

**IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES DIFERENCIALMENTE
METILADAS EM CÂNCER DE MAMA ATRAVÉS DA
TÉCNICA AP - PCR SENSÍVEL À METILAÇÃO
(MSAP - PCR)**

FABRÍCIO FALCONI COSTA

**Tese de Doutorado apresentada à Fundação
Antônio Prudente para a obtenção de Grau de
Doutor em Ciências.**

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Anamaria Aranha Camargo

São Paulo

2004

**EXEMPLAR
ESPECIAL**

**FUNDAÇÃO ANTONIO
PRUDENTE
BIBLIOTECA**

Ficha Catalográfica

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

Costa, Fabrício Falconi

**Identificação de regiões diferencialmente metiladas em
câncer de mama através da técnica AP-PCR sensível à metilação
(MSAP-PCR).** / Fabrício Falconi Costa -- São Paulo, 2004.

111p.

Tese (doutorado) - Fundação Antônio Prudente.

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

Oncologia

Orientadora: Dra. Anamaria Aranha Camargo.

Descritores: 1. CÂNCER DA MAMA. 2. PCR/métodos. 3. METILAÇÃO
DE DNA. 4. ADESÃO CELULAR. 5. DNA SATÉLITE.

Sobre a CIÊNCIA ...

"... penso que a ciência é um dos mais nobres empreendimentos no qual podemos nos engajar."

David Baltimore

Laureado com o Prêmio Nobel em Medicina e
Presidente do Instituto de Tecnologia da Califórnia nos E.U.A

"Teorias são construídas com base em certas suposições que devem ser passíveis de confirmação ou refutação experimental. São os experimentos que têm a última palavra, não as teorias, por mais elegantes que elas sejam. Ao cientista, cabe a humildade de aceitar a limitação de suas teorias e hipóteses, perante a criatividade da natureza. E o orgulho de poder decifrá-la, mesmo que através de caminhos tortuosos."

Marcelo Gleiser

Professor de Física

"Dartmouth College" nos E.U.A



Sobre o CÂNCER...

"... as pesquisas na área de câncer são muito difíceis, sabemos disso, mas ao mesmo tempo são desafiadoras e imprescindíveis para salvar vidas humanas. É muito triste ver essa doença destruir tantas vidas e sonhos!..."

Salvador César Costa, meu pai

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Salvador e Ângela, e ao
meu irmão Frederico pelo amor e
incentivo constantes.

À minha orientadora Anamaria pela
paciência, conselhos e ensinamentos ao
longo desses anos.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Para a minha avó Elvira pelas boas
lembranças que ficaram...

(In memoriam)

AGRADECIMENTOS

À Dra. Anamaria A. Camargo por ter sido uma excepcional orientadora. Obrigado por tudo o que foi feito por mim e pela oportunidade que tive de ser orientado por uma profissional de tanto talento. Você é um exemplo para a ciência brasileira, tanto nos aspectos científicos como no gerenciamento de grandes projetos. Parabéns pelo seu excelente trabalho e obrigado por tudo!

Aos colegas Ricardo P. Moura, Anna Christina Salim, Ana Paula M. Silva e ao Dr. Eduardo Abrantes pela convivência, pela ajuda nos momentos mais difíceis e pela paciência ao longo desses quatro anos.

À Valéria Paixão pela sua amizade e seu grande coração. Obrigado pela ajuda com o Banco de Tumores e pelo levantamento das amostras tumorais utilizadas neste trabalho. Obrigado pelos conselhos, pelas brincadeiras e pela sua disponibilidade.

Ao Dr. Newton V. Verbisck pelo auxílio em experimentos envolvendo anticorpos e proteínas, pelas suas sugestões e idéias.

A todo o pessoal do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (LMBG); Ana Paula, Anna Chris, Daniela, Elisa, Elisângela, Fabiana,

Fernando, Giseli, Jasna, Lílian, Mariana, Maria Cristina, Murilo, Newton, Raphael e Ricardo. Obrigado por tudo!

Ao pessoal do Laboratório de Análises de Expressão Gênica (LGEA) coordenado pela Dra. Dirce M. Carraro. Obrigado à Elen, Jane, Louise e ao Reimar pela ajuda com a extração de RNA e pela atenção.

Ao Dr. Ricardo Renzo Brentani pela valorização da ciência brasileira e pela oportunidade de desenvolver o meu projeto de Doutorado nesta instituição de projeção internacional e de altíssima qualidade.

Ao professor Dr. Luiz Fernando Reis pelas discussões, críticas construtivas e pela competência na implantação de uma pós-graduação que é hoje uma das melhores do país.

Ao Dr. Humberto Torloni pela disponibilização de amostras do Banco de Tumores para a realização deste trabalho. Obrigado também pelas “aulas” de patologia fora de hora. Esses ensinamentos foram de grande valia. Obrigado!

À professora Dra. Otávia Cabalero pela participação da banca de qualificação e pelas sugestões importantes que foram dadas para o enriquecimento deste trabalho.



À Dra Luisa Lina Villa pelas discussões e sugestões entusiasmadas em seminários do ILPC.

À Dra Vilma Martins e aos membros do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) pelo auxílio nas análises de proteínas.

A todos os colegas do ILPC pela convivência durante esses quatro anos. Especialmente ao Dr. Enrique Boccardo, à Marilene Lopes, à Gláucia Hajj e à Angelita Muras pela ajuda nos experimentos envolvendo proteínas e anticorpos. Agradeço também aos colegas Rodrigo Vellasco, Patrícia Sávio, Katyana Junes, Joãozinho, José Carlos, Lara, Dra. Laura, Waleska, Dra. Suzana (filha do meu pediatra em BH - que coincidência!), Dra. Beatriz, Dra. Adriana Abalen e Dr. Alex Fiorini pelas conversas, pela convivência e pelas brincadeiras em momentos de descontração pelos corredores do ILPC.

Ao Dr. Fernando Augusto Soares, chefe do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo, pela rigorosa análise histológica e macrodissecção das amostras tumorais de mama utilizadas neste trabalho.

Ao Dr. José Augusto Rinck do Departamento de Oncologia Clínica do Hospital do Câncer A.C. Camargo pelo auxílio na coleta dos dados clínicos das pacientes avaliadas.

À Dra. Karina de Cássia Braga Ribeiro do Registro Hospitalar do Hospital do Câncer A. C. Camargo pela ajuda com as análises estatísticas envolvendo os dados clínicos das pacientes. Obrigado também pelas sugestões na redação da tese e pelas críticas construtivas.

Aos funcionários do SAME (Serviço de Arquivo Médico e Estatístico) do Hospital do Câncer A. C. Camargo pelo auxílio na coleta dos dados clínicos das pacientes que fizeram parte deste estudo.

A todos os funcionários do ILPC pelo suporte técnico, administrativo e pela convivência ao longo desses anos. Em especial, à Regina Nomizo e à Roseli Mendonça pelo apoio técnico e pelas brincadeiras na sala de cultura de células.

À Ana Maria Kuninari e Márcia Hiratoni pelo trabalho desenvolvido junto aos alunos na Secretaria de Pós-Graduação.

Aos funcionários da biblioteca da Fundação Antônio Prudente pelo auxílio na organização do material bibliográfico.

Ao Professor Dr. Sílvio Zanata e sua esposa Dra. Lia por terem me recebido em Curitiba como grandes anfitriões, pela ajuda metodológica e pelas sugestões no campo da proteômica.

Ao Professor Dr. Roger Chamas pelas sugestões na redação do artigo e pelos ensinamentos sobre adesão celular. Obrigado pela suas idéias e especulações sobre a teoria de seleção clonal e as metástases. Muito obrigado!

À Professora Dra. Mari C. Sogayar pelos ensinamentos no campo da cultura de células e pelo fornecimento das amostras de glioblastomas e tumores primários de cérebro.

Aos meus pais, Salvador e Ângela, e ao meu irmão Frederico pelo incentivo e pelo apoio constantes ao longo desses quatro anos de trabalho. Obrigado por tudo o que vocês fizeram por mim! São vocês que me fornecem energia para continuar a minha jornada científica!

Aos meus padrinhos Lúcia e Umberto Spilotros que, mesmo distantes, sempre me apoiaram e acreditaram no meu potencial. Obrigado pela força!

A todos os meus familiares que sempre me receberam com uma grande festa em BH, pelo apoio e incentivo durante todo esse processo de crescimento profissional, intelectual e pessoal.

Aos meus amigos Rogério, Maurício e Frederico pelo apoio que sempre me deram desde quando me mudei para SP. Obrigado, especialmente ao Rogério e seus pais, Enedir e Rogério *Pai* pelo incentivo e pelas tardes de jogos em BH.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo rigor científico adotado nas análises dos relatórios, pelo suporte financeiro e pela bolsa de Doutorado concedida (Processo número 02/00622-7).

PREFÁCIO

"A seqüência é apenas o início ..."

J.Craig Venter

Nas últimas décadas, muita atenção foi dada ao PROJETO GENOMA HUMANO (PGH) desenvolvido com o principal objetivo de desvendar os "mistérios da vida" através da elucidação da seqüência de "letrinhas" da famosa molécula do DNA. Essa molécula, apesar da estrutura simples, foi sem sombra de dúvidas o maior "astro" do cenário científico mundial dos últimos tempos. Os "segredos" guardados nessa molécula podem contar a história de um indivíduo e de todos os seus antepassados através da combinação das 4 "letrinhas" conhecidas como bases nitrogenadas. Além disso, o DNA possui a "receita" para todos os "ingredientes" dos processos que ocorrem dentro das células.

O PGH começou oficialmente no ano de 1989 e foi financiado principalmente pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos. A partir de então, um grande consórcio de universidades e instituições públicas (Consórcio Público) localizados em vários países do globo terrestre se uniram com um objetivo em comum - sequenciar todos os três bilhões de pares de bases que compõem o genoma humano. O principal pesquisador responsável por esse consórcio foi Francis Collins, um renomado cientista americano. Apesar dos esforços coletivos e da elevada quantia de dinheiro investida, houve pouco progresso no início e em 1998 foi fundada uma empresa privada chamada CELERA. Esta empresa se propôs a sequenciar

todo o genoma humano em um prazo menor do que o estipulado anteriormente. O pesquisador J. Craig Venter foi o principal responsável por essa empreitada, sendo chamado de louco e arrogante pelos seus pares. Desde então, a disputa entre o chamado Consórcio Público do genoma e a empresa CELERA foi uma das maiores corridas da história, comparando-se à corrida para a conquista do espaço na década de 60. Essa corrida terminou no ano de 2000, quando o sequenciamento do DNA foi anunciado em conjunto, por ambas as partes. A seqüência anunciada foi chamada de primeira das muitas versões que se seguiriam. Acredita-se que, nos próximos anos, esse rascunho será polido a fim de produzir a seqüência padrão-ouro que será a nossa referência para o resto dos tempos.

Dessa forma, a geração da seqüência completa do genoma humano foi a maior aventura da ciência moderna, uma aventura que foi impelida pelo desempenho de muitos homens e mulheres notáveis. Dentre eles, encontramos J. Craig Venter, que continua tão controverso quanto era há alguns anos quando irrompeu no palco científico, mas até seus detratores reconheceram, posteriormente, que a sua visão contribuiu para a conclusão do projeto antes do prazo estipulado. Entretanto, ele não realizou essa proeza sozinho: Francis Collins e os líderes do chamado Consórcio Público do genoma labutaram por anos, antes da entrada de J. Craig Venter.

Apesar de grandioso e importante, o PGH não foi capaz de, por si só, elucidar processos envolvidos em doenças como o câncer e não respondeu a algumas perguntas como, por exemplo, o número exato de genes presente no genoma celular. Antes da finalização desse projeto, as estimativas

variavam de 30.000 a 120.000 genes presentes no genoma. Hoje em dia, mesmo com toda a informação da seqüência de DNA em mãos, as estimativas variam de 20.000 a 50.000 genes. Além disso, o número de genes expressos em uma determinada célula pode variar de tipo celular para tipo celular. Portanto, a seqüência do DNA pura e simplesmente não nos diz muita coisa sobre os principais processos celulares. Dessa forma, o sequenciamento do DNA foi o início de uma empreitada ainda maior que está por vir: mapear o chamado *transcriptoma*, ou seja, avaliar todos os genes expressos em cada um dos tipos celulares do corpo humano. Por outro lado, essas análises envolvem um terceiro projeto chamado de *reguloma* que tem como objetivo avaliar todos os processos que regulam a expressão dos genes de um determinado tipo celular. Nesse contexto, o estudo da regulação da expressão dos genes poderia facilitar no entendimento dos processos envolvidos na tumorigênese e na formação de outras doenças.

O processo de controle da expressão gênica envolve os fatores de transcrição basal, os fatores de transcrição gene-específicos, os ativadores, os silenciadores, mecanismos de controle pós-transcricionais e os mecanismos epigenéticos, como a metilação e a acetilação/desacetilação de histonas. A metilação do DNA é a modificação epigenética envolvida no controle da expressão gênica mais estudada dos últimos tempos. Esse mecanismo envolve a adição de um grupamento metil (CH_3) em regiões promotoras dos genes e em outras seqüências do genoma. Dessa forma, a adição ou remoção de grupamentos metil em regiões promotoras da

molécula de DNA pode ocasionar o silenciamento ou a expressão dos genes. Nesse contexto, surgiu um novo campo de estudo dentro do *reguloma* chamado de *epigenômica* que tem como principal objetivo entender os eventos epigenéticos, dentre eles a metilação, no controle da expressão gênica.

Recentemente, muitos estudos têm revelado que o processo de controle da expressão dos genes pode estar defeituoso nas células tumorais. A metilação de regiões promotoras de genes, com concomitante inativação dos mesmos, tem sido descrita em diversos tipos de tumores. Nesse sentido, nos propusemos a dar uma pequena contribuição para esse novo campo em expansão - a *epigenômica* no câncer. Dessa maneira, o trabalho apresentado nas páginas que se seguem surgiu com a finalidade de avaliar o perfil de metilação no DNA comparando-se células normais e tumorais de um determinado tecido. Essa análise inicial tinha como metas secundárias a identificação de regiões com perda ou ganho de metilação no genoma das células tumorais. Utilizando uma metodologia simples e pouco laboriosa, fomos capazes de identificar duas seqüências de DNA diferencialmente metiladas em tumores de mama. É importante ressaltar que o rascunho da primeira versão do genoma humano foi muito importante no processo de mapeamento das seqüências diferencialmente metiladas identificadas nesse projeto. As duas seqüências de DNA isoladas e caracterizadas se mostraram diferentes no que diz respeito ao padrão de metilação e à localização no genoma: a primeira se mostrou metilada em tumores e foi mapeada em uma região de controle da expressão de um gene

importante em processos de adesão celular e a segunda mostrou uma perda de metilação em tumores e foi mapeada em uma seqüência repetitiva do genoma.

Os resultados gerados pelo presente trabalho demonstram que a seqüência do DNA não nos diz muito quanto aos processos celulares normais e patológicos. Os processos celulares são eventos muito mais dinâmicos do que simplesmente uma seqüência de “letrinhas” dispostas de forma estática. Portanto, estudos aprofundados de regulação da expressão dos genes e das proteínas que se ligam ao DNA em determinados processos celulares são de extrema importância para um melhor entendimento do funcionamento celular normal e em situações anormais como no câncer.

RESUMO

Costa FF. **Identificação de regiões diferencialmente metiladas em câncer de mama através da técnica AP-PCR sensível à metilação (MSAP-PCR)**. São Paulo; 2004. [Tese de Doutorado - Fundação Antonio Prudente].

A estabilidade do genoma e o perfil normal de expressão gênica são mantidos por um padrão fixo e pré-determinado de metilação do DNA. Esse padrão pode, no entanto, ser alterado nas células tumorais e contribuir na tumorigênese. Neste trabalho, nós utilizamos a técnica de AP-PCR sensível à metilação (*MSAP-PCR*) com o objetivo de identificar regiões diferencialmente metiladas em tumores de mama. Através desta metodologia, fomos capazes de identificar duas regiões diferencialmente metiladas. O primeiro fragmento de DNA isolado foi mapeado no cromossomo 2q33-34, nas proximidades do gene ADAM23. Os membros da família ADAM são proteínas de superfície celular que apresentam dois domínios proteicos característicos: um domínio de desintegrina e um domínio de metaloprotease. A proteína ADAM23 possui o domínio de metaloprotease inativo e acredita-se que ela esteja envolvida exclusivamente na adesão célula-célula. Nós verificamos que a região promotora do gene ADAM23 está hipermetilada em 66,7% das linhagens tumorais e em 51,4 - 69,2% dos tumores primários de mama analisados. A presença de metilação está fortemente associada com reduções na expressão do RNAm e da proteína, sugerindo que o silenciamento do gene ADAM23 possa estar relacionado com alterações nas propriedades adesivas das células e com a progressão tumoral. Um limite de 40-60% de dinucleotídeos metilados presentes na região promotora é necessário para um completo silenciamento do gene. O tratamento das linhagens celulares MCF-7 e SKBR-3 com o agente desmetilante *5'-aza-2'-deoxycytidina* levou a uma reexpressão do gene ADAM23 e a um decréscimo significativo nos

níveis de metilação. Uma maior porcentagem de metilação foi verificada em tumores de mama com um estágio mais avançado e a presença de metilação parece estar associada com a presença de linfonodos axilares comprometidos e de metástases, assim como, com a ocorrência de recidivas da doença. Em conjunto, estes dados sugerem que a metilação do gene ADAM23 possa ser utilizada como um marcador molecular em tumores de mama. O segundo fragmento de DNA isolado foi mapeado no cromossomo 5 e apresentou elevada similaridade com uma seqüência satélite denominada SATR1. As seqüências satélite correspondem a blocos de repetições em *tandem* geralmente encontrados na heterocromatina centromérica e/ou telomérica. A perda de metilação em seqüências satélites é encontrada freqüentemente em tumores e tem sido associada a um aumento na freqüência de rearranjos do DNA e à instabilidade cromossômica. A perda de metilação na seqüência STAR1 foi observada em 63% das linhagens celulares de mama e em 63-87% dos tumores primários de mama. Pacientes com diminuição nos níveis de metilação na região SATR1 apresentaram uma menor sobrevida livre de doença em relação aos pacientes com níveis normais de metilação (*log-rank*, $p=0.1963$). Nossos resultados sugerem que a diminuição nos níveis de metilação da região SATR1 é um evento comum em tumores de mama, o qual pode facilitar a ocorrência de rearranjos cromossômicos e contribuir no processo de progressão tumoral. Nossos dados também reforçam a importância da hipometilação global do genoma na tumorigênese e devem ser considerados no desenvolvimento de novos protocolos de tratamento contra o câncer que utilizam agentes desmetilantes.

SUMMARY

Costa FF. **Identification of differentially methylated regions in breast tumors by Methylation Sensitive AP-PCR (MSAP-PCR)**. São Paulo; 2004. [Tese de Doutorado - Fundação Antonio Prudente].

Genome stability and normal gene expression are maintained by a fixed and predetermined DNA methylation pattern. However, this pattern may be altered in tumor cells, contributing to tumorigenesis. In this work, we used the Methylation Sensitive Arbitrarily Primed - PCR (*MSAP-PCR*) in order to identify differentially methylated regions in breast tumors. Using this methodology, we were able to identify two differentially methylated regions. The first isolated DNA fragment was mapped to chromosome 2q33-34, in the proximity of the ADAM23 gene. The members of the ADAM family are cell surface proteins, which present two characteristic domains: the desintegrin domain and the metalloprotease domain. The ADAM23 protein presents an inactive metalloprotease domain and it is thought to be involved exclusively in cell-cell adhesion. We verified that the promoter region of the ADAM23 gene is hypermethylated in 66,7% of the tumor cell lines and in 51,4 - 69,2% of the analyzed primary breast tumors. The presence of methylation is strongly associated with reductions in both mRNA and protein expression, suggesting that the silencing of ADAM23 gene may be related to alterations in cell adhesion properties and to tumor progression. A threshold of 40-60% of methylated dinucleotides within the promoter region is necessary for the complete silencing of the gene. Treatment of MCF-7 and SKBR-3 cell lines with 5'-Aza 2'-deoxycytidine led to a reactivation of ADAM23 gene expression and a marked decrease in the methylation level. A higher percentage of methylation was observed in breast tumors in advanced stages and the presence of methylation seems to be associated with the presence of positive axillary lymph nodes and metastases as well as with disease recurrence. In all, these results suggest that the methylation of the ADAM23 gene may be used as a molecular marker in breast tumors. The

second DNA fragment isolated was mapped to chromosome 5 and presented a high similarity with a satellite sequence named SATR1. Satellite sequences correspond to blocks of tandemly repeated sequences usually located in regions of pericentromeric and/or telomeric heterochromatin. The loss of methylation in satellite sequences is frequently found in tumors and has been associated with an increased frequency of DNA rearrangements and chromosome instability. The loss of methylation in the STAR1 sequence was observed in 63% of the breast tumor cell lines and in 63-87% of primary breast tumors. Patients with a decrease in the levels of methylation in the SATR1 region presented a shorter disease-free survival in relation to patients with normal levels of methylation (log-rank, $p=0.1963$). Our results suggest that a decrease in the levels of methylation in the SATR1 region is common in breast tumors and may facilitate the occurrence of chromosome rearrangements and contribute to tumor progression. Our results also reinforce the importance of global genome hypomethylation in tumorigenesis and must be considered in the development of new treatment protocols, which use demethylating agents in the treatment of cancer.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação esquemática da metilação como mecanismo de inativação gênica.....12
- Figura 2** Representação esquemática de um perfil de MSAP-PCR.....16
- Figura 3** Representação esquemática do tratamento do DNA com o reagente bissulfito de sódio.....20
- Figura 4** Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com um perfil de MSAP-PCR.....27
- Figura 5** Localização dos *primers* para as reações de MSP dentro do fragmento contendo 22 ilhas de CpG localizado na porção 5' do gene ADAM23.....42
- Figura 6** Gel de poliacrilamida 8% contendo reações de MSP com duas amostras normais e seis amostras tumorais de mama.....43
- Figura 7** RT-PCR semi-quantitativo utilizando 3 amostras tumorais de mama (7, 8 e 25) com diferentes padrões de metilação analisados por MSP.....44
- Figura 8** Curva de sobrevida Kaplan-Meier com a análise acumulada da sobrevida global (SG) de 72 pacientes no seguimento de 3 anos (36 meses).....50
- Figura 9** Curva de sobrevida Kaplan-Meier com a análise acumulada da sobrevida livre de doença (SLD) de 72 pacientes no seguimento de 3 anos (36 meses).....51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Diferentes *primers* utilizados em perfis de MSAP-PCR e a sua seqüência nucleotídica.....28
- Tabela 2** Número e porcentagem de pacientes segundo metilação na região 5' do gene ADAM23 e estágio clínico, tamanho do tumor, *status* do receptor de estrógeno, *cerbB2*, comprometimento linfonodal, ocorrência de recidivas e metástases à distância avaliados pelo teste de Qui-quadrado (χ^2).....49
- Tabela 3** Probabilidades acumuladas de sobrevida global (SG) e de sobrevida livre de doença (SLD) após 3 anos segundo as variáveis metilação na região 5' do gene ADAM23, estágio clínico, metástase à distância, comprometimento linfonodal, receptor de estrógeno e *cerbB2*.....52

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAM	do inglês "A Desintegrin And Metaloprotease domain"
AJCC	do inglês "The American Joint Committee on Cancer"
APC	do inglês "Adenomatous Polyposis Coli"
APS	Persulfato de Amônio
AT	Ataxia telangectasia
ATP	Adenosina Trifosfato
BCSG1	do inglês "Breast Cancer-Specific Gene 1"
BLASTN	do inglês "Basic Local Alignment Searching Tool"
BRCA 1	do inglês "Breast Cancer Gene 1"
BRCA 2	do inglês "Breast Cancer Gene 2"
BS	Síndrome de Bloom
cerbB2	do inglês "Human Epidermal Growth Factor Receptor"
cDNA	DNA complementar
COBRA	do inglês "Combined Bissulfite Restriction Analysis"
DCC	Deletado em Câncer Colorretal
DMH	do inglês "Differential Methylation Hybridization"
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMTs	DNA metiltransferases
DNTPs	Deoxinucleotídeos fosfato
DSBR	do inglês "Double Strands Break Repair"
EDTA	Etilenodiamino tetraacetato
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
ER	Receptor de Estrógeno
E.U.A.	Estados Unidos da América
FA	Anemia Fanconi
gDNA	DNA genômico
FAP	Polipose Adenomatosa Familiar
HAT	Histona Acetil Transferase

HIC-1	do inglês "Hypermethylated In Cancer 1"
HDAC	Histona deacetilase
HNPCC	Síndrome Coloretal Não-Polipóide Hereditária
ICF	Síndrome Imunocraniofacial
KC	Cloreto de Potássio
KH₂PO₄	Dihidrogenofosfato de potássio
LINE	do inglês "Long Interspaced Element"
LOH	Perda de Heterozigose
MBPs	do inglês "Methyl Binding Proteins"
MCA	do inglês "Methylated CpG Island Amplification"
M-CSF	Fator estimulador de Colônias Monocítico
MDC	do inglês "Metaloprotease-like Desintegrin-like Cysteine Rich"
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MMPs	Metaloproteases de Matriz
MMR	do inglês "Mismatch Repair Pathway"
MSAP-PCR	do inglês "Methylation Sensitive Arbitrarilly Primed - PCR"
MSP	do inglês "Methylation Specific PCR"
NaCl	Cloreto de Sódio
Na₂HPO₄	Bifosfato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCBI	do inglês "National Center for Biotechnology Information"
NER	do inglês "Nucleotide Excision Repair"
OD	Densidade Óptica
p16	Proteína de 16 KiloDaltons
p21	Proteína de 21 KiloDaltons
p53	Proteína de 53 KiloDaltons
PAH	Hidrocarboneto Aromático Policíclico
PBS	Tampão Salina Fosfato
PCR	do inglês "Polimerase Chain Reaction"
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
PNET	do inglês "Primitive NEuroectoderm Tumor"

PR	Receptor de Progesterona
RB	Retinoblastoma
RDA	do inglês "Representational Difference Analysis"
RGD	Arginina-Glicina-Aspartato
RLGS	do inglês "Restriction Landmark Genomic Scanning"
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAi	Interferência de RNA
RT-PCR	do inglês "Reverse Transcriptase PCR"
RSV	do inglês "Rous Sarcoma Vírus"
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatístico
SATR1	DNA satélite R1
SINE	do inglês "Short Interspaced Elements"
SDS	Sódio DodecilSulfato
SDS-PAGE	do inglês "SDS - Polycrylamide Gel Electroforesis"
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SG	Sobrevida Global
SPSS	do inglês "Statistical Package for Social Sciences"
TBS	do inglês "Tris Buffered Saline"
TBST	do inglês "Tris Buffered Saline Tween 20"
TNM	do inglês "Tumor Node Metastasis" - Sistema de classificação tumoral
TEMED	N,N,N',N' - Tetrametiletilenodiamina
TES	Tris - EDTA - SDS
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
UICC	do espanhol "Union Internationale Contre le Cancer"
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
VHL	do inglês "Von Hippel Lindau"
XP	Xeroderma Pigmentosum

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de mama	2
1.1.1	Epidemiologia e Etiologia da doença	2
1.1.2	Diagnóstico, prognóstico e tratamento	4
1.2	O câncer como doença genética	5
1.3	Alterações genéticas e epigenéticas no câncer	7
1.4	Metodologias utilizadas na detecção da metilação	13
1.4.1	Análises de metilação global	13
1.4.2	Análises de metilação em uma seqüência de DNA específica	17
2	OBJETIVO	21
3	MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS	23
3.1	Identificação de regiões diferencialmente metiladas pela técnica AP-PCR sensível à metilação (MSAP-PCR)	24
3.2	SEPARATA 1: “Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors.”	29
3.2.1	Validação do gene ADAM23 como marcador molecular em câncer de mama	38
3.3	SEPARATA 2: “Detection of SATR1 satellite DNA hypomethylation in breast tumors”	53
4	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	80
4.1	Utilização da técnica MSAP-PCR para o isolamento de seqüências diferencialmente metiladas em câncer de mama	81
4.2	ADAM23 - um novo marcador molecular em câncer de mama	83
4.3	Análises da perda de metilação na região satélite SATR1 e suas implicações no câncer de mama	91
5	POSFÁCIO	94

6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
	ANEXOS	112
	Anexo 1 Dados clínicos das 72 pacientes com câncer de mama utilizadas em análises de MSP para a região 5' do gene ADAM23.....	A1
	Anexo 2 Metodologia de AP-PCR sensível à metilação (MSAP-PCR) e a sua padronização.....	A7
	Anexo 3 Metodologia de tratamento do DNA com bissulfito de sódio para as análises de metilação.....	A11
	Anexo 4 Metodologia utilizada na caracterização do anticorpo anti-ADAM23.....	A15
	Anexo 5 Capítulo do Livro "BASES DA ONCOLOGIA" intitulado <i>Oncogenes e Genes Supressores de Tumor</i>	A18
	Anexo 6 CURRICULUM VITAE.....	A39

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA

1.1.1 Epidemiologia e Etiologia da doença

O câncer de mama é o tumor de maior frequência entre as mulheres nos países ocidentais, com uma taxa de incidência nos E.U.A. de 111 casos por 100.000 mulheres/ano e uma taxa de mortalidade de 24 casos por 100.000 mulheres/ano. No Brasil, esse tipo de câncer já é a terceira causa mais freqüente de morte, sendo o segundo maior motivo de morte no sexo feminino. Em 1999 foram registrados no país cerca de 8.104 mortes decorrentes de câncer de mama e a previsão foi de que seriam diagnosticados 41.610 novos casos da doença no ano de 2003 (MINISTÉRIO DA SAÚDE 1999; 2003).

A incidência do câncer de mama se elevou de forma crescente até a década de 80 e desde então se encontra relativamente estável. Por outro lado, a mortalidade de pacientes com esse tipo de câncer apresentou um declínio considerável, principalmente por causa das medidas de prevenção e de tratamento adotadas. Desde os anos 80, exames de mamografia periódicos e a implementação da terapia adjuvante com o tamoxifeno foram de fundamental importância para o diagnóstico precoce e para um aumento na sobrevivência das pacientes (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP - 1998a, 1998b).

O câncer de mama pode se apresentar clinicamente sob a forma de carcinomas *in situ* até as formas mais invasivas e metastáticas. A maior parte dos casos desse tipo de câncer pertence a classe dos carcinomas que se originam do epitélio dos lóbulos e ductos da glândula mamária, especificamente das células luminais. Quando o câncer de mama fica confinado no tecido mamário, as taxas de cura são maiores do que 90%; no entanto, se a doença se dissemina para outros órgãos, o prognóstico é ruim e as taxas de sobrevivência passam a ser menores do que 20% (JEMAL et al. 2003). Estima-se que o câncer de mama seja responsável por um quinto dos óbitos em mulheres entre 40 e 50 anos (RADICE e REDAELLI 2003).

Uma das principais características do câncer de mama é a heterogeneidade clínica e histológica da doença. Essa heterogeneidade reflete a sua complexa etiologia, que sofre a influência de fatores exógenos (tipo de dieta e o uso de contraceptivos orais) e de fatores endógenos (como as taxas hormonais e a predisposição genética) (BIECHE e LIDEREAU 1995). Outros fatores que levam a uma maior susceptibilidade a essa doença incluem a idade avançada (as taxas de incidência dobram a cada 10 anos), a menarca precoce, a menopausa tardia (além dos 50 anos, em média) e a nuliparidade ou a primeira gravidez após os 30 anos de idade. Além desses fatores, o consumo habitual de álcool e o fumo também parecem estar associados a um risco aumentado no desenvolvimento do câncer de mama (RAHMAN e STRATTON 1998).

1.1.2 Diagnóstico, prognóstico e tratamento

A detecção precoce da doença aliada a vários tipos de tratamentos como a intervenção cirúrgica, a quimioterapia, a radioterapia e a terapia hormonal permitem a cura total em vários casos. Os métodos de diagnóstico são bem numerosos e incluem o auto-exame, o exame clínico palpatório, a mamografia, a ultra-sonografia e até exames citológicos e histopatológicos que, em conjunto, oferecem uma acuidade de até 95% no diagnóstico da doença (BARACAT e OLIVEIRA 1995). Essa combinação de métodos possibilita a detecção de carcinomas menores do que 1 cm, mas com um custo bem elevado (BARACAT e OLIVEIRA 1995). No Brasil, 50-70% dos casos são diagnosticados em estágios avançados, dificultando muito o tratamento e a cura da doença (HAMADA et al. 1997).

O estudo do estadiamento do câncer de mama teve início no século 20, com os conceitos de localização primária da doença, o acometimento de linfonodos regionais e a presença de metástases distantes, culminando com o desenvolvimento do sistema de classificação TNM criado pelo AJCC (*The American Joint Committee on Cancer*) e pelo UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*). Esse sistema baseia-se no tamanho do tumor (T), no envolvimento de linfonodos (N) e na presença de metástases distantes (M) (STYBLO e WOOD 1998).

Os fatores prognósticos tradicionais incluem o tamanho do tumor primário, a presença de metástases em linfonodos axilares e a distância, o grau histológico, o subtipo histológico, a expressão de receptores de

estrógeno (*ER*) e de progesterona (*PR*) e a expressão do oncogene *c-erbB2*. No entanto, cerca de 30% das pacientes que não apresentam acometimento de linfonodos morrem em decorrência da doença (STYBLO e WOOD 1998). Assim sendo, uma das áreas mais promissoras na pesquisa contra o câncer de mama é a identificação de novos marcadores moleculares tumorais que possibilitem o desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais sensíveis, um melhor monitoramento da doença e um tratamento mais eficaz e específico.

1.2 O CÂNCER COMO DOENÇA GENÉTICA

A tumorigênese é um processo complexo que se divide em três etapas distintas: a iniciação, a promoção e a progressão tumoral. Esse processo é o resultado de defeitos genéticos acumulados no DNA das células. A iniciação e a promoção tumoral ocorrem precocemente e compreendem alterações em genes envolvidos no controle da proliferação celular. Devido à complexidade e a existência de vias alternativas no controle da proliferação celular, para que haja a formação de um tumor é necessária a ocorrência de alterações adicionais e sucessivas em diferentes genes. Cada nova alteração é acompanhada de uma onda de expansão clonal e, ao final desse processo, surge uma população celular com grande potencial de crescimento e invasão: um tumor maligno (MENDELSON et al. 1995).

Os genes envolvidos na iniciação e promoção tumoral podem ser funcionalmente divididos em duas classes: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Os proto-oncogenes, em geral, estão envolvidos na regulação positiva da proliferação celular e, quando defeituosos ou amplificados no genoma, são denominados oncogenes. Mutações em oncogenes estão freqüentemente associadas a um ganho de função e, portanto, são ditas dominantes em relação à tumorigênese. Basta a alteração de um único alelo para a manifestação do fenótipo celular alterado. Os genes supressores de tumor, ao contrário, atuam restringindo a proliferação celular e alterações nesses genes estão, geralmente, associadas a uma perda de função. Dessa forma, alterações em genes supressores de tumor são recessivas em relação à manifestação do fenótipo maligno, havendo a necessidade de inativação dos dois alelos (MENDELSON et al. 1995).

Durante a progressão tumoral, algumas células do tumor primário perdem a capacidade de adesão, invadem a membrana basal do tecido de origem através da produção de enzimas proteolíticas (ex: Metaloproteases de Matriz ou MMPs), atravessam a parede dos vasos, caem na circulação sangüínea ou linfática e formam áreas de proliferação em outros tecidos. Esse processo é denominado metástase (WEINBERG 1996; BOGENRIEDER e HERLYN 2003). A aquisição de características associadas com a progressão tumoral também é uma consequência de alterações que ocorrem no conteúdo genético das células tumorais.

Nas últimas duas décadas mais de 200 genes envolvidos no controle da proliferação celular foram relacionados com a formação de tumores e descritos como genes supressores de tumor ou oncogenes. Em contraste, muito pouco se sabe sobre os mecanismos que controlam o processo de progressão tumoral. Até o momento, somente 6 genes foram descritos como genes supressores de metástases. Entre eles estão genes diretamente relacionados com a adesão célula-célula e célula-matriz como o CAD1 (HIROHASHI 1998) e o Kai1 (DONG et al. 1997), genes envolvidos no remodelamento da matriz extracelular como o gene RECK (NODA et al. 2003) e genes relacionados com a sinalização celular como o MKK4 (YAMADA et al. 2002) e o Nm23 (HOWLETT et al. 1994).

1.3 ALTERAÇÕES GENÉTICAS E EPIGENÉTICAS NO CÂNCER

Vários tipos de alterações genéticas foram descritas em tumores, incluindo mutações pontuais (substituições, deleções e inserções) e cromossômicas (duplicações, translocações, inserções e deleções). Recentemente, um novo tipo de alteração nas células tumorais foi descrito na literatura e apontado como um mecanismo de inativação gênica: a metilação (JONES e BAYLIN 2002).

