequena escala, incluindo os citados acima, para a investigação de genes únicos potencialmente candidatos, pela análise dos promotores gênicos, em diversos tipos de tumor. A escolha dos alvos de metilação a serem analisados nos numerosos estudos de genes únicos frequentemente se baseia em conhecimento pré-existente de uma função presumida de um gene em particular ou membro de uma família, como é o caso do *PLCG2* no nosso estudo, ou resultado de alguma descoberta mais ou menos ao acaso de algum evento de metilação em particular. Na maioria dos casos é a região de CGI co-localizada com a extremidade 5' dos genes ou região promotora a escolhida para a análise (KALARI e PFEIFER 2010).

O foco inicial dos estudos sobre a metilação do DNA em tumores se concentrou na questão do silenciamento induzido por metilação de genes sabidamente supressores tumorais (KALARI e PFEIFER 2010). Durante a tumorigênese, ambos os alelos de um gene supressor tumoral precisam ser inativados. Isso ocorre por deleções ou perda de função por mutações afetando a sequência codificante dos genes. Alternativamente, a hipermetilação de CGIs ao longo de regiões promotoras de genes supressores de tumor (p.ex. *RB*, *CDKN2*, *VHL*, *APC*, *MLH1*, *RASSF1A* e *BRCA1*) pode levar ao silenciamento gênico e assim, consistir num mecanismo para a tumorigênese equivalente à perda de gene ou mutação (ISSA 1999; COSTELLO et al. 2000; Dammann et al. 2000; JONES e BAYLIN 2002; HERMAN e BAYLIN 2003; NEPHEW e HUANG 2003).

No entanto, muitos dos eventos de metilação ocorrem em genes já silenciados no tecido normal correspondente do qual o tumor se origina (SONG et al. 2002; HAHN et al. 2008; TAKESHIMA et al. 2009). Nesse sentido, estudos de expressão em tumor e tecido normal bem como experimentos de reativação com 5-azadC em linhagens celulares são abordagens padrão para investigar essas questões.

Essa abordagem foi realizada no atual trabalho e mostrou que, de fato, o gene *PLCG2* está silenciado numa linhagem representante das fases iniciais do desenvolvimento e que é reativado mediante desmetilação de sua região promotora. Assim, sua investigação foi devidamente embasada e adequada ao propósito, tendo-se em vista o padrão de expressão de *PLCG2* observado durante o desenvolvimento e no tumor de Wilms. No entanto,

para fornecer evidências mais definidas para o papel causador de um gene silenciado por metilação no câncer, modelos de camundongo *in vivo* empregando modulação direcionada de tal gene são necessários (KALARI e PFEIFER 2010).

Há ainda, evidências de que a metilação de regiões adjacentes pode promover a repressão transcricional de genes não metilados (HSIEH 1997; JONES et al. 1998; NAN et al. 1998; KALUDOV e WOLFFE 2000; CURRADI et al. 2002), o que sugere que uma conformação mais fechada da cromatina em regiões extensas densamente metiladas pode dificultar o acesso de fatores de transcrição a genes contidos nessa região mesmo que estes estejam não metilados. Um estudo ainda demonstrou que o silenciamento por metilação de regiões adjacentes fora da unidade transcricional pode ser potencializado quando houver metilação dentro da unidade transcricional (IRVINE et al. 2002). Esse poderia ser o caso do gene do atual estudo, para o qual foi observada uma correlação inversa e regular entre seu nível de metilação e expressão. Ou seja, uma investigação mais abrangente das regiões adjacentes poderia revelar uma alta densidade de metilação, que associada com a metilação dos sítios identificados, poderia revelar uma correlação mais forte, reforçando as evidências de que a expressão desse gene é regulada por metilação, e que a metilação desses sítios identificados no atual estudo talvez permitisse a identificação desse fenômeno em TW.

