

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES  
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS  
EM ASTROCITOMAS**

**ADRIANA BULGARELLI**

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

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Dr. André Luiz Vettore**

**Co-Orientadora: Dra. Otávia Luisa Silva Damas de  
Caballero**

**São Paulo  
2005**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

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

Bulgarelli, Adriana

**Identificação de genes diferencialmente expressos em astrocitomas /**  
Adriana Bulgarelli -- São Paulo, 2005.

74p.

Dissertação(mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: André Luiz Vettore

Descritores: 1. ASTROCITOMA/classificação. 2. PCR. 3. PERFIL DA  
EXPRESSÃO GÊNICA. 4. METILAÇÃO DE DNA. 5. GLIOBLASTOMA.

## **DEDICATÓRIA**

Gostaria de dedicar esta dissertação aos meus queridos pais, por todo amor e carinho, por confiarem e estarem sempre ao meu lado e por me ajudarem a conquistar mais essa importante vitória da minha vida!

Dedico também aos meus irmãos, pelo companheirismo, pela união e amizade, pelo apoio e compreensão, por estarem sempre torcendo por mim e por todo carinho!

Dedico ao meu namorado, por fazer a minha vida ganhar ainda mais cor, pelo apoio e compreensão, pelo carinho e principalmente por todo o amor compartilhado durante esses seis anos de namoro!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Dr. André Vettore pela confiança em mim e em meu trabalho, por todos os ensinamentos, por ser tão prestativo e paciente, pela dedicação e amizade.

Agradeço à minha co-orientadora Dra. Otávia Caballero por permitir que eu iniciasse minha carreira no Instituto Ludwig, por ter acreditado em mim, pela imensa contribuição neste trabalho e em todo meu aprendizado, por sua dedicação, pela amizade e carinho.

Agradeço aos meus grandes amigos Andrea Seixas, Andrea Trevisan, Fábio Piccoli, Letícia Olops e Roberta Felix, pelas divertidas “edições”, pelo carinho, pelo alegre convívio diário e por todas as risadas compartilhadas!

Agradeço a Andréa Seixas por toda a ajuda prestada no decorrer deste trabalho, por cuidar da cultura de células para mim nos finais de semana, pela grande amizade, pelo agradável convívio, pela consideração e apoio nos momentos difíceis e pelo carinho.

Agradeço a Dinamar Gaspar pela grande amizade e carinho.

Agradeço a todas as pessoas do laboratório: Daniel; Fabrício; Fernanda Góes; Luciane, Márcia, Mariana Brait; Maria Isabel; Mariana Maschietto; Danielle, Érica, Luiz Fernando e Valéria Paixão, pela convivência harmoniosa, pelos momentos de alegria e amizade.

Agradeço a Inês Nishimoto pela ajuda nos cálculos matemáticos incluídos nesse trabalho.

Agradeço a Luciana Wernersbach Pinto, pelas dicas e sugestões sobre os tumores astrocíticos.

Agradeço ao Dr. Andrew Simpson por ter me permitido fazer parte do Laboratório de Genética do Câncer.

Agradeço ao Dr. Ricardo Renzo Brentani, diretor do Instituto Ludwig e Presidente do Hospital do Câncer A.C. Camargo, pelas excelentes condições de trabalho.

Agradeço ao diretor da pós-graduação Dr. Luiz Fernando Lima Reis e às funcionárias Ana Maria Kuninari e Marcia Hiratani, por todo carinho, pela atenção e por sempre estarem dispostas a ajudar.

Agradeço a toda equipe da biblioteca (Suely Francisco, Maria Adriana M. Bassols, Francyne Pólen G. Lima e Rosinéia Aguiar Carneiro) pelo competente trabalho, pelo carinho e atenção, pela enorme ajuda, pela formatação da dissertação e pelas correções feitas na bibliografia.

Agradeço ao Dra. Sueli Marie pela importante colaboração na produção dos meus relatórios e pelas informações fornecidas sobre as amostras de pacientes.

Agradeço ao Dr. Marco Antônio Zago, coordenador do Projeto Genoma Clínico, pela importante colaboração no decorrer do meu trabalho.

Agradeço ao Dr. Wilson Araújo da Silva Junior pela colaboração no fornecimento das informações sobre as análises das bibliotecas de *SAGE* incluídas no estudo.

Agradeço aos membros da banca de qualificação desta dissertação: Dra. Anamaria Aranha Camargo, Dra. Helena Brentani e Dra Maria Bethânia Maria Betânia Mahler-Araújo pelo tempo atribuído à leitura dos relatórios e pelas proveitosas sugestões.

Agradeço a CAPES pela bolsa de estudos concedida, a FAPESP pelo apoio financeiro através do Projeto Genoma Clínico e ao Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer pelo apoio financeiro e pela oportunidade de desenvolver nosso projeto.

Agradeço a *Applied Biosystems* por todo suporte técnico, pelos valiosos treinamentos, pelas dicas e principalmente pelo uso do ABI7000 para a realização das reações de PCR em tempo real.

Agradeço a todos do Instituto Ludwig, pela ajuda, pelo convívio no dia-a-dia e pelas amizades conquistadas.

Agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço a Banca Julgadora da Dissertação pelo tempo atribuído à leitura desta dissertação.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Agradeço aos meus pais, José Eduardo e Ivani, pela pessoa que me tornei, por todos os ensinamentos de vida, por toda a dedicação e amor incondicionais. Agradeço a Deus por vocês serem meus pais, pois vocês são as pessoas mais importantes da minha vida, eu os admiro muito e tenho muito orgulho de ser sua filha! Obrigada por tudo!

Agradeço aos meus irmãos, Fernanda e Thiago, pelo amor e amizade, por todo apoio e carinho.

Agradeço ao meu grande amor, Ruy, por estar sempre ao meu lado me apoiando, por toda a sua dedicação, pela confiança, por todo o amor e companheirismo!

Agradeço aos pais do Ruy, Ruy e Antônia, por terem me acolhido em sua casa de maneira tão carinhosa em São Paulo, por me tratarem tão bem e me considerarem sua terceira “filha”.

Agradeço às irmãs do Ruy, Cristiane e Cristina, por todo o carinho, por serem sempre muito prestativas, pela amizade e por todos os momentos de reunião familiar tão felizes!