A metilação de citosinas no carbono 5 dos dinucleotídeos CpG é uma alteração epigenética característica de genomas eucariotos e um dos principais mecanismos de regulação da expressão gênica. A adição ou remoção de grupamentos metil no genoma é realizado por enzimas

denominadas DNA Metiltransferases ou DNMTs. A distribuição de regiões ricas em dinucleotídeos CpG no genoma dos vertebrados não é randômica, sendo que a grande maioria dessas seqüências se localiza em regiões denominadas ilhas de CpG. GARDINER-GARDEN e FROMMER (1987), definiram uma ilha de CpG como uma porção do DNA maior que 200bp que contém pelo menos 50% de G+C e uma razão entre o observado e o esperado da freqüência de dinucleotídios CpG maior ou igual a 0,6. Em vertebrados, 60-90% de todos os CpGs são metilados, restando apenas uma pequena porção do genoma livre de metilação. Estima-se que existam no genoma humano em torno de 45 mil ilhas de CpG e sabe-se que essas seqüências estão localizadas nas regiões promotoras e nos primeiros exons de aproximadamente 60% dos genes (NAKAO 2001).

De um modo geral, a presença de metilação em seqüências promotoras ou regulatórias está correlacionada com a inativação ou com o silenciamento gênico (Figura 1). A metilação do DNA pode ser detectada, por exemplo, nos promotores de genes regulados por "imprinting", e no processo de inativação do cromossomo X. Os grupamentos metil não afetam o pareamento de bases, mas podem influenciar em interações DNA-proteínas por se projetarem no sulco maior da dupla fita da molécula de DNA. Dois mecanismos pelos quais a metilação pode influenciar a expressão gênica foram propostos. No primeiro modelo, foi proposto que os resíduos de citosina metilados poderiam interferir diretamente na interação de fatores de transcrição aos seus sítios de ligação, uma vez que o grupo metil se projeta no sulco maior da fita de DNA (NAN et al. 1998). Além dessa

interferência direta, um segundo modelo propõe que proteínas se ligam aos grupamentos metil ("*methyl binding proteins*" ou MBPs) e competem com os fatores de transcrição pelo acesso a região promotora do gene. As MBPs podem ainda atrair complexos protéicos contendo co-repressores e histonas deacetilases (HDACs). A ligação desses complexos no DNA gera uma compactação da estrutura da cromatina e a inativação da transcrição gênica (NAN et al. 1998; ROBERTSON 2002). Nenhum dos modelos propostos é exclusivo, sendo que, muito provavelmente todos esses processos estão ocorrendo simultaneamente na repressão da expressão gênica.

A possível associação entre a metilação e a tumorigênese surgiu da observação de que a grande maioria dos genes supressores de tumor continha regiões ricas em CpG nas suas seqüências regulatórias e que, de um modo geral, o padrão de metilação do DNA se encontrava alterado nas células tumorais (BAYLIN et al. 2001). Desde então, o relato de inativação de genes supressores de tumor por metilação vem aumentando na literatura. Trabalhos avaliando o status de metilação dos genes supressores de tumor *BRCA1* (HILTON et al. 2002), *RB1* (OHTANI-FUJITA et al. 1993), *VHL* (HAMANO et al. 2002), *hMLH1* (WHEELER et al. 1999), *p16* (HOU et al. 1999), *APC* (HILTUNEN et al. 1997), *HIN-1* (KROP et al. 2001), *NES1* (GOYAL et al. 1998), *S100A2* (NAGY et al. 2001), entre outros, em tumores esporádicos, destacam a importância da metilação na tumorigênese. A frequência com que promotores metilados contribuem para a inativação de genes relacionados ao câncer varia de 9% no gene do Retinoblastoma

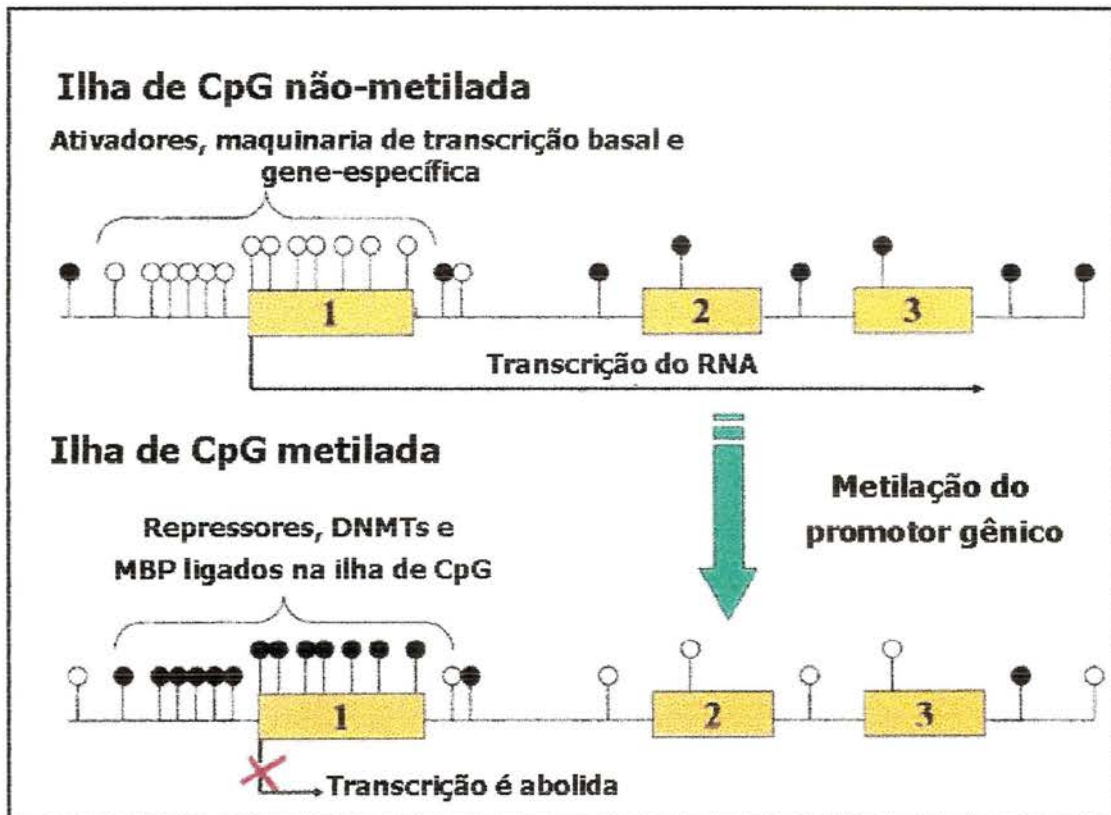
(*RB1*), passando de 33% na doença de Von Hippel Lindau (*VHL*) e atingindo 84% no gene *hMLH1* em tumores coloretais com instabilidade de microsátélites (JONES e LAIRD 1999).

Além da hipermetilação de regiões promotoras de genes, uma diminuição global da metilação (hipometilação) também tem sido observada em tumores. GAMA-SOSA et al. (1983), verificaram uma redução global de 10-20% no conteúdo de 5-metilcitosina no genoma de vários tipos de tumores quando comparados ao tecido normal correspondente. A perda de metilação ou a hipometilação de seqüências de DNA pode afetar diferentes tipos de seqüências repetitivas, tais como os retrotransposons, os retrovírus endógenos, as repetições ALU, as repetições LINE e as repetições de DNA do tipo satélite (DUNN 2003). Recentemente, a perda da metilação em regiões satélite do DNA foi associada com a formação de uma estrutura anormal da cromatina, facilitando a recombinação entre seqüências repetitivas e gerando uma maior instabilidade cromossômica em tumores (EHRlich 2002).

Por outro lado, a perda da metilação parece estar associada com a reexpressão de certos genes que estão silenciados em células normais. Por exemplo, o gene que codifica para a *ornitina decarboxilase* e os proto-oncogenes *ERB-A1* e *BCL-2* se mostraram hipometilados em leucemia linfocítica crônica (LIPSANEN et al. 1988). A ativação do gene *MAGE-1*, que codifica um antígeno tumoral específico em melanomas, também parece estar relacionada com a ausência de metilação na sua região promotora (DE SMET et al. 1996). Outros exemplos recentemente descritos na literatura

são o oncogene *TCL-1* que está hipometilado e re-expresso em Linfoma de Burkitt e Leucemias Linfocíticas Crônicas de células B (YUILLE et al. 2001) e o gene *Sinucleína γ* ou *BCSG1* (do inglês *Breast Cancer-Specific Gene 1*) que foi identificado por apresentar expressão aumentada em tumores de mama (GUPTA et al. 2003).

Dessa forma, o isolamento de novas seqüências de DNA diferencialmente metiladas no genoma celular é fundamental para uma melhor compreensão do processo de transformação maligna e para o desenvolvimento de melhores ferramentas diagnósticas e prognósticas. Neste sentido, algumas técnicas têm sido utilizadas na avaliação de metilação diferencial entre dois tipos celulares. Dentre elas, podemos citar uma técnica de análise global do genoma, chamada de MSAP-PCR (do inglês *Methylation Sensitive Arbitrarilly Primed - PCR*), que pode ser utilizada no isolamento de seqüências com um perfil diferencial de metilação. Por outro lado, técnicas mais específicas também podem ser utilizadas nas análises de metilação em seqüências previamente conhecidas, como é o caso do tratamento do DNA com o reagente bissulfito de sódio.



Fonte: Redesenhado com algumas alterações de ESTELLER (2002).

Figura 1 - Representação esquemática da metilação como mecanismo de inativação gênica.

1.4 METODOLOGIAS UTILIZADAS NA DETECÇÃO DA METILAÇÃO

1.4.1 Análises de metilação global

O isolamento de novas seqüências de DNA diferencialmente metiladas em tumores é fundamental para a melhor compreensão do processo de transformação maligna. Diferentes abordagens metodológicas podem ser utilizadas no isolamento destas seqüências. A técnica de AP-PCR sensível à metilação (MSAP-PCR), por exemplo, foi descrita paralelamente por dois grupos no isolamento de seqüências diferencialmente metiladas em tumores (GONZALGO et al. 1997; HUANG et al. 1997). Resumidamente, DNA tumoral e normal são digeridos completamente com as enzimas de restrição *Msp* I e *Hpa* II (isoesquizomero de *Msp* I sensível à metilação). O DNA digerido é então utilizado como molde em reações de PCR com baixa estringência, obtendo-se um perfil complexo de bandas. Comparando-se o perfil obtido entre as enzimas *Msp* I e *Hpa* II é possível identificar bandas que correspondem a fragmentos de DNA metilados. Bandas representando fragmentos diferencialmente metilados estão presentes nas reações em que o DNA digerido com *Hpa* II é utilizado como molde. Estas bandas estão ausentes quando o DNA é digerido com *Msp* I (insensível à metilação). A identificação de fragmentos diferencialmente metilados é então realizada através da comparação de

bandas obtidas a partir de DNA normal e tumoral digerido com a enzima *Hpa* II (Figura 2 A e B).

HUANG et al. (1997) utilizando MSAP-PCR, isolaram dois fragmentos de DNA diferencialmente metilados em tumores de mama. Um desses fragmentos correspondia ao já conhecido gene Supressor de Tumor WT-1 e o outro, apesar de não apresentar similaridade com nenhuma seqüência previamente descrita no banco de dados, se apresentava metilado em 90% dos tumores de mama analisados. Da mesma maneira, GONZALGO et al. (1997) isolaram 44 fragmentos de DNA diferencialmente metilados em tumores de cólon. Desses fragmentos, 61% (27) se encontravam diferencialmente metilados em tecido normal e tumoral de colon, enquanto 39% (17) se encontravam desmetilados em linhagens celulares.

Além do MSAP-PCR, encontramos na literatura outras técnicas utilizadas para a identificação de seqüências de DNA diferencialmente metiladas: o RLGS (do inglês *Restriction Landmark Genome Scaning*) (SMIRAGLIA et al. 1999), o RDA (do inglês *Representational Difference Analysis*) (USHIJIMA et al. 1997), o MCA (do inglês *Methylated CpG Island Amplification*) (UEKI et al. 2001), o DMH (do inglês *Differential Methylation Hybridization*) (HUANG et al. 1999) e a purificação em coluna de afinidade para DNA metilado (SHIRAISHI et al. 1999). No entanto, essas técnicas requerem grandes quantidades de DNA, são mais trabalhosas e nem sempre são tão sensíveis quanto a MSAP-PCR.

Utilizando essas metodologias, diferentes grupos conseguiram identificar com sucesso seqüências de DNA diferencialmente metiladas em

tumores. Com experimentos adicionais de sequenciamento, clonagem, mapeamento cromossômico e análise dos níveis de expressão, alguns desses fragmentos foram considerados como novos genes supressores de tumor. Por exemplo, o gene HIC-1 (do inglês *Hypermethylated In Cancer - 1*) foi isolado em 1995 por WALES et al. (1995) por estar hipermetilado em linhagens tumorais e foi considerado um novo gene supressor de tumor mapeado no braço curto do cromossomo 17. Esse gene reside em uma região extremamente rica em CG e contém seqüências consenso de ligação ao p53. Ensaios posteriores demonstraram que, em células de câncer de mama, esse gene está inativado por metilação (FUJII et al. 1998).

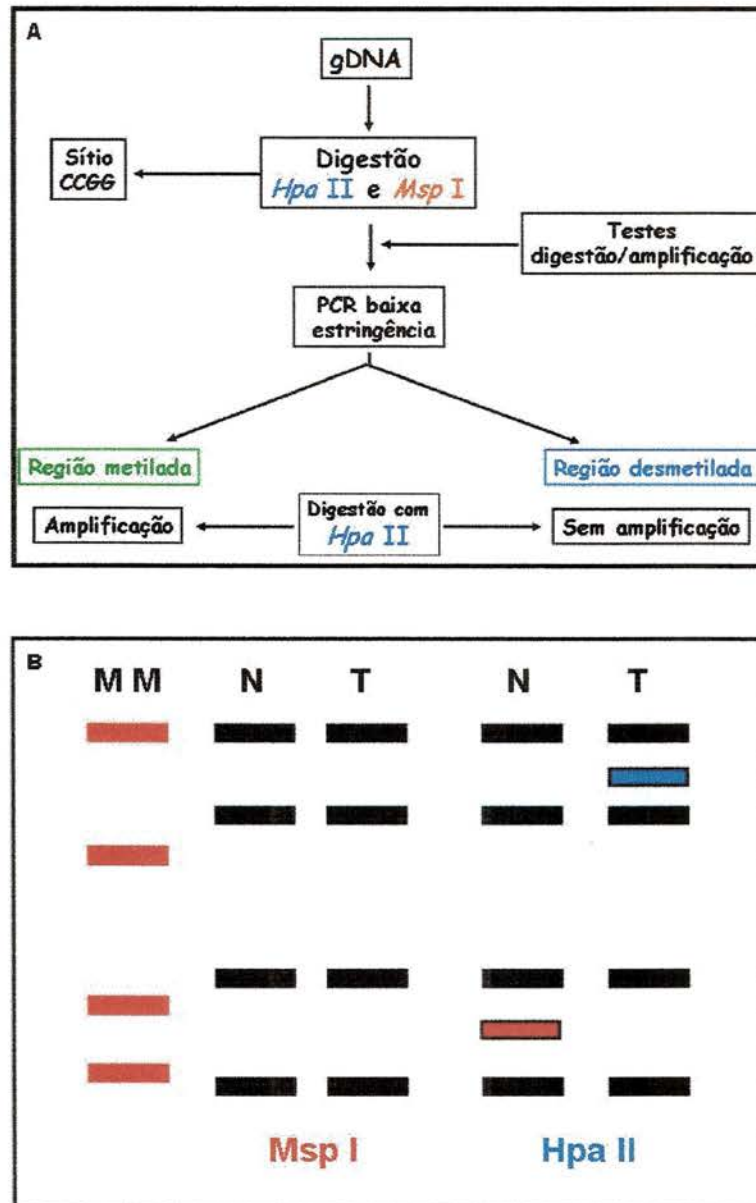


Figura 2 - Representação esquemática da técnica de MSAP-PCR (A) e um perfil ilustrativo gerado após a digestão de um DNA genômico com as enzimas *Hpa II* e *Msp I* (B). Em (B) podemos verificar em vermelho uma banda metilada no tecido normal e em azul uma banda metilada no tecido tumoral. Abreviaturas: MM, Marcador molecular; T, Tecido tumoral; N, Tecido Normal; *Hpa II*, digestão com a enzima *Hpa II*; *Msp I*, digestão com a enzima *Msp I*.

1.4.2 Análises de metilação em uma seqüência de DNA específica

Algumas técnicas de biologia molecular são utilizadas para a análise de metilação em regiões específicas e previamente caracterizadas no genoma. A técnica de *Southern Blot* é a mais antiga técnica de biologia molecular utilizada nas análises de metilação. Nessa técnica, o DNA genômico das células é digerido com enzimas sensíveis à metilação e, posteriormente, uma sonda radioativa específica para a região em estudo é utilizada com o objetivo de verificar se houve ou não digestão do fragmento correspondente a sonda. A presença de mais de uma banda radioativa no auto-radiograma é resultante da digestão do fragmento pela enzima de restrição e indica que o fragmento analisado não está metilado. Por outro lado, a presença de uma única banda radioativa indica a ausência de digestão e a presença de metilação. Apesar de ser muito utilizada, essa técnica é limitada no que diz respeito ao número de dinucleotídeos CpG analisados, sendo que a análise de metilação se restringe ao sítios da(s) enzima(s) escolhida(s) para a digestão. Além disso, essa técnica apresenta a desvantagem de ser laboriosa no que diz respeito à utilização de isótopos radioativos e necessitar de uma grande quantidade de DNA para a digestão.

Recentemente, uma técnica mais moderna tem sido utilizada nas análises de metilação em regiões previamente caracterizadas. Esta metodologia consiste na utilização de um reagente químico conhecido como bissulfito de sódio (composto sólido $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ e dissolvido em água NaHSO_3), que possui a capacidade de atacar as citosinas não-metiladas da molécula de DNA e transformá-las em uracilas através de uma reação simples de

deaminação. No entanto, as citosinas metiladas não são convertidas em uracila após o tratamento com esse reagente. Dessa forma, após o tratamento do DNA com o bissulfito de sódio, pode-se discernir entre as citosinas que possuem um grupamento metil ligado no carbono 5 e as citosinas que não o possuem. Após o tratamento, uma reação de PCR é realizada utilizando-se *primers* específicos para o DNA modificado (Figura 3).

A etapa de desenho dos *primers* é de fundamental importância, pois toda a sequência de DNA não-metilada será modificada após o tratamento. Portanto, os *primers* são desenhados fora da região rica em CG, para que ocorra a amplificação tanto das amostras metiladas quanto das amostras não-metiladas. Após a amplificação, o fragmento gerado pode ser submetido ao sequenciamento direto ou pode ser realizada a clonagem seguida do sequenciamento. Nas análises de sequenciamento do DNA, as citosinas que se mantiverem na sequência são consideradas metiladas por não terem sofrido a modificação com o bissulfito de sódio e aquelas que não estão metiladas são visualizadas como timinas (as uracilas são incorporadas no DNA após a PCR como timinas) (Figura 3). A utilização do tratamento com o bissulfito de sódio nas análises de metilação foi inicialmente descrito por CLARK et al. (1994) e atualmente é a metodologia mais utilizada nessas análises.

Dois técnicas menos laboriosas que utilizam o tratamento com o bissulfito de sódio estão sendo preferencialmente adotadas nos trabalhos que avaliam a metilação em um número elevado de amostras. Estas duas

metodologias são o MSP (PCR metilação específica - do inglês *Methylation Specific PCR*) (HERMAN et al. 1996) e o COBRA (Análise de restrição combinada ao bissulfito de sódio - do inglês *Combined Bissulfite Restriction Analysis*) (XIONG e LAIRD 1997). A utilização desses dois métodos se justifica em um número elevado de amostras, pois o sequenciamento do DNA é uma técnica mais laboriosa e cara.

No MSP, o DNA é tratado com o bissulfito de sódio, mas os *primers* são desenhados dentro das regiões ricas em CG. Dois pares de *primers* capazes de distinguir as amostras metiladas das não-metiladas são desenhados levando-se em consideração a modificação dos nucleotídeos pelo bissulfito de sódio. Dessa forma, duas reações de PCR separadas (uma para a situação metilada e outra para a situação não-metilada) são realizadas e a presença de metilação em uma seqüência de nucleotídeos pode ser verificada.

No COBRA, o DNA tratado com o bissulfito de sódio é amplificado com *primers* desenhados fora da região rica em CG e, posteriormente, o produto amplificado é digerido com uma enzima que possua em seu sítio de restrição a seqüência CpG (exs: *BstU I* - sítio CGCG). A presença de metilação nos dinucleotídeos CpG preserva o sítio da enzima após o tratamento com o bissulfito de sódio, ao passo que a sua ausência destrói o sítio e impede a digestão. Essa técnica só pode ser utilizada quando a região estudada inclui sítios para a enzima de restrição.

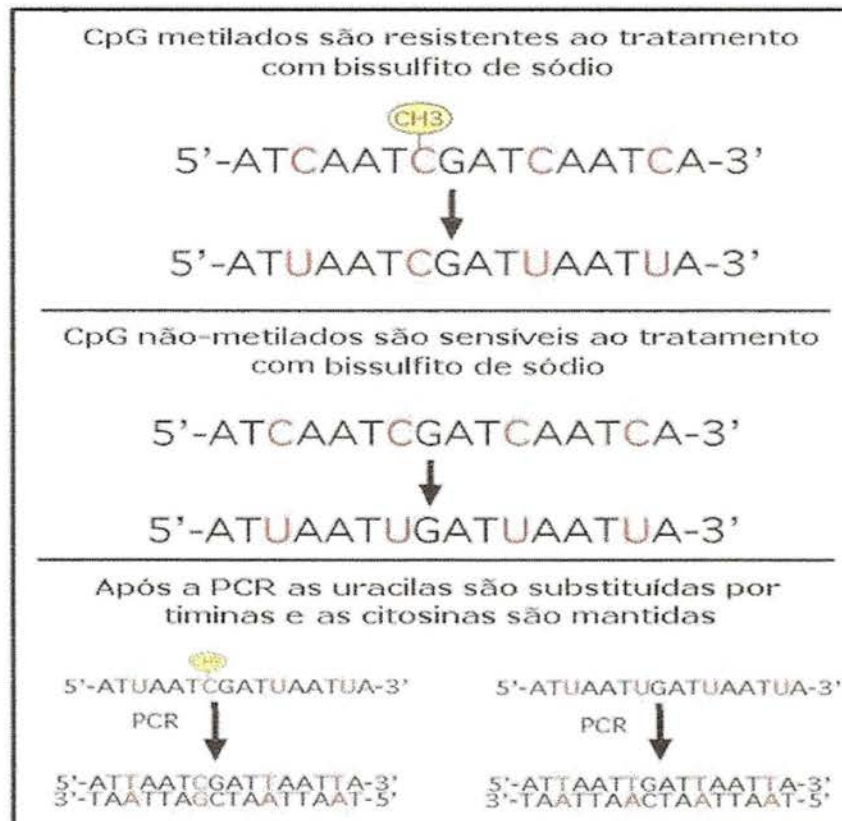


Figura 3 - Representação esquemática do tratamento do DNA com o reagente bissulfito de sódio.

OBJETIVO

2 OBJETIVO

Identificação, clonagem e caracterização de seqüências de DNA diferencialmente metiladas em linhagens celulares de mama através da técnica de AP-PCR sensível à metilação (MSAP-PCR).

**MATERIAIS, MÉTODOS E
RESULTADOS**

3 MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

3.1 IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES DIFERENCIALMENTE METILADAS PELA TÉCNICA AP-PCR SENSÍVEL À METILAÇÃO (MSAP-PCR)

Com o objetivo de identificar e clonar regiões diferencialmente metiladas em câncer de mama, nós utilizamos a técnica MSAP-PCR. Inicialmente, foi realizada uma padronização da quantidade de DNA digerido e da concentração ideal dos *primers* a serem utilizados nos perfis de MSAP-PCR (Figura 4). Dois controles foram criados com o objetivo de evitar a digestão parcial dos DNAs e para verificar se o DNA digerido era passível de amplificação. Como controle de digestão utilizamos uma reação de PCR com iniciadores específicos para a região promotora do gene hMLH1, que possui sítios de restrição para as enzimas *Hpa* II / *Msp* I (BEVILACQUA e SIMPSON 2000). Como a frequência de metilação do gene hMLH1 em tumores de mama é relativamente baixa, a amplificação de um fragmento específico após da digestão do DNA com as enzimas *Hpa* II / *Msp* I foi utilizada como indicativo de digestão parcial. Como controle de amplificação das amostras após a digestão dos DNAs foi utilizada uma reação de PCR com *primers* específicos para o exon 6 do gene p53. A região do éxon 6 foi escolhida por não conter o sítio das enzimas de restrição utilizadas (maiores detalhes no ANEXO 2).

De 13 perfis de MSAP-PCR gerados com diferentes iniciadores (Tabela 1), conseguimos isolar duas bandas diferencialmente metiladas. As duas bandas diferencialmente metiladas isoladas por MSAP-PCR se apresentaram hipometiladas em linhagens celulares tumorais de mama quando estas foram comparadas com as células de mama normais derivadas das células luminais (HBR 514 *Lum*) e das células mioepiteliais (HBR 514 *Myo*). Os dois fragmentos isolados foram reamplificados, clonados, sequenciados e mapeados no genoma humano através da ferramenta BLASTN disponível no NCBI - do inglês *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

O primeiro fragmento de DNA isolado foi mapeado no cromossomo 2q33-34 em uma região muito próxima (menos de 2Kb) do gene ADAM23. Alguns trabalhos na literatura destacam que a perda ou o ganho de metilação em tumores podem ocorrer em blocos de seqüência de DNA contidas no mesmo locus cromossômico, afetando diferentes genes (LIN et al. 2003). Em vista disso, resolvemos estender as nossas análises, avaliando o padrão de expressão e de metilação do gene ADAM23 em amostras normais e tumorais de mama. Neste trabalho, não foi possível estabelecer uma correlação clara entre o padrão de metilação do fragmento inicialmente isolado através do MSAP-PCR e o gene ADAM23. Os resultados referentes às análises de metilação/expressão do gene ADAM23 podem ser verificados no *item 3.2 - Separata 1*. Além disso, análises de metilação na porção 5' do gene ADAM23 foram realizadas em um número elevado de amostras tumorais de mama (n=72) utilizando a técnica de MSP. Através dessas análises, foi possível

verificar uma tendência de associação entre a metilação, a presença de linfonodos comprometidos, a presença de metástases, a ocorrência de recidivas e uma menor sobrevida livre de doença entre as pacientes analisadas. Os resultados referentes ao estudo ampliado de metilação estão apresentados no *item 3.2.1*.

O segundo fragmento de DNA isolado foi mapeado no cromossomo 5 e apresentou elevada similaridade com uma seqüência repetitiva satélite denominada SATR1. Os resultados obtidos nas análises de metilação referentes ao fragmento SATR1 estão descritos no *item 3.3 - Separata 2*.

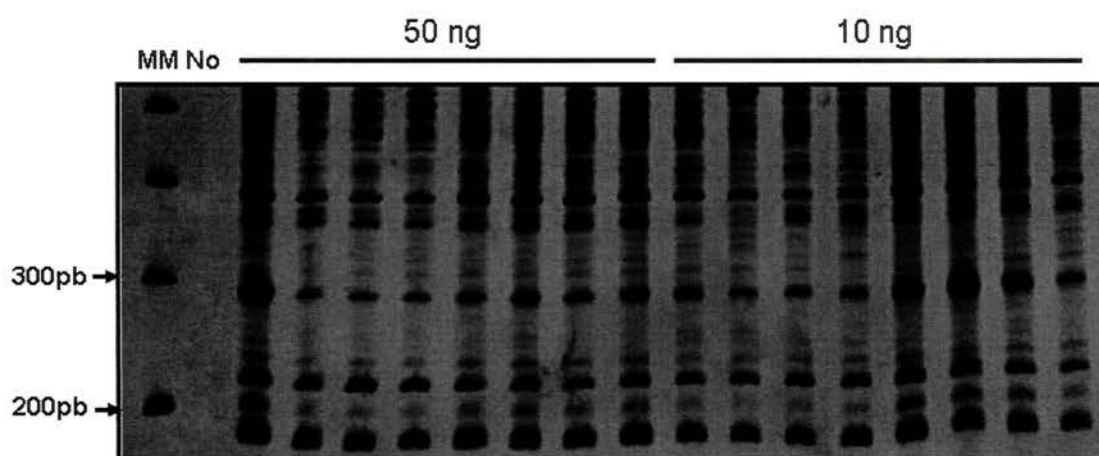


Figura 4 - Gel de poliacrilamida 6% corado pela prata com um perfil de MSAP-PCR. Neste perfil, um teste de reprodutibilidade com 50 ng e 10 ng de DNA genômico foi realizado em octuplicatas após a digestão com a enzima *Hpa* II. Notar a reprodutibilidade entre as octuplicatas. MM, Marcador Molecular ; No, Controle sem DNA.

Tabela 1 - Diferentes *primers* utilizados em perfis de MSAP-PCR e a sua seqüência nucleotídica.

NOME	Primer	PROCEDÊNCIA
OLIGO 01	5'-GGT CCG CTC GGA CCA-3'	HCGP*
OLIGO 02	5'-CTT GAA TAG GAG CTC-3'	HCGP
OLIGO 08	5'-TCT GCC TAC GCG ACG-3'	HCGP
OLIGO 10	5'-CAT CAC GCG GGA GCG-3'	HCGP
OLIGO 14	5'-GTT CAA TTT CTA CAC -3'	HCGP
OLIGO 21	5'-GCG GTG GCC TCA TGA-3'	HCGP
OLIGO 26	5'-CGG AAG GTT GGT CTC-3'	HCGP
OLIGO 42	5'-GCT GCC CAC GAA GTG-3'	HCGP
OLIGO 175	5'-ACG CTG ATC CGG AGC-3'	HCGP
MLG-2	5'-AAC CCT CAC CCT AAC CCC GG -3'	GONZALGO et al. (1997)
MGF-0	5'-AAC CCT CAC CCT AAC CGC GC -3'	GONZALGO et al. (1997)
MGF-2	5'-AAC CCT CAC CCT AAC CCG CG-3'	GONZALGO et al. (1997)
MT5.3R	5'-GGC TGA GTG ACA GCA TCT CG-3'	HCGP

Legenda: * Human Cancer Genome Project - LICR / FAPESP

3.2 SEPARATA 1

***“Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23
is highly frequent in breast tumors.”***

Oncogene, 2004

23 (7): 1481-1488

ORIGINAL PAPER

Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors

Fabrcio F Costa¹, Newton V Verbisck¹, Anna Christina M Salim¹, Daniela F Ierardi¹, Lilian C Pires¹, Regina M Sasahara², Mari C Sogayar², Silvio M Zanata³, Alan Mackay⁴, Michael O'Hare⁴, Fernando Soares⁵, Andrew JG Simpson¹, Anamaria A Camargo^{*1}

¹Laboratory of Molecular Biology and Genomics, Ludwig Institute for Cancer Research, SP, Brazil; ²Departamento de Bioqumica, Instituto de Qumica, Universidade de So Paulo, SP, Brazil; ³Laborat3rio de Neurobiologia, Universidade Federal do Paran3, P.R, Brazil; ⁴Breast Cancer Laboratory, Ludwig Institute for Cancer Research, University College, England; ⁵Departamento de Patologia, Hospital ACCamargo, SP, Brazil

Altered cell adhesion is causally involved in tumor progression, and the identification of novel adhesion molecules altered in tumors is crucial for our understanding of tumor biology and for the development of new prognostic and therapeutic strategies. Here, we provide evidence for the epigenetic downregulation in breast tumors of the *A Desintegrin And Metalloprotease domain 23* gene (ADAM23), a member of a new family of surface molecules with roles in cell–cell adhesion and/or cell–matrix interactions. We examined the mRNA expression and methylation status of the 5' upstream region of the ADAM23 gene in different breast tumor cell lines as well as in primary breast tumors. We found ADAM23 5' hypermethylation in eight out of 12 (66.7%) tumor cell lines and in nine out of 13 (69.2%) primary tumors. Promoter hypermethylation was strongly associated with reductions in both mRNA and protein expression, with a threshold of 40–60% of modified CpG dinucleotides being required for the complete silencing of ADAM23 mRNA expression. Treatment of MCF-7 and SKBR-3 cell lines with 5'-Aza-2'-deoxycytidine led to a reactivation of ADAM23 mRNA expression and a marked decrease in the methylation level. It is worth noting that primary breast tumors with a more advanced grade showed a higher degree of methylation, suggesting that the adhesion molecule ADAM23 may be downregulated during the progression of breast cancer.

Oncogene advance online publication, 8 December 2003; doi:10.1038/sj.onc.1207263

Keywords: ADAM23; methylation; cell adhesion; downregulation; breast tumor

Introduction

Breast cancer accounts approximately for one-fifth of all deaths in women aged 40–50 years (Radice and Redaelli,

2003). When breast carcinomas remain confined to breast tissue, cure rates exceed 90%; however, if metastases have developed, prognosis is poor, with 5-year survival rates usually being less than 20% (Jemal *et al.*, 2003). Breast cancer progression and metastases formation are a multistep process resulting from a series of genetic changes (Welch *et al.*, 2000).

An increasing body of evidence indicates that altered cell adhesion is causally involved in tumor progression and metastases formation rather than merely being a consequence of it (Cavallaro and Christofori, 2001; Okegawa *et al.*, 2002). Genetic alterations in two main groups of adhesion molecules, cadherins and cell adhesion molecules (CAMs), have been implicated in tumor malignancy and the identification of novel classes of adhesion molecules altered in human cancers is crucial for extending our understanding of tumor biology and for the development of new prognostic and therapeutic strategies (Cavallaro and Christofori, 2001; Okegawa *et al.*, 2002).

The ADAMs (*A Desintegrin And Metalloprotease domains*) comprise a family of membrane-anchored cell surface proteins with a common structural organization, including metalloprotease, disintegrin, cysteine-rich, epidermal growth factor-like, transmembrane and cytoplasmic domains. The ADAMs are unique among cell surface proteins in possessing both a potential adhesion domain and a potential protease domain (Wolfsberg *et al.*, 1995a, b; Black and White, 1998; Primakoff and Myles, 2000). In addition, the cytoplasmic tails of many ADAMs contain sequence homology 3 binding sites, suggesting that they may interact with intracellular signaling and cytoskeletal systems (Weskamp *et al.*, 1996; Howard *et al.*, 1999; Cousin *et al.*, 2000; Suzuki *et al.* 2000).

Cell–cell and cell–matrix interactions are known to determine cell-adhesion, cell migration and proliferation processes that are directly involved in tumor development and progression. Owing to the ability to perform both functions, some members of the ADAM family have been suggested to play an important role in human cancers. ADAM11 was originally identified as a candidate tumor suppressor gene involved in human

*Correspondence: AA Camargo, Laboratory of Molecular Biology and Genomics, Ludwig Institute for Cancer Research (LICR), Rua Professor Ant3nio Prudente 109, 4th floor, So Paulo, SP 01509-010, Brazil; E-mail: anamaria@compbio.ludwig.org.br
Received 7 May 2003; accepted 10 October 2003

breast cancer (Emi *et al.*, 1993), whereas several ADAM members (ADAM 9, 10, 11 and 15) have been proposed to be responsible for pathological features of hematological malignancies (Wu *et al.*, 1997). ADAM2 has recently been identified as a putative cancer/testis antigen expressed in renal cancer (Scanlan *et al.*, 2002). In addition, ADAM10 is overexpressed in pheochromocytomas and neuroblastomas, while the expression of ADAMs 9, 10 and 17 is differentially regulated by androgen in the androgen-responsive LNCaP prostate cancer cell line (McCulloch *et al.*, 2000). The overexpression of ADAM15 in NIH3T3 cells appears to enhance cell-cell interactions, as suggested by decreased cell migration, altered cell morphology and increased cell adhesion (Herren *et al.*, 2001). Finally, other family members such as ADAM17 (TACE – TNF- α converting enzyme) have been proposed to play an important role in tumor progression through their participation in the proteolytic activation of growth factor precursors of relevance to cancer, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Moss *et al.*, 2001).

ADAM23 exhibits the typical structure of the ADAM family members; however, the metalloprotease domain is inactive, suggesting that it is exclusively involved in the cell adhesion process (Sagane *et al.*, 1998). In this context, ADAM23 was recently shown to interact specifically with $\alpha v \beta 3$ integrin in an RGD-independent manner (Cal *et al.*, 2000). In this study, we have evaluated the mRNA expression level and methylation status of the 5' upstream region of the ADAM23 gene in different breast tumor cell lines and primary tumors as a further contribution to the investigation of the role of ADAM family members in human cancer.

Materials and methods

Patients and tumor cell lines

A total of 13 breast tumor cell lines (Du4475, MDA-MB-415, MDA-MB-361, MDA-MB-468, 734b, SKBR-3, MDA-MB-175, ZR-75-1, CAMA-1, MCF-7, CAL-51, PMC42 and MDA-MB-436), most of which of metastatic origin, were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and maintained under recommended culture conditions.

In all, 15 primary ductal breast tumors were collected from patients during surgery at the Hospital do Câncer AC Camargo after explicit informed consent and rapidly frozen in liquid nitrogen. Paired normal and tumor tissues were obtained from all patients. Normal breast samples were commercially obtained from Clontech (Palo Alto, CA, USA).