Análises que permitissem a investigação de modificações de histonas também auxiliariam na identificação da ocorrência, nessa região, de enriquecimento para modificações associadas a formação de

heterocromatina como, por exemplo, desacetilação de histonas e metilação de lisina 9 e 27 da histona H3 e do resíduo de lisina 20 da histona H4, acompanhada da presença do repressor transcricional HP1. Isso fortaleceria as evidências de controle epigenético da expressão de *PLCG2*.

Outra análise importante é a pesquisa de sequências consenso na região promotora de genes, como foi feito por KANG et al (1996) que clonaram 1.5kb da região promotora do *PLCG2* e observaram que não há a sequência consenso TATA *box* nessa região, mas que há sítios consenso para ligação de Sp1, NF1, AP2, SRE, EBF e CACCC *box*. Os sítios consenso para ligação de Sp1 em geral são sequências ricas em CG nas quais o Sp1 se liga com alta afinidade, podendo regular a expressão de genes contendo ou não o TATA *box*, pela interação com outros fatores de transcrição e/ou componentes da maquinaria transcricional basal (para revisão TAN e KHACHIGIAN 2009).

Nesse sentido, diversos estudos relatam a importância da ligação desse fator ao seu sítio para a ativação transcricional, como para o gene *COL1A2* [colágeno humano $\alpha 2(I)$] em fibroblastos humanos (TAMAKI et al. 1995), para o gene 5-LO (codifica para 5-lipoxigenase) em monócitos humanos, entre outros. Em todos eles, a perda da capacidade de ligação do Sp1 ao seu sítio foi capaz de promover a repressão transcricional. Por outro lado, alguns estudos mostram que a metilação no sítio consenso Sp1 não influencia a ligação do fator (ZHU et al. 2003; HARRINGTON et al. 1988) e sim a metilação fora dos CG boxes que reduzem significativamente a sua

ligação levando à repressão da expressão do gene (ZHU et al. 2003; DOUET et al. 2007).

Conforme observado por KANG et al (1996), uma pesquisa com auxílio do software TESS (*Transcription Element Search System*-<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>) da região analisada a montante do gene *PLCG2* no atual estudo, relevou sítios de ligação pra Sp1, NF1, AP2, E2F-p107 dentre outros. E dos sítios de ligação para fatores de transcrição nos quais residiam os sítios CpG diferencialmente metilados, destacaram-se 10 sítios para Sp1 co-localizados com 3 sítios mais metilados em TW, sugerindo a esse fator um papel regulatório na expressão de *PLCG2* e reforçando a importância da metilação do DNA na sua região promotora. No entanto, no delineamento experimental deste estudo, não é capaz de determinar qual a influência desse sítio e de sua metilação na expressão de *PLCG2*.

Ademais, o *PLCG2* está envolvido na sinalização Wnt pelo braço Wnt/ Ca^{2+} , mediante ativação da proteína *Frizzled* que leva à ativação do *PLCG2* promovendo a liberação do Ca^{2+} , liberação esta envolvida em diversos processos do desenvolvimento. Além disso, a via Wnt é crítica para a indução da MET, transição esta que se apresenta interrompida no TW, levando-o a apresentar características que recapitulam os estágios iniciais da nefrogênese. O aumento da expressão de *PLCG2* observado durante a diferenciação sinaliza como um evento importante para a constituição de um rim funcional e sua repressão observada no TW pode estar envolvida na

inibição da diferenciação e desencadeamento da neoplasia (MASCHIETTO et al. 2008).

Dessa forma, a importância do fenômeno de metilação visto nesse trabalho ressalta a relevância do gene e reforça um potencial papel do *PLCG2* no desenvolvimento do rim e tumorigênese de Wilms, em que a manutenção do silenciamento por metilação pode consistir num dos eventos que levam à interrupção da diferenciação.