Agradeço a todos que deram sua pequena ou grande contribuição para que eu chegasse até aqui.

## RESUMO

Bulgarelli A. **Identificação de genes diferencialmente expressos em astrocitomas.** São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

O Projeto Genoma Clínico foi uma das extensões do Projeto Genoma do Câncer e teve como objetivo coletar amostras de 8 tipos tumorais (Osteossarcoma, Mieloma Múltiplo, Leucemia Linfóide Aguda da infância, Carcinoma epidermóide do esôfago, Adenocarcinoma do estômago, Adenocarcinoma de cólon e reto, Astrocitomas e Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço) e estocá-las em um Banco de Tumores. Os astrocitomas representam as neoplasias primárias mais comuns do Sistema Nervoso Central, e são histologicamente classificados como: astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III) e glioblastoma (grau IV). O diagnóstico molecular pode se tornar uma ferramenta importante para auxiliar a classificação dos gliomas, pois, devido à heterogeneidade do tumor, o material analisado pelo patologista muitas vezes não é representativo, dificultando o diagnóstico e classificação. Sendo assim, um dos objetivos do Projeto Genoma Clínico foi a identificação de genes diferencialmente expressos em astrocitomas que pudessem ser úteis como possíveis marcadores diagnósticos e como prováveis fatores preditivos de prognóstico. Por esses motivos, o presente trabalho, (o qual é um subprojeto do Projeto Piloto Genoma Clínico) teve a finalidade de identificar genes diferencialmente expressos em astrocitomas através da análise de bibliotecas de *SAGE* provenientes de glioblastomas e tecido cerebral não-neoplásico e validar esta expressão diferencial em amostras de astrocitomas através de PCR em tempo real. A análise de *SAGE* permitiu a identificação de 242 genes diferencialmente expressos. Treze destes genes foram selecionados para terem sua expressão diferencial avaliada por meio de PCR em tempo real em amostras de pacientes, sendo que, quatro deles (*CHI3L1*, *NRGN*, *OLFM1* e *TPM2*) foram avaliados no Laboratório de Genética do Câncer – ILPC. O gene *CHI3L1* apresentou um aumento de expressão em 59% (17/29) das amostras de astrocitomas, enquanto que, os genes *NRGN* e *OLFM1* apresentaram uma diminuição da expressão em 90% (26/29) e 59%

(17/29) das amostras estudadas, respectivamente, em relação a um *pool* de amostras normais. Também foi demonstrado que o nível de expressão do gene *NRGN* em tecido pulmonar normal é de cerca de 25% daquele apresentado no cérebro normal, enquanto que, em outros tecidos normais (mama, bexiga e cólon) o nível de expressão deste gene foi cerca de 7% do nível apresentado no cérebro normal. Em linhagens celulares tumorais de cólon, este gene apresentou um nível de expressão similar ao observado no tecido normal de cólon e nas demais linhagens celulares avaliadas houve sempre uma redução do nível de expressão deste gene em relação aos tecidos normais correspondentes. O gene *OLFMI* mostrou, em todos os tecidos normais avaliados (pulmão, mama, bexiga e cólon) um nível de expressão inferior a 5% daquele observado em cérebro normal. O nível de expressão deste gene nas linhagens celulares tumorais avaliadas foi sempre menor do que nos tecidos normais correspondentes. Foram identificadas ilhas de CpG nas regiões promotoras de ambos os genes e o tratamento de três linhagens celulares tumorais (A172, T98G e H1299) com 5-Aza-dC, um conhecido agente desmetilante, foi capaz de promover um aumento de 1,8 a 15,9 vezes no nível de expressão destes genes. Entretanto, não foi possível estabelecer uma correlação entre a diminuição no nível de expressão dos genes *NRGN* e *OLFMI* e a hipermetilação de suas regiões promotoras, pois a maioria dos dinucleotídeos CpGs situados no promotor destes genes não se encontra metilada.

## SUMMARY

Bulgarelli A. [**Identification of differentially expressed genes in astrocytomas**]. São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

The Clinical Genomics Project, one of the Cancer Genomics Project extensions, had the purpose of collecting samples of eight tumor types (Osteosarcoma, Multiple Myeloma, Acute Lymphoid Leukemia of childhood, Epidermoid Carcinoma of the Esophagus, Stomach Adenocarcinoma, Colorectal Adenocarcinoma, Astrocytomas and Head and Neck Epidermoid Carcinoma) and stock them in a tumor bank. Astrocytomas are the most frequent primary neoplasms of Central Nervous System and they are classified as: pilocytic astrocytomas (grade I), diffuse astrocytomas (grade II), anaplastic astrocytomas (grade III) and glioblastomas (grade IV). The molecular diagnostic could be an important tool to glioma classification because frequently the sample analysed by the pathologist is not tumour representative, bringing difficulties for the diagnosis and classification. For this reason, one of the aims of the Clinical Genomics Pilot Project was the identification and evaluation of molecular markers for diagnostic, predictive or prognostic value and also therapeutic targets in astrocytomas. For these reasons, this work, which is a subproject of Clinical Genomics Pilot Project, had the purpose of identifying differentially expressed genes through the analysis of glioblastomas and normal brain SAGE libraries and validate them in tumor samples. The SAGE analysis allowed the identification of 242 differentially expressed genes. Thirteen genes were selected to have the differential expression confirmed by Real Time PCR in patient samples. Four of these thirteen genes (*CHI3L1*, *NRGN*, *OLFM1* e *TPM2*) were validated in the Laboratory of Cancer Genetics – ILPC. *CHI3L1* showed a significant overexpression in 59% (17/29) of astrocytoma samples tested. *NRGN* and *OLFM1* were found to be underexpressed in 90% (26/29) and 59% (17/29) of the samples analyzed, respectively. The next step was to investigate if *NRGN* and *OLFM1* were also under expressed in non-neoplasm tissue of lung, breast, bladder, colon and brain and in different tumor cell lines. The expression level of *NRGN* gene in normal lung tissue