In silico CpG island identification

We used the ADAM23 complete cDNA sequence (GenBank Accession No. AB009672) to search the publicly available human genome draft using the BLASTN program and to define the genomic structure of the ADAM23 gene. A genomic clone on chromosome 2q33–34 (GenBank Accession No. AC009225), that contained the 5' cDNA sequence as well as 5' upstream sequence was selected. An interval of 2 kb upstream and downstream from the transcription initiation site was used for *in silico* CpG island identification. The CpG plot program

(<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot>) was used for CpG island identification with the following parameters: 100 bp length, 50% G + C and 0.6 observed/expected ratio. Putative SPI binding sites were identified using TESS (Transcription Element Search System) program.

Analysis of DNA methylation by sequencing of sodium bisulfite-treated DNA

Genomic DNA was obtained by digestion with proteinase K (Gibco BRL) followed by phenol/chloroform extraction, and was subjected to sodium bisulfite treatment to modify unmethylated cytosine to uracil using the 'CpG Modification Kit' (Intergen). Bisulfite-treated DNA was amplified by a nested-PCR protocol using the following primers: ADAMB1-F, 5'-TTT GTT TTG GAT AAA TTA AGG TTA-3' and ADAMB1-R, 5'-CTA CAA AAA TCA AAA CTA AAT CTC-3' for the first reaction; and ADAMB2-F, 5'-GTA TGT AAA TAT AAA GGA TTG TAG-3' and ADAMB2-R, 5'-ATA AAA ATA TAT CCT CCT AAA TAT-3' for the second reaction. PCR was performed in a volume of 25 μ l containing 1 \times PCR Buffer (Applied Biosystems); 1.5 mM of MgCl₂ (Applied Biosystems); 200 μ M of dNTPs (Amersham); 0.32 μ M of each primer and 1 U of Taq GOLD (Applied Biosystems). The PCR conditions were: 94°C for 12 min, 94°C for 3 min, 50°C for 3 min, 72°C for 2 min; 94°C for 3 min, 53°C for 3 min, 72°C for 2 min five cycles and 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min 35 cycles for the first reaction and different annealing temperatures (45, 48 and 50°C) for the nested reaction. Amplified products were purified using the PCR Purification Kit (Qiagen) and were sequenced directly or ligated to a TA cloning vector (Invitrogen). Six positive clones were sequenced for each cell line and 10 clones were sequenced for each primary tumor, and its normal counterpart using the vector's universal primers. The methylation percentage for each sample was calculated as the number of methylated CpG dinucleotides from the total number of CpGs analysed in all positive clones. DNA sequencing reactions were performed using the 'Dynamic™ ET terminator cycle sequencing' kit (Amersham) and an ABI3100 sequencer (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions.

5'-aza-2'-deoxycytidine treatment

MCF-7 and SKBR-3 cell lines were treated with 5-Aza-CdR (Sigma). Cells (10⁶) were seeded in 100 mm dishes, cultured for 48 h and treated with 1 μ M of 5-Aza-CdR or left untreated. After 2–6 days, cells were washed with PBS and total RNA and DNA were isolated.

RNA isolation and RT-PCR

Total RNA was isolated using guanidine-isothiocyanate or Trizol® (Gibco BRL). The quality of RNA samples was determined by electrophoresis through agarose gels and staining with ethidium bromide. Relative intensities of the 18S and 28S RNA bands were evaluated under UV light. Reverse transcription reactions were performed with 2 μ g DNA-free RNA using SUPERScript II Reverse Transcriptase (Gibco BRL). PCR was performed using ADAM23-specific primers 5'-TAT GAG CAG CTG TCC ACT CG-3' (sense) and 5'-CCC CAG CCT GTG CCC CCA AG -3' (antisense). The PCR conditions were as follows: one cycle at 94°C for 4 min and 35 cycles at 94°C for 45 s, 62°C for 45 s and 72°C for 1 min. The glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene was amplified as an internal control. Primers for GAPDH were 5'-CTG CAC CAC CAA CTG CTT A-3' (sense) and 5'-CAT GAC GGC AGG TCA GGT

C-3' (antisense). PCR products were resolved on 1% agarose gels, blotted onto nylon membranes and hybridized to a specific probe as described below.

Semiquantitative RT-PCR

Semiquantitative RT-PCR was carried out as described above, and reactions were terminated at different cycles: 22, 25 and 28 cycles for GAPDH and 28, 30 and 35 cycles for ADAM23 gene. PCR products were resolved on 1% agarose gels and blotted onto nylon membranes. Hybridizations were undertaken as described previously (Church and Gilbert, 1984) using a ³²P-labeled ADAM23 cDNA (Accession No. AB009672 nucleotide 1870–2800) and control probe from GAPDH cDNA (Accession No. BC023632 nucleotide 486–778).

Antibodies and Western blot

The peptide (C N N T S C L F Q P R G Y E C R D A V N E C D I T) corresponding to residues 546–570 from human ADAM 23 (Accession No. AB009672) was chemically synthesized by Bethyl Inc. (Montgomery, TX, USA) and conjugated to keyhole limpet hemocyanin (KLH) as carrier protein. Polyclonal antibodies against KLH peptide were raised in rabbits (Custom Antibody Generation Service, Bethyl) and purified IgG obtained from hyperimmune serum after Protein A–Sepharose chromatography according to the manufacturer's instruction (Amersham). Total cell lysates were isolated as described previously (Towbin *et al.*, 1979), and 80 µg of protein per sample were separated on 8% SDS–PAGE, transferred to PVDF membranes (Amersham) and immunoblotted with the anti-peptide polyclonal at 1:2000 dilution using enhanced chemiluminescence detection system (Amersham). The anti-peptide polyclonal specifically detected a single sharp band of approximately 120 kDa in breast tumor cell lines expressing the ADAM23 mRNA, but not in control cells where ADAM23 mRNA expression was not detected by RT-PCR. Membranes were stripped and reblotted with antiactin monoclonal antibody (SIGMA at 1:400 dilution) as a control of protein integrity.

Results

Downregulation of ADAM23 mRNA expression in breast tumor cell lines

We evaluated the ADAM23 mRNA expression by RT-PCR followed by hybridization in a panel of 12 breast tumor cell lines (Du4475, MDA-MB-415, MDA-MB-361, MDA-MB-468, 734b, MDA-MB-175, ZR-75-1, CAMA-1, MCF-7, SKBR-3, CAL-51 and PMC42) and in normal breast tissue. ADAM23 expression was detected at high levels in normal tissue, but could not be detected or was detected at a lower level in eight (66.7%) of the breast tumor cell lines (Du4475, MDA-MB-415, MDA-MB-468, 734b, MDA-MB-175, MCF-7, SKBR-3 and CAL-51) (Figure 1a).

Aberrant methylation of the 5' upstream region of the ADAM23 gene

Downregulation of tumor-related genes is often associated with aberrant methylation of CpG dinucleotides located at the 5' upstream region of the gene (Jones and

Laird, 1999; Garinis *et al.*, 2002; Jones and Baylin, 2002). We used the human genome sequence to obtain the 5' upstream region of the ADAM23 gene and to identify *in silico* putative CpG islands. A genomic clone on chromosome 2q33–34 was obtained and two CpG islands were identified within a 2.0 kb region that includes approximately 1.0 kb upstream from the transcription initiation site, together with the first exon and intron (Figure 2). More than 100 CpG dinucleotides were present in this region, suggesting that methylation might influence the transcription of the ADAM23 gene.

Bisulfite genomic sequencing of a region comprising 22 CpG dinucleotides located approximately –1025 to –549 bp from the transcription start site revealed a high frequency (66.7%) of ADAM23 5' hypermethylation in tumor cell lines analysed. We could also observe that the methylation status was strongly correlated with ADAM23 mRNA expression (Figure 1b). Methylation of more than 50% of the CpG dinucleotides in this region was detected by direct sequencing in nine breast tumor cell lines (Du4475, MDA-MB-415, MDA-MB-361, MDA-MB-468, 734b, MDA-MB-175, MCF-7, SKBR-3 and CAL-51) (Figure 1b). With the exception of the MDA-MB-361 all other cell lines exhibiting hypermethylation showed altered ADAM23 expression.

Methylation density, mRNA and protein expression level

We observed that a threshold of modified CpG dinucleotides was required for the complete silencing of ADAM23 mRNA expression. To explore this observation, we analysed the methylation pattern of six independent alleles from breast tumor cell lines (PMC42; ZR-75-1, CAMA-1, 734b, MDA-MB-415) with different percentages of modified CpG dinucleotides (as determined by direct PCR sequencing) and performed a semiquantitative RT-PCR experiment. Samples of the RT-PCR were taken at different cycles of the reaction and were analysed by Southern blotting.

As it can be seen in Figure 3a, amplification products corresponding to the ADAM23 transcript from cell lines with a lower methylation density (PMC42, CAMA-1, ZR-75-1) were detected at earlier cycles and had a higher hybridization intensity at the end of the reaction, confirming that they are expressed at higher levels than in cell lines with high methylation densities (734b, MDA-MB-415). These results indicate that at least 40–60% of the CpG dinucleotides had to be modified for a complete gene silencing and that methylation density, and not merely the presence of hypermethylation, may be of critical importance to transcription (Figure 3b). It is interesting to note that, in this model, methylation seems to initiate mostly at CpG dinucleotides 13–19 and spread towards the promoter region, which contains two putative SP1 binding sites at CpG dinucleotides 3 and 10 (Figure 3b).

Western blot analysis, using specific anti-ADAM23 antibody, demonstrated protein expression in cell lines that express the ADAM23 mRNA (PMC42 and MDA-MB-436), but not in the MCF-7 cell line in which ADAM23 mRNA expression was silenced by aberrant

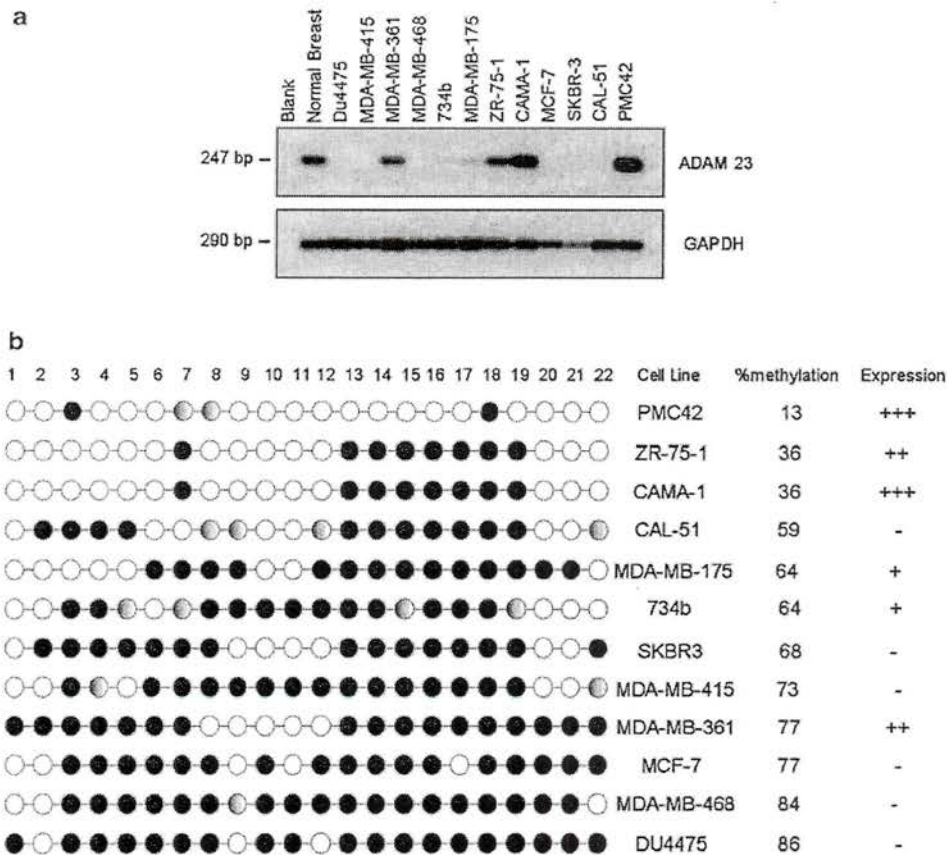
ADAM23 methylation in breast tumors
FF Costa *et al*

Figure 1 ADAM23 mRNA expression and methylation analysis in a panel of 12 breast tumor cell lines. (a) RT-PCR products were blotted onto nylon membranes and hybridized with cDNA probes. GAPDH was used to control the integrity of RNA samples and a blank control was included. (b) Direct bisulfite sequencing of region 1 containing 22 CpG dinucleotides. The numbers at the top indicate the CpG dinucleotides in the amplicon. Cell lines, percentage of methylation in each sample and expression level are indicated on the right. Each circle represents a CpG dinucleotide. Spacing between circles is relative. Methylation: open circle, unmethylated; black circle, methylated; gray circle, hemimethylated. Expression: -, not detected; + barely detected; ++ detected; +++ greatly detected

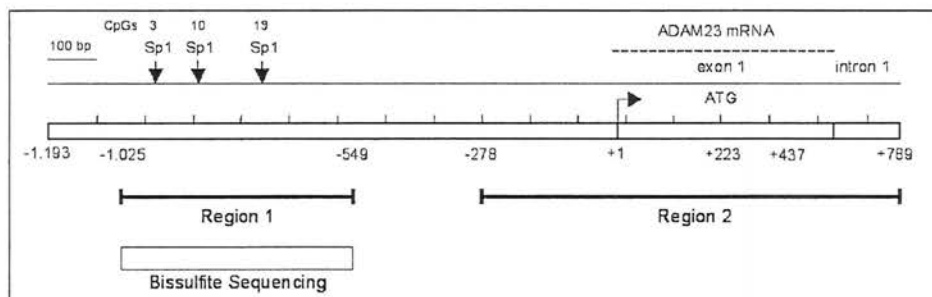


Figure 2 Schematic representation of CpG islands in the 5' upstream region of the ADAM23 gene. The bent arrow indicates the transcription initiation site and the downside arrows represent potential Sp1 sites. Positions in base pairs were calculated from the transcription start site (+1). Regions comprising the two CpG islands are indicated as regions 1 and 2. Horizontal gray bar indicates the region with 22 CpG islands analysed by bisulfite sequencing

promoter methylation (Figure 4). These results provide a validation for the RT-PCR and methylation studies and indicate that DNA promoter hypermethylation contribute to the downregulation of ADAM23 gene at the protein level.

ADAM23 mRNA re-expression with 5'-Aza-dCR

To confirm the relationship between ADAM23 hypermethylation and expression, we treated MCF-7 and SKBR-3 breast tumor cell lines with the demethylating

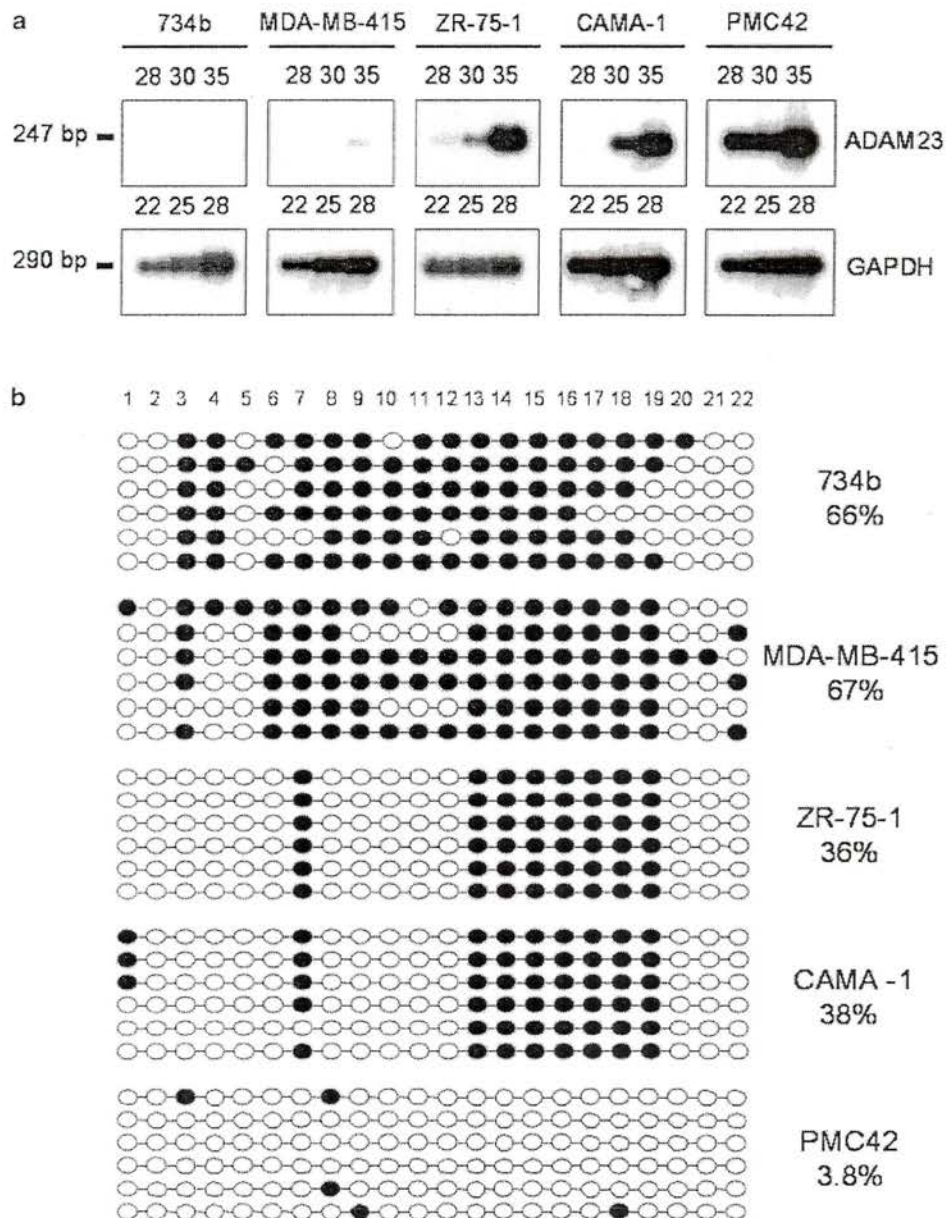


Figure 3 Semiquantitative RT-PCR using five breast tumor cell lines (734b, MDA-MB-415, ZR-75-1, CAMA-1 and PMC42) showing different levels of ADAM23 expression (a) and methylation (b). RT-PCR reactions were terminated at different cycles: 22, 25 and 28 cycles for GAPDH and 28, 30 and 35 cycles for ADAM23. Each row represents one sequenced allele and each circle represents a CpG dinucleotide. A filled and open circle represents the presence or absence of methylation, respectively. Cell lines and percentage of methylation are indicated on the right

agent 5-aza-2'-deoxycytidine (5'-Aza-dCR). ADAM23 expression was restored upon treatment in both cell lines, as detected by RT-PCR (Figure 5). A marked decrease in the original methylation status was observed at the 5' upstream region following treatment for both cell lines. It is worth noting that CpG islands 3 and 10 that correspond to putative SP1 binding sites became completely unmethylated after treatment (data not shown).

ADAM23 aberrant methylation in primary breast tumors

We next examined whether this epigenetic alteration could be extrapolated to primary tumors. The methylation status of the 5' upstream region was determined for 10 alleles of primary breast tumors as well as for their corresponding adjacent normal tissues. Tumor samples were defined as presenting aberrant methylation if their percentage of methylation was at least three times higher

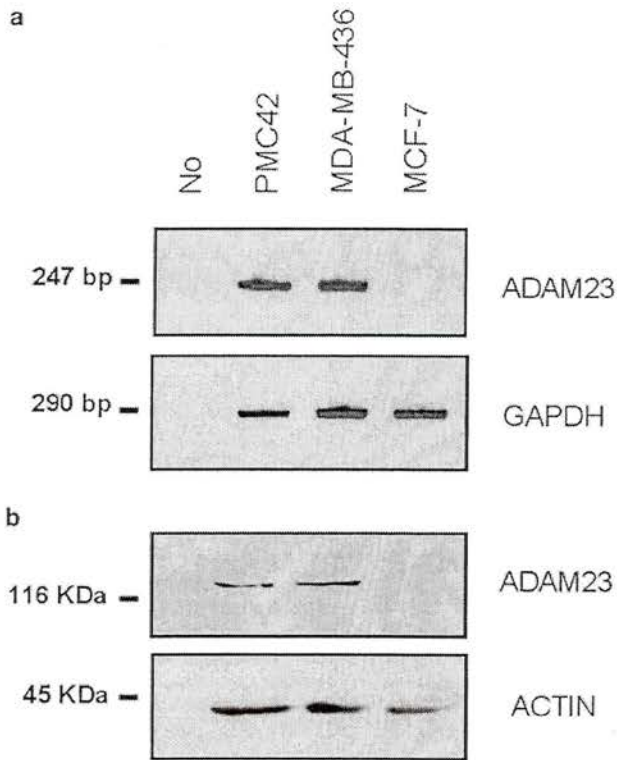


Figure 4 ADAM23 mRNA and protein expression analysis. (a) RT-PCR analysis of ADAM23 mRNA expression in the PMC42, MDA-MB-436 and MCF-7 breast tumor cell lines. GAPDH was used to control the integrity of RNA samples and a blank control was included (no DNA control), (b) Western blot analysis of the PMC42, MDA-MB-436 and MCF-7 tumor cell lines using an antibody against the ADAM23 desintegrin domain. An antiactin antibody commercially available was used as a control of the protein integrity

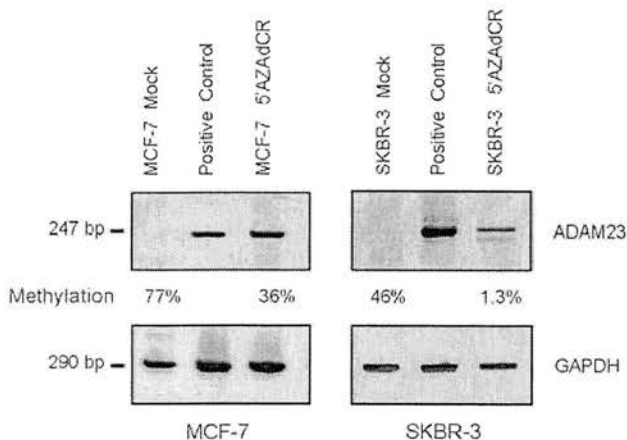


Figure 5 Effects of 5'-Aza-dCR treatment on ADAM23 expression in the MCF-7 and SKBR-3 cell lines. Silver stained 8% polyacrylamide gel showing RT-PCR products derived from ADAM23 mRNA. PMC42 cDNA was used as positive control. GAPDH was amplified separately as a control of RNA integrity. Methylation percentage was obtained after bisulfite sequencing of six alleles for each cell line. The percentage of methylation was calculated as the number of methylated CpG dinucleotides from the total number of CpGs analysed in all alleles

than that of normal samples. As observed for the breast tumor cell lines, a high frequency of promoter hypermethylation was observed. Aberrant methylation was found in nine out of 13 (69.2%) cases of primary breast tumors (Figure 6a). It is interesting to note that primary breast tumors with a more advanced grade have a higher degree of methylation (Figure 6b). Although these results require further verification, they suggest that ADAM23 may be downregulated during the progression of breast cancer. The ADAM23 mRNA expression was also determined in tumor and adjacent normal tissue whenever fresh preserved tissues were available for mRNA extraction. The downregulation of the ADAM23 gene was observed in tumors with a high percentage of methylation (Figure 6a).

We observed a highly heterogeneous pattern of promoter region methylation. Although many CpG sites were affected by methylation, the exact location of methylated sites varied not only between samples but also between alleles from the same sample (Figure 6a). This kind of heterogeneity was recently observed for the E-cadherin gene and was suggested to contribute to the dynamic phenotypic heterogeneity that drives metastatic progression in primary breast tumors (Graff *et al.*, 2000). The presence of unmethylated molecules in most tumor samples was also observed, and could be derived from contaminating normal tissue or infiltrating lymphocytes.

Discussion

A group of recently described proteins, the ADAMs, have stimulated interest due to their potential ability to perform two different functions related to tumorigenesis: cell adhesion and proteolysis (Wolfsberg *et al.*, 1995a, b; Black and White, 1998; Primakoff and Myles, 2000). As a further step to determine the role of ADAM family members in human cancers, we examined the expression level and methylation status of the 5' upstream region of the ADAM23 gene in different breast tumor cell lines as well as in primary breast tumors.

ADAM23 expression was detected in normal tissue, but could not be detected or was detected at a lower level in eight (66.7%) of the breast tumor cell lines examined. The presence of methylation in a region located approximately 0.5 kb from the transcription initiation site of the ADAM23 gene was strongly associated with the altered mRNA and protein expression pattern. This association was further confirmed in experiments using the demethylating agent 5'-Aza-dCR. We also found ADAM23 tumor-specific hypermethylation in 69.2% primary breast tumors.

A threshold of 40–60% of modified CpG dinucleotides was required for the complete silencing of ADAM23 mRNA expression. Similarly, Cameron *et al.* (1999) have shown that a threshold of 40% was required for silencing the human p15 gene in acute leukemia. The existence of such a threshold has also been

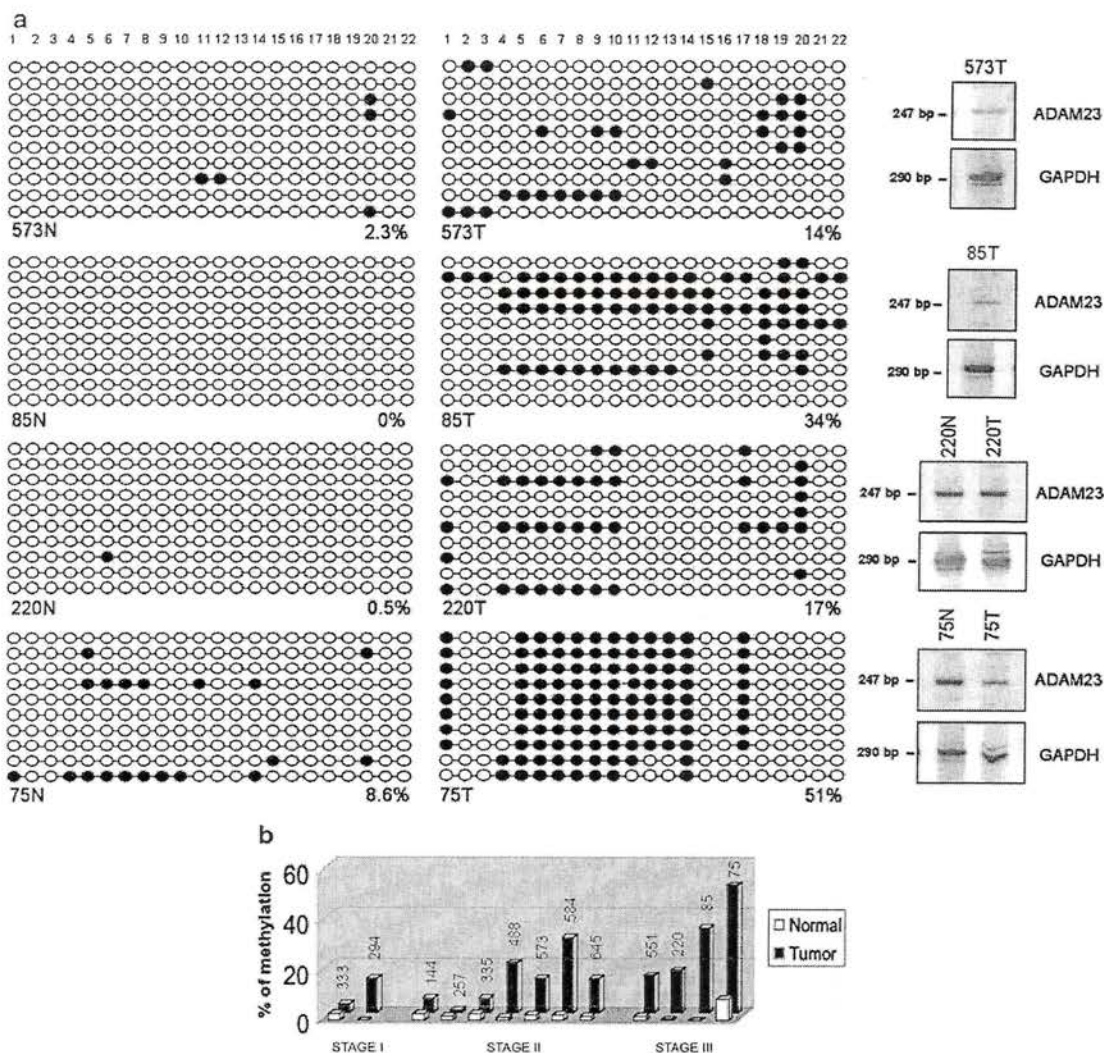


Figure 6 Bismulfite genomic sequencing and ADAM23 mRNA expression analysis of primary breast tumors. (a) Representative examples of four (573, 75, 220 and 85) paired normal (N) and tumor (T) samples. (Left) Bismulfite sequencing of region 1 containing 22 CpG dinucleotides. The numbers at the top indicate the CpG dinucleotides in the amplicon. Each circle represents a CpG dinucleotide and spacing between circles is relative. Methylation: open circle, unmethylated; black circle, methylated. Methylation percentages are indicated below of each diagram. (Right) RT-PCR products derived from ADAM23 mRNA. GAPDH was used as a control for RNA integrity. (b) Histogram representation of the methylation status of 13 paired normal (N) and tumor (T) samples. The percentage of methylation is represented in the Y-axis and tumor stages are represented in the X-axis

demonstrated in experiments using plasmid constructs containing a different number of methylated dinucleotides cloned at different positions relative to a specific promoter (Ohtani-Fujita *et al.*, 1993; Hsieh, 1994; Curradi *et al.*, 2002). The presence of intra-allelic variation and the requirement of a threshold for complete gene silencing supports the view that aberrant methylation is a consequence of a decrease in normal transcription activity and involves progressive methylation towards the regulatory transcription sites (Clark and Melki, 2002; Turker, 2002).

Alterations of the methylation pattern have now been widely observed in tumors. Global hypomethylation, increased DNA methyltransferase activity and local DNA hypermethylation of CpG islands located in the 5'

regulatory regions of tumor-related genes have all been reported (Ehrlich, 2002; Esteller, 2002; Robertson, 2002). Here we provide, for the first time, evidence for the epigenetic silencing of a member of the ADAM family, suggesting a potential role of this new family of adhesion molecules in cancer.

A growing body of evidence suggests that alterations in the adhesion properties of neoplastic cells have a pivotal role in the progression of cancer and metastasis formation (Cavallaro and Christofori, 2001; Okegawa *et al.*, 2002). Loss of intercellular adhesion and desquamation of cells from the *lamina propria* allows malignant cells to escape from their site of origin, degrade the extracellular matrix, invade and metastasize. Since ADAM23 was recently shown to act as an



adhesion molecule (Cal *et al.*, 2000), gene silencing caused by aberrant promoter methylation may result in abnormal cell–cell interactions and favor cell migration during metastatic process.

In this context, we have observed that primary breast tumors with a more advanced grade have a higher degree of ADAM23 promoter hypermethylation. We also observed that, although many CpG sites were affected by methylation, the exact location of methylated sites varied not only between tumor samples but also between alleles from the same sample. The presence of this intra-allelic heterogeneity in the methylation pattern suggests that methyltransferase enzyme does not faithfully maintain methylation at individual CpG sites. This fact could reflect a type of epigenetic instability, which, in turn, may provide a growth advantage to the cell leading to the selection of those with the most dense methylation profile during metastatic progression. This kind of epigenetic instability was recently observed for the E-cadherin gene and was suggested to contribute to the dynamic, phenotypic heterogeneity that drives metastatic progression in primary breast tumors (Graff

et al., 2000). Further studies are underway to support the role of ADAM23 (and other ADAM family members) in tumor progression and to explore its potential use as a tumor marker.

Abbreviations

ADAM, A Desintegrin And Metalloprotease domain; MDC, Metalloprotease/Disintegrin/Cysteine rich; TACE, TNF- α converting enzyme; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; CAM, cell adhesion molecule ; 5'-Aza-dCR, 5'-Aza-2'-deoxycytidine.

Acknowledgements

We thank Dr Ricardo R Brentani, Dr Roger Chamas, Dr Luís F Reis, Dr Dirce M Carraro and Dr Eduardo F Abrantes for critically reading this manuscript and Valéria Paixão, Marilene H Lopes and Waleska K Martins for technical assistance. This work was supported by The Ludwig Institute for Cancer Research (LICR) – São Paulo – Brazil and by the CEPID Program from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). FFC is sponsored by a fellowship from FAPESP.

References

- Black RA and White JM. (1998). *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, 654–659.
- Cal S, Freije JM, Lopez JM, Takada Y and Lopez-Otin C. (2000). *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 1457–1469.
- Cameron EE, Baylin SB and Herman JG. (1999). *Blood*, **94**, 2445–2451.
- Cavallaro U and Christofori G. (2001). *Biochim. Biophys. Acta*, **1552**, 39–45.
- Church GM and Gilbert W. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1991–1995.
- Clark SJ and Melki J. (2002). *Oncogene*, **21**, 5380–5387.
- Cousin H, Gaultier A, Bleux C, Darriberre T and Alfandari D. (2000). *Dev. Biol.*, **227**, 197–210.
- Curradi M, Izzo A, Badaracco G and Landsberger N.. (2002). *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 3157–3173.
- Ehrlich M. (2002). *Oncogene*, **21**, 5400–5413.
- Emi M, Katagiri T, Harada Y, Saito H, Inazawa J, Ito I, Kasumi F and Nakamura Y. (1993). *Nat. Genet.*, **5**, 151–157.
- Esteller M. (2002). *Oncogene*, **21**, 5427–5440.
- Garinis GA, Patrinos GP, Spanakis NE and Menounos PG.. (2002). *Hum. Genet.*, **111**, 115–127.
- Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB and Herman JG. (2000). *J. Biol. Chem.*, **275**, 2727–2732.
- Herren B, Garton KJ, Coats S, Bowen-Pope DF, Ross R and Raines EW. (2001). *Exp. Cell Res.*, **271**, 152–160.
- Howard L, Nelson KK, Maciewicz RA and Blobel CP. (1999). *J. Biol. Chem.*, **274**, 31693–31699.
- Hsieh CL. (1994). *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 5487–5494.
- Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E and Thun MJ. (2003). *CA Cancer J. Clin.*, **53**, 5–26.
- Jones PA and Baylin SB. (2002). *Nat. Rev. Genet.*, **3**, 415–428.
- Jones PA and Laird PW. (1999). *Nat. Genet.*, **21**, 163–167.
- McCulloch DR, Harvey M and Herington AC. (2000). *Mol. Cell Endocrinol.*, **167**, 11–21.
- Moss ML, White JM, Lambert MH and Andrews RC. (2001). *Drug. Discov. Today*, **6**, 417–426.
- Ohtani-Fujita N, Fujita T, Aoike A, Osifchin NE, Robbins PD and Sakai T. (1993). *Oncogene*, **8**, 1063–1067.
- Okegawa T, Li Y, Pong RC and Hsieh JT. (2002). *J. Urol.*, **167**, 1836–1843.
- Primakoff P and Myles DG. (2000). *Trends Genet.*, **16**, 83–87.
- Radice D and Redaelli A. (2003). *Pharmacogenomics*, **21**, 383–396.
- Robertson KD. (2002). *Oncogene*, **21**, 5361–5379.
- Sagane K, Ohya Y, Hasegawa Y and Tanaka I. (1998). *Biochem. J.*, **334**, 93–98.
- Scanlan MJ, Gordon CM, Williamson B, Lee SY, Chen YT, Stockert E, Jungbluth A, Ritter G, Jager D, Jager E, Knuth A and Old LJ. (2002). *Int. J. Cancer*, **98**, 485–492.
- Suzuki A, Kadota N, Hara T, Nakagami Y, Izumi T, Takenawa T, Sabe H and Endo T. (2000). *Oncogene*, **19**, 5842–5850.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 350–4354.
- Turker MS. (2002). *Oncogene*, **21**, 5388–5393.
- Welch DR, Steeg PS and Rinker-Schaeffer CW. (2000). *Breast Cancer Res.*, **2**, 408–416.
- Weskamp G, Kratzschmar J, Reid MS and Blobel CP. (1996). *J. Cell Biol.*, **132**, 717–726.
- Wolfsberg TG, Primakoff P, Myles DG and White JM. (1995a). *J. Cell Biol.*, **131**, 275–278.
- Wolfsberg TG, Straight PD, Gerena RL, Huovila AP, Primakoff P, Myles DG and White JM. (1995b). *Dev. Biol.*, **169**, 378–383.
- Wu E, Croucher PI and McKie N. (1997). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235**, 437–442.