6 CONCLUSÕES

1. A metodologia e o delineamento experimental de realizar um mapeamento prévio dos sítios candidatos em linhagem celular com sequenciamento capilar seguido de rastreamento do nível de metilação de tais sítios de forma direcionada por pirosequenciamento, utilizados no estudo mostraram-se eficientes e adequados à proposta do estudo
2. O gene *PLCG2* teve sua expressão reativada pelo agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina na linhagem HEK293, sugerindo que sua expressão seja regulada por metilação do DNA
3. Foram identificados 8 sítios CpG potencialmente envolvidos na regulação da expressão de *PLCG2* (+608, +700 +707, +735, +769, +777, +829, +853), dos quais 7 mostraram-se mais metilados nas amostras de TW do que na de RM (+700 +707, +735, +769, +777, +829, +853).
4. O nível de metilação desses sítios diferencialmente metilados mostrou correlação inversa em relação à expressão relativa do gene *PLCG2*, indicando que esse processo é pelo menos parcialmente responsável pela regulação da transcrição do gene.
5. Não houve associação entre frequência de recaída em amostras enriquecidas para os estadios III e IV e nível de metilação desses sítios diferencialmente metilados dividido pela mediana.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, et al. Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. **Oncogene** 2006;25:4116-21.

Almeida LG, Sakabe NJ, deOliveira AR et al. CTdatabase: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens. **Nucleic Acids Res** 2009; 37:D816–D819.

Antequera F and Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1993;90:11995-9.

Antequera F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. **Cell Mol Life Sci** 2003; 60:1647-58.

Bachman KE, Park BH, Rhee I et al. Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. **Cancer Cell** 2003; 3:89-95.

Barski A, Cuddapah S, Cui K et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. **Cell** 2007; 129:823–37.

Beckwith JB, Kiviat NB, Bonadio JF: Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' tumor. **Pediatr Pathol** 1990; 10:1-36.

Berdasco M and Esteller M. Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. **Developmental Cell** 2010; 19:698-711.

Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. **Nat Struct Mol Biol** 2007; 14:1008-16.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev** 2002; 16:6–21.

Bock C and Lengauer T. Computational epigenetics. **Bioinformatics** 2008; 24:1-10.

Bordoni R, Bonnal R, Rizzi E et al. Evaluation of human gene variant detection in amplicon pools by the GS-FLX parallel Pyrosequencer. **BMC Genomics** 2008; 9:464.

Boyes J and Bird AP. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. **Cell** 1991; 64:1123-34.

Breslow N, Olshan A, Beckwith JB, et al. Epidemiology of Wilms tumor. **Med Pediatr Oncol** 1993; 21:172-81.

Brodeur AE and Brodeur GM. Abdominal masses in children: neuroblastoma, Wilms' tumor, and other considerations. **Pediatr Rev** 1991; 12:196-206.

Caiafa P and Zampieri M. DNA methylation and chromatin structure: the puzzling CpG islands. **J. Cell. Biochem** 2005; 94:257–65.

Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-typespecific patterns. **Nat Genet** 2000; 24:132-8.

Costello JF and Plass C. Methylation matters. **J Med Genet** 2001; 38:285-303.

Cottrell SE and Laird PW. Sensitive detection of DNA methylation. **Ann N Y Acad Sci** 2003; 983:120-30.

Curradi M, Izzo A, Badaracco G, Landsberger N. Molecular Mechanisms of Gene Silencing Mediated by DNA Methylation. **Mol Cell Biol** 2002; 22:3157-73.

Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. **Nat Genet** 2000; 25:315-9.

Davalos V and Esteller M. MicroRNAs and cancer epigenetics: a macrorevolution. **Curr Opin Oncol** 2010; 22:35-45.

Davidoff AM. Wilm's Tumor. **Curr Opin Pediatr** 2009; 21:357-64.

De Calisto J, Araya C, Marchant L, Riaz CF, Mayor R. Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. **Development** 2005; 132:2587-97.

De Camargo B, de Andrea ML, Franco EL. Catching up with history: treatment of Wilms' tumor in a developing country. **Med Pediatr Oncol** 1987; 15:270-6.

De Camargo B, Felipe CFP, Noronha CP, et al. **Câncer na criança e no adolescente no Brasil – dados dos Registros de Base Populacional e de Mortalidade**. Rio de Janeiro; Gráfica Esdeva; 2008. Introdução; p.19.

De Smet C, Lurquin C, Lethe B, Martelange V, Boon T. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. **Mol Cell Biol** 1999; 19:7327-35.