was about 25% of the expression in normal brain tissue and in the other normal tissues analyzed (breast, bladder and colon) the expression level observed was around 7% of that one determined in normal brain tissue. The *NRGN* gene showed a similar expression level in tumour colon cell lines and in normal colon tissue. However, this gene showed a reduction in the expression levels in the other cell lines evaluated when compared to corresponding normal tissues. The *OLFMI* gene showed an underexpression (below 5%) in all normal tissues analyzed in comparison to normal brain tissue. The expression level of this gene in the tumour cell lines evaluated was always lower than the expression level in the corresponding normal tissues. CpGs islands were identified in the promoter regions of *NRGN* and *OLFMI* genes and three tumour cell lines (A172, T98G and H1299) were submitted to 5-Aza-dC treatment. An induction of expression (1.8 to 15.9 folds) was detected for both genes in all the cell lines analyzed. Nevertheless, the association between the under expression of *NRGN* e *OLFMI* and CpG island hipermethylation in their promoter region could not be established because the CpGs dinucleotides evaluated in these gene promoters were unmethylated.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Amplificação do fragmento de 543pb do gene <i>NRGN</i>	36
<b>Figura 2</b>	Padronização da reação de PCR para o gene <i>NRGN</i>	37
<b>Figura 3</b>	Curva de desnaturação para análise de especificidade da reação de PCR em tempo real do gene <i>NRGN</i>	37
<b>Figura 4</b>	Padronização da reação de PCR para o gene <i>TPM2</i>	38
<b>Figura 5</b>	Quantificação relativa através de PCR em tempo real dos níveis de expressão dos genes <i>NRGN</i> e <i>OLFM1</i> em diferentes tecidos normais	44
<b>Figura 6</b>	Quantificação relativa através de PCR em tempo real dos níveis de expressão do gene <i>NRGN</i> em diferentes linhagens tumorais	46
<b>Figura 7</b>	Quantificação relativa através de PCR em tempo real dos níveis de expressão do gene <i>OLFM1</i> em diferentes linhagens tumorais	47
<b>Figura 8</b>	Ilhas de CpG presentes nas regiões promotora dos genes <i>NRGN</i> e <i>OLFM1</i>	49
<b>Figura 9</b>	Quantificação dos níveis de expressão do gene <i>NRGN</i> por PCR em tempo real após tratamento das linhagens celulares com 5-Aza-dC	52
<b>Figura 10</b>	Quantificação dos níveis de expressão do gene <i>OLFM1</i> por PCR em tempo real após tratamento das linhagens celulares com 5-Aza-dC	53
<b>Figura 11</b>	<i>Status</i> de Metilação das ilhas de CpGs localizadas nas regiões promotoras dos genes <i>NRGN</i> e <i>OLFM1</i>	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Características gerais dos pacientes incluídos no estudo.	19
<b>Tabela 2</b>	Lista dos genes com expressão diferencial em glioblastomas selecionados a partir das análises das bibliotecas de <i>SAGE</i> de tecido cerebral normal e glioblastoma.	31
<b>Tabela 3</b>	Genes com expressão diferencial entre tecido cerebral normal e glioblastoma selecionados para validação por PCR em tempo real no Laboratório de Genética do Câncer – ILPC.	32
<b>Tabela 4</b>	Porcentagem das amostras de astrocitomas analisadas por PCR em tempo real que apresentaram hiper-expressão do gene <i>CHI3L1</i>	41
<b>Tabela 5</b>	Porcentagem das amostras de astrocitomas analisadas por PCR em tempo real que apresentaram hipo-expressão dos genes <i>NRGN</i> e <i>OLFMI</i> .	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b><i>APOE</i></b>	<i>apolipoprotein E</i>
<b><i>ATCC</i></b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>5-Aza-dC</b>	5-aza-deoxicitidina
<b><i>CD14</i></b>	<i>CD14 antigen</i>
<b><i>CDK4</i></b>	<i>cyclin-dependent kinase 4</i>
<b><i>CDKN2A/p16/p14<sup>ARF</sup></i></b>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
<b><i>CDKN2D/p19</i></b>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2D</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b><i>CGAP</i></b>	<i>cancer genome anatomy project</i>
<b>CH<sub>3</sub></b>	radical metil
<b><i>CHI3L1</i></b>	<i>chitinase 3 like 1</i>
<b><i>ChIP</i></b>	<i>chromatin immunoprecipitation</i>
<b><i>CLU</i></b>	<i>clusterin</i>
<b>CsCl</b>	Cloreto de Césio
<b><i>Ct</i></b>	<i>threshold cycle</i>
<b><i>DAPK</i></b>	<i>death-associated protein kinase 1</i>
<b>DEPC</b>	di-etil pirocarbonato
<b>DMSO</b>	dimetil sulfóxido
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>DNMTs</b>	<i>DNA methyltransferases</i>
<b>dNTPs</b>	deoxinucleotídeos fosfato
<b><i>EGFR</i></b>	<i>epidermal growth factor receptor</i>
<b><i>EGR1</i></b>	<i>early growth response 1</i>
<b><i>EMBL-EBI</i></b>	<i>European Bioinformatics Institute</i>
<b><i>EST</i></b>	<i>expressed sequence tags</i>
<b>FAPESP</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
<b><i>GAPDH</i></b>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
<b><i>GAS6</i></b>	<i>growth arrest-specific 6</i>
<b><i>GSTP1</i></b>	<i>glutathione S-transferase pi</i>

<b>H3-K4</b>	resíduo de lisina 4 da histona H3
<b>H3-K9</b>	resíduo de lisina 9 da histona H3
<b><i>HCgp-39</i></b>	<i>human cartilage glycoprotein-39</i>
<b>HDACs</b>	histonas desacetilases
<b><i>hMLH1</i></b>	<i>humam Mut-L Homologue 1</i>
<b>Ilha CpG</b>	regiões de 0.5 a 4 kb, ricas em dinucleotídeos CG
<b>ILPC</b>	Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer
<b>KLK</b>	família das kalicreínas
<b><i>LGALS3</i></b>	<i>lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3)</i>
<b>LMA</b>	leucemia mielóide aguda
<b>M</b>	molar
<b><i>MAPKIP1</i></b>	<i>mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1</i>
<b>MBPs</b>	<i>methylcytosine binding proteins</i>
<b><i>MDM2</i></b>	<i>mouse double minute 2 homolog</i>
<b><i>MDS</i></b>	<i>myelodysplastic syndrome</i>
<b>MeCP2</b>	<i>methyl-CpG-binding protein MeCP2</i>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b><i>MGMT</i></b>	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
<b>µg</b>	micrograma
<b>µL</b>	microlitro
<b>µM</b>	micromolar
<b>mL</b>	mililitro
<b>mM</b>	milimolar
<b><i>MPO</i></b>	<i>myeloperoxidase</i>
<b><i>MYO18B</i></b>	<i>myosin XVIIIIB</i>
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sódio
<b><i>NCBI</i></b>	<i>National Center For Biotechnology Information</i>
<b><i>NCI</i></b>	<i>National Cancer Institute</i>
<b><i>NOTCH2</i></b>	<i>Homo sapiens Notch homolog 2</i>
<b><i>NRGN</i></b>	<i>neurogranin</i>
<b><i>OLFM1</i></b>	<i>olfactomedin 1</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde

<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da Polimerase
<b><i>PDGFR<math>\alpha</math></i></b>	<i>platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide</i>
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b><i>PTEN</i></b>	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
<b><i>PTPN22</i></b>	<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22</i>
<b><i>Rb1</i></b>	<i>retinoblastoma 1</i>
<b>RNA</b>	ácido ribonucléico
<b><i>RPGR</i></b>	<i>retinitis pigmentosa GTPase regulator</i>
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b><i>RT-PCR</i></b>	<i>reverse transcriptase PCR</i>
<b><i>SAGE</i></b>	<i>serial analysis of gene expression</i>
<b><i>SAGTags</i></b>	seqüência de DNA com 10 pb que representa um transcrito
<b><i>SEC61G</i></b>	<i>Sec61 gamma subunit</i>
<b>Sin3A</b>	co-repressor transcricional Sin3A
<b><i>SLIT2</i></b>	<i>slit homolog 2</i>
<b>SNC</b>	sistema nervoso central
<b><i>SPP1</i></b>	<i>secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)</i>
<b><i>TGFBI</i></b>	<i>transforming growth factor, beta-induced</i>
<b><i>THBS1</i></b>	<i>thrombospondin 1</i>
<b><i>TIG1</i></b>	<i>Tazarotene-induced gene 1</i>
<b><i>TIMP3</i></b>	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase 3</i>
<b><i>Tm</i></b>	<i>melting temperature</i>
<b><i>TMS1</i></b>	<i>target of methylation-induced silencing</i>
<b><i>TP53</i></b>	<i>tumor protein p53</i>
<b><i>TP73</i></b>	<i>tumor protein p73</i>
<b><i>TPM2</i></b>	<i>tropomyosin 2 beta</i>
<b><i>TSA</i></b>	<i>tricostatin A</i>
<b>U</b>	unidades
<b><i>UCSC</i></b>	<i>University of California Santa Cruz</i>

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	O Projeto Genoma Clínico	1
1.2	Os Gliomas	2
1.2.1	Os Astrocitomas	2
1.3	Biologia Molecular dos tumores astrocíticos	7
1.4	Análise da expressão gênica	9
1.5	Hipermetilação do DNA	11
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>16</b>
3.1	Bibliotecas de <i>SAGE</i>	16
3.2	Crítérios de bioinformática utilizados para seleção dos genes candidatos	17
3.3	Amostras de tecidos	18
3.4	Linhagens celulares	20
3.5	Extração de RNA e Síntese de cDNA	21
3.6	Desenho dos <i>primers</i>	23
3.7	Padronização das reações de PCR	24
3.8	Reações de PCR em Tempo Real	24
3.9	Tratamento de linhagens celulares com 5-Aza-deoxicitidina (5-Aza-dC)	25
3.10	Extração de DNA e Tratamento com Bissulfito de Sódio	26
3.11	Reação de PCR p/ amplificação dos promotores gênicos <i>NRGN</i> e <i>OLFM1</i>	27
3.12	Clonagem e seqüenciamento	29
3.13	Aspectos éticos	29
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>30</b>
4.1	Seleção dos genes candidatos	30
4.2	Descrição dos genes estudados	32

4.3	Padronização das reações de PCR	35
4.4	Quantificação do nível de expressão dos genes selecionados em amostras de pacientes	38
4.5	Quantificação dos níveis de expressão dos genes <i>NRGN</i> e <i>OLFM1</i> em tecidos normais e linhagens tumorais	42
4.6	Identificação das ilhas de CpG	48
4.7	Tratamento de linhagens celulares com 5-Aza-deoxicitidina	50
4.8	Amplificação, Clonagem e Seqüenciamento das Ilhas de CpG	54
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>71</b>

## **ANEXOS**

- Anexo 1** Documento de aprovação do presente estudo pela Comissão de Ética em Pesquisa do Câncer do Hospital do Câncer A.C. Camargo - Fundação Antônio Prudente
- Anexo 2** Manuscrito submetido à publicação na revista **Cancer Research** com o título: *New candidate markers of malignancy in astrocytic gliomas identified by SAGE database mining and DNA microarrays*, 2005. Marie SKN, Shinjo SMO, Okamoto OK et al.
- Anexo 3** Tabelas ilustrando a quantificação do nível de expressão dos genes *CHI3LI*, *NRGN* e *OLFM1* em cada amostra analisada.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O PROJETO GENOMA CLÍNICO

O Projeto Genoma Clínico foi uma das extensões do Projeto Genoma do Câncer, patrocinado pela FAPESP e pelo Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer. Esse Projeto teve como objetivo coletar amostras de 8 tipos tumorais (Osteossarcoma, Mieloma Múltiplo, Leucemia Linfóide Aguda da infância, Carcinoma epidermóide do esôfago, Adenocarcinoma do estômago, Adenocarcinoma de cólon e reto, Astrocitomas e Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço) e estocá-las em Banco de Tumores. Dezenove grupos clínicos, formados por cirurgiões, patologistas e epidemiologistas e 5 grupos de biologia molecular participaram deste projeto.

Um segundo objetivo deste projeto foi a análise molecular destes tumores com a finalidade de identificar genes que fossem relevantes para o diagnóstico e prognóstico do câncer. Para verificar a viabilidade deste projeto, um estudo piloto foi realizado visando a identificação de genes diferencialmente expressos em astrocitomas (em relação a tecido cerebral normal) através da análise de dados de *SAGE* e *microarray* e posterior confirmação desta expressão diferencial por PCR em tempo real em amostras de tecido normal e tumoral de pacientes acometidos pela doença.