3.2.1 Validação do gene ADAM23 como marcador molecular em câncer de mama

Em estudos prévios realizados em nosso laboratório (*item 3.2 - Separata 1*), examinamos o nível de expressão e o padrão de metilação da região promotora do gene ADAM23 em diferentes linhagens celulares tumorais, bem como em tumores primários de mama, através da técnica de sequenciamento após tratamento do DNA com o bissulfito de sódio. Apesar do número reduzido de tumores primários analisados nessa primeira etapa, verificamos que há uma estreita correlação entre os níveis de metilação da região 5' do gene ADAM23 e o estadiamento dos tumores. Sendo assim, o próximo passo deste trabalho foi a ampliação do estudo da metilação em tumores de mama. O aumento do número de amostras foi importante para confirmarmos os achados anteriores e estabelecermos de maneira mais significativa, uma correlação entre os dados clínicos dos pacientes e o grau de metilação da região promotora do gene ADAM23.

Para estender as análises de metilação na região 5' do gene ADAM23, nós optamos pela utilização da técnica MSP. Essa técnica permite a análise de um número grande de amostras tumorais com um custo relativamente baixo quando comparada ao sequenciamento após o tratamento com o bissulfito de sódio. No entanto, a MSP possui como desvantagem a análise do padrão de metilação de um número limitado de dinucleotídeos CpG dentro da região genômica em estudo.

O desenho dos *primers* para a reação de MSP é muito importante para evitar resultados falso-positivos. Nesse sentido, algumas informações foram levadas em consideração, como, por exemplo, a localização dos dinucleotídeos CG mais freqüentemente metilados em linhagens celulares e que tiveram uma correlação inversa com a expressão do gene ADAM23. Além disso, a localização dos sítios de ligação do fator de transcrição Sp1 presentes na região promotora do gene foi avaliada. Dessa forma, dois pares de *primers* para as reações de MSP foram desenhados, levando-se em consideração as informações obtidas anteriormente no *item 3.2 - Separata 1*. A posição do dois pares de *primers* desenhados pode ser visualizada na Figura 5. A técnica de MSP foi padronizada em nosso laboratório com a participação da aluna de iniciação científica Mariana Granato (Processo FAPESP número 02/11710-4), utilizando como controles DNAs extraídos de duas linhagens celulares (PMC42 e Du4475) e DNA extraído de mama normal (220N) com o padrão de metilação já caracterizado.

Os DNA tratados com o reagente bissulfito de sódio (descrito no *Anexo 3*) foram amplificados utilizando-se os seguintes *primers* : ADAM23 U -F: 5'- ATT GTT TTT TTG TTA GAA TGT TG - 3' / ADAM23 U -R: 5'- TAA AAA AAA CAC AAA AAA CCA AAC A - 3' para a situação não-metilada e ADAM23 M -F: 5'- ATT GTT TTT TCG TTA GAA TGT CG - 3' / ADAM23 M -R: 5'- TAA AAA AAA CAC AAA AAA CCG AAC G - 3' para a situação metilada. Os dinucleotídeos CpG contidos dentro dos *primers* estão marcados em azul. As reações de MSP foram realizadas com os seguintes reagentes: 0,24 mM de

dNTPs (Amersham Biosciences); 0,32 μ M de cada *primer* (Forward e Reverse); 2 mM de MgCl₂ (Applied Biosystems) e 1U de AmpliTaq GOLD (Applied Biosystems). Um a dois μ l dos DNAs tratados com bissulfito de sódio foi acrescentado em cada tubo de reação. O volume final de cada reação de MSP foi de 25 μ l. O programa de PCR utilizado foi o seguinte : 95°C por 10 min. para a ativação da enzima Taq GOLD seguido de 40 ciclos de 95°C por 45 s, 59°C por 45 s (temperatura de anelamento) e 72°C por 1 min. A extensão final utilizada foi de 5 min. a 72°C. Um fragmento de 100 pares de bases foi gerado em ambas as situações (M - metilada e U - não-metilada). Duas linhagens celulares (PMC42 e a Du4475), as quais havíamos realizado o sequenciamento após tratamento com bissulfito de sódio, foram utilizadas como controles. A linhagem PMC42 apresentou um perfil completamente desmetilado e a linhagem Du4475 apresentou um perfil completamente metilado como esperado (Figura 6).

Nas análises das 72 amostras tumorais de mama de pacientes do Hospital do Câncer, foi verificado pela técnica de MSP que 51,4% (37/72) das amostras apresentaram a banda metilada (Figura 6 e ANEXO 1). A amplificação referente ao par de *primers* não-metilado foi verificada em todas as 72 amostras analisadas. Este fato foi observado em outros trabalhos e pode ser explicado pela presença de moléculas não-metiladas, derivadas de tecido normal contaminante ou de linfócitos infiltrativos (CAMERON et al. 1999; WONG et al. 1999).

Com o objetivo de avaliar se o *status* de metilação analisado através do MSP podia ser correlacionado com os níveis de expressão do gene ADAM23, o padrão de expressão de tumores de mama com diferentes perfis de MSP foi analisado através de RT-PCR semi-quantitativo. Nesta análise, foi observada uma boa correlação entre a expressão e a metilação nas amostras 7, 8 e 25 (os dados de metilação estão apresentados no ANEXO 1). As amostras 7 e 8, que não apresentaram a banda metilada nas análises de MSP possuem uma elevada expressão do gene ADAM23. Por outro lado, a amostra 25, que apresentou a banda metilada, possui baixa expressão do RNAm que corresponde ao gene ADAM23 (Figura 7).

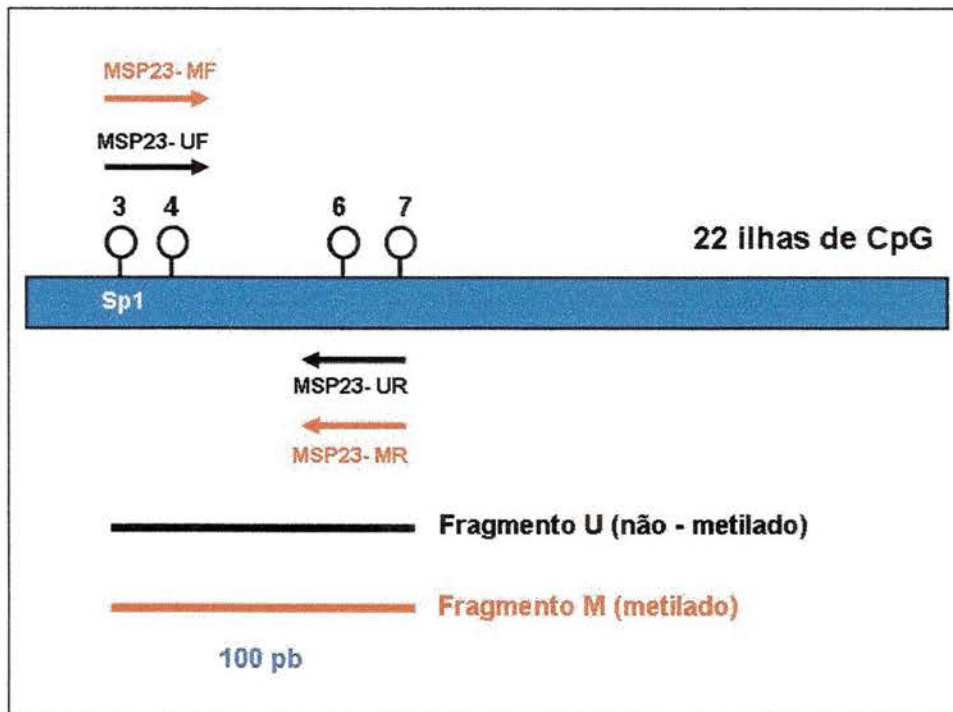


Figura 5 - Localização dos *primers* para as reações de MSP dentro do fragmento contendo 22 ilhas de CpG localizado na porção 5' do gene ADAM23 (*item 3.2 - Separata 1*). Os *primers* desenhados para a situação metilada estão representados em vermelho e os *primers* desenhados para a situação não-metilada estão representados em preto. Os *primers* utilizados foram desenhados nos dinucleotídeos CpG 3, 4, 6 e 7 sendo que o dinucleotídeo 3 possui um sítio de ligação ao fator de transcrição Sp1.

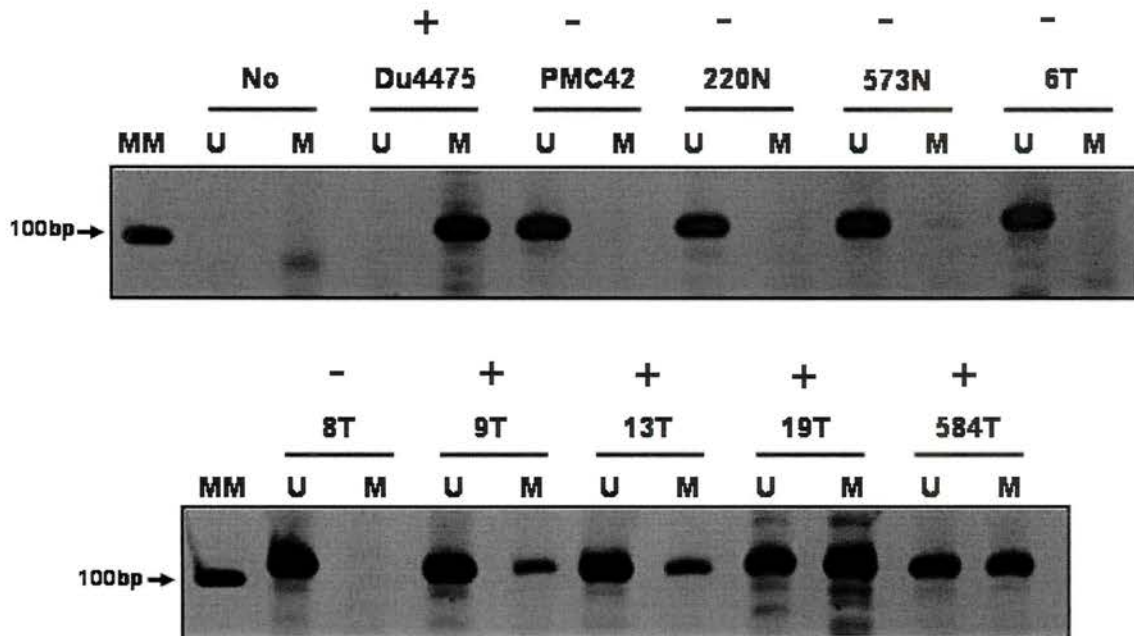


Figura 6 - Gel de poliacrilamida 8% contendo reações de MSP com duas amostras normais e seis amostras tumorais de mama. As amostras referentes aos pacientes 220, 645, 6, 8, 9, 13, 19 e 584 estão representadas. Dois controles foram utilizados: um para a situação não-metilada (PMC42) e um para a situação metilada (Du4475). MM, Marcador Molecular ; No, Controle sem DNA; U - situação não metilada ; M - situação metilada. Status de metilação - : não metilada ; + : metilada.

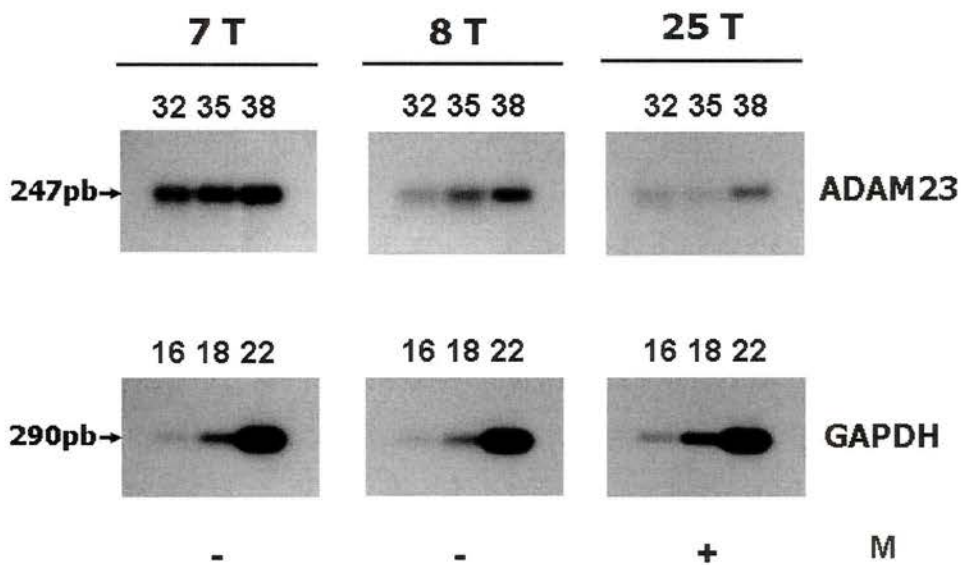


Figura 7 - RT-PCR semi-quantitativo utilizando 3 amostras tumorais de mama (7, 8 e 25) com diferentes padrões de metilação analisados por MSP. As reações de RT-PCR foram retiradas em diferentes ciclagens: 16, 18 e 22 ciclos para o GAPDH e 32, 35 e 38 ciclos para o gene ADAM23. As amplificações foram transferidas para uma membrana de nylon e hibridizadas com sondas específicas para o gene GAPDH e para o gene ADAM23 de acordo com o *item 3.2 - Separata 1*. As amostras tumorais estão representadas como 7T, 8T e 25T. M : padrão de metilação para a região 5' do gene ADAM23 por MSP; +, metilado ; -, não metilado.

Com o objetivo de confirmar os resultados preliminares obtidos pelo nosso grupo e analisar a possibilidade de utilização da metilação na região 5' do gene ADAM23 como um marcador molecular em câncer de mama, dados clínicos das pacientes avaliadas neste estudo foram coletados com a ajuda do Departamento de Oncologia Clínica do Hospital do Câncer A. C. Camargo. Os dados clínicos coletados estão apresentados no ANEXO 1 e as principais informações avaliadas foram: o estágio dos tumores, o comprometimento linfonodal, o número de linfonodos comprometidos, a presença ou não de recidivas, o seguimento das pacientes, além de dados relacionados a marcadores tumorais já caracterizados como o receptor de estrógeno (*ER*) e o oncogene *cerbB2*. O estadiamento dos tumores foi feito de acordo com a Classificação TNM da União Internacional Contra o Câncer (UICC) (SOBIN e WITTEKIND 1998).

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do Registro Hospitalar do Hospital do Câncer A.C. Camargo. A associação entre as variáveis qualitativas foi avaliada através do teste do *Qui-Quadrado* ou teste *exato de Fisher* e a análise de sobrevida foi realizada pelo método de Kaplan-Meier, com o teste de *log-rank* para a comparação das curvas. Para todos os testes, foi estabelecido um erro $\alpha=5\%$, isto é, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p<0,05$. O *software* utilizado para a análise estatística foi o SPSS (do inglês *Statistical Package for Social Sciences*) para Windows versão 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Das 72 amostras tumorais analisadas, 14 (19.4%) foram diagnosticadas com estágio I, 29 (40.3%) com estágio II, 21 (29.3%) com estágio III e 8 (11%) com estágio IV. O comprometimento linfonodal foi avaliado em 71 pacientes, entre as quais 40 (57.7%) apresentaram linfonodos comprometidos. Foi observado também a ocorrência de metástases e recidivas locais em 18 (26%) pacientes. O tempo de seguimento máximo (do inglês *follow-up*) das pacientes foi de 60 meses, sendo que, a maior parte destas foi seguida em média por 36 meses. Todos os casos coletados corresponderam a pacientes do sexo feminino.

A frequência de metilação na região 5' do gene ADAM23 foi avaliada separadamente nos tumores de diferentes estádios, a fim de confirmar nossas observações iniciais de que tumores com estádios mais avançados apresentavam uma maior frequência e densidade de metilação no gene ADAM23. Um aumento na frequência de metilação na região promotora do gene ADAM23 foi observado nos tumores de estágio IV quando comparado aos tumores dos demais estádios. As frequências de metilação nos estádios I (50%), II (44,8%) e III (47,6%) foram constantes, enquanto que no grupo de pacientes de estágio IV foi observado um aumento considerável na frequência de metilação (87,5%). No entanto, essas diferenças não foram consideradas estatisticamente significativas ($p=0,187$). A correlação entre a presença de metilação no gene ADAM23 e a ocorrência de metástases à distância também foi avaliada. O grupo de pacientes com metástases apresentou uma frequência de metilação no gene ADAM23 elevada (87,5%), enquanto que no grupo de

pacientes sem metástases a frequência de metilação foi menor (12,5%). Além disso, foi verificado que essa diferença se encontra no limite de significância estatística ($p=0,056$), sugerindo uma possível correlação entre a presença de metilação no gene ADAM23 e a progressão tumoral.

Correlações estatisticamente significativas entre a metilação na região promotora do gene ADAM23 e o comprometimento de linfonodos axilares, a ocorrência de recidivas, a expressão de *cerbB2* e do receptor ER não foram observadas em nossa amostra. Em relação ao comprometimento de linfonodos, foi verificado que 42,5% das pacientes linfonodo positivo não apresentaram metilação e 57,5% dessas pacientes apresentaram metilação no gene ADAM23 ($p=0,193$). No caso da ocorrência de recidivas, foi observado que 31,2% das pacientes com recidivas não apresentaram metilação e 68,8% das pacientes com recidivas apresentaram metilação no gene ADAM23 ($p=0,115$). Com relação a expressão para o receptor de estrógeno, foi verificado que 44,4% das pacientes negativas para ER não apresentaram metilação e 55,6% dessas pacientes apresentaram metilação no gene ADAM23 ($p=0,649$). Por fim, no caso da expressão do oncogene *cerbB2*, foi verificado que 48,9% das pacientes com expressão positiva de *cerbB2* não apresentaram metilação e 51,1% dessas pacientes apresentaram metilação no gene ADAM23 ($p=0,934$). Esses resultados podem ser visualizados na Tabela 2.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na sobrevida global e na sobrevida livre de doença entre pacientes com e sem metilação no gene ADAM23. Foi verificado que 79% das pacientes que

apresentaram metilação na região 5' do gene ADAM23 estavam vivas após 36 meses de acompanhamento, enquanto que 90.2% das pacientes que não apresentaram metilação estavam vivas nesse mesmo período ($p=0,327$) (Figura 8 e Tabela 3). Por outro lado, entre aquelas pacientes que não apresentaram metilação na região 5' do gene ADAM23, passados 36 meses da data do diagnóstico, 85,9% não apresentaram recidivas. No caso das pacientes que tiveram metilação, passados os mesmos 36 meses, apenas 69,1% não apresentaram recidivas ($p=0,096$) (Figura 9 e Tabela 3).

Das variáveis descritas na literatura e com valor clínico já estabelecido avaliadas em nossa amostragem, foi verificada uma significância estatística para um pior prognóstico nas análises de sobrevida global para o estágio dos tumores ($p=0.002$) e para a presença de metástases ($p=0.004$). Por outro lado, em análises de sobrevida livre de doença, verificamos significância estatística para um pior prognóstico quando o estágio dos tumores ($p<0.001$), a presença de linfonodos comprometidos ($p=0.003$) e a presença de metástases ($p<0.001$) foram avaliados. As outras variáveis analisadas não foram estatisticamente significantes (Tabela 3).

Tabela 2 - Número e porcentagem de pacientes segundo metilação na região 5' do gene ADAM23 e estágio clínico, tamanho do tumor, *status* do receptor de estrógeno, *cerbB2*, comprometimento linfonodal, ocorrência de recidivas e metástases à distância avaliados pelo teste de Qui-quadrado (χ^2).

VARIÁVEL	CATEGORIA	METILAÇÃO (%)		p
		Não	Sim	
Estadiamento	I	7 (50,0)	7 (50,0)	0,187
	II	16 (55,2)	13 (44,8)	
	III	11 (52,4)	10 (47,6)	
	IV	1 (12,5)	7 (87,5)	
Tumor	T ₁	10 (41,7)	14 (58,3)	0,634
	T ₂	15 (51,7)	14 (48,3)	
	T ₃	3 (75,0)	1 (25,0)	
	T ₄	7 (46,7)	8 (53,4)	
Linfonodos	Positivo	17(42,5)	23 (57,5)	0,193
	Negativo	18 (58,1)	13(41,9)	
ER	Positivo	22 (50,0)	22 (50,0)	0,649
	Negativo	12 (44,4)	15 (55,6)	
cerbB2	Positivo	22 (48,9)	23 (51,1)	0,934
	Negativo	11 (47,8)	12 (52,2)	
Recidiva	Não	30 (53,6)	26 (46,4)	0,115
	Sim	5 (31,2)	11 (68,8)	
Metástase	Não	34 (53,1)	30 (46,9)	0,056
	Sim	1 (12,5)	7 (87,5)	

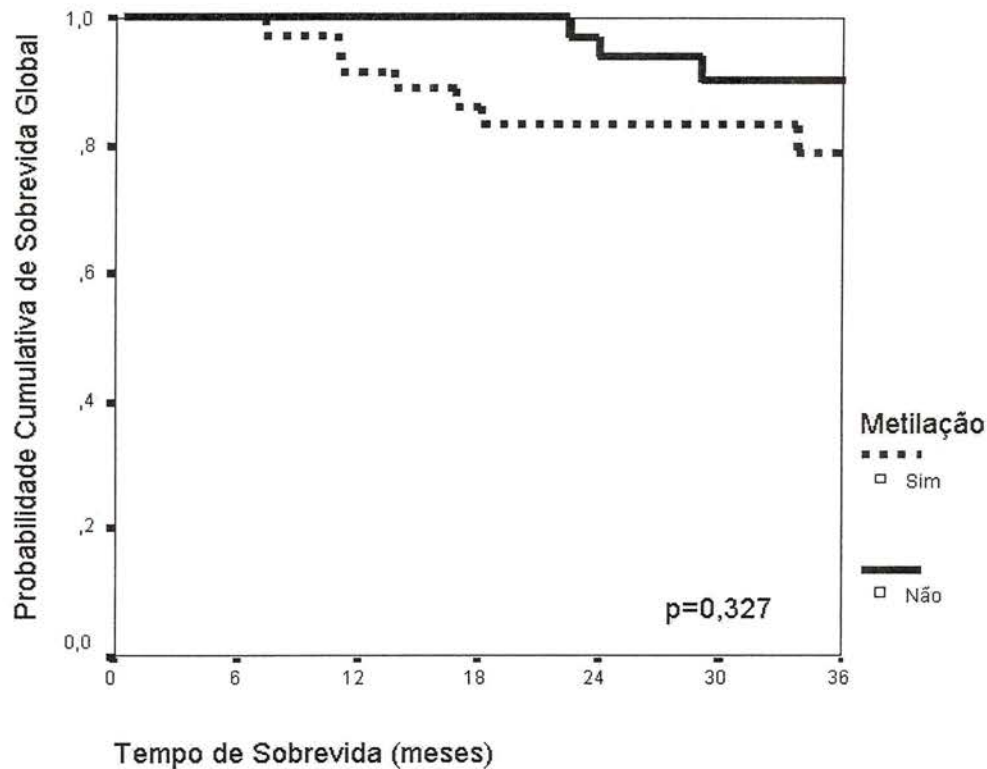


Figura 8: Curva de sobrevida Kaplan-Meier com a análise acumulada da sobrevida global (SG) de 72 pacientes no seguimento de 3 anos (36 meses). No eixo Y verificamos a sobrevida cumulativa das pacientes e no eixo X verificamos o tempo em meses. A linha contínua representa o grupo de pacientes negativos para metilação no gene ADAM23 e a linha tracejada representa o grupo de pacientes com a região 5' do gene ADAM23 metilada de acordo com os ensaios de MSP.

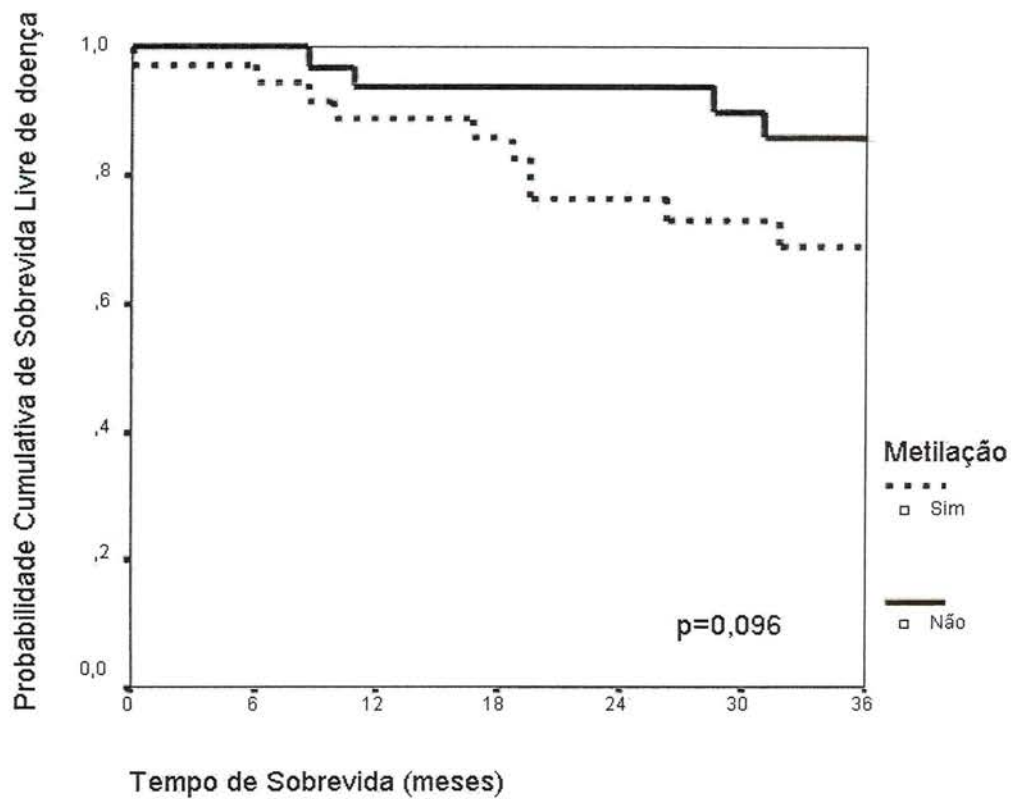


Figura 9: Curva de sobrevida Kaplan-Meier com a análise acumulada da sobrevida livre de doença (SLD) de 72 pacientes no seguimento de 3 anos (36 meses). No eixo Y verificamos a sobrevida cumulativa das pacientes e no eixo X verificamos o tempo em meses. A linha contínua representa o grupo de pacientes negativos para metilação no gene ADAM23 e a linha tracejada representa o grupo de pacientes com a região 5' do gene ADAM23 metilada de acordo com os ensaios de MSP.

Tabela 3: Probabilidades acumuladas de sobrevida global (SG) e de sobrevida livre de doença (SLD) após 3 anos segundo as variáveis metilação na região 5' do gene ADAM23, estágio clínico, metástase à distância, comprometimento linfonodal, receptor de estrógeno e *cerbB2*.

VARIÁVEL	CATEGORIA	% SG	p	% SLD	p
Estádio	I	100,0		100,0	
	II	88,4		80,0	
	III	84,5		79,3	
	IV	28,6	0,002	0	<0,001
Metástase	Ausente	89,9		85,2	
	Presente	28,6	0,004	0	<0,001
Linfonodo	Negativo	92,6		96,5	
	Positivo	78,9	0,271	62,7	0,003
ER	Positivo	89,0		84,6	
	Negativo	76,7	0,084	67,6	0,147
cerbB2	Negativo	95,2		80,2	
	Positivo	80,8	0,427	76,6	0,898
Metilação	Ausente	90,2		85,9	
	Presente	79,0	0,327	69,0	0,096

3.3 SEPARATA 2

“Detection of SATR1 satellite DNA hypomethylation in breast tumors.”

Fabrício F. Costa¹, Karina B. Ribeiro², José Augusto Rinck Jr⁴, Fernando Soares³, Ricardo R. Brentani¹ and Anamaria A. Camargo^{1*}

1 Laboratory of Molecular Biology and Genomics, Ludwig Institute for Cancer Research, SP, Brazil

2 Cancer Hospital Registry, Hospital A.C. Camargo, SP, Brazil

3 Pathology Department, Hospital A.C. Camargo, SP, Brazil

4 Clinical Oncology Department, Hospital A.C. Camargo, SP, Brazil

Running title: Hypomethylation of SATR1 satellite in breast tumors

*Correspondence: Anamaria A. Camargo, Laboratory of Molecular Biology and Genomics, Ludwig Institute for Cancer Research (LICR), Rua Prof. Antônio Prudente 109 4th floor, 01509-010

São Paulo, SP, Brasil. Phone 55 11 3388-3248, FAX 55 11 3207-7001

e-mail: anamaria@compbio.ludwig.org.br

ABSTRACT

Genome stability and normal gene expression are largely maintained by a fixed and predetermined DNA methylation pattern. Methylation pattern, however, becomes abnormal in malignant cells and may contribute to tumorigenesis. Particularly, hypomethylation of satellite DNA sequences is frequently found in human tumors and has been associated with an increased frequency of DNA rearrangements and chromosome instability. In this work, a novel differentially methylated DNA fragment, with high sequence similarity to SATR1 satellite DNA, was isolated using the Methylation Sensitive Arbitrarily Primed PCR (MSAP-PCR) technique. DNA hypomethylation within this fragment was observed in 63% of breast tumor cell lines and in 63-84% of primary breast tumors. SATR1 hypomethylation was associated with a trend towards a shorter disease-free survival (log-rank test, $p=0.1963$). Our results suggest that DNA hypomethylation of SATR1 sequences (in addition to other satellite sequences) is a common event in breast cancer that might facilitate tumor progression by promoting the occurrence of chromosomal aberrations. Our results also highlight the importance of global DNA hypomethylation as a contributing factor in tumorigenesis. This is of special concern for cancer treatment protocols aimed at decreasing DNA methylation in cancer patients.

Keywords: MSAP-PCR analysis, DNA hypomethylation, Satellite DNA and breast cancer

INTRODUCTION

DNA methylation is central to many biological processes such as X-inactivation and genomic imprinting. Alterations in the normal methylation pattern have been associated with several pathological conditions including neoplasias. Two general types of DNA methylation changes can concurrently occur in tumors: local hypermethylation within CpG-rich regulatory regions of cancer-related genes and large-scale hypomethylation of the genome^{1,2}.

The discovery of tumor-associated hypomethylation preceded that of hypermethylation. However, inadequate attention has been paid to hypomethylation in cancer, and as a consequence its biological significance remains unclear. A global reduction of 10-20% in the methylcytosine content has been reported for various tumors when compared to normal adult tissue³. This global reduction can affect different types of repetitive sequences, such as retrotransposons, endogenous retrovirus, and satellite DNA sequences. In addition, single copy regulatory sequences of oncogenes, tumor antigens and imprinted genes may also become hypomethylated leading to tumor-specific abnormal gene expression^{1,4}.

Satellite DNA consists of large blocks of tandemly repeated sequences usually located in regions of pericentromeric and/or telomeric heterochromatin⁵. Satellite sequences are normally heavily methylated and have been associated with complex organizational features necessary for the function of eukaryotic

genomes, such as the formation of heterochromatic genomic compartments important for proper chromosomal segregation during meiosis and mitosis⁶.

Hypomethylation of satellite DNA has been shown to correlate with chromosome instability. This correlation is evident in the ICF syndrome, a recessive genetic disease in which mutations in a DNA methyltransferase gene are associated with satellite DNA hypomethylation and an increased level of chromosomal rearrangements⁷. Likewise, hypomethylation of specific satellite DNA sequences is frequently found in human tumors^{8,9,10} and has been associated in some cases with an increased frequency of DNA rearrangements and chromosome instability^{11,12,13,14}. DNA hypomethylation has also been associated with aggressive histological features and malignant potential in breast and ovarian tumors^{11,15}.

Here, we report the identification of a satellite DNA sequence, named SATR1, which is frequently hypomethylated in human breast tumors. A novel differentially methylated DNA fragment corresponding to the SATR1 repeat was isolated after Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed PCR (MSAP-PCR). DNA hypomethylation within this fragment was observed after *Hpa* II / *Msp* I digestion and bisulfite treatment in 63% of breast tumor cell lines and in 63-84% of primary breast tumors. A clear association between SATR1 hypomethylation and a shorter disease-free survival seems to exist, although not statistically supported.

MATERIAL AND METHODS

Breast cell lines, tissues and DNA isolation.

A total of 27 breast tumor cell lines (MDA-MB-435, HTM3552, HBL-100, MDA-MB-157, CAL-51, CAMA-1, SKBR-7, MDA-MB-231, Du4475, PMC42, GI101, SKBR-5, MDA-MB-453, MDA-MB-469, MCF-7, MDA-MB-468, 734b, T47D, SKBR-3, MDA-MB-361, MDA-MB-175, MDA-MB-415, BT-20, BT-474, ZR-75-30, ZR-75-1, MDA-MB-134) and two normal cell lines (HBR 514 *Lum* and HBR 514 *Myo*) were kindly provided by Dr. Mike O'Hare from the Ludwig Institute for Cancer Research - London Branch. Cell lines were maintained under recommended culture conditions as suggested by the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Eleven primary ductal breast tumors, together with adjacent normal tissue as well as fifty primary tumor samples were collected from patients treated at the Hospital do Cancer A.C. Camargo after explicit informed consent and were rapidly frozen in liquid nitrogen. Genomic DNA was isolated by digestion with proteinase K followed by phenol/ chloroform extractions.

Restriction Enzyme Digestion of Genomic DNA.

One μg of DNA from breast cell lines were separately digested with either 100 U of *Hpa* II or *Msp* I (New England Biolabs) at 37°C for 16 h. *Hpa* II does not cut DNA if the internal cytosine of its restriction site (CCGG) is methylated,

whereas *Msp* I is insensitive to the methylation status of the internal cytosine. Restriction enzymes were heat inactivated by incubating the reactions at 95°C for 10 min and then stored at -20°C. The occurrence of partial restriction digestion was checked to avoid the occurrence of false positive results. Digested genomic DNA was amplified with primers specific to the hMLH1 promoter as described previously¹⁶. Since hMLH1 promoter hypermethylation is not frequent in breast tumors no amplification is expected if complete digestion is achieved. A positive amplification control was also used to exclude the possibility of amplification inhibition after restriction digest. In this case, a control fragment corresponding to p53 gene without any *Msp* I/*Hpa* II restriction sites was used (e6p53 - F:5'-CAG GGC TGG TTG CCC AGG GTC CCC A-3' and e6p53 - R: 5'-ACT GAC AAC CAC CCT TAA CCC CTC C-3').

MSAP-PCR profile generation and analysis.

Restriction-digested DNA was amplified using MSAP-PCR with a single primer (MLG2: 5'- AAC CCT CAC CCT AAC CCC GG-3') as described previously¹⁷. PCR products were resolved on silver stained 6% polyacrylamide gels and candidate bands that appeared to be differentially methylated by MSAP-PCR analysis were excised from dried polyacrylamide gels and placed in a microcentrifuge tube containing 40 µl of sterile water. The eluate (2-5µl) was re-amplified with the original MSAP-PCR primer to generate sufficient amounts of template for cloning and sequencing. PCR products were cloned using the TA

cloning Kit (Invitrogen). Multiple colonies were sequenced using the Dynamic™ ET terminator cycle sequencing kit (Amersham Biosciences) and an ABI3100 sequencer (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Specific primers to the Hipo2 fragment were designed (Hipo2F: 5'- CAC AGT GGT GGT GTA CAT - 3' and Hipo2R: 5'- CAC CTG GCC TGT GAT ATT - 3') and the methylation status was confirmed by specific PCR after restriction enzyme digestion with *Hpa* II and *Msp* I for all the cell lines.

Analysis of DNA methylation by sequencing of sodium bisulfite-treated DNA.

Genomic DNA obtained by phenol / chloroform extraction was subjected to sodium bisulfite treatment to modify unmethylated cytosine to uracil using the "CpG Modification Kit" (Intergen). Bisulfite-treated DNA was amplified by a nested-PCR protocol using the following primers: HIPO2 Bis-1F: 5'- GTT ATA TTA TTT TTT GTT TTT TTG G -3' and HIPO2 Bis-1R: 5'- ACA TTT CCT TAT AAT ATT ATT CC -3' for the first reaction and HIPO2 Bis-2F: 5'- TAT AGT GGT GGT GTA TAT TTG -3' and HIPO2 Bis-2R: 5'- CAC CTA ACC TAT AAT ATT TCT TC - 3' for the second reaction. PCR was performed in a volume of 25 µl containing 1X PCR Buffer; 1,5 mM of MgCl₂; 200 µM of dNTPs; 8 µM of each primer and 1U of Taq GOLD (Applied Biosystems). The PCR conditions were: 94°C for 12 min, 94°C for 3 min, 50°C for 3 min, 72°C for 2 min; 94°C for 3 min, 52°C for 3 min, 72°C for 2 min 5 cycles and 94°C for 1 min, 54°C for 1 min, 72°C for 1 min 35 cycles for the first reaction. Different annealing temperatures (52°C,

54°C and 56°C) with the same cycling parameters were used for the nested reaction. Amplified products were purified using the PCR Purification Kit (Qiagen) and were cloned and sequenced as described above. Six positive clones were sequenced for each cell line and five clones were sequenced for each primary tumor and its normal counterpart using M13 universal primers. The methylation percentage decrease for each sample was calculated as the number of unmethylated CpG dinucleotides from the total number of CpGs analyzed in all positive clones. Primary tumor samples were considered hypomethylated when a decrease in 10% of the methylated CpGs was observed compared to the normal sample.

Combined Bissulfite Restriction Analysis.