Dehner LP. The evolution of the diagnosis and understanding of primitive and embryonic neoplasms in children: living through an epoch. **Mod Pathol** 1998; 11:669-85.

Denekamp J. Changes in the rate of repopulation during multifraction irradiation of mouse skin. **Br J Radiol** 1973; 46:381-7.

Dome JS and Coppes MJ. Recent advances in Wilms tumor genetics. **Curr Opin Pediatr** 2002; 14:5-11.

Dome JS, Perlman EJ, Ritchey ML, et al. Renal tumors. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. **Pediatric oncology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p.905-32.

Douet V, Heller MB, Le Saux O. DNA methylation and Sp1 binding determine the tissue-specific transcriptional activity of the mouse Abcc6 promoter. **Biochem Biophys Res Commun** 2007; 354:66-71.

Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF. Rates of spontaneous mutation. **Genetics** 1998; 148:1667-86.

Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. MethyLight: a highthroughput assay to measure DNA methylation. **Nucleic Acids Res** 2000; 28:E32.

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

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

Esteller, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nat Rev Genet** 2007a;8:286-98.

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

Esteller, M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. **Hum Mol Genet** 2007b; 16:R50-9.

Fan T, Schmidtman A, Xi S et al. DNA hypomethylation caused by Lsh deletion promotes erythroleukemia development. **Epigenetics** 2008; 3:134-42.

Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nat Rev Genet** 2006; 7:21-33.

Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:143-53.

Feltus FA, Lee EK, Costello JF, Plass C, Vertino PM. Predicting aberrant CpG island methylation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:12253-8.

Fraga MF and Esteller M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. **Trends Genet** 2007; 23:413-8.

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1992; 89:1827-31.

Gardiner-Garden M and Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. **J Mol Biol** 1987; 196:261-2.

Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. **Science** 2003; 300:489-92.

Geiman TM and Robertson KD. Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together? **J Cell Biochem** 2002; 87:117-25.

Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. **Nature** 1990; 343:774-8.

Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. **Science** 1985; 228:187-90.

Gonzalzo ML and Jones PA. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). **Nucleic Acids Res** 1997; 25:2529-31.

Grundy PE, Breslow NE, Li S, et al. Loss of heterozygosity for chromosomes 1p and 16q is an adverse prognostic factor in favorable-histology Wilms tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. **J Clin Oncol** 2005; 23:7312-21.

Grundy PE, Telzerow PE, Breslow N, Moksness J, Huff V, Paterson MC. Loss of heterozygosity for chromosomes 16q and 1p in Wilms' tumors predicts an adverse outcome. **Cancer Res** 1994; 54:2331-3.

Grundy RG, Pritchard J, Scambler P, et al.: Loss of heterozygosity on chromosome 16 in sporadic Wilms' tumor. **Br J Cancer** 1998; 78:1181-7.

Guedes TA, Acorsi CRL, Martins ABT, Janeiro V. **Estatística descritiva**. Aprender Fazendo estatística, p. 35, 2005. Disponível em: <URL:http://www.des.uem.br/downloads/arquivos/Estatistica_Descritiva.pdf>

Guil S and Esteller M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: Tying it all together. **Int J of Biochem & Cell Biol** 2009; 41:87-95.

Haber DA, Buckler AJ, Glaser T, et al. An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. **Cell** 1990; 61:1257-69.

Hahn MA, Hahn T, Lee DH, et al. Methylation of polycomb target genes in intestinal cancer is mediated by inflammation. **Cancer Res** 2008; 68:10280-9.

Harrington MA, Jones PA, Imagawa M, Karin M. Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor Sp1. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1988; 85:2066-70.

Harris TJ and Peifer M. Decisions, decisions: beta-catenin chooses between adhesion and transcription. **Trends Cell Biol** 2005; 15:234-7.

Hastie ND: The genetics of Wilms' tumor – a case of disrupted development. **Annu Rev Genet** 1994; 28:523–58.

Herman JG and Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. **N Engl J Med** 2003; 349:2042-54.