## **1.2 OS GLIOMAS**

Os tumores primários do Sistema Nervoso Central mais freqüentes são os gliomas (UHLMANN et al. 2003). A incidência anual dos gliomas é de 5 a 10/100.000 na população em geral (BEHIN et al. 2003). De acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), os três tipos principais de gliomas são os astrocitomas, oligodendrogliomas e gliomas mistos.

### **1.2.1 Os Astrocitomas**

Os astrocitomas são tumores derivados de células da glia, denominadas astrócitos, os quais têm a função de sustentar e nutrir os neurônios.

Os gliomas astrocíticos representam as neoplasias primárias mais comuns do Sistema Nervoso Central (65 a 70% de todos os gliomas) e são histologicamente classificados como: astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III) e glioblastoma (grau IV) (GONZALEZ-GOMEZ et al. 2003b; COLLINS 2002; KLEIHUES e CAVENEE 2000).

Os Astrocitomas pilocíticos (grau I) são os gliomas mais comuns em crianças, representando 10% dos astrocitomas cerebrais e 85% dos astrocitomas cerebelares (GONZALEZ-GOMEZ et al. 2003a; KLEIHUES e CAVENEE 2000). Também são encontrados no nervo óptico, quiasma óptico, hipotálamo, tálamo, ganglios da base e tronco cerebral (REIFENBERGER e COLLINS 2004). Macroscopicamente, os astrocitomas pilocíticos freqüentemente se apresentam como lesões císticas, geralmente bem circunscritas e de crescimento lento

(REIFENBERGER e COLLINS 2004). Histologicamente, esses tumores são caracterizados por baixa celularidade, raras mitoses, núcleos hipercromáticos ocasionais, proliferação microvascular e infiltração das meninges, sem sinal de malignidade (KLEIHUES e CAVENEE 2000). Uma característica importante para o diagnóstico é a presença de uma arquitetura bifásica, consistindo de áreas compactas com células tumorais bipolares (pilóides) que apresentam fibras de Rosenthal e áreas microcísticas com células tumorais multipolares que apresentam corpos granulares eosinofílicos (KLEIHUES e CAVENEE 2000). O prognóstico dos astrocitomas pilocíticos geralmente é bom, sendo que os pacientes são curados por meio da ressecção total do tumor (REIFENBERGER e COLLINS 2004).

Os astrocitomas difusos (grau II) representam 15% de todos os tumores astrocíticos, com uma incidência média anual de menos de 1/100.000, na população em geral (KLEIHUES e CAVENEE 2000; WALKER e KAYE 2003). O pico de incidência desse tumor astrocítico é em adultos jovens entre idades de 30 a 40 anos (25% de todos os casos). As principais áreas cerebrais acometidas por este tipo tumoral são os lobos frontal e temporal (um terço dos casos) (KLEIHUES e CAVENEE 2000). Macroscopicamente, os astrocitomas difusos mostram limites anatômicos mal definidos por causa de sua natureza infiltrativa. Geralmente não há destruição das estruturas vizinhas invadidas e sim uma distorção delas. Lesões maciças podem estar presentes tanto na substância cinzenta quanto na substância branca, mas são indistinguíveis e podem se transformar em cistos. (KLEIHUES e CAVENEE 2000; WALKER e KAYE 2003). Histologicamente, o astrocitoma difuso pode ser fibrilar (tipo de astrocitoma difuso mais comum), gemistocítico ou protoplásmico, sendo o primeiro composto por astrócitos fibrilares neoplásicos

(produzem muitos filamentos gliais), o segundo composto por astrócitos gemistocíticos neoplásicos e o terceiro é uma variante rara que produz poucos filamentos gliais. Uma característica típica dessa neoplasia é a celularidade moderadamente aumentada e atipia nuclear pouco freqüente. Não há presença de necrose e proliferação microvascular, contudo raras mitoses podem ser compatíveis com diagnóstico de astrocitoma difuso (KLEIHUES e CAVENEE 2000). A média de sobrevida dos pacientes portadores desse tipo tumoral é de cinco anos após o diagnóstico e um importante fator responsável por esse mau prognóstico é o crescimento infiltrativo e difuso do tumor, o qual não permite a sua total ressecção. Além disso, muitos astrocitomas difusos progridem para astrocitoma anaplásico e/ou glioblastoma secundário dentro de 4-5 anos após o diagnóstico (REIFENBERGER e COLLINS 2004).

Os astrocitomas anaplásicos (grau III) são definidos como astrocitomas difusamente infiltrativos com anaplasia focal ou difusa, com um potencial de proliferação marcante. Esses tumores atingem pessoas na idade média de 41 anos, sendo mais freqüentes em homens (1,8:1). Quanto a localização, os astrocitomas anaplásicos são encontrados preferencialmente nos hemisférios cerebrais (KLEIHUES e CAVENEE 2000). Histologicamente, esses tumores são caracterizados por celularidade aumentada, atipias nucleares e alta atividade mitótica (REIFENBERGER e COLLINS 2004). A sobrevida média do paciente é 2-3 anos, sendo que esse valor aumenta para mais de 7 anos quando existe a presença de componentes oligodendrogliais nos tumores (KLEIHUES e CAVENEE 2000).

Os glioblastomas (grau IV) são os tumores astrocíticos de maior grau de malignidade, compostos por astrócitos neoplásicos muito pouco diferenciados. São os

tumores cerebrais mais freqüentes, representando 50 a 60% de todos os tumores astrocíticos e cerca de 12 a 15% de todas as neoplasias intracraniais. A incidência anual dessa neoplasia é de 2 a 3 casos novos por 100.000 (KLEIHUES e CAVENEE, 2000). Preferencialmente, esses tumores afetam homens adultos (1,5:1), com maior incidência entre 45 e 70 anos (KLEIHUES e CAVENEE 2000). De acordo com a OMS, os glioblastomas possuem duas variantes denominadas glioblastoma de células gigantes e gliosarcoma. A primeira variante é caracterizada por células gigantes multinucleadas e pleomórficas e está associada a um melhor prognóstico por causa de seu crescimento relativamente bem circunscrito. A segunda variante é caracterizada por um padrão tecidual bifásico, com áreas de características fenotípicas de gliomas e sarcomas. As duas são variantes raras, sendo que glioblastoma de células gigantes corresponde a menos de 1% dos tumores cerebrais e gliosarcoma, menos de 2% dos glioblastomas (REIFENBERGER e COLLINS 2004).