For COmbined Bissulfite Restriction Analysis (COBRA)¹⁸, 25-50 ng of bisulfite treated DNA was amplified as described above. The PCR products were purified using a PCR Purification Kit (Qiagen). Fifty to 100 ng of purified PCR products were digested with 10 Units of *BstU1* (New England Biolabs) for 4 hours in a 30 µl reaction. The digestion products were resolved on 8% polyacrylamide gels. Complete restriction digestion occurs only if the CpG dinucleotides within the *BstU1* sites have been retained during the bisulfite conversion due to the methylated status of the cytosine residues. Methylated 734b and unmethylated PMC42 breast cell lines were used as controls.

Statistical Analysis

Overall and Disease-free survival curves were calculated with Kaplan-Meier method. Log-rank test was used to assess statistical differences between groups with and without STAR1 hypomethylation. For all tests, alpha error was established as 0.05 and results were considered statistically significant when $p < 0.05$. All of the statistical analyses were performed using SPSS Software 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS

MSAP-PCR and the isolation of differentially methylated fragments.

MSAP-PCR was performed on digested DNA using a single 20-mer primer (MLG-2) under low stringency conditions. The MLG-2 primer was designed by GONZALGO et al. (1997) with a 3' end complementary to the recognition sequence of *Hpa* II and *Msp* I restriction enzymes¹⁷. With this primer, no PCR products would be produced if the region of DNA between the two primer annealing sites contained at least one unmethylated *Hpa* II site. DNA digested with *Msp* I served as control for determining whether bands observed in the MSAP-PCR of *Hpa* II-digested DNA were due to differential methylation of CCGG sequences within the amplified fragment.

A MSAP-PCR profile for two normal breast cell lines (HBR *Lum* and HBR *Myo*) and two breast tumor cell lines (HTM3552 and HBL-100) is shown on Figure 1A. The DNA fragment indicated on the figure is absent on *Msp* I digestions of both normal and tumor DNAs, present in *Hpa* II digestion of both normal DNAs, and absent in *Hpa* II digestion of HTM3552. These findings indicated that this fragment is hypomethylated in tumor cell lines compared to normal cell lines.

The differentially methylated fragment was extracted from the dried gel, re-amplified by PCR, cloned and sequenced. After manual inspection of the sequence, we were able to identify two CCGG sites at the primer annealing sites and a total of 15 CpG dinucleotides within the sequence. BLAST N searches

against the human genome assembly revealed that the cloned fragment is located on chromosome 5 and contained a repetitive sequence element present in several chromosomes (Figure 1B). The differentially methylated fragment was identified as a SATR1 satellite sequence after consulting the Repbase database of repetitive sequences¹⁹ using the Censor tool provided by the Genetic Information Research Institute (www.geospiza.com/products/tools/repbase.htm).

SATR1 Satellite DNA hypomethylation is highly frequent in breast tumor cell lines.

In order to confirm the MSAP-PCR results and extend the methylation analysis of the SATR1 fragment, we used a panel of 27 breast tumor cell lines. Primers specific to the SATR1 repeat were designed based on the chromosome 5 genomic sequence and used to amplify genomic DNA digested with *Hpa* II and *Msp* I. We confirmed the hypomethylation pattern observed in the MSAP-PCR for the HTM3552 and HBL-100 tumor cell lines (Figure 2A) and found that 63% (17/27) of the breast tumor cell lines analyzed were hypomethylated (Table 1).

We then designed primers for bisulfite sequencing analysis to determine the extent of DNA hypomethylation within 15 CpGs dinucleotides contained within the SATR1 fragment (Figure 1B). Bisulfite sequencing analysis confirmed the methylation pattern observed by restriction digestion in all cell lines analyzed (Figure 2B) and revealed a DNA methylation decrease of 7-87% within the 15 CpGs dinucleotides analysed (Table 1).

SATR1 Satellite DNA hypomethylation in primary breast tumors.

Next we examined whether this epigenetic alteration could be extrapolated to primary breast tumors. The methylation status of the SATR1 fragment was determined for 5 alleles of 11 primary breast tumors as well as for their corresponding adjacent normal tissues (Figure 3A). Tumor samples were considered as hypomethylated when a decrease of at least 10% of the methylated CpGs was observed compared to the corresponding normal sample. As shown in Figure 3B, 7 out of the 11 tumors analyzed (75, 488, 573, 220, 144, 330, 333) were considered hypomethylated in comparison to their normal counterparts. The decrease in DNA methylation varied from 5 to 40% in tumors as compared with normal tissues. However, the assessment of methylation changes is probably underestimated because tumor samples may contain up to 30% of normal cells, including infiltrating lymphocytes.

Hypomethylation of satellite DNA sequences has been significantly correlated with malignant potential and aggressive histological features in some tumors types^{11,15}. Accordingly, we have evaluated the methylation status of the SATR1 region in 50 breast tumor samples using COBRA (COmbined Bissulfite Restriction Analysis) (Figure 4). The majority (84%) of the samples analyzed presented some degree of SATR1 hypomethylation as inferred from the presence of undigested SATR1 PCR products after bisulfite treatment. Although not statistically significant, there was a strong difference between 3 year disease-free survival rates comparing the group of patients with methylation (100% disease-free) and hypomethylation (66,1% disease-free) of

the SATR1 satellite DNA (log-rank test, $p=0.1963$) (Figure 5A). No association was observed between SATR1 hypomethylation and overall survival (log-rank test, $p=0.9886$)(Figure 5B).

DISCUSSION

Satellite sequences are tandem, high-copy-number repeats, composed of variations of oligonucleotide sequences, which are usually found in constitutively heterochromatic chromosome regions⁵. Satellite sequences in heterochromatic regions are heavily methylated and it has been postulated that a decrease in the DNA methylation level observed in tumors confers abnormal chromatin structure, facilitating recombination between repeated DNA sequences and predisposing tumor cells to chromosomal instability^{11,12,13,14}.

In support of the postulated involvement of abnormal satellite DNA hypomethylation in aberrant recombination, CHEN et al. (1998) have demonstrated that DNA hypomethylation caused by a homozygous knockout of the DNMT1 gene in murine embryonic stem cells increased abnormal DNA recombination and mutagenesis at HPRT and TK genes²⁰. Additionally, a causal link between DNA hypomethylation in satellite sequences and chromosomal instability was recently demonstrated by Eden A. et al. (2003) using a transgenic mouse model, which express just 10% of DNMT1²¹. The dnmt1 transgenic mice developed aggressive T cell lymphomas earlier in development and the lymphomas displayed a high frequency of chromosome 15 trisomy²². Finally,

treatment of normal cells with demethylating agents was shown to induce a high frequency of chromosome rearrangements probably related to heterochromatin undercondensation²³.

Hypomethylation of specific satellite DNA sequences is frequently found in human tumors and has been, in some cases, associated with an increased frequency of DNA rearrangements and chromosome instability. Hypomethylation in the main DNA component of the centromere (satellite alpha) in chromosome 1 or in satellite sequences (satellite 2) located in the juxtacentromeric region of chromosomes 1 and 16 was observed in 40-90% of breast adenocarcinomas, ovarian epithelial carcinomas and Wilms tumors^{8,9,15}. Interestingly, hypomethylation within Sat2 and Sat α sequences has been associated with numerical and structural chromosome 1 aberrations in DNA derived from Wilms tumors, hepatocellular and breast carcinoma^{11,12,13,14}. DNA hypomethylation was also associated with aggressive histological features and malignant potential. For example, hypomethylation of satellite DNA has been observed in ovarian and breast tumors, the degree and frequency of DNA hypomethylation correlating with the malignant potential of the tumors based on histological criteria^{11,15}.

In this work, digestion of genomic DNA with methylation-sensitive restriction enzymes followed by low-stringency AP-PCR (MSAP-PCR) allowed us to identify a novel differentially methylated fragment in breast tumors with a high similarity to SATR1 satellite DNA. SATR1 repeats are present on

chromosomes 3, 5, 11, 16, 19, 22 and present a variable structural pattern indicating the occurrence of complex patterns of duplications. DNA hypomethylation within this fragment was observed in 63%-84% of breast tumor cell lines and primary tumors. Although not statistically supported due to the small sample size and limited follow-up time, there is a strong association between STAR1 hypomethylation and a shorter disease-free survival.

In general, inadequate attention has been paid to the role of DNA hypomethylation in tumorigenesis, instead much more emphasis has been put on the critical role of DNA hypermethylation as a mechanism for tumor suppressor gene inactivation. Our results suggest that satellite DNA hypomethylation is a common and general event in breast tumorigenesis affecting different satellite sequences located on many chromosomes and favor the hypothesis that satellite DNA hypomethylation facilitates tumor development by promoting the occurrence of structural and numerical chromosomal aberrations. Additional characterization of DNA sequences that undergo loss of DNA methylation in tumors and the establishment of a direct relationship between this process with chromatin structure and chromosomal instability is crucial for a better understanding of the role of DNA hypomethylation in cancer.

Our findings highlight the importance of considering that global DNA hypomethylation (in addition to local hypermethylation) may be a general contributing factor in tumorigenesis. These findings are specially relevant for designing cancer treatment protocols aimed at decreasing the overall DNA methylation content in tumors in order to reactivate epigenetically silenced tumor

suppressor genes or to increase the presentation of specific tumor antigens which could then be target by immunotherapy^{24,25}.

DNA demethylation can be induced by cytidine analogues modified at position 5 of the pyrimidine ring such as 5-azacytidine (ZCyd) and 5-aza-2'deoxycytidine (ZdCyd). These demethylating agents work by inhibiting DNA methyltransferase activity since the enzyme becomes irreversibly bound to the modified residue²⁶. Several Phase I or Phase II clinical trials using demethylating agents are listed in the NCI cancer clinical trial database. The greatest successes have come with treatment of hematopoietic disorders such as myelodysplasic syndrome and acute myeloid leukaemia^{27,28,29,30}.

However drugs used to demethylate DNA are inespecific and cannot be used to target particular DNA sequences. Inducing DNA hypomethylation may have short-term anti-tumoral effects, but might also favor tumor progression from tumor cells surviving the DNA demethylation therapy. In patients treated with demethylating agents, DNA demethylation of satellite sequences may promote genomic instability and induce tumor formation, as seen in DNMT1 mutant mice, in which T-cell lymphoma was induced at high frequency. Demethylating drugs could possibly be a double-edged sword for patients with a long-term prognosis. In this context, we stress that special attention should be given to define the optimal timing and dosing regimens for inhibiting DNA methyltransferase and we suggest that chromosomal aberrations should be carefully monitored in clinical trials using prolonged treatment protocols.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Erney F. P. Camargo for critically reading this manuscript and Valéria Paixão and Anna Christina M. Salim for technical assistance. This work was supported by The Ludwig Institute for Cancer Research (LICR) - São Paulo - Brazil and by the CEPID Program from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 98/14335-2). FFC is sponsored by a fellowship from FAPESP.

REFERENCES

1. Ehrlich M (2002) DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 21:5400-5413.
2. Esteller M (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21:5427-5440.
3. Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M (1983) The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res* 19:6883-6894.
4. Dunn BK (2003) Hypomethylation: one side of a larger picture. *Ann NY Acad Sci* 983:28-42.
5. Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215-20.
6. Csink AK, Henikoff S (1998) Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. *Trends Genet* 5:200-204.
7. Ehrlich M (2003) The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease. *Clin Immunol* 109:17-28.
8. Narayan A, W Jr, Zhang X-Y, Marrogi A, Graff JR, Baylin SB, Ehrlich M (1998) Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast carcinomas. *Int J Cancer* 77:833-838.
9. Qu G, Grundy PE, Narayan A, Ehrlich M (1999) Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. *Cancer Genet Cytogenet* 109: 34-39

10. Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S (2002) Overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, associated with DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 15:10060-10065.
11. Tsuda H, Takarabe T, Kanai Y, Fukutomi T, Hirohashi S (2001) Correlation of DNA hypomethylation at pericentromeric heterochromatin regions of chromosomes 16 and 1 with histological features and chromosomal abnormalities of human breast carcinomas. *Am J Pathol* 161:859-866.
12. Wong N, Lam, W-C, Lai P B-S, Pang E, Lau W-Y and Johnson PJ (2001) Hypomethylation of Chromosome 1 Heterochromatin DNA Correlates with q-Arm copy gain in Human Hepatocellular Carcinoma. *Am J Pathol* 159:465-471.
13. Kimura F, Florl AR, Seifert HH, Louhelainen J, Maas S, Knowles MA, Schulz WA (2001) Destabilization of chromosome 9 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br J Cancer* 12:1887-1893.
14. Ehrlich M, Hopkins NE, Jiang G, Dome JS, Yu MC, Woods CB, Tominson GE, Chintagumpala M, Champagne M, Dillerg L, Parham DM, Sawyer J (2003b) Satellite DNA hypomethylation in karyotyped Wilms tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 141:97-105.
15. Qu G, Dubeau L, Narayan A, Yu M, Ehrlich M (1999) Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential. *Mut Res* 423:91-101.

16. Bevilacqua RA, Simpson AJ (2000) Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. *Int J Cancer* 87: 200-203.
17. Gonzalgo ML, Liang G, Spruck CH 3rd, Zingg JM, Rideout WM 3rd, Jones PA (1997) Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR. *Cancer Res* 57:594-599.
18. Xiong Z, Laird PW (1997) COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 25:2532-2534.
19. Jurka J (2000) Repbase update: a database and an electronic journal of repetitive elements. *Trends Genet* 9:418-420.
20. Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R (1998) DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 395:89-93.
21. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R (2003) Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 300:455-489.
22. Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H, Jaenisch R (2003) Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 300:489-491.
23. Ji W, Hernandez R, Zhang X-Y, Qu G-Z, Frady A, Varela M and Ehrlich M (1997) DNA demethylation and pericentromeric rearrangements of chromosome 1. *Mut Res* 379:33-41.
24. Brown R, Strathdee G (2002) Epigenomics and epigenetic therapy of cancer. *Trends Mol Med* 4:43-48.

25. Karpf AR, Jones DA (2002) Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer. *Oncogene* 35:5496-5503.
26. Christman JK (2002) 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21:5483-5495.
27. Wijermans PW, Krulder JW, Huijgens PC, Neve P (1997) Continuous infusion of low-dose 5-Aza-2'-deoxycytidine in elderly patients with high-risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 1:19-23.
28. Wijermans P, Lubbert M, Verhoef G, Bosly A, Ravoet C, Andre M, Ferrant A (2000) Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. *J Clin Oncol* 5:956-962.
29. Leone G, Voso MT, Teofili L, Lubbert M (2003) Inhibitors of DNA methylation in the treatment of hematological malignancies and MDS. *Clin Immunol* 109:89-102.
30. Schwartzmann G, Fernandes MS, Schaan MD, Moschen M, Gerhardt LM, Di Leone L, Loitzembauer B, Kalakun L (1997) Decitabine (5-Aza-2'-deoxycytidine; DAC) plus daunorubicin as a first line treatment in patients with acute myeloid leukemia: preliminary observations. *Leukemia* 1: 28-31.

Table 1: Methylation analysis of the SATR1 satellite DNA in 27 breast tumor cell lines and two normal cell lines (HBR *Myo* and HBR *Lum*).

Cell Line	Site of origin	MS-PCR ^a	Methylation decrease ^b
HBR 514 <i>Myo</i>	Myoepithelial cells	+	NA
HBR 514 <i>Lum</i>	Luminal cells	+	NA
MDA-MB-435	Pleural effusion	-	NA
HTM3552	Breast	-	NA
HBL-100	Breast	+	NA
MDA-MB-157	Pleural Effusion	-	NA
CAL-51	Pleural Effusion	-	NA
CAMA-1	Pleural Effusion	-	NA
SKBR-7	Pleural Effusion	-	NA
MDA-MB-231	Pleural Effusion	-	56%
Du4475	Skin	+	NA
PMC42	Pleural Effusion	-	87%
GI-101	Breast	+	13%
SKBR-5	Pleural Effusion	-	NA
MDA-MB-453	Pleural Effusion	-	73%
MDA-MB-469	NA ^c	-	NA
MCF-7	Pleural Effusion	-	60%
MDA-MB-468	Pleural Effusion	+	26%
734b	Pleural Effusion	+	7%
T47D	Pleural Effusion	-	NA
SKBR-3	Pleural Effusion	+	NA
MDA-MB-361	Brain	-	NA
MDA-MB-175	Pleural Effusion	+	NA
MDA-MB-415	Pleural Effusion	+	NA
BT-20	Breast	-	79%
BT-474	Breast	+	NA
ZR-75-30	Ascities	-	NA
ZR-75-1	Ascities	-	NA
MDA-MB-134	Pleural Effusion	+	NA

Legend:^a Methylation analysis by PCR after *Hpa* II / *Msp* I DNA digestion.^b Methylation analysis by bisulfite sequencing.^c Not analyzed.

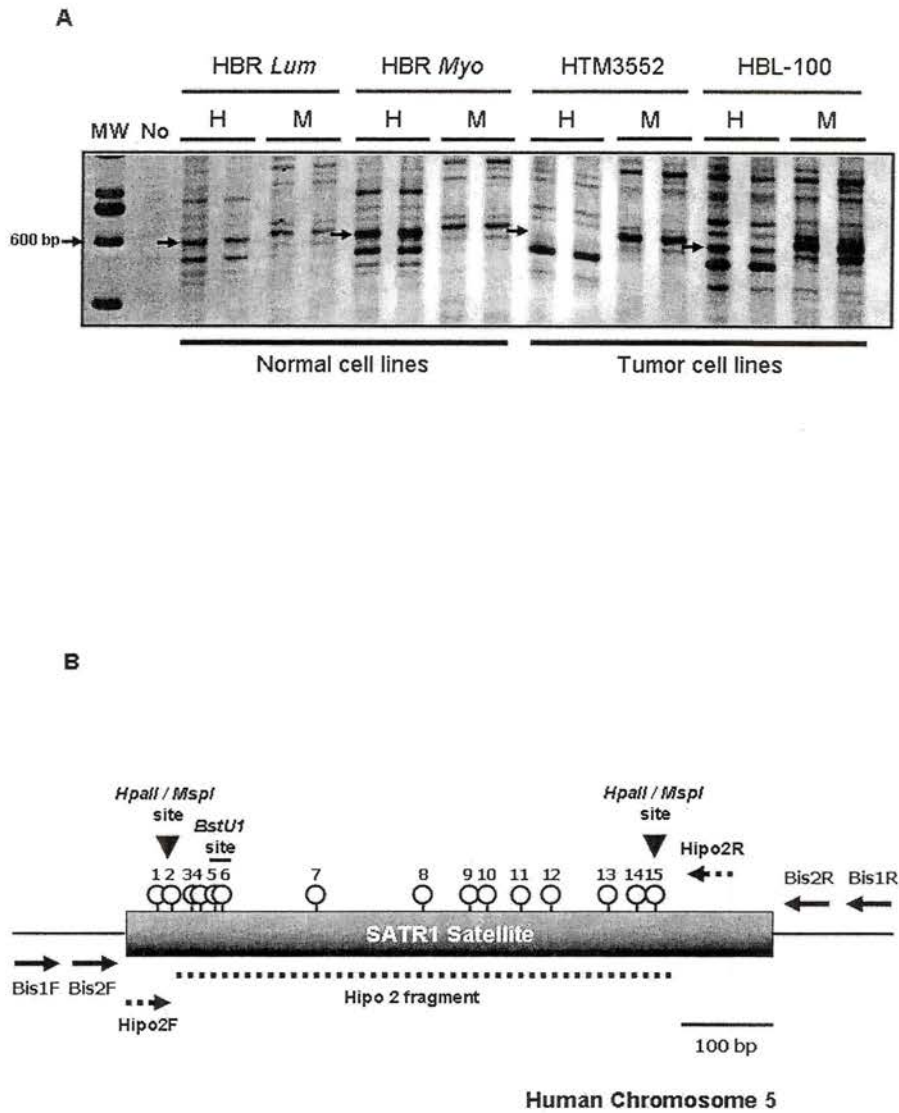


Figure 1 - MSAP-PCR profile and schematic representation of the SATR1 fragment. (A) MSAP-PCR profile of two normal breast cell lines (HBR *Lum* and HBR *Myo*) and two breast tumor cell lines (HTM3552 and HBL-100). The black arrows indicate the hypomethylated DNA fragment. MW - 100 bp DNA ladder; No - No DNA control; H - *Hpa* II digestion; M - *Msp* I digestion (B) CpG dinucleotides (1-15) are represented by open circles. Distances between the CpG dinucleotides are absolute. Specific primers are represented by dashed arrows and bisulfite sequencing primers are represented by black arrows. *BstU1* (CpG dinucleotides 5-6) and *Hpa* II / *Msp* I sites (CpG dinucleotides 2 and 15) are indicated.

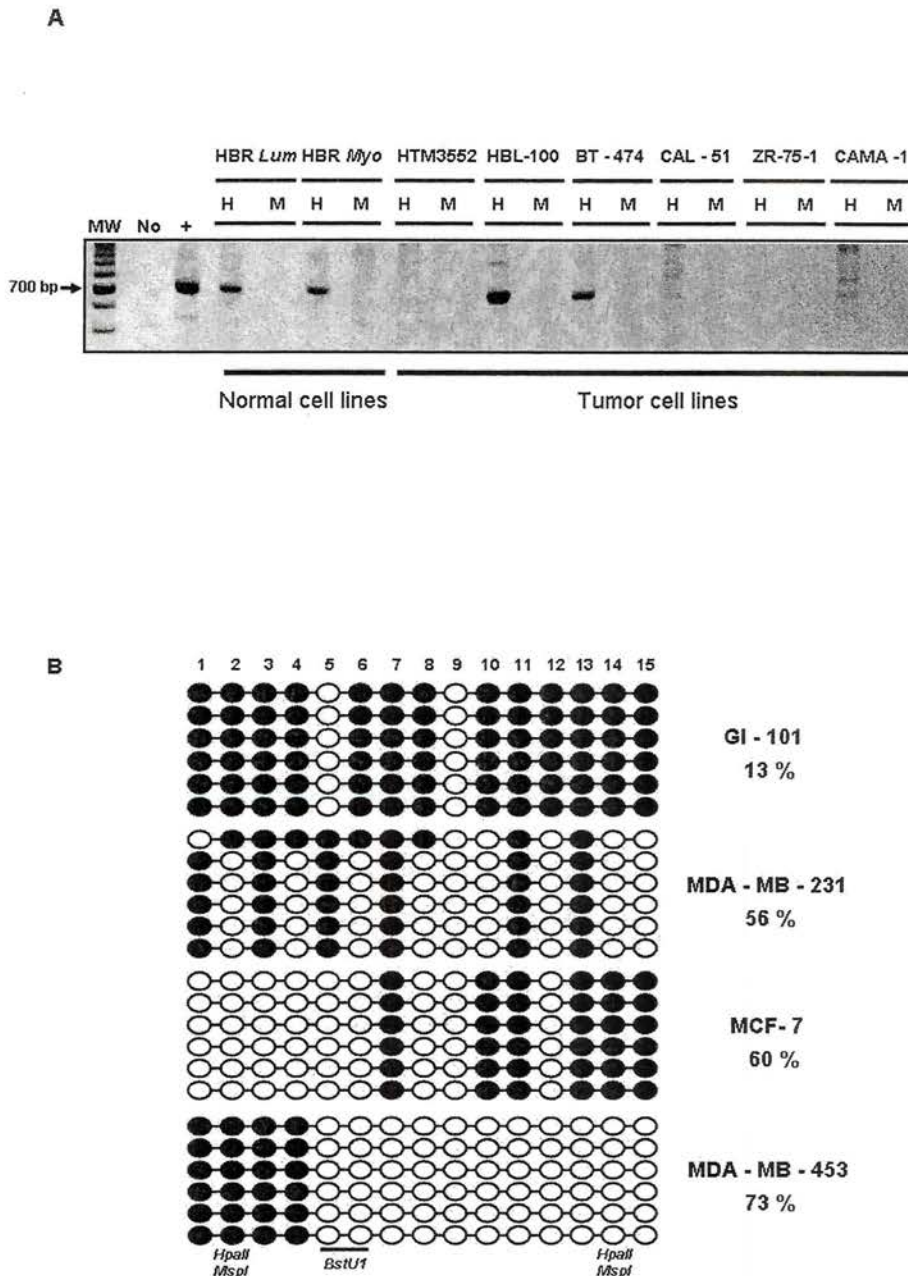


Figure 2 - Methylation status of STAR1 in breast tumor cell lines (A) PCR amplification with STAR1 specific primers after digestion with *Hpa* II / *Msp* I. Six tumor cell lines (HTM3552, HBL-100, BT-474, CAL-51, ZR-75-1 and CAMA-1) and two normal cell lines (HBR *Myo* and HBR *Lum*) were analysed (above). MW - 100 bp DNA ladder; No - No DNA control; + undigested DNA control; H - *Hpa* II digestion; M - *Msp* I digestion. (B) Representative examples of bisulfite sequencing analysis from 4 breast tumor cell lines (GI-101, MDA-MB-231, MCF-7 and MDA-MB-453). Each row represents one sequenced allele and each circle represents a CpG dinucleotide. Cell lines and percentages of DNA methylation decrease are indicated on the right.

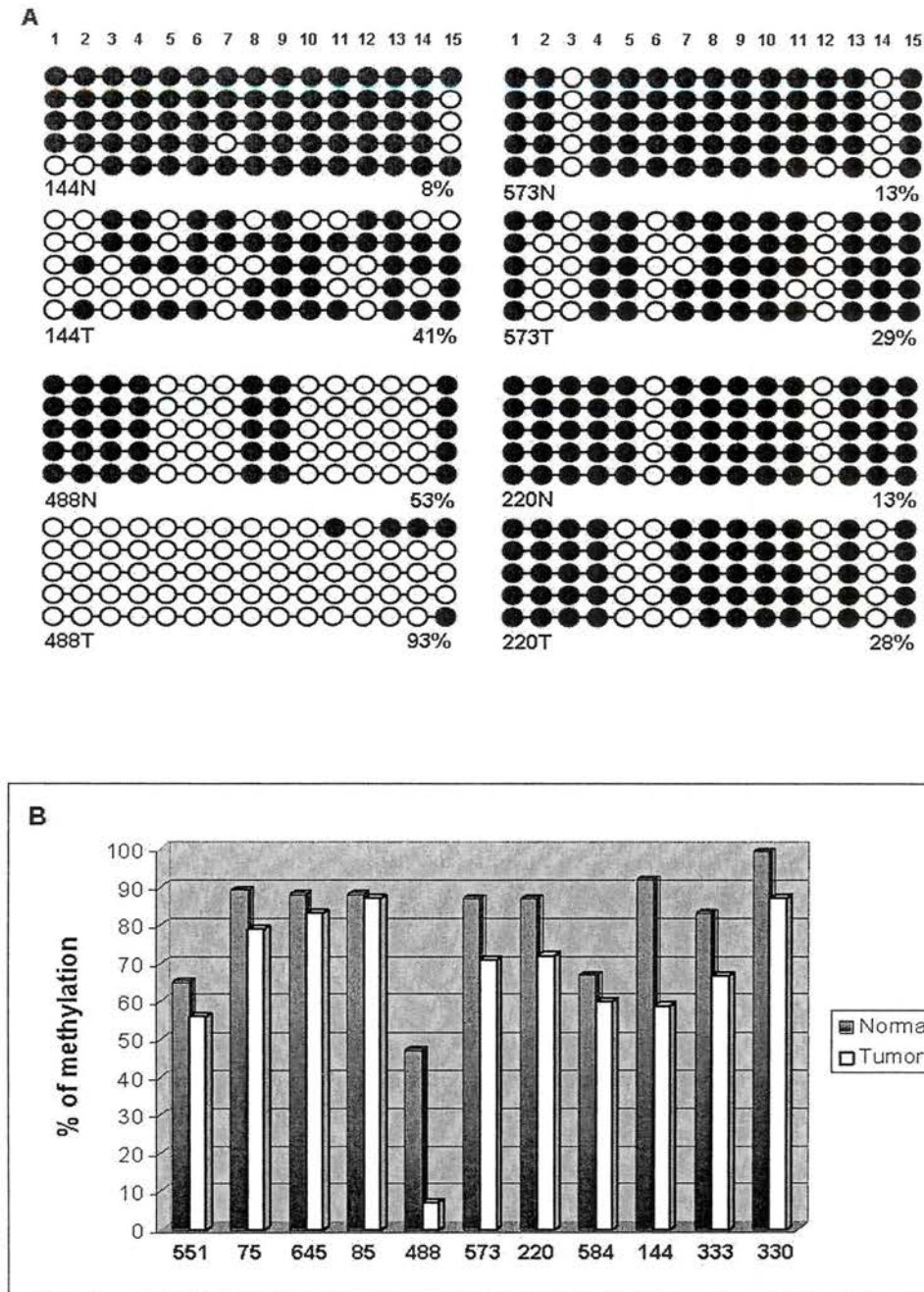


Figure 3 - Bismulfite sequencing analysis in breast normal / tumor pairs. (A) Representative examples of four (144, 488, 573, and 220) paired normal (N) and tumor (T) samples. CpG dinucleotide diagrams are as described in Figure 2. Percentages of DNA methylation decrease are indicated for each normal / tumor pair. (B) Histogram representation of STAR-1 methylation status of 11 paired normal (N) and tumor (T) samples. The percentage of DNA methylation is represented in the Y axis and paired samples (551, 75, 645, 85, 488, 573, 220, 584, 144, 333, 330) are represented in the X axis.

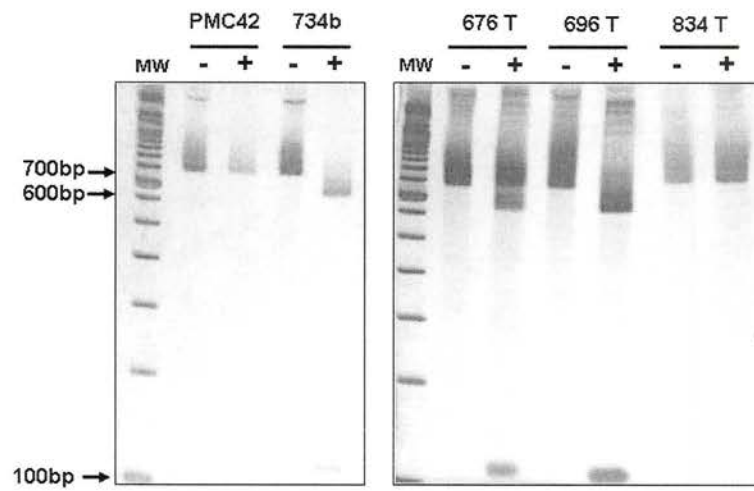


Figure 4 - COBRA analysis of primary breast tumors. Representative examples of three tumor samples (676T, 696T and 834T) with different *BstU1* digestion profiles. Complete *BstU1* digestion generates two DNA fragments of 600 and 100bp. Two breast cell lines PMC42 and 734b of known STAR-1 methylation status were used as digestion controls. MW: 100 bp DNA ladder; - undigested; + digested with *BstU1*.

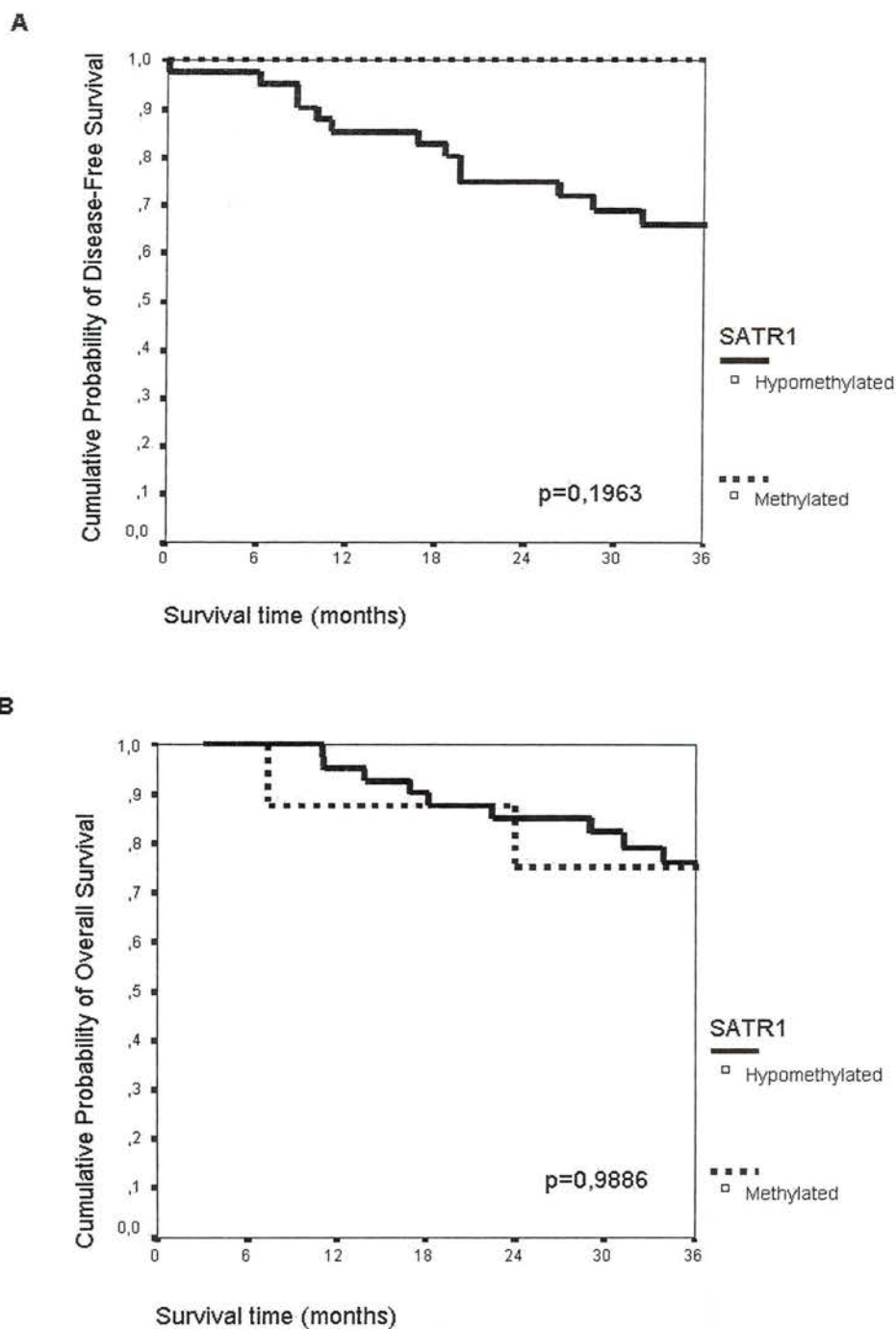


Figure 5 - Disease-free survival (A) and overall survival (B) curves according to STAR1 methylation status.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4.1 UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA MSAP-PCR PARA O ISOLAMENTO DE SEQÜÊNCIAS DIFERENCIALMENTE METILADAS EM CÂNCER DE MAMA

O isolamento de regiões diferencialmente metiladas em tumores é de fundamental importância para uma melhor compreensão dos processos envolvidos na transformação maligna. Com o objetivo de identificar e clonar regiões diferencialmente metiladas em câncer de mama, nós utilizamos a técnica de MSAP-PCR. Dos 13 perfis de MSAP-PCR gerados neste trabalho, fomos capazes de identificar e confirmar duas regiões genômicas diferencialmente metiladas em tumores de mama.

Estudos anteriores que utilizaram a técnica MSAP-PCR para o isolamento de regiões diferencialmente metiladas em outros tecidos tumorais relataram o isolamento de um número elevado de fragmentos diferencialmente metilados (GONZALGO et al. 1997; HUANG et al. 1997). Esse fato pode ser explicado por algumas diferenças metodológicas na produção dos perfis em relação ao protocolo utilizado no presente trabalho. Os grupos que isolaram vários fragmentos diferencialmente metilados utilizaram marcação radioativa para a visualização dos fragmentos e uma combinação de vários *primers* na produção dos perfis. No presente trabalho, não utilizamos isótopos radioativos e

cada perfil foi produzido com um único *primer*. A utilização de um único *primer* se justificou pela complexidade de bandas verificadas nos perfis produzidos.

Além disso, o aparecimento de um número relativamente pequeno de seqüências de DNA diferencialmente metiladas nos perfis de MSAP-PCR apresentados nesse estudo pode ser explicado pela menor freqüência de metilação em tumores de mama. COSTELLO et al. (2000) verificaram que cada tumor possui um padrão de metilação característico e específico. Esses autores utilizaram a técnica RLGS que consiste em um escaneamento global do padrão de metilação. Das estimadas 45.000 ilhas de CpG presentes no genoma humano, 1.184 foram analisadas em diferentes tumores. Cerca de 22% dos tumores de mama analisados possuíam ilhas de CpG metiladas. Por outro lado, verificou-se que esta porcentagem subia para 82% e 71% em PNETs e gliomas, respectivamente. Além disso, os tumores de mama apresentaram uma freqüência de metilação nas ilhas de CpG analisadas bem inferior aos outros tipos de tumores. (COSTELLO et al. 2000).