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:9821-6.

Hinoue T, Weisenberger DJ, Pan F, et al. Analysis of the association between CIMP and BRAF in colorectal cancer by DNA methylation profiling. **PLoS One** 2009; 4:e8357.

Hsieh C and Stability of Patch Methylation and Its Impact in Regions of Transcriptional Initiation and Elongation. **Mol Cell Biol** 1997; 17:5897-904.

Huang A, Campbell CE, Bonetta L, et al. Tissue, developmental, and tumor-specific expression of divergent transcripts in Wilms tumor. **Science** 1990; 250:991-4.

Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Carvalho B, et al. Comprehensive high-throughput arrays for relative methylation (CHARM). **Genome Res** 2008; 18:780-90.

Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. **Nat Genet** 2009; 41:178-86.

Irvine RA, Lin IG and Hsieh C. DNA Methylation Has a Local Effect on Transcription and Histone Acetylation, **Mol Cell Biol** 2002; 22:6689-96.

Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K. Regulation of lymphoid enhancer factor 1/T-cell factor by mitogen-activated protein kinase-related Nemo-like kinase-dependent phosphorylation in Wnt/beta-catenin signaling. **Mol Cell Biol** 2003; 23:1379-89.

Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, et al. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. **Nature** 1999; 399:798-802.

Issa JP. Aging, DNA methylation and cancer. **Crit Rev Oncol Hematol** 1999; 32:31-43.

Jiang C, Pugh BF. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. **Nat Rev Genet** 2009; 10:161-72

Jones AV, Kreil S, Zoi K, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. **Blood** 2005; 106:2162-8.

Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. **Cell** 2007; 128:683-92.

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

Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription **Nat Genet** 1998; 19:187-91.

Kalari S, Pfeifer GP. Identification of driver and passenger DNA methylation in cancer by epigenomic analysis. **Adv Genet** 2010; 70:277-308.

Kaludov N K and Wolffe AP. MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. **Nucleic Acids Res.** 2000; 28:1921-8.

Kambara T, Simms LA, Whitehall VL, et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. **Gut** 2004; 53:1137-44.

Kang JS, Kohlhuber F, Hug H, Marmé D, Eick D, Ueffing M. Cloning and functional analysis of the hematopoietic cell-specific phospholipase C-gamma-2 promoter. **FEBS Let** 1996; 399:14-20.

Kavanagh BD, Lin PS, Chen P, Schmidt-Ullrich RK. Radiation-induced enhanced proliferation of human squamous cancer cells in vitro: a release from inhibition by epidermal growth factor. **Clin Cancer Res** 1995; 1:1557-62.

Keshet I, Schlesinger Y, Farkash S, et al. I. Evidence for an instructive mechanism of de novo methylation in cancer cells. **Nat Genet** 2006;38:149-53.

Kimelman D, Xu W. beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. **Oncogene** 2006; 25:7482-91.

Kispert A, Vainio S, McMahon AP. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. **Development** 1998; 125:4225-34.

Kobor MS, Venkatasubrahmanyam S, Meneghini MD, et al. A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. **PLoS Biol** 2004; 2:e131.

Koesters R, Niggli F, von Knebel Doeberitz M, Stallmach T. Nuclear accumulation of beta-catenin protein in Wilms' tumours dagger. **J Pathol** 2003; 199:68-76.

Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A et al. Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. **Cancer Res** 1999; 59:3880-2.

Koga Y, Pelizzola M, Cheng E, et al. Genome-wide screen of promoter methylation identifies novel markers in melanoma. **Genome Res** 2009; 19:1462-70.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. **Cell** 2007; 128:693-705.

Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, et al. WT-1 is required for early kidney development. **Cell** 1993; 74:679-91.

Kremenevskaja N, von Wasielewski R, Rao AS, Schöfl C, Andersson T, Brabant G. Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma. **Oncogene** 2005; 24:2144-54.

Kristensen LS, Dobrovic A. Direct genotyping of single nucleotide polymorphisms in methyl metabolism genes using probe-free high-resolution melting analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2008; 17:1240-7.