Glioblastomas podem se desenvolver a partir da progressão dos astrocitomas difusos ou astrocitomas anaplásicos (glioblastomas secundários) ou, mais freqüentemente, se desenvolvem rapidamente “de novo”, sem evidências de preexistência de uma lesão de menor malignidade (glioblastomas primários). Morfologicamente, glioblastomas primários e secundários não são distinguíveis. Porém clinicamente, glioblastomas secundários tendem a se desenvolver em pessoas mais jovens (antes dos 45 anos) enquanto que os primários geralmente surgem em pessoas mais velhas (média dos 55 anos) (KLEIHUES e CAVENEE 2000). Quanto a localização, os glioblastomas se situam freqüentemente na substância branca subcortical dos hemisférios cerebrais. Histologicamente, glioblastomas são tumores altamente anaplásicos, apresentando alta celularidade, atipia nuclear marcante e

intensa atividade mitótica. Proliferação microvascular e necrose são características essenciais para o diagnóstico (KLEIHUES e CAVENEE 2000; REIFENBERGER e COLLINS 2004). A sobrevida em um ano após o diagnóstico é de apenas 20% (BEHIN et al. 2003). Apesar dos tratamentos agressivos com radioterapia e quimioterapia, o prognóstico é extremamente desfavorável, com sobrevida em 3 anos de menos de 1,8% (KLEIHUES e CAVENEE 2000). O objetivo dos tratamentos atuais é melhorar os déficits neurológicos e a sobrevida, mantendo a melhor qualidade de vida possível (BEHIN et al. 2003). Geralmente, pacientes mais jovens portadores de glioblastoma (menos que 45 anos) possuem um melhor prognóstico que os pacientes mais velhos (KLEIHUES e CAVENEE 2000).

O diagnóstico dos astrocitomas é dado pelo exame anátomo patológico, o qual é baseado primariamente em características morfológicas. Além disso, para conclusão do diagnóstico, também são utilizados os exames de neuroimagem (ressonância magnética e tomografia computadorizada). Apesar disso, as amostras analisadas podem não ser necessariamente representativas por causa da heterogeneidade do tumor, dificultando o diagnóstico e classificação. O diagnóstico molecular pode se tornar uma ferramenta importante para auxiliar a histopatologia no que diz respeito à classificação dos gliomas. Além disso, os dados moleculares também poderão ser de extrema importância para que, no futuro, seja possível prever com maior confiabilidade o prognóstico da doença.

### 1.3 BIOLOGIA MOLECULAR DOS TUMORES ASTROCÍTICOS

Assim como ocorre com outros tumores, a transformação maligna das células neuroepiteliais é um processo de múltiplos passos que envolve aquisições sequenciais de várias alterações genéticas. Os glioblastomas contêm o maior número de anormalidades genéticas dentre os gliomas astrocíticos e o esclarecimento dos perfis dessas anormalidades estão emergindo (COLLINS 2002). Os genes supressores de tumor e os oncogenes identificados até o momento com expressão alterada nos gliomas não são específicos a este tecido, porém suas combinações e acumulações são características (BEHIN et al. 2003).

A anormalidade cromossomal mais comum nos astrocitomas difusos (grau II) é a trissomia/polissomia do 7. Cerca de 60% dos casos de astrocitomas difusos apresentam mutações no gene supressor de tumor *TP53* (*tumor protein p53*) e em muitos casos, essas mutações são acompanhadas por perda de heterozigose da porção 17p, resultando na ausência completa do gene *TP53* selvagem (REIFENBERGER e COLLINS 2004). Os astrocitomas difusos que não apresentam mutações no gene *TP53* podem possuir um mecanismo alternativo de alteração da via de controle de crescimento dependente de p53, como por exemplo, hipermetilação do promotor do gene *p14<sup>ARF</sup>* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) localizado na posição 9p21 (REIFENBERGER e COLLINS 2004). Frequentemente, os astrocitomas difusos também apresentam expressão elevada do gene *PDGFR $\alpha$*  (*platelet-derived growth factor receptor alpha*), sendo observada preferencialmente em tumores com perda de heterozigose do cromossomo 17p (REIFENBERGER e COLLINS 2004).

Os astrocitomas anaplásicos (grau III) constituem um estágio intermediário de progressão para glioblastoma. Esses tumores apresentam alta frequência de mutação no gene *TP53* semelhante aos astrocitomas difusos (KLEIHUES e CAVENEE 2000). Perda de heterozigose do cromossomo 19q e mutações no gene *Rb1* (*retinoblastoma 1*) são observada em aproximadamente 40% dos casos de astrocitomas anaplásicos (KLEIHUES e CAVENEE 2000; KITANGE et al. 2003). Amplificação do gene *CDK4* (*cyclin-dependent kinase 4*) ocorrem em aproximadamente 10% dos astrocitomas anaplásicos, sendo que essa alteração ocorre preferencialmente em tumores sem deleção ou mutação do gene *p16* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) (KLEIHUES e CAVENEE 2000; REIFENBERGER e COLLINS 2004). Outras alterações são observadas em menos de 10% dos casos de astrocitomas anaplásicos, como a amplificação do gene *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) e mutações no gene supressor de tumor *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*). Quando presente, a mutação no gene *PTEN* indica pior prognóstico (KLEIHUES e CAVENEE 2000; REIFENBERGER e COLLINS 2004).

Análises moleculares têm demonstrado que os padrões de alterações genéticas são diferentes entre glioblastomas primários e secundários. Glioblastomas primários frequentemente apresentam amplificação (40% dos casos) e hiperexpressão (>50% dos casos) do gene *EGFR*, enquanto que mutações no gene *TP53* são raras. Também são encontradas mutações no gene *PTEN* em 45% dos casos de glioblastomas primários (KITANGE et al. 2003). Outras alterações encontradas nos glioblastomas primários são as deleções dos genes *p16* e *p14<sup>ARF</sup>*, amplificação de *CDK4* e *MDM2* (*mouse double minute 2 homolog*), mutação e deleção de *Rb1* e monossomia do cromossomo 10 (REIFENBERGER e COLLINS 2004).