Apesar do número reduzido de fragmentos isolados, os mesmos foram confirmados experimentalmente, demonstrando que a técnica de MSAP-PCR pode ser utilizada com sucesso na clonagem de regiões que sofrem perda ou ganho de metilação no genoma humano em doenças como o câncer. Além disso, essa metodologia é extremamente simples e os custos são baixos quando comparados a outras técnicas que têm como objetivo a identificação de regiões diferencialmente metiladas nas células.

4.2 ADAM23- UM NOVO MARCADOR MOLECULAR EM CÂNCER DE MAMA ?

O primeiro fragmento de DNA isolado pela técnica de MSAP-PCR foi mapeado no cromossomo 2q33-34 em uma região próxima ao gene ADAM23. Os membros que fazem parte da família ADAM (do inglês *A Desintegrin And Metaloproteinase domain*) ou MDC (do inglês *Metaloproteinase-like, Desintegrin-like, Cysteine-rich*), possuem dois domínios característicos: um de metaloprotease e outro de desintegrina. Além desses dois domínios, as proteínas que fazem parte dessa família apresentam outros domínios característicos: um domínio *EGF-like*, um domínio rico em cisteína, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático (SCHLONDORFF e BLOBEL 1999; SEALS e COURTNEIDGE 2003; WHITE 2003).

Até o momento, 34 membros da família gênica ADAM foram caracterizados em organismos evolutivamente distantes como *C.elegans*, *Drosophila melanogaster* e o homem, mas a função biológica e o padrão de expressão de vários membros ainda não foram completamente estudados. O último membro descrito, a ADAM34, foi identificada em camundongo, mas o seu homólogo humano ainda é desconhecido (BRACHVOGEL et al. 2002). Dos 34 membros descritos até o momento, apenas 21 foram encontrados no genoma humano (PRIMAKOFF e MYLES 2000).

Nos membros dessa família gênica, o domínio de desintegrina tem a função de adesão, tanto célula-célula como célula-matriz extracelular e age como um ligante de integrinas na superfície celular (WOLFSBERG et al.1995; EVANS 2001). Por outro lado, o domínio de metaloprotease realiza a clivagem de algumas citocinas, fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular e está envolvido em processos importantes como, por exemplo, no remodelamento da superfície celular, na regulação da disponibilidade de fatores de crescimento e na modulação da capacidade das células de responderem a estímulos extracelulares. O domínio de metaloprotease para ser ativo depende da presença da seqüência consenso de aminoácidos HEXGHXXGXXHD. Algumas proteínas da família ADAM possuem esse domínio inativo por apresentarem um ou mais resíduos diferentes nesta região, gerando uma incompatibilidade com a atividade enzimática, como é o caso das ADAMs 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 14, 16, 18, 22, 23 e 27 (PRIMAKOFF e MYLES 2000).

O cDNA que corresponde à proteína ADAM23 foi clonado por SAGANE et al. em 1998. O gene ADAM23 é predominantemente expresso em cérebro e atua como uma molécula de adesão provavelmente relacionada com o desenvolvimento e/ou manutenção das funções neurais (SAGANE et al. 1998; 1999). A proteína ADAM23 possui todos os domínios característicos dos membros da família ADAM, mas o domínio de metaloprotease se encontra inativo pela falta de três resíduos de histidina e de um resíduo de ácido glutâmico que fazem parte de um sítio de ligação ao zinco e são essenciais para essa atividade. CAL et al. (2000) utilizaram um painel de células CHO

expressando diferentes tipos de integrinas e demonstraram que a proteína ADAM23 se liga especificamente à integrina $\alpha v \beta 3$ de uma maneira independente da presença do motivo RGD na região de desintegrina, sugerindo que essa proteína esteja envolvida exclusivamente no processo de adesão celular.

Neste trabalho, a expressão do gene ADAM23 e o padrão de metilação de sua região promotora foram avaliados em linhagens tumorais e em tumores primários de mama. Através dessas análises, observamos que a região promotora do gene ADAM23 se encontra frequentemente metilada em tumores e que a presença de metilação está diretamente correlacionada com a ausência de expressão do mRNA e da proteína. Observamos também que há uma estreita correlação entre os níveis de metilação na região 5' do gene ADAM23 e o estadiamento dos tumores. Quanto mais avançado o tumor de mama, maior a frequência e a porcentagem de metilação na região 5' do gene ADAM23.

Análises de metilação com um número elevado de amostras tumorais de mama revelaram a existência de uma correlação (embora no limite da significância estatística) entre a existência de metilação na região 5' do gene ADAM23 e a presença de metástases à distância ($p=0.056$). Esses dados corroboram com a hipótese de que o silenciamento do gene ADAM23 durante a progressão tumoral favoreça o desenvolvimento de metástases através de alterações nas propriedades adesivas das células.

Durante o processo de progressão tumoral, algumas células perdem a capacidade de adesão, caem na circulação e formam sítios secundários de crescimento (metástases). Alterações nas propriedades adesivas de células tumorais, conferidas por moléculas de adesão presentes na superfície celular, estão diretamente relacionadas com a progressão do câncer (CAIRNS et al. 2003). Até o momento, em torno de 50 moléculas envolvidas nos processos de adesão celular já foram identificadas e caracterizadas. Vários estudos já demonstraram o envolvimento dessas moléculas de adesão celular no processo de progressão tumoral (HIROHASHI e KANAI 2003). Alguns estudos propõem que a perda de adesão seja um pré-requisito para a invasão das células tumorais e a formação das metástases (HIROHASHI e KANAI 2003). Um exemplo bem conhecido são as caderinas, que estabelecem um tipo de junção aderente pela mediação da adesão dependente de cálcio (BIRCHMEIER et al. 1993). Diferentes grupos demonstraram que a expressão da molécula de adesão E-caderina encontra-se silenciada por metilação em diferentes tipos de tumores e que a re-expressão desse gene em linhagens tumorais é capaz de reverter o fenótipo invasivo (STRATHDEE 2002).

Neste contexto, HERREN et al. (2001) demonstraram que a expressão aumentada do gene ADAM15 pode inibir a migração celular em experimentos de migração. Esse grupo propõe que o aumento na adesão celular deve ser primariamente responsável pela redução na migração. Com base nesses dados, podemos especular que a perda da expressão da molécula de adesão ADAM23 causada pela ocorrência de metilação na região 5' pode ter alguma

importância nos processos de adesão e de migração das células tumorais, facilitando a formação de metástases em tumores de mama.

O câncer de mama é um dos tumores de maior frequência entre as mulheres nos países ocidentais, sendo, no Brasil, a terceira causa mais frequente de morte no sexo feminino. A presença de metástases em linfonodos axilares e o tamanho do tumor são os dois fatores prognósticos mais importantes. Entretanto, cerca de 30% das pacientes que não apresentam acometimento de linfonodos eventualmente morrem em decorrência da doença. A necessidade de se determinar quais pacientes possuem um risco aumentado de recorrência da doença e uma pior evolução clínica tem conduzido muitos estudos voltados para a identificação de novos marcadores moleculares que possam ser utilizados como ferramentas no diagnóstico, no prognóstico e no tratamento de pacientes com câncer.

Recentemente, a utilização de alguns marcadores moleculares começou a ter um grande impacto na avaliação da sobrevida de pacientes com câncer de mama. Alguns exemplos de genes importantes no processo de tumorigênese em câncer de mama e com um valor prognóstico são: o oncogene *c-erbB2*, os receptores de hormônio esteróide (receptor de estrógeno e receptor de progesterona), o gene supressor *p53*, o receptor de ácido retinóico β , o gene *PDGF* (Fator de Crescimento derivado de Plaquetas - do inglês *Platelet Derived Growth Factor*), o gene *VEGF* (Fator de Crescimento Vascular

Endotelial - do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*) entre outros (KEEN e DAVIDSON 2003).

Como citado anteriormente, as análises realizadas neste estudo sugerem a existência de uma associação (embora não estatisticamente significativa) entre a presença de metilação na região promotora do gene ADAM23, a ocorrência de tumores em estágio mais avançado ($p=0.187$) e a ocorrência de metástases a distância ($p=0.056$). Também foi possível observar uma correlação positiva, mas não estatisticamente significativa, entre a presença de metilação e a ocorrência de linfonodos comprometidos ($p=0.193$) e recidivas da doença ($p=0.115$). Análises de sobrevida global e sobrevida livre de doença através de curvas de Kaplan-Meier revelaram que a presença de metilação na região promotora do gene ADAM23 parece estar associada com uma menor sobrevida global no intervalo de 36 meses ($p=0.3273$) e com uma menor sobrevida livre de doença ($p=0.0959$).

No entanto, é importante ressaltar que nas análises estatísticas realizadas obtivemos tendências de correlação bastante sugestivas, mas, em nenhuma delas, os resultados foram estatisticamente significativos ($p<0.05$). Tal fato pode ser explicado pela existência de características insatisfatórias das amostras avaliadas como, por exemplo, o curto período de acompanhamento clínico das pacientes e o tamanho da amostra utilizada ($n=72$). É interessante notar que os resultados obtidos nas correlações envolvendo a frequência de metilação da região promotora do gene ADAM23 e a sobrevida global e livre de doença foram estatisticamente equivalentes aos resultados obtidos para fatores

prognósticos reconhecidos como, por exemplo, a ausência de expressão do receptor de estrógeno (sobrevida global $p=0.0843$ e sobrevida livre de doença $p=0.1472$) e a superexpressão do oncogene *cerbB2* (sobrevida global $p=0.4276$ e sobrevida livre de doença $p=0.8989$). Esses dados suportam a existência de limitações na nossa amostragem.

Recentemente, uma atenção especial tem sido dada na utilização da metilação como um marcador molecular em câncer (ESTELLER 2003; PATEL et al. 2003). Uma vantagem do uso da metilação como marcador molecular é que, ao contrário das mutações, que ocorrem em inúmeras regiões de um dado gene e podem ser de muitos tipos, a metilação ocorre sempre na mesma região. Além disso, a metilação pode ser detectada mesmo no meio de uma grande quantidade de células normais, enquanto que outras alterações genéticas como a perda de heterozigose (LOH) ou deleções homozigóticas não são detectadas nesse contexto. Trabalhos na literatura destacam ainda taxas significativas de detecção de metilação em diferentes tipos de amostras tumorais e em alíquotas de fluídos corpóreos. Alterações no padrão de metilação do gene supressor de tumor p16 foram detectadas no plasma de pacientes com tumores de pulmão, fígado e mama com eficiência de 73, 81 e 20%, respectivamente (ESTELLER et al. 1999; SILVA et al. 1999; WONG IH et al. 1999). Recentemente, um grupo de pesquisadores avaliou, simultaneamente, a metilação em 39 genes distintos no soro de pacientes com câncer de mama e foi verificado que a metilação na região promotora dos

genes *RASSF1A* e *APC* servem como um forte indicador de pior prognóstico (MULLER et al. 2003).

A continuidade deste trabalho será a padronização de ensaios de imunohistoquímica com um anticorpo específico para a proteína ADAM23. Essa etapa será importante para avaliarmos a diminuição da expressão da proteína ADAM23 em um maior número de amostras através da utilização da técnica do “*Tissue Array*” ou microarranjo de tecidos. Essa metodologia permite a análise simultânea por imunohistoquímica de até 500 tumores emblocados em parafina e a comparação posterior com os dados clínicos das mesmas pacientes (SKACEL et al. 2002). A associação dessa metodologia com a análise da metilação na região 5’ do gene ADAM23 dos mesmos pacientes possibilitaria a confirmação dos dados obtidos neste trabalho com maior significância estatística e do uso desse gene como um marcador molecular na rotina clínica. Paralelamente, estudos funcionais envolvendo o silenciamento do gene ADAM23 em linhagens tumorais de mama através da metodologia de RNAi estão em andamento em nosso laboratório.

4.3 ANÁLISES DA PERDA DE METILAÇÃO NA REGIÃO SATÉLITE SATR1 E SUAS IMPLICAÇÕES NO CÂNCER DE MAMA

O segundo fragmento de DNA isolado apresentou uma elevada similaridade com uma seqüência repetitiva satélite denominada SATR1. As regiões satélite compreendem blocos longos de repetições em *tandem* de DNA que são, geralmente, encontradas na heterocromatina centromérica e/ou telomérica dos cromossomos. Essas seqüências podem apresentar variações nas repetições de oligonucleotídeos e padrões de evolução muito característicos (CHARLESWORTH et al. 1994). Cada espécie possui um tipo de variação oligonucleotídica específica, sendo que essas seqüências podem ser utilizadas em testes moleculares para discernir uma espécie de outra ou até indivíduos da mesma espécie (CSINK e HENIKOFF 1998).

Normalmente, as seqüências de DNA satélite se encontram altamente metiladas, facilitando o empacotamento dos cromossomos e a formação da cromatina. Essas seqüências são importantes para o funcionamento normal do genoma, participando de processos tais como a formação de compartimentos genômicos importantes na segregação dos cromossomos durante os processos de meiose e de mitose (CSINK e HENIKOFF 1998). Recentemente, a perda da metilação ou a hipometilação de regiões satélite do DNA foi associada com a formação de uma estrutura anormal da cromatina, facilitando a recombinação entre seqüências repetitivas e gerando uma maior instabilidade cromossômica

em tumores (KIMURA et al. 2001; TSUDA et al. 2001; WONG N et al. 2001; EHRLICH 2003). Essa correlação é bem evidente na síndrome ICF (síndrome *imunocraniofacial*), uma doença genética na qual os pacientes apresentam mutações nas DNA metiltransferases (DNMTs), fato este associado a uma perda de metilação em DNA satélite e a um aumento de rearranjos cromossômicos (EHRLICH 2003). A hipometilação de seqüências de DNA satélite também tem sido associada com características histológicas mais agressivas e com um maior potencial maligno em tumores de ovário e de mama (QU et al. 1999; TSUDA et al. 2001) podendo, dessa forma, ser utilizada como marcador molecular.

Nesse sentido, nós avaliamos a perda de metilação do fragmento SATR1 em tumores de mama e verificamos que este evento é freqüente nesse tipo de tumor. Em torno de 63-84% das linhagens celulares e dos tumores de mama apresentaram algum grau de perda de metilação nessa região. Além disso, verificamos que o grupo de pacientes com diminuição da metilação nessa região repetitiva possui uma tendência de apresentar recidivas em um menor espaço de tempo quando comparado ao grupo de pacientes sem a perda de metilação (teste *log-rank*, $p=0.1963$). Esses dados sugerem que a perda de metilação em regiões satélite SATR1 nos tumores de mama deve ser um evento frequente que, em associação com a perda de metilação em outras regiões repetitivas do genoma, podem ser a causa da instabilidade genômica e das alterações cromossômicas observadas nesses tumores. Como discutido no *item 3.3 - Separata 2* nossos achados devem ser considerados no contexto do



desenvolvimento de novos protocolos para o tratamento de pacientes com câncer baseados na utilização de agentes desmetilantes como, por exemplo, a *5'-aza-2'-deoxicitidina* em pacientes com câncer.

Em geral, pouca atenção tem sido dada ao papel da hipometilação do DNA no processo de tumorigênese, existindo na literatura um número bem maior de estudos voltados para o processo de hipermetilação de regiões promotoras de genes relacionados ao câncer. Portanto, a caracterização de seqüências de DNA que perdem a metilação em tumores e o estabelecimento de uma relação direta entre esse processo com a instabilidade cromossômica é crucial para um melhor entendimento do papel da hipometilação global do DNA em doenças como o câncer.

POSFÁCIO

6 POSFÁCIO

“The Human Genome Project provided the blueprint for life, but epigenome will tell us how the whole thing gets executed.”

Alexander Olek, CEO - Epigenomics AG

No presente trabalho, fomos capazes de identificar duas regiões diferencialmente metiladas em tumores de mama. A primeira foi mapeada em um locus cromossômico próximo a um gene chamado ADAM23. Através de análises de metilação e de expressão, fomos capazes de demonstrar que esse gene é controlado por metilação na sua região promotora e que esse controle é perdido em células tumorais de mama. Os dados de expressão e de silenciamento do gene ADAM23 apresentados neste trabalho foram a primeira descrição de inativação gênica de um membro dessa família em câncer. Além disso, verificamos que a metilação na região promotora do gene ADAM23 pode ser um indicativo de pior prognóstico nesse tipo de tumor, colocando esse gene como um potencial marcador molecular em câncer de mama.

A segunda região identificada neste trabalho foi mapeada em uma seqüência repetitiva do genoma humano chamada de SATR1. Através de análises de metilação, verificamos uma diminuição na porcentagem de grupamentos metil nessa região em tumores de mama quando comparados ao tecido normal. Alguns trabalhos na literatura têm observado o mesmo fenômeno

em outros tipos de seqüências repetitivas como as seqüências satélite alfa, LINE, ALU e etc. Até pouco tempo, as seqüências repetitivas do genoma não passavam de DNA lixo ou “junk DNA”. Hoje em dia, acredita-se que essas regiões do genoma possuem uma função importante na formação do arcabouço molecular que compõe a estrutura da cromatina. Esse arcabouço molecular pode ser formado pela ligação de grupamentos e de proteínas ao DNA, gerando um empacotamento do mesmo. Dessa forma, a perda de metilação nessas regiões pode estar associada a um pior prognóstico de pacientes com câncer de mama pelo aumento da freqüência de rearranjos cromossômicos, ocasionado por uma maior instabilidade do genoma.

Os dados apresentados aqui se enquadram perfeitamente no cenário de modificações epigenéticas que ocorrem nas células tumorais. Em uma célula normal, a metilação de CpGs individuais é estabelecida de uma maneira regional específica, sendo que algumas porções do genoma se mantem desmetiladas (exs: regiões promotoras de genes importantes no controle do ciclo celular, da adesão celular e etc), enquanto outras regiões permanecem densamente metiladas (exs: seqüências repetitivas, regiões intergênicas e etc). Por outro lado, esse padrão definido de metilação é perdido totalmente nas células tumorais, com um ganho de metilação em regiões normalmente desmetiladas e uma perda de metilação na maior parte do genoma celular (hipometilação global). Neste cenário de eventos epigenéticos descritos para a célula tumoral, podemos agora encaixar duas novas peças: o gene ADAM23

inativado por metilação aberrante em sua região promotora e a seqüência satélite SATR1 hipometilada em tumores.

Mesmo assim, várias perguntas ainda se encontram sem respostas. Como em todo trabalho científico, à medida que os resultados são gerados a partir de um objetivo traçado, o número de perguntas a serem respondidas se multiplica exponencialmente. Neste sentido, alguns questionamentos ao modelo de inativação gênica pela metilação têm sido levantados por pesquisadores e podem ser discutidos. Esses questionamentos nos colocam de frente com o famoso “*egg and chicken problem*”. Qual mecanismo ocorre primeiro nas células tumorais - a metilação com concomitante silenciamento gênico (metilação como causa) ou a diminuição da transcrição poderia facilitar no processo de metilação do promotor dos genes (metilação como consequência)? - esta e outras perguntas são revisados pelo pesquisador Mitchell Turker em um número especial sobre metilação da revista ONCOGENE (TURKER 2002). No primeiro caso, a metilação impediria a ligação dos fatores de transcrição gene-específicos no promotor de um dado gene sendo a hipótese mais aceita atualmente e, no segundo caso, a metilação se espalharia ao longo do promotor do gene pela ausência dos mesmos fatores de transcrição (neste caso esses fatores também podem estar inativados - efeito cascata - ou com mutações em sítios de ligação ao DNA). Infelizmente, as ferramentas utilizadas nas análises de metilação atualmente avaliam esse evento epigenético de forma estática, mas os processos celulares são muito mais dinâmicos e estão em constante modificação. Nesse sentido, acreditamos que perguntas como essas poderão

ser respondidas nos próximos anos com trabalhos mais complexos de avaliação temporal dos eventos epigenéticos dentro da célula. Como foi dito no *Prefácio*, nesse admirável mundo novo que surge com o fim do sequenciamento do Genoma Humano, áreas de grande interesse como a *epigenômica* serão sem sombra de dúvidas um campo importante de pesquisa científica de agora em diante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baracat FF, Oliveira AB. Câncer de mama: etiopatogenia, diagnóstico e estadiamento. In: Abrão FS, editor. **Tratado de oncologia genital e mamária**. São Paulo: Roca; 1995. p.549-79.

Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. **Hum Mol Genet** 2001; 10:687-92.

Bevilacqua RA, Simpson AJ. Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. **Int J Cancer** 2000; 87:200-3.

Bieche I, Lidereau R. Genetic alterations in breast cancer. **Genes Chromosomes Cancer** 1995; 14:227-51.

Birchmeier W, Weidner KM, Hulsken J, Behrens J. Molecular mechanisms leading to cell junction (cadherin) deficiency in invasive carcinomas. **Semin Cancer Biol** 1993; 4:231-9.

Bogenrieder T, Herlyn M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. **Oncogene** 2003; 22:6524-36.

Brachvogel B, Reichenberg D, Beyer S, Jehn B, von der Mark K, Bielke W. Molecular cloning and expression analysis of a novel member of the Disintegrin and Metalloprotease-Domain (ADAM) family. **Gene** 2002; 288:203-10.

Cairns RA, Khokha R, Hill RP. Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view. **Curr Mol Med** 2003; 3:659-71.

Cal S, Freije JM, Lopez JM, Takada Y, Lopez-Otin C. ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the alphavbeta3 integrin through an RGD-independent mechanism. **Mol Biol Cell** 2000; 11:1457-69.

Cameron EE, Baylin SB, Herman JG. p15 (INK4B) CpG island methylation in primary acute leukemia is heterogeneous and suggests density as a critical factor for transcriptional silencing. **Blood** 1999; 94:2445-51.

Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature** 1994; 371:215-20.

Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. **Nucleic Acids Res** 1994; 22:2990-7.

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

Csank AK, Henikoff S. Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. **Trends Genet** 1998; 5:200-4.

De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. **Proc Natl Acad Sci USA** 1996; 93:7149-53.

Dong JT, Isaacs WB, Barrett JC, Isaacs JT. Genomic organization of the human KAI1 metastasis-suppressor gene. **Genomics** 1997; 41:25-32.

Dunn BK. Hypomethylation: one side of a larger picture. **Ann NY Acad Sci** 2003; 983:28-42.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. **Lancet** 1998a; 351:1451-67.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. **Lancet** 1998b; 352:930-42.

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

Ehrlich M. The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease. **Clin Immunol** 2003; 109:17-28.

Ehrlich M, Hopkins NE, Jiang G, et al. Satellite DNA hypomethylation in karyotyped Wilms tumors. **Cancer Genet Cytogen** 2003; 141:97-105.

Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. **Cancer Res** 1999; 59:67-70. [Published erratum in **Cancer Res** 1999; 59:3853].

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

Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. **Lancet Oncol** 2003; 4: 351-8.

Evans JP. Fertilin beta and other ADAMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization. **Bioessays** 2001; 7:628-39.

Fujii H, Biel MA, Zhou W, Weitzman SA, Baylin SB, Gabrielson E. Methylation of the HIC-1 candidate tumor suppressor gene in human breast cancer. **Oncogene** 1998; 16:2159-64.

Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, et al. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. **Nucleic Acids Res** 1983; 19:6883-94.

Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. **J Mol Biol** 1987; 196:261-82.

Goyal J, Smith KM, Cowan JM, Wazer DE, Lee SW, Band V. The role for NES1 serine protease as a novel tumor suppressor. **Cancer Res** 1998; 58:4782-6.

Gonzalzo ML, Liang G, Spruck CH 3rd, Zingg JM, Rideout WM 3rd, Jones PA. Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR. **Cancer Res** 1997; 57: 594-9.

Gupta A, Godwin AK, Vanderveer L, Lu A, Liu J. Hypomethylation of the synuclein gamma gene CpG island promotes its aberrant expression in breast carcinoma and ovarian carcinoma. **Cancer Res** 2003; 63:664-73.

Hamada GS, Nishimoto IN, Torloni H. **Registro Hospitalar do Câncer, 1994**. Rio de Janeiro: Pro-Onco, 1997. (Monografias do Registro Hospitalar de Câncer-Hospital A. C. Camargo, vol.1, 1996).

Hamano K, Esumi M, Igarashi H, et al. inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in sporadic renal cell carcinoma. **J Urol** 2002; 167:713-7.

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 USA** 1996; 93:9821-6.

Herren B, Garton KJ, Coats S, Bowen-Pope DF, Ross R, Raines EW. ADAM15 overexpression in NIH3T3 cells enhances cell-cell interactions. **Exp Cell Res** 2001; 271:152-60.

Hilton JL, Geisler JP, Rathe JA, Hattermann-Zogg MA, DeYoung B, Buller RE. Inactivation of BRCA1 and BRCA2 in ovarian cancer. **J Natl Cancer Inst** 2002; 94:1396-406.

Hiltunen MO, Alhonen L, Koistinaho J, et al. Hypermethylation of the APC (adenomatous polyposis coli) gene promoter region in human colorectal carcinoma. **Int J Cancer** 1997; 70:644-8.

Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. **Am J Pathol** 1998; 153:333-9.

Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. **Cancer Sci** 2003; 94: 575-81.

Howlett AR, Petersen OW, Steeg PS, Bissell MJ. A novel function for the nm23-H1 gene: overexpression in human breast carcinoma cells leads to the formation of basement membrane and growth arrest. **J Natl Cancer Inst** 1994; 86:1838-44.

- Hou M, Morishita Y, Iijima T, et al. DNA methylation and expression of p16 (INK4A) gene in pulmonary adenocarcinoma and anthracosis in background lung. **Int J Cancer** 1999; 84:609-13.
- Huang TH, Laux DE, Hamlin BC, Tran P, Tran H, Lubahn DB. Identification of DNA methylation markers for human breast carcinomas using the methylation-sensitive restriction fingerprinting technique. **Cancer Res** 1997; 57:1030-4.
- Huang TH, Perry MR, Laux DE. Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. **Hum Mol Genet** 1999; 8:459-70.
- Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. **CA Cancer J Clin** 2003; 53:5-26.
- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet** 2002; 6:415-28.
- Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. **Nat Genet** 1999; 21:163-7.
- Keen JC, Davidson NE. The biology of breast carcinoma. **Cancer** 2003; 97:Suppl 3:825-33.
- Kimura F, Florl AR, Seifert HH, et al. Destabilization of chromosome 9 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **Br J Cancer** 2001; 12:1887-93.
- Krop IE, Sgroi D, Porter DA, et al. HIN-1, a putative cytokine highly expressed in normal but not cancerous mammary epithelial cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:9796-801.

Lin SP, Youngson N, Takada S, et al. Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the Dlk1-Gtl2 imprinted cluster on mouse chromosome 12. **Nat Genet** 2003; 35:97-102.

Lipsanen V, Leinonen P, Alhonen L, Janne J. Hypomethylation of ornithine decarboxylase gene and erb-A1 oncogene in human chronic lymphatic leukemia. **Blood** 1988; 72:2042-4.

Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta, LA. **The molecular basis of cancer**. Philadelphia: WB Saunders; 1995.

Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa de incidência e mortalidade de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 1999; 2003.

Muller HM, Widschwendter A, Fiegl H, et al. DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. **Cancer Res** 2003; 63:7641-5.

Nagy N, Brenner C, Markadiou N, et al. S100A2, a putative tumor suppressor gene, regulates in vitro squamous cell carcinoma migration. **Lab Invest** 2001; 81:599-612.

Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. **Gene** 2001; 278:25-31.

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.

Noda M, Oh J, Takahashi R, Kondo S, Kitayama H, Takahashi C. RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. **Cancer Metastasis Review**. 2003; (2-3) : 167- 75.

Ohtani-Fujita N, Fujita T, Aoike A, Osifchin NE, Robbins PD, Sakai T. CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. **Oncogene** 1993; 8:1063-7.

Patel A, Groopman JD, Umar A. DNA methylation as a cancer-specific biomarker: from molecules to populations. **Ann N Y Acad Sci** 2003; 983:286-97.

Primakoff P, Myles DG. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. **Trends Genet** 2000; 16:83-7.

Qu G, Dubeau L, Narayan A, Yu M, Ehrlich M . Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential. **Mut Res** 1999; 423:91-101.

Radice D, Redaelli A. Breast cancer management: quality-of-life and cost considerations. **Pharmacoeconomics** 2003; 21:383-96.

Rahman N, Stratton MR. The genetics of breast cancer susceptibility. **Annu Rev Genet** 1998; 32:95-121.

Robertson KD. DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. **Oncogene** 2002; 21:5361-79.

Sagane K, Ohya Y, Hasegawa Y, Tanaka I. Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. **Biochem J** 1998; 334:93-8.

Sagane K, Yamazaki K, Mizui Y, Tanaka I. Cloning and chromosomal mapping of mouse ADAM11, ADAM22 and ADAM23. **Gene** 1999; 236:79-86.

Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes Dev** 2003; 17:7-30.

Silva JM, Dominguez G, Villanueva MJ, et al. Aberrant DNA methylation of the p16INK4a gene in plasma DNA of breast cancer patients. **Br J Cancer** 1999; 80:1262-4.

Skacel M, Skilton B, Pettay JD, Tubbs RR. Tissue microarrays: a powerful tool for high-throughput analysis of clinical specimens: a review of the method with validation data. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2002; 10:1-6.

Smiraglia DJ, Fruhwald MC, Costello JF, et al. A new tool for the rapid cloning of amplified and hypermethylated human DNA sequences from restriction landmark genome scanning gels. **Genomics** 1999; 58:254-62.

Sobin LH, Wittekind Ch. **TNM - Classificação dos tumores malignos**. 5 ed. Trad. de Ministério da Saúde-Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA; 1998. Tumores de mama; p.128-37.

Strathdee G. Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. **Semin Cancer Biol** 2002;12:373-9.

Styblo MT, Wood WC. **The breast: Comprehensive management of benign and malignant diseases**. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1998. Traditional prognostic factors for breast cancer; p.419-25.

Shiraishi M, Chuu YH, Sekiya T. Isolation of DNA fragments associated with methylated CpG islands in human adenocarcinomas of the lung using a methylated DNA binding column and denaturing gradient gel electrophoresis. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96:2913-8.

Schlondorff J, Blobel CP. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. **J Cell Sci** 1999; 112:3603-17.

Tsuda H, Takarabe T, Kanai Y, Fukutomi T, Hirohashi S. Correlation of DNA hypomethylation at pericentromeric heterochromatin regions of chromosomes 16 and 1 with histological features and chromosomal abnormalities of human breast carcinomas. **Am J Pathol** 2001; 161:859-66.

Turker MS. Gene Silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. **Oncogene** 2002; 21:5388-93.

Ueki T, Toyota M, Skinner H, et al. Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma. **Cancer Res** 2001; 61:8540-6.

Ushijima T, Morimura K, Hosoya Y, et al. Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997; 94:2284-9.

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

Wales MM, Biel MA, el Deiry W, et al. p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. **Nat Med** 1995; 6:570-7.

Wheeler JM, Beck NE, Kim HC, Tomlinson IP, Mortensen NJ, Bodmer WF. Mechanisms of inactivation of mismatch repair genes in human colorectal cancer cell lines: the predominant role of hMLH1. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96:10296-301.

White JM. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. **Curr Opin Cell Biol** 2003; 5:598-606.

Weinberg RA. How cancer arises. **Sci Am** 1996; 275:62-70.

Wong DJ, Foster SA, Galloway DA, Reid BJ. Progressive region-specific de novo methylation of the p16 CpG island in primary human mammary epithelial cell strains during escape from M(0) growth arrest. **Mol Cell Biol** 1999; 8:5642-51.

Wong IH, Lo YM, Zhang J, et al. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. **Cancer Res** 1999; 59:71-3.

Wong N, Lam WC, Lai PB, Pang E, Lau WY, Johnson PJ. Hypomethylation of Chromosome 1 Heterochromatin DNA Correlates with q-Arm copy gain in Human Hepatocellular Carcinoma. **Am J Pathol** 2001; 159:465-71.

Wolfsberg TG, Primakoff P, Myles DG, White JM. ADAM, a novel family of membrane proteins containing a disintegrin and metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. **J Cell Biol** 1995; 131:275-8.

Yamada SD, Hickson JA, Hrobowski Y, et al. Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) acts as a metastasis suppressor gene in human ovarian carcinoma. **Cancer Res** 2002; 62:6717-23.

Yuille MR, Condie A, Stone EM, Wilsher J, Bradshaw PS, Brooks L, Catovsky D. TCL1 is activated by chromosomal rearrangement or by hypomethylation. **Genes Chromosomes Cancer** 2001; 30:336-41.

ANEXOS

ANEXO 1- Dados clínicos das 72 pacientes com câncer de mama utilizadas em análises de MSP para a região 5' do gene ADAM23.