Krogan NJ, Keogh MC, Datta N, et al. A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. **Mol Cell** 2003; 12:1565-76.

Kühl M. The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. **Front Biosci** 2004; 9:967-74.

Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature** 2001; 409:860-921.

Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, et al. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. **Cell** 1992; 69:905-14.

Li CM, Guo M, Borczuk A, et al. B: Gene expression in Wilms tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. **Am J Pathol** 2002; 160:2181-90.

Li W, Kessler P, Williams BR: Transcript profiling of Wilms tumors reveals connections to kidney morphogenesis and expression patterns associated with anaplasia. **Oncogene** 2005; 24:457-68.

Liang H, Chen Q, Coles AH et al. Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. **Cancer Cell** 2003; 4:349-60.

Little J. Introduction. In: Little J. **Epidemiology of childhood cancer**. Lyon: International Agency for Research on Cancer: World Health Organization; 1999. p.1-9. [IARC Scientific Publications, 149

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DCT method. **Methods** 2001; 25:402-8.

Logan CY and Nusse R: The Wnt signaling pathway in development and disease. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2004; 20:781-810.

Macleod D, Clark VH, Bird A. Absence of genome-wide changes in DNA methylation during development of the zebrafish. **Nat Genet** 1999; 23:139-40.

Maiti S, Alam R, Amos CI, Huff V. Frequent association of β -catenin and WT1 mutations in Wilms tumors. **Cancer Res** 2000; 60:6288-92.

Major MB, Camp ND, Berndt JD, et al. Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. **Science** 2007; 316:1043-6.

Mao D, Epple H, Uthgenannt B, Novack DV, Faccio R. J. PLCgamma2 regulates osteoclastogenesis via its interaction with ITAM proteins and GAB2. **Clin Invest** 2006; 116:2869-79.

Maschietto M, de Camargo B, Brentani H, et al. Molecular Profiling of Isolated Histological Components of Wilms Tumor Implicates a Common Role for the Wnt Signaling Pathway in Kidney and Tumor Development. **Oncology** 2008; 75:81-91.

Mashayekhi F, Ronaghi M. Analysis of Read-Length Limiting Factors in Pyrosequencing Chemistry. **Anal Biochem** 2007; 363:275-87.

Matsui T, Raya A, Kawakami Y, et al. Noncanonical Wnt signaling regulates midline convergence of organ primordia during zebrafish development. **Genes Dev** 2005; 19:164-75.

Maw MA, Grundy PE, Millow LJ, et al. A third Wilms' tumor locus on chromosome 16q. **Cancer Res** 1992; 52:3094-8.

McDonald JM, Douglass EC, Fisher R, et al.: Linkage of familial Wilms tumor predisposition to chromosome 19 and a two-locus model for the etiology of familial tumors. **Cancer Res** 1998; 58:1387-90.

Mierau GW, Beckwith JB, Weeks DA: Ultrastructure and histogenesis of the renal tumors of childhood: an overview. **Ultrastruct Pathol** 1987; 11:313-33.

Miyoshi, Y., Iwao, K., Nagasawa, Y., Aihara, T., Sasaki, Y., Imaoka, S., Murata, M., Shimano, T., and Nakamura, Y. Activation of the b-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. **Cancer Res** 1988; 58:2524-7.

Mizuguchi G, Shen X, Landry J, Wu WH, Sen S, Wu C. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. **Science** 2004; 303:343-8.

Monk M, Boubelik M, Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. **Development** 1987; 99:371-82.

Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. **Biotechniques** 1998; 24:954-8.

Nan X, Ng HH, Johnson CA et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. **Nature** 1998; 393:386-9.

Narasimhan S, Falkenberg VR, Khin MM, Rajeevan MS. Determination of quantitative and site-specific DNA methylation of perforin by pyrosequencing. **BMC Research Notes** 2009; 2:104.

Nephew KP, Huang TH. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. **Cancer Lett** 2003;190:125-33.

Nojima M, Suzuki H, Toyota M, et al. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. **Oncogene** 2007; 26:4699-713.