Os glioblastomas secundários apresentam uma alta incidência de mutações no gene *TP53* (> 65% dos casos). Outras alterações genéticas presentes nesse tipo tumoral é a perda de alelos do cromossomo 19q (54% dos casos) e hiper-expressão do gene *PDGFR $\alpha$*  (16%) (REIFENBERGER e COLLINS 2004; KLEIHUES e CAVENEE 2000). Geralmente, a perda de heterozigose do cromossomo 10q está mais restrita aos glioblastomas secundários, enquanto que os glioblastomas primários apresentam perda total do cromossomo 10 (KLEIHUES e CAVENEE 2000). A hipermetilação do promotor do gene *Rbl* também é um evento associado mais aos glioblastomas secundários. Nakamura e colaboradores (2001) demonstraram haver hipermetilação do promotor do gene *Rbl* em 9 dos 21 glioblastomas secundários estudados (43%) e somente em 5 dos 35 glioblastomas primários avaliados (14%).

#### **1.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA**

A classificação molecular dos tumores pela análise dos perfis de expressão gênica é uma nova maneira de investigação e diagnóstico possível em virtude dos recentes avanços tecnológicos e científicos. Em 2001 foi disponibilizado o conjunto de informações referentes às seqüências dos cromossomos humanos (LANDER et al. 2001; VENTER et al. 2001). Devido a este grande volume de informações disponível, novas tecnologias como *microarrays* de cDNA (SCHENA et al. 1998) e *SAGE* (*serial analysis of gene expression*) (VELCULESCU et al. 1995) puderam se desenvolver e têm permitido a análise da expressão de milhares de genes em um único experimento, possibilitando a identificação de importantes genes relacionados a tumorigênese.

A técnica de *cDNA Microarray* consiste da análise de um grande número de fragmentos de DNA representando genes que são fixados a uma plataforma, geralmente lâmina de vidro ou membranas de nylon, e são hibridizados com cDNAs de fita simples representantes de diferentes populações de células. Após a hibridização, um *scanner* obtém a intensidade do *spots*, e assim, os dados são analisados com o auxílio de um *software* especial que permite a identificação de genes com níveis de expressão diferentes (SCHENA et al., 1995).

A técnica de *SAGE* permite a análise simultânea e quantitativa de um grande número de transcritos, ou seja, a técnica mostra não somente quais genes estão ativos no tecido, mas também o nível de expressão destes genes (VELCULESCU et al. 1995). *SAGE* é uma técnica bastante utilizada pelo *CGAP* (*Cancer Genome Anatomy Project*), o qual é um programa interdisciplinar estabelecido e administrado pelo *NCI* (*National Cancer Institute*) que tem a finalidade de desenvolver ferramentas tecnológicas e obter informações necessárias para o entendimento da base molecular do câncer. Um banco de dados de *SAGEtags* e várias ferramentas *on-line* foram criadas e oferecidas à comunidade científica (YE et al. 2002). Atualmente, o *CGAP* possui o maior banco de dados públicos de *SAGE*, onde se encontram depositados os dados gerados a partir da análise de 284 bibliotecas de *SAGE*, dentre as quais, existem 87 bibliotecas construídas a partir de tecido cerebral, sendo que, 10 são de tecido normal e 16 são de glioblastoma.

A validação dos dados relativos às diferenças de expressão encontradas por estes ensaios deve ser realizada por um método complementar, como, por exemplo, *Northern-Blot* ou *RT-PCR* (*Reverse Transcriptase-PCR*). Entretanto, estes métodos são lentos e trabalhosos, além de requisitar, no caso do *Northern-blot*, grandes

quantidades de RNA (>5 µg). Por isso, a PCR em tempo real surge como um método alternativo bastante adequado a este tipo de análise. Este método se baseia na avaliação do acúmulo do produto na fase logarítmica da reação de amplificação, o qual está diretamente relacionado à quantidade de molde existente no início da reação. A observação contínua da fluorescência emitida pelo DNA amplificado permite uma quantificação rápida e precisa do número de cópias de um transcrito específico presente numa dada amostra de RNA (MORRISON et al. 1998). O uso da técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico molecular é atraente, pois ela é objetiva, rápida, versátil e pode ser usada com pequenas quantidades de tecido (BERNARD e WITTWER 2002).

## 1.5 HIPERMETILAÇÃO DO DNA

A metilação é um mecanismo importante para o desenvolvimento dos mamíferos e está relacionada à regulação da expressão gênica (JONES e TAKAI 2001). Este mecanismo é considerado um evento epigenético, pois promove uma alteração no fenótipo (expressão gênica) sem que haja modificação na sequência de nucleotídeos do DNA.

Por exemplo, nos seres humanos este fenômeno está associado à inativação de um dos cromossomos X nas mulheres e ao silenciamento de determinados alelos autossômicos herdados dos pais (*imprinting* genômico) (HERMAN e BAYLIN 2000). Neste processo, um radical metil (CH<sub>3</sub>) é adicionado a uma citosina sempre situada a 5' de uma guanina em um dinucleotídeo CpG através da ação de enzimas especializadas denominadas DNA metil-transferases (DNMTs) (JONES e BAYLIN

2002). Esse evento ocorre principalmente nas chamadas ilhas de CpGs (regiões de 0.5 a 4 kb, ricas em dinucleotídeos CG) localizadas na região promotora de genes.

Existem três hipóteses para explicar como a adição desses radicais metil nas citosinas, localizadas nas regiões promotoras, pode inibir a transcrição gênica: (1) a presença desses radicais metil nas ilhas de CpG impediria, diretamente, a ligação da maquinaria de transcrição, e, conseqüentemente, bloquearia a transcrição gênica. (2) Proteínas chamadas MBPs (*methylcytosine binding proteins*) reconheceriam e se ligariam as CpGs metiladas impedindo que fatores de transcrição se ligassem aos seus sítios específicos nos promotores. (3) A metilação poderia contribuir para estabilização da compactação da estrutura da cromatina, desta forma os sítios reconhecidos pelos fatores de transcrição estariam indisponíveis e a transcrição gênica seria reprimida (ATTWOOD et al. 2002). Na verdade, acredita-se que as três hipóteses possam ser verdadeiras. (HERMAN e BAYLIN 2000).

Vários estudos já foram realizados em astrocitomas com a finalidade de se averiguar o *status* de metilação do DNA desses tumores. Os principais objetivos desses trabalhos foram obter uma melhor compreensão das vias moleculares envolvidas na tumorigênese de cada tipo de astrocitoma e encontrar marcadores moleculares que pudessem ser usados para diagnóstico e prognóstico da doença.