Tumor	RGH	D.Nasc.	D.Diag.	TNM	T	N	M	Tcent	Linf.	Nlinf.	ER	c-erb	D.Recid.	D.Seg.	Recid	Stat	Stat C.	M
575	582710	25/09/23	07/10/98	I	1	0	0	2,0	0	0	1	0		09/11/02	0	0	1	0
582	984608	04/01/43	10/11/98	II	2	0	0	2,2	0	0	1	1		29/04/03	0	0	1	0
496	983648	03/01/48	24/09/98	I	1	0	0	2,3	0	0	0	0		16/05/03	0	0	1	0
850	940273	15/01/27	23/02/99	II	2	0	0	1,5	0	0	1	0		23/05/01	0	0	1	0
573	984436	26/05/56	14/10/98	II	2	1	0	2,5	1	1	0	1	11/08/99	17/09/99	1	1	3	1
767	990232	07/01/40	23/09/99	III	4	1	0	2,2	1	5	1	1		25/06/03	0	0	1	1
560	984018	18/01/54	27/10/98	II	2	1	0	4,5	1	8	0	1	20/06/01	05/06/02	1	0	2	1
536	983946	27/02/48	14/09/98	I	1	0	0	1,7	0	0	0	0		29/04/03	0	0	1	1
752	990470	24/03/63	28/02/99	II	2	0	0	3,0	0	0	0	1	25/01/00	12/01/01	1	1	4	0
742	990388	24/02/38	14/01/99	I	1	0	0	1,7	0	0	0	1		16/04/03	0	0	1	0
758	990649	24/03/50	26/01/99	I	1	0	0	2,0	0	0	0	1		18/12/02	0	0	1	1
724	990088	25/03/22	02/03/99	III	2	3	0	3,0	1	26	0	0	03/09/99	29/01/00	1	1	4	1
695	990081	25/01/37	12/01/99	III	1	3	0	1,2	1	29	0	1		16/04/03	0	0	1	1
508	983558	17/05/48	09/10/98	I	1	0	0	1,0	0	0	0	0		09/05/03	0	0	1	0
773	990377	03/02/54	26/01/99	I	1	0	0	1,5	0	0	1	1		10/02/03	0	0	1	0
834	990956	10/04/47	05/03/99	II	2	0	0	2,5	0	0	1	0		12/07/00	0	0	1	1

Tumor	RGH	D.Nasc.	D.Diag.	TNM	T	N	M	Tcent	Linf.	Nlinf.	ER	c-erb	D.Recid.	D.Seg.	Recid	Stat	Stat C.	M
574	984347	27/07/26	05/11/98	II	2	0	0	3,5	0	0	1	1		19/06/00	0	0	1	1
666	974978	07/04/66	16/12/97	IV	1	1	1	1,5	1	2	0	1	16/12/97	12/05/99	0	1	4	1
629	985078	23/09/25	25/11/98	I	1	0	0	1,8	0	0	1	1		16/03/03	0	0	1	1
505	983932	25/10/24	01/10/98	I	1	0	0	1,5	0	0	1	1	04/07/02	19/04/03	1	0	1	0
727	985448	19/12/40	21/10/98	II	1	1	0	2,0	1	1	1	1		17/06/03	0	0	1	0
599	984888	09/01/35	19/11/98	I	1	0	0	1,8	0	0	1	1		17/04/03	0	0	1	1
597	984607	08/08/55	17/11/98	II	2	1	0	2,9	1	1	0	1		02/09/02	0	0	1	0
630	984832	30/05/64	01/12/98	II	2	0	0	4,5	0	0	1	1		12/12/01	0	0	1	0
637	784243	12/09/08	03/12/98	II	2	0	0	2,5	0	0	1	1		28/08/02	0	0	1	1
696	985032	15/10/38	12/01/99	II	2	1	0	2,5	1	1	1	1		24/08/99	0	1	3	1
830	980378	16/06/23	25/03/99	II	2	0	0	2,7	0	0	1	0		09/04/99	0	0	1	0
645	906773	22/09/41	05/12/90	I	1	0	0	1,2	0	0	0	9		01/11/02	0	0	1	1
756	990649	24/03/50	26/01/99	II	2	0	0	2,5	0	0	0	1		18/12/02	0	0	1	1
753	990015	28/05/56	12/02/99	IV	1	9	1	2,0	9	9	0	9	12/02/99	16/08/00	1	1	4	1
527	990470	20/10/56	08/10/98	II	2	1	0	2,3	1	1	1	1		05/10/00	0	0	1	0
584	984439	14/06/44	10/11/98	II	1	1	0	1,5	1	3	1	0	28/06/00	08/05/03	1	0	2	1
636	985159	09/03/25	27/11/98	II	1	1	0	1,5	1	1	1	1		23/04/03	0	0	1	0

Tumor	RGH	D.Nasc.	D.Diag.	TNM	T	N	M	Tcent	Linf.	Nlinf.	ER	c-erb	D.Recid.	D.Seg.	Recid	Stat	Stat C.	M
676	985306	14/03/52	07/12/98	II	1	1	0	1,8	1	3	1	0		11/02/03	0	0	1	0
494	983523	17/07/59	24/09/98	II	2	0	0	2,4	0	0	1	9		03/06/03	0	0	1	0
610	984455	11/09/22	24/11/98	II	2	0	0	2,1	0	0	1	0		15/04/03	0	0	1	1
675	985421	15/06/06	05/01/99	II	2	0	0	2,7	0	0	0	0		18/03/02	0	1	3	0
554	983519	26/09/20	22/10/98	I	1	0	0	1,0	0	0	0	1		19/11/02	0	0	1	0
583	742870	20/12/15	10/11/98	II	2	0	0	3,5	0	0	1	1		07/11/00	0	1	3	0
551	984162	19/12/66	20/10/98	III	1	2	0	2,0	1	9	0	0	08/03/03	13/06/03	1	0	2	1
541	953048	28/11/27	05/07/95	III	3	1	0	4,5	1	1	1	1		31/10/02	0	0	1	0
759	990143	14/12/65	28/02/98	I	1	0	0	1,3	0	0	0	1		26/05/03	0	0	1	1
601	984757	07/03/30	19/11/98	II	1	1	0	1,9	1	1	1	1		04/06/03	0	0	1	1
720	985480	25/04/49	15/12/98	I	1	0	0	1,2	0	0	1	1		07/04/03	0	0	1	1
1	9802935	13/07/55	23/07/98	III	2	3	0	2,0	1	13	0	1		30/06/03	0	0	1	0
2	9804018	18/01/54	27/10/98	III	2	2	0	4,5	1	8	0	1	05/06/02	26/05/01	1	0	2	0
3	9804439	14/06/49	10/11/98	II	1	1	0	1,5	1	3	1	0	28/06/00	31/10/03	1	0	2	1
4	9804832	30/05/64	01/12/98	II	2	0	0	4,5	0	0	1	1		12/12/01	0	0	1	1
5	9902742	15/06/39	13/07/99	III	2	2	0	4,0	1	4	1	1		20/08/01	0	0	1	1
6	9902408	07/12/39	05/08/99	II	3	0	0	5,5	0	0	0	1		01/09/03	0	0	1	0

Tumor	RGH	D.Nasc.	D.Diag.	TNM	T	N	M	Tcent	Linf.	NIinf.	ER	c-erb	D.Recid.	D.Seg.	Recid	Stat	Stat C.	M
7	347	20/09/24	17/02/00	II	2	0	0	2,7	0	0	9	9		10/03/00	0	0	1	0
8	700	07/11/36	14/03/00	II	2	0	0	2,5	0	0	1	0		17/09/03	0	0	1	0
9	1863	24/04/45	10/04/00	IV	2	1	1	2,5	1	2	0	1	01/09/01	14/11/02	1	1	4	1
10	2786	15/08/20	03/07/00	IV	3	2	1	4,5	1	7	0	0		04/09/00	0	0	2	1
11	3249	18/12/63	19/05/00	IV	2	1	1	3,5	1	3	1	1	05/02/01	07/11/03	1	0	2	0
12	4378	29/07/34	18/10/00	III	2	2	0	4,5	1	8	1	0		17/06/03	0	0	1	1
13	4952	10/07/52	20/11/00	IV	4	3	1	7,2	1	30	1	1	09/08/01	14/01/02	1	1	4	1
15	10346	22/03/30	17/01/01	II	2	1	0	3,5	1	2	1	1		17/09/03	0	0	1	1
17	11453	15/11/01	21/03/01	III	4	2	0	11	1	19	1	1		03/11/03	0	0	1	0
18	11925	15/03/47	03/05/01	III	3	1	0	5,5	1	1	0	0		27/08/03	0	0	1	0
19	11115	24/06/46	06/07/00	IV	4	2	1	11	1	7	1	1	12/09/02	29/04/03	1	1	4	1
21	10755	21/06/57	06/02/01	III	4	1	0	7	1	2	0	0		21/08/03	0	0	1	1
22	10744	04/03/44	16/02/01	III	4	2	0	12	1	14	1	0		08/10/03	0	0	1	0
24	12624	27/02/25	19/06/01	IV	4	1	1	11	1	7	1	0	07/01/03	22/10/03	1	0	2	1
25	5273	05/03/42	10/08/00	III	4	2	0	5,5	1	1	1	0		08/10/03	0	0	1	1
27	13126	19/11/25	04/06/01	III	4	3	0	2,5	1	18	1	0		24/06/03	0	0	1	0
28	12949	15/07/33	11/06/01	III	4	2	0	5,0	1	36	1	1		25/07/03	0	0	1	1

Tumor	RGH	D.Nasc.	D.Diag.	TNM	T	N	M	Tcent	Linf.	Nlinf.	ER	c-erb	D.Recid.	D.Seg.	Recid	Stat	Stat C.	M
30	13173	27/07/31	08/06/01	III	4	2	0	4,0	1	2	1	1		26/06/03	0	0	1	0
31	11890	15/08/53	26/04/01	III	4	2	0	5,0	1	4	1	1		11/11/03	0	0	1	1
32	12354	24/04/03	25/04/01	III	4	3	0	3,1	1	13	1	1		29/10/03	0	0	1	0
33	12023	28/04/63	08/05/01	III	4	2	0	6,5	1	33	0	1	22/09/03	08/10/03	1	1	4	0
35	13818	02/05/32	31/08/01	III	4	1	0	3,0	1	1	1	1		01/10/03	0	0	1	0

Legenda: Tumor - refere-se ao número de cadastro do tumor no Banco de Tumores do Hospital do Câncer A . C. Camargo ; RGH - refere-se ao registro hospitalar da paciente; D. Nasc. - refere-se ao ano de nascimento da paciente ; D.Diag. - refere-se a data que o tumor da paciente foi diagnosticado ; TNM - refere-se ao estágio do tumor; T - tamanho do tumor ; N - presença de linfonodos comprometidos ; M - presença de metástases em sítios secundários; T cent. - refere-se ao tamanho do tumor em centímetros; Linf. - presença de linfonodos comprometidos ou não (0=negativo e 1=positivo) ; Nlinf. - número de linfonodos comprometidos em cada paciente; ER - status do receptor de estrógeno (0= negativo e 1=positivo) ; c-erb - status do receptor c-erbB2 (0=negativo e 1=positivo); D.Recid. - data da recidiva do tumor se tiver ocorrido; D.Seg. - data da última consulta realizada no Hospital pela paciente; Recid. - presença ou não de recidiva (0=não e 1=sim) ; Stat. - refere-se ao status da paciente (0=viva e 1=morta) ; Stat C. - refere-se ao status completo (1=viva sem câncer, 2=viva com câncer, 3=morta sem câncer e 4=morta com câncer) ; M - refere-se ao status de metilação da região 5' do gene ADAM23 não importando a intensidade da amplificação observada (0=sem amplificação e 1=com amplificação). A presença do número 9 em alguns quadrantes representa que o parâmetro não foi analisado naquela paciente.

ANEXO 2

Metodologia de AP-PCR sensível à metilação (MSAP-PCR) e a sua padronização

Extração de DNA

DNA genômico das diferentes linhagens e tumores foi extraído através do método convencional de fenol / clorofórmio. Resumidamente, as amostras foram digeridas durante toda a noite em tampão TES (Tris 10 mM, EDTA 50 mM, 0,5 % SDS) contendo 100ug/ml de Proteinase K e extraídas com o mesmo volume de fenol/clorofórmio até a obtenção de uma fase aquosa transparente livre de proteínas. Após recuperação da fase aquosa, o DNA foi precipitado com 1/10 do volume de Acetato de Sódio 3M pH6 e 2 volumes de etanol absoluto. Após centrifugação, o precipitado de DNA foi lavado com 70% de etanol e foi ressuspendido em 500µl de TE (Tris-EDTA) e armazenado a 4°C. A qualidade e quantidade do DNA obtido foram avaliadas através de leituras em espectrofotômetro (O.D. 260 e 280 nm) e visualização em gel de agarose 0,8%, respectivamente.

Digestão dos DNAs com as enzimas *Hpa* II e *Msp* I

Após a extração dos DNAs pela técnica de fenol-clorofórmio e a quantificação dos mesmos, 1µg de DNA foi utilizado nas digestões com 100U das enzimas *Hpa* II e *Msp* I (New England Biolabs) em um volume final de 50-100µl a 37°C por 16-20 h.

Controles de amplificação e de digestão total

Testes de digestão e de amplificação foram realizados em reações de PCR separadas. O teste de digestão foi realizado pela amplificação de uma porção do promotor do gene hMLH1, que possui sítios para as enzimas de restrição *Hpa* II / *Msp* I. Essa reação foi feita em um volume final de 25µl contendo 1X tampão de Taq Polimerase (Gibco-BRL), 1.5 mM de MgCl₂ (Gibco BRL), 200µM de dNTPs (Gibco BRL), 0.5U de Taq polimerase (Gibco BRL) e 4 pmoles dos *primers*. O DNA foi inicialmente desnaturado por 5 minutos a 95°C e em seguida submetido a 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 54°C por um minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final da ciclagem, as moléculas foram estendidas por 5 minutos a 72°C. Os *primers* utilizados nessas reações foram o phMLH1F: 5'-CGC TCG TAG TAT TCG TGC-3' e o phMLH1R: 5'-TCA GTG CCT CGT GCT CAC-3'.

O teste de amplificação foi realizado pela amplificação do exon 6 do gene p53, que não possui nenhum sítio para as enzimas de restrição *Hpa* II / *Msp*I. Essa reação foi feita em um volume final de 20µl contendo 1X tampão de Taq Polimerase (Gibco-BRL), 1.5mM de MgCl₂ (Gibco BRL), 200µM de dNTPs (Gibco BRL), 0.5U de Taq polimerase (Gibco BRL) e 5 pmoles de *primers*. O DNA foi inicialmente denaturado por 5 minutos a 95°C e em seguida submetido a 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por um minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final da ciclagem as moléculas são estendidas por 5 minutos a 72°C. Os *primers* utilizados nessas reações foram o e6p53 - F:5'-CAG GGC TGG TTG CCC AGG GTC CCC A-3' e o e6p53 - R: 5'-ACT GAC AAC CAC CCT TAA CCC CTC C-3'.

AP-PCR sensível à metilação (MSAP-PCR)

Após a realização dos testes de digestão e de amplificação, os DNAs foram utilizados como molde na AP-PCR sensível à metilação. Inicialmente, diferentes concentrações de DNA e iniciadores foram utilizados para

padronizar os perfis de MSAP-PCR. Para a produção dos perfis foram utilizados oligonucleotídeos previamente selecionados por possuírem um alto conteúdo de G+C. Os oligonucleotídeos selecionados foram testados para a presença de DNA contaminante e somente oligos com um teste negativo foram utilizados na MSAP-PCR. As reações foram realizadas em volume final de 20µl contendo 1X tampão de Taq Polimerase (Gibco-BRL), 1.5mM MgCl₂ (Gibco-BRL), 200uM dNTPs(Gibco BRL), 0.5U Taq polimerase (Gibco BRL) e 20 pmoles de iniciadores. A amplificação foi realizada em condições de baixa estringência. O DNA foi inicialmente desnaturado por 5 minutos a 95°C e em seguida submetido a 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 40°C por um minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final da ciclagem, as moléculas foram estendidas por 7 minutos a 72°C. Os perfis de amplificação foram analisados em géis de poliacrilamida 6% corados com prata ou em géis de poliacrilamida em condição desnaturante com uréia. Comparando-se os perfis de amplificação entre tecidos tumorais e normais, foram selecionadas bandas correspondentes a fragmentos de DNA diferencialmente metilados.

Géis de poliacrilamida 6% e 8% foram feitos utilizando-se uma solução de poliacrilamida e bis-acrilamida na proporção 29:1, TEMED (Life Technologies) como doador de elétrons da reação e persulfato de amônio (APS) 10% como catalisador da reação. A eletroforese foi conduzida em um aparato de gel médio a 100 V por aproximadamente 1h. O gel foi incubado em cuba de vidro por 10 minutos em solução fixadora (ácido acético glacial 0,5 % e etanol absoluto 10 %), sob agitação, à temperatura ambiente. Esta solução foi trocada pela de nitrato de prata (nitrato de prata 0,2 %) e o gel foi incubado por mais 6 minutos. Após impregnação do DNA com prata, o gel foi lavado com água deionizada e foi adicionada a solução reveladora (hidróxido de sódio 30 % e formaldeído 0,5 %) por mais 15 minutos, sob agitação, à temperatura ambiente. Após a revelação, a solução reveladora foi trocada pela fixadora e o gel foi seco com papel celofane.

Bandas candidatas identificadas por MSAP-PCR foram recortadas do gel de poliacrilamida e colocadas em um tubo de microcentrifuga contendo

40µl de 1X tampão de Taq Polimerase (Gibco-BRL). Esse tubo foi aquecido até 95°C por 10 a 20 minutos até o DNA passar para a solução. O eluato foi reamplificado em uma reação de PCR com o mesmo iniciador utilizado na MSAP-PCR original para gerar quantidades suficientes de DNA para a clonagem e o sequenciamento. Para a clonagem dos fragmentos foi utilizado um kit de clonagem de DNA segundo as instruções do fornecedor (TA Cloning Kit - Invitrogen). O produto de ligação no vetor foi utilizado para a transformação de bactérias *E.coli* (JM109, DH10B ou DH5α) competentes. Para a transformação foi utilizado um protocolo já estabelecido de choque térmico ou de eletroporação. O sequenciamento dos fragmentos clonados foi realizado de acordo com a técnica de terminação com dideoxynucleotídeos, seguindo as instruções do fornecedor. Para cada fragmento clonado, em torno de 10 colônias foram sequenciadas para evitar artefatos gerados pela reamplificação.

Todos os fragmentos clonados e sequenciados foram submetidos a alguns critérios de validação como: a presença dos *primers* utilizados no perfil de MSAP-PCR nas duas extremidades do fragmento, a presença de pelo menos um sítio das enzimas *Hpa* II / *Msp* I dentro do fragmento e o mapeamento cromossômico através de análises no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Confirmação do perfil de metilação diferencial

O padrão diferencial de metilação foi confirmado através do desenho de *primers* específicos para o fragmento clonado e a amplificação dessa região utilizando-se como molde o gDNA (DNA genômico) digerido com *Hpa* II e *Msp* I. Na PCR, a confirmação do perfil de metilação foi verificada pela amplificação de uma banda específica no DNA digerido com *Hpa* II e a ausência de amplificação no DNA digerido com *Msp* I no caso de um fragmento metilado. Por outro lado, nenhuma amplificação (DNA digerido com *Hpa* II e com *Msp* I) deveria ser verificada em um fragmento não-metilado.

ANEXO 3

Metodologia de tratamento do DNA com bissulfito de sódio para as análises de metilação

Tratamento com o reagente bissulfito de sódio

DNA genômico de todas as amostras foi submetido ao tratamento com o reagente bissulfito de sódio, que transforma as citosinas não-metiladas em uracilas utilizando-se o kit "CpG Modification Kit" (Intergen) de acordo com as especificações do fabricante.

O tratamento com bissulfito de sódio consiste na desnaturação inicial do DNA com o hidróxido de sódio, o ataque do carbono 5 das citosinas pelo reagente bissulfito de sódio e a lavagem (*CLEAN UP*) do DNA tratado com diferentes concentrações de etanol para a retirada de eventuais resquícios desse sal nas amostras. A etapa de desnaturação inicial do DNA é importante para que o tratamento com o bissulfito de sódio seja eficiente e homogêneo ao longo da molécula de DNA. Recentemente, novos protocolos com a adição de DMSO e betaina estão sendo utilizados com o objetivo de retirar as proteínas que podem estar ligadas ao DNA, atrapalhando o tratamento. Basicamente, 1 µg do DNA que se deseja estudar é desnaturado com o hidróxido de sódio (3M de NaOH) a 37°C por um período de 10-20 min. Posteriormente, é adicionado em torno de 500 µl de bissulfito de sódio pH5 e o DNA em tratamento é mantido a 55°C por 16-20h (*overnight*). No outro dia, um reagente chamado de hidroquinona é adicionado na amostra com o objetivo de parar a reação com o bissulfito de sódio, reagindo com esse composto e gerando como produtos compostos que devem ser retirados ou lavados, para evitar eventual inibição da reação de PCR. Antes das lavagens, uma sílica com carga positiva e alta afinidade elétrica pelo DNA é adicionada, se ligando fortemente ao mesmo. Posteriormente, são realizadas de 3-5 lavagens com diferentes concentrações de etanol,

variando de 75% até 90%. Após as lavagens, o DNA é desligado da sílica através de uma incubação a 55°C por um período de 15-20 min. Essa temperatura elevada facilita o desligamento do DNA tratado da sílica com carga positiva. Após uma centrifugação na velocidade máxima por 2-3 min, o DNA presente na fase aquosa ou sobrenadante é retirado e deve ser estocado a -80°C, se mantendo íntegro por até três meses.

Desenho dos *primers*, PCR e sequenciamento após tratamento com o bissulfito de sódio

O desenho dos *primers* específicos para a região do DNA em estudo após a modificação com o reagente bissulfito de sódio é de fundamental importância. Para o sequenciamento de regiões promotoras ou sequências de DNA nas quais se deseja verificar o padrão e a distribuição da metilação, os *primers* desenhados não devem conter nenhum dinucleotídeo CG. Essa característica é importante para que a reação de PCR seja capaz de amplificar a mesma região em estudo, tanto em amostras altamente metiladas, quanto em amostras desmetiladas. Nesse caso, na sequência dos *primers* FORWARD todas as citosinas são convertidas em timina e na sequência dos *primers* REVERSE todas as guaninas são convertidas em adenina. Para tanto, pode-se utilizar um programa disponível em uma página da INTERNET chamado de METHPRIME (<http://itsa.ucsf.edu/~urolab/methprimer/index1.html>).

As reações de amplificação após o tratamento com o reagente bissulfito de sódio podem variar de acordo com o fragmento e com a disponibilidade de reagentes. Os dois tipos de programa de PCR mais utilizados são o *TOUCHDOWN*, no qual as temperaturas diminuem ao longo dos passos da PCR e o *STEP UP*, no qual as temperaturas aumentam, geralmente de 2 em 2 graus, ao longo dos passos da PCR. Além disso, são realizadas duas reações (*NESTED PCR*), nas quais dois pares de *primers* são desenhados, sendo um mais interno e um mais externo. Na primeira reação, os *primers* mais externos são utilizados gerando um perfil de

amplificação sem bandas específicas e na segunda reação, os *primers* mais internos são utilizados gerando a amplificação do fragmento específico. Na segunda reação uma alíquota (1-3 μ l) do perfil de amplificação da primeira reação foi utilizado como DNA alvo. Para as amplificações de PCR após o tratamento com o bissulfito de sódio foram utilizadas enzimas especiais como a Taq GOLD e/ou a Taq PLATINUM com o objetivo de aumentar a eficiência da amplificação e a quantidade de produto gerado. Essas informações são muito importantes, pois o DNA tratado com o reagente bissulfito de sódio sofre uma degradação considerável, dificultando a sua amplificação.

Os produtos amplificados foram purificados com um Kit de purificação de produtos de PCR (PCR Purification Kit - Qiagen) e foram sequenciados diretamente ou clonados com um Kit de clonagem (TA Cloning Kit - Invitrogen) de acordo com as especificações do fabricante. Com o objetivo de verificar a representatividade de cada um dos alelos na população de células, o número ideal de colônias a serem sequenciadas é de 5 a 10. Nesse estudo, nós avaliamos 6 colônias nas linhagens celulares e de 5-10 colônias nos tumores primários. O sequenciamento foi realizado utilizando-se os *primers* universais do vetor (Forward: 5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3' e Reverse: 5'-TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C-3'). A porcentagem de metilação para cada amostra foi calculada como o número de CpGs metilados em relação ao número total de CpGs analisados. As reações de sequenciamento de DNA foram realizadas utilizando-se um kit de terminação de dideoxynucleotídeos (Applied Biosystems) e um sequenciador disponível (Applied Biosystems) de acordo com as especificações do fabricante.

PCR Metilação Específica (MSP)

No caso da técnica de MSP, dois pares de *primers* foram desenhados, sendo que um foi desenhado para a situação metilada e o outro foi desenhado para a situação não-metilada. O desenho desses

primers foi realizado manualmente ou com a ajuda do programa METHPRIME. Nesse caso, os primers foram desenhados dentro da região rica em CG ou ilha de CpG e possuíam pelo menos um dinucleotídeo CG cada um. Outra informação importante é que os dois pares de *primers* (situação metilada e não-metilada) possuíam uma temperatura de anelamento parecida e as reações de PCR foram ser feitas na mesma máquina para evitar variações externas nas condições de amplificação. Na MSP, de 1-2 μ l do DNA tratado com bissulfito de sódio foi utilizado como DNA alvo.

Análise de restrição combinada ao tratamento com o bissulfito de sódio (COBRA)

Nas análises de COBRA, 25-50 ng dos DNAs tratados com o reagente bissulfito de sódio como descrito acima (item *Desenho dos primers, PCR e sequenciamento após tratamento com o bissulfito de sódio*) foram amplificados com primers específicos para a região do DNA a ser analisada. Os produtos amplificados foram purificados com um Kit de purificação de produtos de PCR (PCR Purification Kit - Qiagen). De 50-100 ng do produto de PCR purificado foram utilizados em reações de digestão com 10 unidades da enzima *BstU1* (New England Biolabs) por 4 horas em um volume final de 30 μ l. Os produtos de digestão foram resolvidos em géis de piliacrilamida 8% ou em géis de agarose de 2-3%. A restrição completa do DNA ocorre somente se os dinucleotídeos CpG contidos dentro do sítio de *BstU1* se mantiverem não-modificados após a conversão com o tratamento com bissulfito de sódio.

ANEXO 4

Metodologia utilizada na caracterização do anticorpo anti-ADAM23

Purificação de Imunoglobulinas G reativas

A purificação das imunoglobulinas G reativas do anticorpo anti-ADAM23 foi realizada com o Kit "Protein A Sepharose CL-4B" (Amersham Biosciences) de acordo com as instruções do fornecedor. Inicialmente, 0,5 g de proteína A foi lavada 3 vezes e dissolvida em 5 ml de água deionizada. No outro dia, a coluna foi "empacotada" em uma seringa de 5 ml e lavada com 40 ml de PBS 1X (137mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ e 2 mM de KH₂PO₄ em pH7,4). Após a última lavagem com o PBS 1X, o eluato foi lido no espectrofotômetro a 280 nm. Essa leitura deve ser baixa indicando que o soro está ligado na coluna. O soro purificado foi eluído após a passagem de tampão ácido de glicina (0,1 M de glicina e 0,15 M de NaCl em pH2,7) pela coluna (Figura 4A). Dez frações do eluato foram coletadas e 100 µl de 1M de Tris pH9 foram adicionados imediatamente em cada tubo de coleta para a neutralização do pH ácido. Cada fração coletada foi lida no espectrofotômetro a 280 nm com o objetivo de verificar a concentração das eluições. Posteriormente, as frações coletadas foram dializadas em PBS 1X e água deionizada para a retirada dos sais e das impurezas. Após a diálise, as amostras foram quantificadas e congeladas a -20°C.

Western Blot

Anticorpos específicos contra a proteína de interesse foram gerados por imunização de dois coelhos com o peptídeo escolhido. O experimento de "Western Blot" foi realizado utilizando-se uma quantidade de 30-80 μ g de proteínas do extrato celular de linhagens celulares. Os anticorpos foram utilizados em diferentes diluições (1:100 até 1:20.000). Um gel de poli-acrilamida SDS-PAGE 8% foi produzido utilizando-se uma solução de poli-acrilamida e bis-acrilamida na proporção 29:1; TEMED (Life Technologies) como doador de elétrons da reação e persulfato de amônio (APS) 10% como catalisador da reação. As amostras foram aplicadas após quantificação e aquecimento por 10' a 95°C com o tampão de corrida 1x (240mM de Tris, SDS 0,8%, 200mM de β -mercaptoetanol, glicerol 40% e traços de Bromofenol Blue). A eletroforese foi conduzida em um aparato de gel a 100 V por aproximadamente 1h utilizando-se tampão de corrida 1x concentrado [25 mM de Tris, 190 mM de glicina (Merck) e SDS 0,1%]. Após a corrida, o gel foi retirado das placas e transferido para uma membrana de nitrocelulose (HYBOND P - Amersham Pharmacia Biotech) por 1h sob corrente constante de 0,8 mA/cm² no sistema SEMI-DRY (BioRad) em tampão de transferência [39mM de glicina (Merck), 48mM de Tris, SDS 0,037% e metanol 20%]. Para verificar a eficiência de transferência o corante Ponceau (Sigma) foi utilizado. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas durante 2 horas com TBST (120mM de NaCl, 20mM de Tris e Tween 20 0,05%) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (Molico, Nestlé).

Posteriormente, a membrana foi incubada a 4°C durante 16 horas com o anticorpo de interesse diluído em tampão de bloqueio (TBST contendo 5% de leite desnatado liofilizado como descrito acima). No outro dia, a membrana foi lavada com TBST por 1 h e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:20.000 por mais 1h. Após a incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi lavada por 30 min. com TBST. Após a lavagem, a membrana

foi revelada através de um método de quimioluminescência (ECL-Amersham Pharmacia Biotech) de acordo com as especificações do fornecedor. Posteriormente, a membrana foi exposta contra um filme de raio X (Kodak). O filme foi revelado utilizando-se as soluções reveladoras e fixadoras, conforme as especificações do fabricante (Kodak).

ANEXO 5

Livro "BASES DA ONCOLOGIA"

Maria Mitzi Brentani - Francisco Ricardo Gualda Coelho - Luiz Paulo

Kowalski

2ª edição Editora LEMAR

Capítulo 5: Oncogenes e Genes Supressores de Tumor

Autores: Anamaria A. Camargo e Fabrício F. Costa

pgs 71-86

O câncer como uma doença genética.

A integridade de um determinado tecido, assim como sua função, são conferidos por um equilíbrio estabelecido entre proliferação e morte celular. Este equilíbrio é mantido através de um complexo sistema de sinalização intra e extracelular. Quando este equilíbrio é perdido, as células passam a se proliferar de forma anômala, formando uma massa de células desordenadas que constituem um tumor primário. As células tumorais são capazes de se dividir na ausência de sinais positivos para a proliferação e apresentam morfologia e comportamento alterados. No processo de progressão tumoral, algumas células do tumor primário perdem a capacidade de adesão, invadem a membrana basal do tecido de origem através da produção de enzimas proteolíticas, atravessam a parede dos vasos sanguíneos, caem na circulação e formam áreas de proliferação em outros tecidos. Esse processo é denominado metástase.

A perda do controle da proliferação e a aquisição de características associadas com a progressão tumoral são conseqüências de alterações que ocorrem no conteúdo genético das células tumorais. A célula alterada, por adquirir uma maior capacidade de proliferação em relação às células vizinhas, sofre uma expansão clonal, transmitindo geneticamente a alteração

para todas as células que, a partir dela, se originam. Devido à complexidade e à existência de vias alternativas no controle da proliferação celular, para que haja a formação de um tumor é necessária a ocorrência de alterações adicionais e sucessivas em diferentes genes. Cada nova alteração é acompanhada de uma nova onda de expansão clonal e, ao final desse processo, surge uma população celular com grande potencial de crescimento e invasão - um tumor maligno.

As alterações genéticas relacionadas ao câncer podem ser herdadas ou adquiridas somaticamente durante a vida do indivíduo. Se considerarmos que o acúmulo de alterações genéticas em diferentes genes é um processo exclusivamente dependente de tempo, esperaríamos uma forte correlação entre a incidência de câncer e a idade avançada dos pacientes. Quando a incidência de câncer é comparada entre as diferentes faixas etárias, essa correlação é observada, e um aumento exponencial na incidência de câncer ocorre entre os 30 e 70 anos de idade como esperado. Cálculos estatísticos, levando em consideração a ocorrência de alterações genéticas e o aumento da incidência de câncer com a idade dos pacientes, estimaram a necessidade de ocorrência de 4 a 6 alterações genéticas em diferentes genes para o desenvolvimento de um tumor maligno. O tumor colorretal é um bom exemplo de como o acúmulo de pequenas alterações pode culminar no desenvolvimento do câncer. Indivíduos sofrendo de polipose adenomatosa familiar (FAP) carregam alterações no gene APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) que gera a formação de múltiplos pólipos. Esse gene, que também pode ser alterado por mutações somáticas (câncer esporádico), age em etapas bem preliminares do processo de tumorigênese. Após esse defeito genético, uma série de eventos ocorrem na célula guiando-a para uma transformação maligna. Esse modelo de múltiplos passos para a carcinogênese está esquematizado na Figura 1.

O câncer, portanto, é uma doença genética e as primeiras evidências disso surgiram nas décadas de 50 e 60, através da inspeção em microscópios óticos dos cromossomos de células tumorais. Nessas inspeções, a ocorrência de certas alterações cromossômicas podia ser

freqüentemente associada a certos tipos de câncer. Uma das primeiras alterações genéticas a ser diretamente associada a um tipo específico de câncer foi o cromossomo Filadélfia, resultante de troca recíproca de material genético entre os cromossomos 9 e 22 e encontrado com alta freqüência em pacientes com leucemia mielóide crônica. No entanto, devido a limitações metodológicas da época, os genes afetados por essas alterações cromossômicas não podiam ser isolados e caracterizados.

Essa situação foi revertida na década de 70, com o desenvolvimento da metodologia do DNA recombinante, um conjunto de técnicas que permite a manipulação e caracterização de fragmentos específicos de DNA. Nascia assim a Genética do Câncer, ciência voltada para o estudo das bases moleculares e celulares da formação e progressão de tumores. Nas últimas duas décadas mais de 200 genes envolvidos no controle da proliferação celular foram caracterizados. Esses podem ser funcionalmente divididos em duas classes: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor.

Os proto-oncogenes, geralmente, estão envolvidos na regulação positiva da proliferação celular e quando alterados são chamados oncogenes. Alterações genéticas em proto-oncogenes estão frequentemente associadas a um ganho de função e são dominantes em relação a carcinogênese, ou seja, basta a alteração de um dos dois alelos da célula para que haja a manifestação do fenótipo mutado. Os genes supressores de tumor, ao contrário, atuam restringindo a proliferação celular, e a sua inativação está associada a uma perda de função. Alterações em genes supressores de tumor são, portanto, na sua maioria recessivas em relação a carcinogênese, ou seja, há a necessidade de inativação dos dois alelos para que haja a manifestação do fenótipo mutado. Recentemente, em alguns tumores, foi comprovado o envolvimento de uma terceira classe de genes que codificam proteínas relacionadas ao reparo de DNA. Mutações nesses genes promovem uma instabilidade genética na célula, favorecendo o acúmulo de alterações genéticas e, conseqüentemente, o desenvolvimento de tumores.

Oncogenes

Os primeiros dados referentes à existência e função dos oncogenes foram obtidos através de estudos com o retrovírus RSV (*Rous sarcoma virus*), nos quais se observou que células em cultura infectadas pelo vírus perdiam o controle da proliferação celular. Em estudos subseqüentes foi verificado que o gene *src*, presente no genoma viral, era responsável pelas alterações relacionadas à proliferação celular. O gene *src* foi denominado oncogene e após essa descoberta inicial, outros oncogenes de origem retroviral foram caracterizados. Alguns anos mais tarde, verificou-se que os oncogenes retrovirais correspondiam a cópias alteradas de genes presentes em células normais. Vários oncogenes virais foram identificados, cujos homólogos celulares normais (proto-oncogenes celulares) na sua maioria são genes que controlam a proliferação e diferenciação celular. Os proto-oncogenes celulares podem ser alterados por mutações e ser convertidos em genes dominantes capazes de induzir a formação de tumores por mecanismos genéticos não relacionados aos vírus.

Os oncogenes já caracterizados são atualmente classificados em quatro grupos de acordo com seu modo de atuação: i) os fatores de crescimento, ii) os receptores para fatores de crescimento, iii) os transdutores de sinal e iv) os fatores de transcrição.

Os fatores de crescimento são proteínas que estimulam a célula a se dividir. Na ausência dessas proteínas, a célula normal sai do seu ciclo de divisão e entra em um estado quiescente conhecido como G0. Vários oncogenes codificam proteínas que influenciam o crescimento e a diferenciação celular. Na maioria dos casos, as mutações oncogênicas desses genes aumentam a quantidade de proteína produzida, sem alterar sua estrutura molecular. O oncogene *c-sis*, por exemplo, codifica uma das cadeias do fator de crescimento derivado de plaquetas (*PDGF*) e a célula mutada fica sob o controle autócrino, tornando-se menos sensível a regulação externa. Além do *c-sis*, outros grupos de oncogenes que codificam homólogos a fatores de crescimento de fibroblastos são *hst2* e *int-2*.

A segunda classe de oncogenes corresponde aos receptores para fatores de crescimento presentes na superfície da célula. Os receptores são proteínas transmembrânicas, com um domínio externo ao qual se liga o fator de crescimento e um domínio citoplasmático capaz de ativar a cascata de sinalização intracelular. Alterações estruturais ou a superprodução desses receptores têm sido identificadas em alguns tumores resultando na ativação da proliferação celular mesmo na ausência de estímulo extracelular. Exemplos de receptores para fatores de crescimento que agem como oncogenes quando alterados são o receptor de EGF (codificado pelo *cerbB*) e o receptor de M-CSF (codificado por *c-fms*).

A terceira classe de oncogenes compreende as proteínas localizadas na face interna da membrana citoplasmática e que estão envolvidas no processo de sinalização intracelular. Essas proteínas atuam em vias complexas como transdutoras ou amplificadoras do sinal desencadeado pela ligação do fator de crescimento ao seu receptor. Alterações nos comandos de proliferação celular podem ocorrer quando essas proteínas sofrem alterações estruturais que fazem com que elas emitam sinais proliferativos mesmo na ausência de estímulo externo. Exemplos de proto-oncogenes desta classe são *c-abl* e *ras*.

A última classe de proto-oncogenes engloba proteínas nucleares que agem como fatores de transcrição, regulando diretamente a expressão gênica. Os fatores de transcrição possuem em sua estrutura domínios protéicos capazes de interagir com a região promotora dos genes, assim como, com outros membros da maquinaria de transcrição da célula. Os fatores de transcrição frequentemente relacionados a formação de tumores são as proteínas das famílias *myc*, *fos* e *jun*. Na ausência de fatores de crescimento, esses genes se encontram desligados e seus produtos são indetectáveis na célula, no entanto, na presença dos mesmos, os níveis dessas proteínas se acumulam rapidamente no núcleo e são capazes de ativar uma série de genes.

As alterações genéticas mais frequentes em oncogenes são as translocações e amplificações. No entanto, mutações pontuais são

observadas em alguns casos como, por exemplo, no oncogene *ras*. Aproximadamente 30% dos tumores humanos apresentam mutações pontuais no oncogene *ras*. Essas mutações se concentram em regiões específicas da proteína, preferencialmente nos códons 12, 13 e 61. Na tabela 1 podemos verificar exemplos de oncogenes e suas funções celulares.

Genes supressores de tumor

A caracterização de genes supressores de tumor sempre foi dificultada pelo fato do fenótipo maligno se manifestar apenas após a perda, a mutação ou a inativação do gene em estudo. Com o desenvolvimento da citogenética, dos experimentos de fusão celular e, posteriormente, da tecnologia do DNA recombinante, os genes supressores de tumor puderam ser mapeados de forma mais precisa e isolados através de técnicas de clonagem posicional. Utilizando essas metodologias, a presença de alteração em um determinado locus pôde ser inferida através da análise do padrão de bandejamento dos cromossomos da célula tumoral ou então através da análise de marcadores moleculares específicos para uma determinada região do cromossomo. Vários genes supressores de tumor foram caracterizados dessa forma e alterações genéticas nesses genes, associadas a um determinado tipo de tumor, são muito freqüentes na literatura.

Em 1971, Knudson, estudando casos esporádicos e familiares de retinoblastoma, propôs a hipótese do “two hits” para a inativação de genes supressores de tumor. Segundo essa hipótese, são necessárias duas alterações genéticas (“hits”) distintas envolvendo os dois alelos para que haja inativação total do gene supressor. Nos casos esporádicos de câncer, ambas as alterações ocorrem no tecido afetado ao longo da vida do indivíduo e são, portanto, denominadas mutações somáticas. Nos casos familiares de câncer, uma das mutações é herdada dos pais (mutação

germinativa) e o segundo “hit” ocorre através do aparecimento de uma mutação somática no tecido afetado.

O gene *RB1* foi o primeiro gene supressor de tumor a ser descrito por Knudson em seus estudos epidemiológicos sobre as formas esporádicas e hereditárias de retinoblastoma, sendo posteriormente isolado em 1986. A localização deste gene foi possível através da observação de que a deleção do braço curto do cromossomo 13 estava frequentemente associada ao desenvolvimento de retinoblastomas. A proteína codificada pelo gene *RB1* possui 928 aminoácidos, se localiza predominantemente no núcleo e é expressa na maioria dos tecidos. Esta proteína regula o ciclo celular e na sua forma ativa é capaz de paralisar a célula na fase G0/G1 do ciclo celular, bloqueando o avanço para a fase S (síntese de DNA).