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell** 1999; 99:247–57.

Park WY, Hwang CI, Im CN, et al. Identification of radiation-specific responses from gene expression profile, **Oncogene** 2002; 21:8521-8.

Pastore G, Znaor A, Spreafico F, et al. Malignant renal tumours incidence and survival in European children (1978–1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project. **Eur J Cancer** 2006; 42:2103–14.

Patterson RL et al. Phospholipase C-gamma is required for agonist-induced Ca(2+) entry. **Cell** 2002; 111:529-41.

Pelletier J, Schalling M, Buckler AJ, Rogers A, Haber DA, Housman D. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. **Genes Dev** 1991; 5:1345-56.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res** 2001; 29:e45.

Polach KJ, Widom J. A model for the cooperative binding of eukaryotic regulatory proteins to nucleosomal target sites. **J Mol Biol** 1996; 258:800-12.

Polach KJ, Widom J. Mechanism of protein access to specific DNA sequences in chromatin: a dynamic equilibrium model for gene regulation. **J Mol Biol** 1995; 254:130-49.

Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. **Nat Biotechnol** 2010; 28:1057-68.

Pradhan S, Talbot D, Sha M, et al. Baculovirus-mediated expression and characterization of the full-length murine DNA methyltransferase. **Nucleic Acids Res** 1997; 25:4666-73.

Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D. The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. **Nature** 1990; 346:194-7.

Rahman N, Abidi F, Ford D, et al. Confirmation of FWT1 as a Wilms' tumour susceptibility gene and phenotypic characteristics of wilm's tumour attributable to FWT1. **Hum Genet** 1998; 103:547-56.

Rahman N, Arbour L, Tonin P, et al. Evidence for a familial Wilms tumour gene (FWT1) on chromosome 17q12-q21. **Nat Genet** 1996; 13:461-6.

Rapley EA, Barfoot R, Bonaiti-Pellie C, et al.: Evidence for susceptibility genes to familial Wilms tumour in addition to WT1, FWT1 and FWT2. **Br J Cancer** 2000; 83:177-83.

Ries LAG. SEER **Cancer Statistics Review**. Section XXVII - Childhood Cancer by Site Incidence, Survival and Mortality – 2008, table XXVIII-8.

Rivera MN, Haber DA. Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:699-712.

Rivera MN, Kim WJ, Wells J, et al. An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. **Science** 2007; 315:642-5.

Ruteshouser EC, Robinson SM, Huff V. Wilms tumor genetics: mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors. **Genes Chromosomes Cancer** 2008; 47:461-70.

Sánchez CC, Smith TP, Wiedmann RT, Vallejo RL, Salem M, Yao J, Rexroad CE 3rd. Single nucleotide polymorphism discovery in rainbow trout by deep sequencing of a reduced representation library. **BMC Genomics** 2009; 10:559.

Sanford JP, Clark HJ, Chapman VM, Rossant J. Differences in DNA methylation during oogenesis and spermatogenesis and their persistence during early embryogenesis in the mouse. **Genes Dev** 1987; 1:1039-46.

Schedl A. Renal abnormalities and their developmental origin. **Nat Rev Genet** 2007; 8:791-802.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Mol Biol** 2006; 7:3.

Schulz, W.A. L1 retrotransposons in human cancers. **J Biomed Biotechnol** 2006; 2006:83672.

Seifert JR, Mlodzik M. Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. **Nat Rev Genet** 2007; 8:126-38.

Shaw RJ, Liloglou T, Rogers SN, et al. Promoter methylation of P16, RARbeta, E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing. **Br J Cancer** 2006; 94:561-8.

Slusarski DC, Pelegri F. Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis. **Dev Biol** 2007; 307:1-13.

Song JZ, Stirzaker C, Harrison J, Melki JR, Clark SJ. Hypermethylation trigger of the glutathione-S-transferase gene (GSTP1) in prostate cancer cells. **Oncogene** 2002; 21:1048-61.

Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. **Cancer Res** 1998; 58:1130-4.