O modelo de Knudson proposto inicialmente para o gene *RB1* tem se aplicado também para outros genes supressores de tumor. O gene *WT-1*, localizado no cromossomo 11p13, foi associado ao tumor de Wilms, pois está inativo ou mutado nesse tipo de câncer. A proteína codificada por esse gene é um fator de transcrição que reprime a expressão de fatores de crescimento como o *IGF-II* e do receptor de *IGF-I*. Outro gene supressor de tumor importante é o *NF1*, cuja perda ou mutação pode gerar a neurofibromatose tipo 1. Esse gene está localizado no cromossomo 17. A análise da sequência desse gene revelou a presença de homologia com genes que inibem a atividade GTPásica de algumas proteínas, tornando-as inativas. A atividade descontrolada de proteínas com características de GTPase pode levar a um descontrole do ciclo celular e a função de *NF1* parece ser de regular negativamente essas proteínas.

O gene supressor de tumor *p53* encontra-se alterado em 50% dos tumores humanos e possui características importantes tanto no controle do ciclo celular quanto nos mecanismos de reparo de DNA. A proteína codificada por esse gene foi nomeada de p53 por possuir um peso molecular de 53 KDa e assim como os genes *RB1* e *WT1* possui localização nuclear. A proteína p53 funcional é composta por quatro subunidades idênticas. Dessa forma, quando a célula apresenta um alelo mutado e outro normal, a função

da proteína pode estar comprometida, pois cada tetrâmero terá pelo menos uma subunidade defeituosa (efeito dominante negativo). A descrição de mutações no gene *p53* é extensa e verificou-se que existem regiões da proteína nas quais ocorre uma concentração de mutações. A maioria das mutações se concentra nos exons 5 a 8 entre os aminoácidos 130 a 290. Essa região compreende o sítio de ligação ao DNA. A proteína *p53* possui um papel muito importante na célula, pois ela atua como “guardião” do genoma. Ela age antes da síntese de DNA durante a divisão mitótica, verificando se a molécula de DNA está íntegra para que o ciclo celular possa seguir adiante. Se algum problema grave é detectado, existem duas possibilidades para a célula: ativar o sistema de reparo via *p53* ou no caso de existirem múltiplas lesões, a opção é a morte celular programada (MCP) ou apoptose. Em células com o *p53* mutado ou inativo, há um acúmulo de defeitos genéticos que culminam na transformação maligna, pois não ocorre a apoptose. Recentemente, verificou-se que a proteína *p53* é capaz de ativar vários genes celulares que atuam nos processos de integridade genômica e divisão celular. Um exemplo é o gene *p21*, que é um inibidor de quinases dependentes de ciclinas. Esse gene tem um papel importante no ciclo celular juntamente com outros genes ainda desconhecidos.

Diversos tipos de alterações genéticas foram descritas para genes supressores de tumor, incluindo mutações pontuais e cromossômicas (duplicações, translocações, amplificações e deleções). Diferentes genes supressores de tumor são inativados preferencialmente por um determinado mecanismo. O gene *p53*, por exemplo, é inativado preferencialmente por mutações pontuais. Por outro lado, o gene *DCC* (*Deleted in Colorectal Cancer*) é inativado por deleções. Esse gene foi localizado por estudos citogenéticos que demonstraram que a região do cromossomo 18q onde este se localiza está frequentemente deletada em tumores coloretais. Estudos moleculares posteriores verificaram que esse gene apresenta deleção em 80 % dos casos de câncer coloretal e 50% dos adenomas.

Recentemente, um novo mecanismo de silenciamento de genes supressores de tumor por metilação (alteração epigenética) foi descrito na

literatura e apontado como um novo mecanismo de inativação gênica a ser considerado na hipótese de Knudson. Na Tabela 2 podemos verificar os genes supressores de tumor mais estudados e a sua função na célula.

Genes de Reparo

O envolvimento de uma terceira classe de genes que codificam proteínas relacionadas ao reparo de DNA foi recentemente comprovado em alguns tumores. O sistema de reparo do DNA é um mecanismo altamente conservado ao longo da escala evolutiva, sendo encontrado desde bactérias até os mamíferos superiores.

Os principais mecanismos de reparo de DNA conhecidos são: (1) Reparo direto (*Direct Repair*) no qual ocorre reconhecimento da lesão e um reparo direto sem a formação de um complexo enzimático; (2) Reparo de quebras duplas (DSBR - *Double Strands Break Repair*) que repara lesões causadas por agentes químicos e envolve genes importantes em tumores como o *p53*, o *BRCA1* e o *BRCA2*; (3) Reparo por excisão que por sua vez se divide em 3a) Reparo de erros de mal pareamento (MMR - *Mismatch Repair Pathway*) o qual está envolvido no reparo de lesões que modificam a estrutura espacial e física da molécula de DNA e envolve genes comumente mutados em câncer colorretal, como o *hMLH1* e o *hMSH2*; 3b) Reparo por excisão de bases (BER - *Base Excision Repair*) que retira uma base que sofreu modificação por agentes químicos e 3c) Reparo por excisão de nucleotídeos (NER - *Nucleotide Excision Repair*) que repara lesões causadas por agentes físicos, com a retirada de um fragmento de DNA de 23-30 nucleotídeos.

Defeitos em genes de reparo de DNA podem causar instabilidade cromossômica e predisposição ao câncer. Alguns exemplos de doenças autossômicas recessivas causadas por defeitos em enzimas do sistema de reparo de DNA e que predispõem os indivíduos acometidos ao câncer incluem a síndrome do Xeroderma Pigmentosum (XP), a síndrome Colorretal

Não-Polipóide Hereditária (HNPCC), a ataxia telangectasia (AT), a anemia Fanconi (FA) e a síndrome de Bloom (BS). A existência de indivíduos com síndromes relacionadas aos genes de reparo que predispõem ao câncer demonstra que a existência de um sistema de reparo de DNA eficiente é de extrema importância para manter a integridade da molécula de DNA e evitar, assim, o aparecimento do câncer.

Alterações genéticas em tumores: mutações gênicas e alterações cromossômicas

As informações contidas na molécula de DNA podem ser alteradas durante o processo de replicação do material genético. Essas alterações são conhecidas como mutações e são agrupadas em três classes distintas de acordo com sua extensão.

Mutações Genômicas: são alterações (ganho ou perda) no número total de cromossomos de uma célula, podendo envolver todo o conjunto de cromossomos (poliploidia) ou o número de cópias de um cromossomo em particular (aneuploidia).

Mutações Cromossômicas: são alterações na estrutura do cromossomo (duplicações, deleções, ampliações ou translocações) que podem ser detectadas a nível microscópico e afetam uma região específica do cromossomo, não havendo alteração no número total destes.

Mutações Gênicas: são alterações (substituições, deleções ou inserções) na sequência de nucleotídeos que compõem a molécula de DNA e podem ser classificadas de acordo com as alterações provocadas na síntese protéica: (1) mutações silenciosas são aquelas que não alteram a sequência protéica codificada; (2) mutações “nonsense” são aquelas que geram uma parada precoce na sequência de aminoácidos da proteína e (3) mutações “missense” são aquelas que levam a uma incorporação de aminoácidos diferentes na proteína. No último caso, a atividade polipeptídica pode ser alterada ou não dependendo do caráter (hidrofílico ou hidrofóbico) do aminoácido que foi trocado. Além disso, algumas deleções ou adições de

um único nucleotídeo no DNA podem modificar a fase de leitura do código genético gerando um conjunto de aminoácidos diferentes da proteína original. Esse tipo de mutação é chamado de mudança de fase de leitura ou *frameshift*. (Figura 2).

As mutações podem ser introduzidas durante o processo de replicação da molécula de DNA em decorrência de processos endógenos ou da exposição a uma grande variedade de fatores ambientais, compostos químicos, radiações ionizantes ou mesmo alguns tipos de vírus. Assim sendo, a divisão celular é um dos fatores críticos da mutagênese e, como é de se esperar, há uma baixa incidência de câncer em tecidos com pequena taxa de replicação.

Os metabólitos derivados do oxigênio gerados pela respiração celular são a maior fonte endógena de carcinógenos para a célula. Compostos como o peróxido de hidrogênio, radicais superóxido entre outros surgem na célula após a utilização do oxigênio na geração de ATP e podem lesar a molécula de DNA. Danos na molécula de DNA também podem ser causados por agentes físicos e/ou químicos externos como será melhor abordado na Seção I do capítulo 12. O principal carcinógeno físico encontrado no meio ambiente é a luz ultravioleta seguido pelas radiações ionizantes (raios X e γ). Alguns compostos carcinogênicos presentes na água, nos alimentos e no ar também podem exercer efeitos deletérios para a molécula de DNA. A maioria dos carcinógenos químicos causa danos ao DNA por ação direta ou após a sua metabolização. O mais importante e estudado carcinógeno químico é o fumo, sendo responsável por 1/3 de todas as mortes por câncer nos E.U.A. O composto químico mais estudado e mais carcinogênico presente no tabaco é o Benzo[a]pireno (Hidrocarboneto Aromático Policíclico - PAH). Além do fumo, o álcool é considerado um potente agente carcinogênico, pois os produtos metabólicos gerados pela degradação deste composto podem causar câncer de boca, esôfago, estômago, laringe e outros.



Alterações genéticas em tumores: mecanismos epigenéticos

As alterações epigenéticas são todas as modificações que podem alterar a estrutura físico-espacial do DNA sem alterar a sua seqüência de nucleotídeos. A metilação de citosinas no carbono 5' dos dinucleotídeos CpG é uma alteração epigenética característica de genomas eucarióticos e um dos principais mecanismos de regulação da expressão gênica. De um modo geral, a presença de metilação em seqüências promotoras ou regulatórias de genes pode ser correlacionada com a inativação ou com o silenciamento gênico (Figura 3). A metilação do DNA pode ser detectada, por exemplo, nos promotores de genes inativados por "imprinting", e no processo de inativação do cromossomo X. Os grupamentos metil (CH₃) não afetam o pareamento de bases, mas podem influenciar em interações DNA-proteínas por se projetarem no sulco maior da dupla fita da molécula de DNA. As enzimas responsáveis pela adição do grupamento metil no DNA são denominadas de DNA Metiltransferases (DNMTs) e a falta dessas enzimas pode ser letal.

A possível associação entre metilação e tumorigênese surgiu da observação de que a grande maioria dos genes supressores de tumor continha regiões ricas em CpG nas suas seqüências regulatórias e que, de um modo geral, o padrão de metilação do DNA se encontrava alterado em células tumorais. Desde então, o relato de inativação de genes supressores de tumor por metilação vem aumentando na literatura. Trabalhos avaliando o status de metilação dos genes supressores de tumor em tumores esporádicos destacam a importância da metilação na tumorigênese. Na tabela 3 podemos verificar os genes supressores de tumor cuja metilação em regiões regulatórias já foi descrita na literatura. A freqüência com que promotores metilados contribuem para a inativação de genes relacionados ao câncer varia de 9% no gene do Retinoblastoma (*RB1*), passando de 33% na doença de Von Hippel Lindau (*VHL*) e atingindo 84% no gene *hMLH1* em tumores coloretais com instabilidade de microsátélites.

De maneira semelhante, a perda da metilação parece estar associada com a ativação de certos genes que estão inativos em células normais. Por exemplo, o gene que codifica para a *ornitina decarboxilase* e os proto-oncogenes *ERB-A1* e *BCL-2* se mostraram hipometilados em leucemia linfocítica crônica. A ativação do gene *MAGE-1*, que codifica um antígeno específico em melanomas, também parece estar relacionada com a perda da metilação do promotor do gene. Outros exemplos bem recentes na literatura são os oncogenes *TCL-1* e *BCSG1*. O gene *TCL-1* perde a metilação na sua região regulatória e passa a ser expresso em Linfoma de Burkitt e Leucemias Linfocíticas Crônicas de células B. De maneira semelhante, o gene *BCSG1* (*Breast Cancer-Specific Gene 1*) foi identificado por estar com a expressão aumentada em tumores de mama após a perda de metilação na sua região promotora.

Recentemente, um segundo mecanismo epigenético que envolve proteínas importantes na compactação da molécula de DNA - as histonas - tem sido associado ao silenciamento ou à reexpressão de genes em tumores de uma maneira sinérgica com a metilação. As histonas são proteínas nucleares que possuem uma dinâmica de associação ao DNA de acordo com os grupamentos que se ligam a ela. Quando as histonas se ligam fortemente ao DNA, este se encontra na sua forma mais compactada e inacessível à transcrição gênica. Grupamentos acetil (possuem carga negativa) em associação com as histonas, diminuem a afinidade dessas proteínas pelo DNA, gerando uma redução na compactação da cromatina. A diminuição da compactação da cromatina possibilita a expressão dos genes localizados em uma determinada região cromossômica. Enzimas denominadas histonas deacetilases e histonas acetiltransferases (HDAC e HAT) possuem um papel muito importante no processo de desacetilação e de acetilação das histonas, aumentando ou diminuindo a acessibilidade dessas proteínas ao DNA.

A associação sinérgica entre a metilação de regiões regulatórias de genes e a acetilação / desacetilação de histonas se deve ao fato de que há uma ligação física descrita entre as enzimas metil-transferases (DNMTs) e as

histonas deacetilases (HDAC). Em doenças como o câncer, defeitos nessas enzimas podem gerar um descontrole desses mecanismos, com concomitante alteração no padrão de expressão gênica.

Utilização de alterações genéticas como marcadores tumorais

Apesar dos grandes avanços obtidos nos últimos anos, ainda estamos longe da cura do câncer e o diagnóstico precoce continua sendo a grande arma no combate à doença. O isolamento de genes alterados em tumores, assim como a caracterização de suas alterações genéticas são fundamentais para a compreensão do processo de transformação maligna. No entanto, essas alterações genéticas também podem ser utilizadas como marcadores tumorais no diagnóstico, prognóstico e tratamento da doença. Testes moleculares para o diagnóstico de câncer estão sendo desenvolvidos com base na observação de que DNA tumoral pode ser detectado por PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) em células provenientes do tecido afetado. Em uma reação de PCR, uma única molécula de DNA com alteração genética pode ser amplificada milhões de vezes. Devido à alta sensibilidade e especificidade da reação de PCR, um número muito pequeno de células tumorais pode ser detectado em meio a inúmeras células normais, aumentando infinitamente a sensibilidade e especificidade de diagnóstico em relação às técnicas tradicionais de imagem.

Vários tipos de fluidos corporais também vem sendo utilizados em diferentes estudos como, por exemplo, a urina na detecção de tumores de bexiga, fezes para os tumores de intestino, lavado brônquico e escarro para detecção de tumores pulmonares e saliva para detecção de tumores de cabeça e pescoço. De uma maneira mais genérica, DNA tumoral também pode ser encontrado no plasma de pacientes com diferentes tipos de tumores, incluindo tumores de mama. A detecção de alterações genéticas em fluidos corporais possui, além da alta sensibilidade, a vantagem ser um método diagnóstico não invasivo. Vários estudos já demonstram que é possível identificar mutações específicas nos genes *p53* e *RAS* no soro de

pacientes com carcinoma colorretal e pancreático. Alterações em microssatélites também são frequentemente utilizadas como marcadores para a detecção de DNA tumoral no plasma de pacientes com tumores de mama, pulmão e cabeça e pescoço.

Um exemplo de detecção de alteração genética que pode determinar uma melhor ou pior sobrevida de pacientes com tumores colorretais é a análise de mutações ou metilação nos genes de reparo *hMSH2* e *hMLH1*. Esses genes estão envolvidos no reconhecimento e retirada de lesões no DNA. Quando as células tumorais de cólon possuem esses genes inativados e apresentam uma taxa de erros na molécula de DNA elevado, o prognóstico após radioterapia e quimioterapia é bem melhor do que tumores que possuem esses genes funcionando perfeitamente. Esse fato é explicado pela incapacidade que as células tumorais com problemas no reparo de DNA têm de reparar os danos causados pelo tratamento. Essa incapacidade gera múltiplas lesões na célula tumoral incapacitando-a de sobreviver, gerando uma regressão tumoral.

Recentemente, alterações no padrão de metilação em regiões regulatórias do gene supressor de tumor *p16* foram detectadas no plasma de pacientes com tumores de pulmão, fígado e mama com eficiência de 73, 81 e 20%, respectivamente. Todos os trabalhos utilizaram a técnica do MSP ou PCR específica para a metilação (*Methylation Specific PCR*) na qual o DNA extraído a partir de amostras de plasma é tratado com um composto químico chamado de bissulfito de sódio (permite a distinção entre regiões metiladas e não-metiladas no DNA) e, posteriormente, amplificado com iniciadores específicos para a região promotora do gene. A amplificação de um fragmento específico representa a presença ou não de metilação. Esta, por sua vez, pode então ser utilizada como ferramenta diagnóstica ou correlacionada com um pior ou melhor prognóstico.

Assim, a caracterização de alterações em diferentes marcadores moleculares será de fundamental importância para uma melhor avaliação do diagnóstico, do prognóstico e de recorrência do câncer em pacientes.

Leituras Recomendadas:

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

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

Jones PA. DNA methylation and cancer. **Oncogene** 2002; 21:5358-60.

Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA. **The molecular basis of cancer**. Philadelphia: W. B. Saunders; 1995.

Raskó I, Downes CS. **Genes in medicine**. London: Chapman & Hall; 1995.

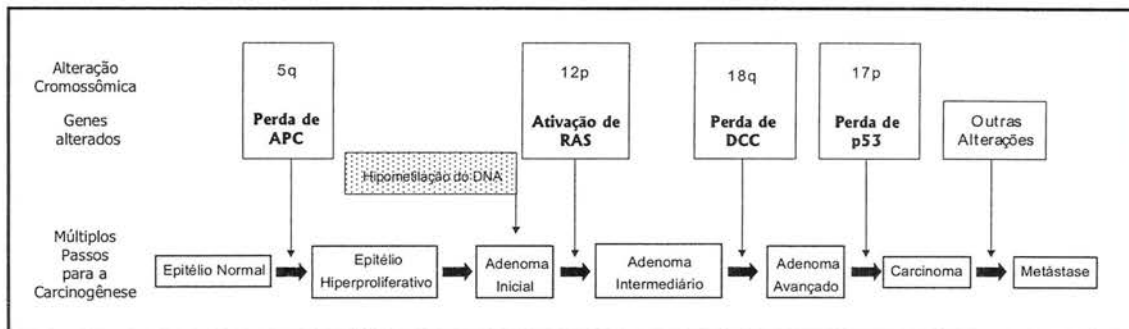
Robertson KD. DNA methylation and Chromatin - unraveling the tangled web. **Oncogene** 2002; 21:5358-79.

Sidrasky D. Advances in cancer prevention. **Scientific Am** 1996; 275:70-75.

Trichopoulos D, Li FP, Hunter DJ. What causes cancer? **Scientific Am** 1996; 275:50-57.

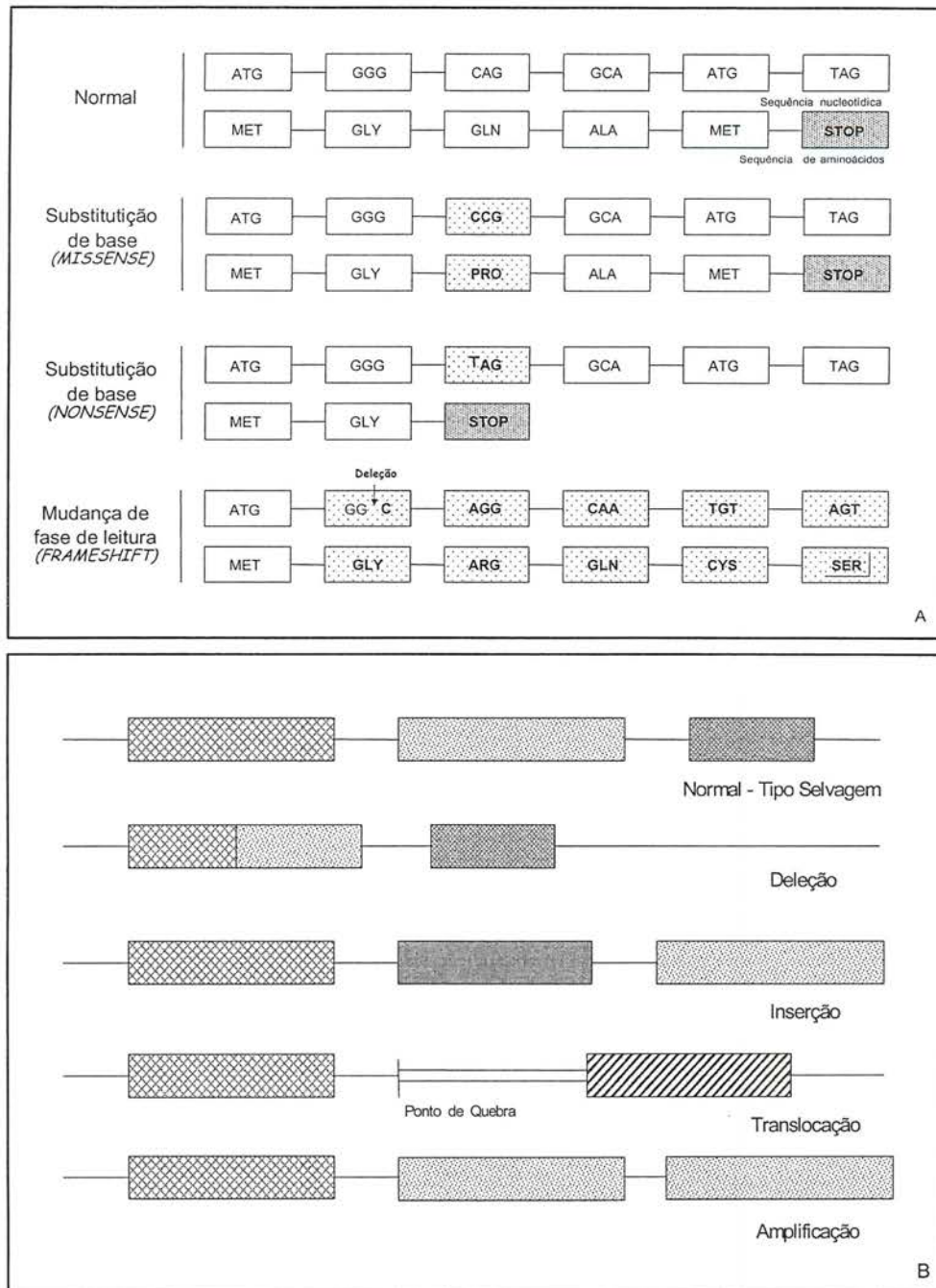
Varmus H, Weinberg RA. **Genes and the biology of cancer**. New York: Scientific American Library; 1993.

Wienberg, RA. How cancer arises. **Scientific Am** 1996; 275:32-40.



Fonte: Redesenhado, com algumas alterações de Varmus e Weinberg (1993).

Figura 1 - Modelo de múltiplos passos na evolução de um típico tumor colorretal. Essas alterações estão estatisticamente associadas à progressão tumoral e cada tipo de tumor deve ter uma via de eventos moleculares distintas.



Fonte: Redesenhado, com algumas alterações de Varmus e Weinberg (1993).

Figura 2 - Esquema das mutações que podem acontecer em genes supressores de tumor e oncogenes em uma célula. (A) Representação esquemática dos tipos de mutações pontuais. As bases púricas e pirimídicas estão agrupadas em códons de três letras e os aminoácidos são indicados pela forma abreviada de seu nome. (B) Representação esquemática de mutações cromossômicas que envolvem deleções, ampliações, inserções e translocações entre cromossomos.

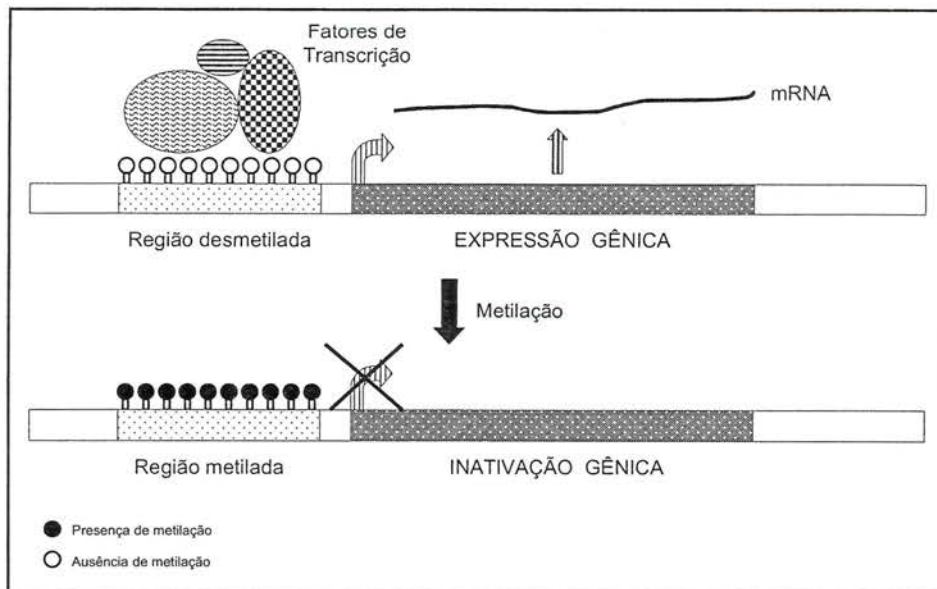


Figura 3 - Modelo simplificado de metilação e inativação gênica de supressores de tumor em câncer. Em células normais, um gene que controla negativamente a proliferação celular possui a sua região regulatória ou promotora desmetilada e acessível aos fatores de transcrição. Por outro lado, em células tumorais, o mesmo gene pode apresentar grupamentos metil ligados em citosinas dos dinucleotídeos CpG inibindo a ligação dos mesmos fatores e impedindo a expressão do gene. Esse tipo de alteração genética foi incluído recentemente na Hipótese de Knudson como um mecanismo de inativação de genes supressores de tumor.

Tabela 1 - Alguns exemplos de oncogenes e a sua função celular.

GENE	LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA	LOCALIZAÇÃO CELULAR	FUNÇÃO
<i>sis</i>	22q13.1	Extracelular	Fator de crescimento
<i>hst2</i>	12p13	Extracelular	Fator de crescimento
<i>c-erbB2</i>	17q21.1	Superfície celular	Receptor de fator de crescimento
<i>abl</i>	9q34.1	Citoplasma	Sinalização intracelular
<i>jun</i>	1p32-p31	Núcleo	Fator de transcrição
<i>myc</i>	8q24.12-13	Núcleo	Fator de transcrição

Tabela 2 - Alguns exemplos de genes supressores de tumor e a sua função celular.

GENE	LOCALIZAÇÃO		LOCALIZAÇÃO CELULAR	FUNÇÃO
	CROMOSSÔMICA	PRODUTO GÊNICO		
RB1	13q	pRB	Núcleo	Fator de Transcrição
<i>NF1</i>	17q	Neurofibromina	Citoplasma	Proteína ativadora
<i>p53</i>	17p	p53	Núcleo	Fator de Transcrição
<i>NF2</i>	22q	Merlin	Citoesqueleto	Integração do citoesqueleto
<i>WT1</i>	11p	WT1	Núcleo	Fator de transcrição
<i>DCC</i>	18q	DCC	Membrana Plasmática	Adesão celular
<i>APC</i>	5q	APC	Citoplasma	Ligação à β -catenina
<i>MTS1</i>	9p	p16	Núcleo	Inibidor de quinases
VHL	3p	VHL	Elongação dos RNAs	Papel na transcrição
BRCA1	17q	BRCA1	Núcleo	Reparo de DNA
BRCA2	13q	BRCA2	Núcleo	Reparo de DNA
hMLH1	3p	hMLH1	Núcleo	Reparo de DNA
hMSH2	2p	hMSH2	Núcleo	Reparo de DNA

Tabela 3 - Exemplos de genes supressores de tumor inativados por metilação em alguns tipos de câncer.

Gene Supressor de Tumor	Função	Tipos de câncer
CDH1 (E-caderina)	Adesão celular e supressão de metástase	Mama, estômago e leucemias
CDH13 (H-caderina)	Adesão celular	Mama e pulmão
BRCA1	Reparo de DNA e transcrição gênica	Mama e ovário
hMLH1	Reparo de DNA (DSBR)	Cólon, endométrio e estômago
VHL	Componente de alongação do RNA e ligação de ubiquitina	Rim e hemangioblastomas
RB1	Inibidor do ciclo celular	Retinoblastoma e outros
APC	Inibidor de β -cateninas	Trato digestivo (estômago, intestino)
PR	Receptor de Progesterona	Mama
AR	Receptor de andrógeno	Próstata
ER	Receptor de estrógeno	Mama
DAPK	Envolvida na morte celular programada (MCP)	Linfoma, pulmão e colon
RAR β 2	Receptor de ácido retinóico 2	Colon, pulmão e cabeça e pescoço
THBS-1	Anti-angiogênico (inibe a formação de vasos)	Gliomas
HIC-1	Fator de Transcrição	Vários tipos
COX-2	Ciclooxigenase-2	Cólon e estômago
RIZ-1	Histona/Metiltransferase	Mama e fígado
p16	Inibidor de ciclinas	Vários tipos
MGMT	Reparo de DNA	Vários tipos

ANEXO 6**CURRICULUM VITAE**

Nome: Fabrício Falconi Costa

RG: M-8.599.209

CPF: 036281746-43

Endereço atual: Rua Pelotas, 470 apto 05 Vila Mariana
São Paulo/SP 04012-002

Data de Nascimento: 04/04/1977

Local de Nascimento: Belo Horizonte/MG

Filiação: Salvador César Costa e Ângela Márcia Falconi Costa

Tel.: 96738491

e-mail: ffalconi@ludwig.org.br

1996 - 2000

Graduado pela UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais) - Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado em Bioquímica e Imunologia.

Nº de matrícula na UFMG: 9521739

2000 - 2004

DOUTORADO DIRETO em Genética do Câncer (Oncologia/Ciências da Vida) pela Fundação Antônio Prudente (FAP152) no Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer em São Paulo/SP, sob a orientação da Dra. Anamaria Aranha Camargo e co-orientação do Dr. Andrew J.G. Simpson.

Título do projeto: "Identificação de regiões diferencialmente metiladas em câncer de mama através da técnica AP-PCR sensível à metilação (MSAP-PCR)."

Processo FAPESP número: 02/00622-7

De Agosto de 1995 até Agosto de 1997, participação no projeto "Leishmania: ASPECTOS DA INTERAÇÃO DESTE PARASITA COM OS SEUS HOSPEDEIROS" pelo Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG com o apoio da FAPEMIG, tendo como orientador o professor Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo e como co-orientadores a professora Dra. Maria Norma Mello e o professor Dr. Marcos dos Mares Guia;

De Outubro de 1997 até Junho de 1999, participação no projeto de pesquisa intitulado: "CLONAGEM DE GENES HUMANOS ENVOLVIDOS NO REPARO DE DNA POR COMPLEMENTAÇÃO FUNCIONAL HETERÓLOGA" no Laboratório de Genética-Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG sob orientação do professor Dr. Carlos Renato Machado e co - orientação do professor Dr. Sérgio D.J. Pena;

Em Julho de 1999, apresentação da MONOGRAFIA intitulada "CLONAGEM DE UM cDNA HUMANO CAPAZ DE COMPLEMENTAR DUAS BACTÉRIAS DEFICIENTES NO REPARO POR EXCISÃO DE BASES" para a obtenção do título de Bacharel em Bioquímica e Imunologia - orientada pelos professores Dr. Carlos Renato Machado e Dr. Sérgio D.J. Pena e desenvolvida no Laboratório de Genética-Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG.

V ENCONTRO DE PESQUISA DO ICB da UFMG, realizado no período de 14 a 18 de Outubro de 1996;

II ENCONTRO DE LEISHMANIOSES DO ICB/UFMG, realizado em 21 de Maio de 1997;

49º REUNIÃO ANUAL DA SBPC (SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA), de 13 a 18 de Julho de 1997;

VI SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFMG, de 09 a 13 de Junho de 1997;

X SEMANA DE ESTUDOS DE BIOLOGIA, de 02 a 07 de Junho de 1997;

XXVIIa REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, de 23 a 26 de Maio de 1998;

VII SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFMG, de 26 a 31 de Outubro de 1998;

Simpósio "HUMAN DNA REPAIR DISEASES: FROM GENOMIC INSTABILITY TO CANCER", realizado em São Paulo, SP, Brasil, de 12 a 14 de Novembro de 1998;

XXVIIIa REUNIÃO ANUAL DO SBBQ, realizada de 22 a 25 de Maio de 1999 em Caxambu com o seguinte trabalho : " Construction of a WWW Web site for the teaching of Biochemistry : showing how to fish.";

VIII SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFMG, de 13 a 18 de Setembro de 1999;

45º CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, em Gramado - RS, de 3 a 6 de Outubro de 1999;

IV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENÊSE E TERATOGENÊSE AMBIENTAL realizado de 05 a 08 de Dezembro de 1999 no Grande Hotel de Águas de São Pedro -SP;

46º CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA em Águas de Lindóia/ SP em 2000 ;

Participação do Curso: “Treinamento Básico de sequenciamento de DNA no ABI377” do dia 30 de Outubro ao dia 01 de Novembro de 2000 realizado no Instituto Ludwig pela *Applied Biosystems* do Brasil ;

“BRAZILIAN INTERNATIONAL GENOMIC CONFERENCE (B.I.G.)” em Angra dos Reis/RJ em Março de 2001 com apresentação de trabalho;

Participação no Curso: “Técnicas Analíticas para a Detecção de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) em alimentos” no período de 16 a 18 de julho de 2001 realizado na FIOCRUZ / RJ ;

Uma aula ministrada para os alunos do 5º ano de Medicina com o tema “Carcinogênese química e radiação” no dia 23 de Agosto de 2001, no Hospital do Câncer em São Paulo/SP;

II CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA em São Paulo /SP em Novembro de 2001 ;

Quatro aulas ministradas no Cursinho ETAPA VESTIBULARES em São Paulo, com o título “A Revolução no Campo da Biotecnologia - Projeto Genoma e suas aplicações” no final de 2001;

Participação no Curso “Uso Clínico dos testes genéticos”, realizado no Hospital Israelita Albert Einstein no dia 17 de Agosto de 2002 ;

Participação no “Simpósio Internacional de Novas Abordagens Clínicas e Moleculares voltadas para o Câncer” realizado no Hospital do Câncer A.C. Camargo em São Paulo/SP de 8 a 10 de Novembro de 2002 ;

Duas aulas ministradas no XXIV Congresso Brasileiro de Patologia realizado em Florianópolis intituladas :“O câncer como doença genética” e “O controle da expressão gênica” de 30 de Abril a 04 de Maio de 2003 ;

Uma aula ministrada na Reunião Científica do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da USP intitulada “Mecanismos da Carcinogênese: metilação e as neoplasias” no dia 05 de Maio de 2003 ;

Participação no 94TH AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH (AACR) com a apresentação do poster “Aberrant methylation and silencing of the ADAM23 gene in human cancers” realizado no *Washington Convention Center* em Washington D.C. (E.U.A) de 11 a 14 de Julho de 2003 ;

Participação no Simpósio “HOW CLOSE ARE WE FROM CANCER CURE?” realizado no Hotel Grand Hyatt em São Paulo de 21 a 23 de Agosto de 2003.

XVIII CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE MEDICINA com a apresentação do poster “Caracterização do gene ADAM23/MDC3 como um possível marcador tumoral : correlação entre o padrão de metilação de sua região promotora e o estadiamento de tumores de mama” realizado em Campos do Jordão de 12 a 13 de Setembro de 2003.

Participação no Simpósio “I SÃO PAULO RESEARCH CONFERENCE” realizado em São Paulo nos dias 14 e 15 de Novembro de 2003.

INGLÊS

Nível : Pós - avançado (YÁZIGI INTERNATIONAL)

“British certificate” FCE outorgado pela UNIVERSITY OF CAMBRIDGE, INGLATERRA.

PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS:

Camargo Anamaria A, **Costa Fabrício F.** Oncogenes e genes supressores de tumor. In: Brentani MM, Coelho FRG, Kowalski LP. **Bases da Oncologia.** São Paulo: Lemar; 2003. p.71-86.

Gontijo NF, Almeida S, **Costa FF**, Mares Guia ML, Williams P, Mello MN. *Lutzomia longipalpis*: pH in the gut, digestive glycosidases and some speculations upon *Leishmania* development. **Experimental Parasitol** 1998; 90:212-9.

Abrantes EF, Pires EG, Carvalho AF, **Costa FF**, Savino W, Reis LFL. Identification, structural characterization and tissue distribution of Tsg-5: a new TNF- stimulated gene. **Genes Immunity** 2003; 4:298-311.

Costa FF, Verbisck NV, Salim AC, Ierardi DF, Pires LC, Sasahara RM, Sogayar MC, Zanata SM, Mackay A, O'Hare M, Soares F, Simpson AJ, Camargo AA. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene** 2004; 23(7):1481-1488

Costa FF, Ribeiro KB, Rinck Jr JA, Soares FA, Brentani RR, Camargo AA. Detection of SATR1 satellite DNA hypomethylation in breast tumors. (*manuscript in preparation*).