Stiller CA, Parkin DM. International variations in the incidence of childhood renal tumours. **Br J Cancer** 1990; 62:1026-30.

Strahl BD, Allis CD: The language of covalent histone modifications. **Nature** 2000; 403:41-5.

Stuart RO, Bush KT, Nigam SK: Changes in gene expression patterns in the ureteric bud and metanephric mesenchyme in models of kidney development. **Kidney Int** 2003; 64:1997-2008.

Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. **Nat Genet** 2004; 36:417-22.

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

Takeshima H, Yamashita S, Shimazu T, Niwa T, Ushijima T. The presence of RNA polymerase II, active or stalled, predicts epigenetic fate of promoter CpG islands. **Genome Res** 2009; 19:1974-82.

Tamaki T, Ohnishi K, Hartl C, LeRoy EC, Trojanowska M. Characterization of a GC-rich Region Containing Sp1 Binding Site(s) as a Constitutive Responsive Element of the $\alpha 2(I)$ Collagen Gene in Human Fibroblasts. **Journ of Boil Chem** 1995; 270:4299-304.

Tamimi Y, Ekuere U, Laughton N, Grundy P. WNT5A is regulated by PAX2 and may be involved in blastemal predominant Wilms tumorigenesis. **Neoplasia** 2008; 10:1470-80.

Tan NY, Khachigian LM. Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. **Mol Cell Biol** 2009; 29:2483-8.

Taniguchi H, Yamamoto H, Hirata T, et al. Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. **Oncogene** 2005; 24:7946-52.

Tremblay J and Hamet P. Impact of genetic and epigenetic factors from early life to later disease. **Metabolism** 2008; 57:S27-31.

Turner BM. Defining an epigenetic code. **Nat Cell Biol** 2007; 9:2-6.

Ushijima T, Watanabe N, Okochi E, Kaneda A, Sugimura T, Miyamoto K. Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome. **Genome Res** 2003; 13:868-74.

Ushijima T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:223–31.

Vainio S, Lin Y. Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. **Nature Rev Genet** 2002; 3:533-43.

Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. **Dev Cell** 2003; 5:367-77.

Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. **Nat Med** 2004; 10:789-99.

Weber M, Hellmann I, Stadler MB, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. **Nat Genet** 2007; 39:457-66.

Wegert J, Wittmann S, Leuschner I, Geissinger E, Graf N, Gessler M. WTX inactivation is a frequent, but late event in Wilms tumors without apparent clinical impact. **Genes Chromosomes Cancer** 2009; 48:1102-11.

Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. **Nat Genet** 2006; 38:787-93.

White HE, Durston VJ, Harvey JF, Cross NC: Quantitative analysis of SNRPN (correction of SRNPN) gene methylation by pyrosequencing as a diagnostic test for Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. **Clin Chem** 2006; 52:1005-13.

Whitelaw E, Garrick D. Epigenetic mechanisms. In: Gluckman PD, Hanson MA, editors. **Developmental origins of health and disease**. Cambridge University Press; 2006. p.62-74.

Wiederhold NP, Grabinski JL, Garcia-Effron G, Perlin DS, Lee SA. Pyrosequencing to detect mutations in FKS1 that confer reduced echinocandin susceptibility in *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother** 2008; 52:4145-8.

Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. **Clin Chem** 2003; 49:853-60.

Worm J, Aggerholm A, Guldberg P. In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis. **Clin Chem** 2001; 47:1183-9.

Wu H, Caffo B, Jaffee HA, Irizarry RA, Feinberg AP. Redefining CpG islands using hidden Markov models. **Biostatistics** 2010; 11:499-514.

Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. **Nucleic Acids Res** 1997; 25:2532-4.

Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. **Trends Genet** 1997; 13:335-40.

Yu P, Constien R, Dear N, et al: Autoimmunity and inflammation due to a gain-of-function mutation in phospholipase C gamma 2 that specifically increases external Ca²⁺ entry. **Immunity** 2005; 22:451-65.

Zhu WG, Srinivasan K, Dai Z, et al. Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21(Cip1) promoter. **Mol Cell Biol** 2003; 23:4056-65.