GONZALEZ-GOMEZ e colaboradores. (2003a) determinaram o perfil de hipermetilação de 13 amostras de astrocitomas pilocíticos e 11 de meduloblastomas, utilizando 10 genes associados a tumorigênese: *MGMT*, *GSTP1*, *DAPK*, *p14<sup>ARF</sup>*, *THBS1*, *TIMP-3*, *TP73*, *p16*, *Rb1* e *TP53*. Astrocitomas pilocíticos apresentaram altos valores de metilação nos genes *p16* (46%), *THBS1* (38%) e *TIMP-3* (31%), enquanto que para os outros genes as freqüências encontradas foram menores que

25%. Em outro estudo, GONZALEZ-GOMEZ e colaboradores (2003b) investigaram o perfil de metilação dos mesmos genes citados acima em 88 amostras de astrocitomas (24 astrocitomas difusos, 21 astrocitomas anaplásicos e 43 glioblastomas, sendo 33 glioblastomas primários e 10 glioblastomas secundários). Os genes *MGMT*, *THBS1*, *TIMP-3* e *p16* foram encontrados mais frequentemente metilados em astrocitomas difusos em pelo menos 45% dos casos, enquanto que *GSTP*, *DAPK*, *p14<sup>ARF</sup>* aparecem hipermetilados em 15 a 50% dos casos de astrocitomas anaplásicos e glioblastomas. Os genes *TP73* e *Rb1* sofreram variações de 10 a 40% em todos os subgrupos estudados, enquanto que *TP53* apresentou hipermetilação em menos de 10% de todos casos. Quando se compara o grupo de glioblastomas primário e secundário, foi observado diferenças nas taxas de metilação. Altas freqüências de metilação dos genes *MGMT*, *GSTP1*, *TP73*, *p16* e *Rb1* foram encontradas em glioblastomas secundários, em contrapartida, altas freqüências dos genes *p14<sup>ARF</sup>* e *THBS1* foram observadas nos glioblastomas primários.

KAMIRYO e colaboradores (2003) também estudaram a hipermetilação do gene *MGMT* em 116 tumores astrocíticos de alto grau (42 astrocitomas anaplásicos e 74 glioblastomas). Esse gene estava hipermetilado em 45% dos astrocitomas anaplásicos e 44% dos glioblastomas. Os autores conseguiram correlacionar significativamente o *status* de metilação do promotor do gene *MGMT* com sobrevida global e sobrevida livre de doença em astrocitomas anaplásicos ( $p < 0.0001$ ) mas não em pacientes com glioblastoma.

NAKAMURA e colaboradores (2001) analisaram alterações dos genes *p14<sup>ARF</sup>* e *p16*, incluindo deleção em homozigose, expressão proteica e hipermetilação

da região promotora desses genes em 34 glioblastomas primários e 16 glioblastomas secundários. Eles encontraram uma frequência de metilação dos genes *p14<sup>ARF</sup>* e *p16* em 6% e 3% dos glioblastomas primários e 31% e 19% dos glioblastomas secundários, respectivamente.

## 2 OBJETIVOS

- Identificar genes diferencialmente expressos em glioblastomas por meio de pesquisa no banco de dados público de *SAGE* mantido pelo *CGAP*;
- Confirmar a expressão diferencial dos genes selecionados através de PCR em tempo real em amostras de astrocitomas;
- Verificar se a diminuição do nível de expressão de alguns dos genes analisados observada nas amostras de tumores astrocíticos em relação ao tecido cerebral normal pode estar associada a hipermetilação da região promotoras desses genes.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 AS BIBLIOTECAS DE *SAGE*

Para a identificação dos genes diferencialmente expressos em astrocitomas foram utilizados os dados de 4 bibliotecas de tecido cerebral tumoral e 3 bibliotecas de tecido cerebral normal que se encontravam disponíveis no banco de dados públicos de *SAGE* no *site* do *CGAP* (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>) em junho de 2002.

As quatro bibliotecas de tecido cerebral tumoral (totalizando 232.606 *SAGEtags*) incluídas no estudo foram: *SAGE Brain glioblastoma CL\_H392* (linhagem celular derivada de glioblastoma de córtex cerebral), *SAGE Brain glioblastoma control CL H247* (linhagem celular derivada de glioblastoma de córtex cerebral), *SAGE Brain glioblastoma B pooled* (conjunto de 5 córtex cerebrais com glioblastomas primários) e *SAGE Brain glioblastoma B GBM1062* (córtex cerebral infantil com glioblastoma). As três bibliotecas de tecido cerebral normal (totalizando 234.238 *SAGEtags*) analisadas foram: *SAGE Brain normal córtex B BB542* (córtex cerebral normal, com mais de 95% de substância branca, oriundo de um homem de 82 anos), *SAGE Brain normal córtex B pool6* (biblioteca derivada de córtex cerebral normal oriundo de dois homens de 51 e 17 anos) e *SAGE Brain normal peds córtex B H1571* (córtex frontal normal de um menino de 15 meses - lobectomia parcial).

### 3.2 CRITÉRIOS DE BIOINFORMÁTICA UTILIZADOS PARA SELEÇÃO DOS GENES CANDIDATOS

Os genes diferencialmente expressos foram selecionados através da comparação dos dois grupos de bibliotecas (normal X tumoral) utilizando-se a ferramenta de bioinformática H2G desenvolvida pelo Laboratório de Bioinformática da Universidade São Paulo de Ribeirão Preto ([http://gdm.fmrp.usp.br/tools\\_bit.php](http://gdm.fmrp.usp.br/tools_bit.php)). Essa ferramenta permite comparar o nível de expressão de diferentes genes em tecidos distintos através da contagem do número de *SAGEtags* correspondentes aos genes de interesse presentes nas bibliotecas de *SAGE* geradas a partir destes tecidos. Para este estudo envolvendo tumores astrocíticos, os dados provenientes das 3 bibliotecas de *SAGE* de tecidos cerebral normal foram reunidas em um *pool* contendo 234.238 *SAGEtags* (Grupo Normal), enquanto que, os dados de 4 bibliotecas de *SAGE* geradas a partir de tecido tumoral foram reunidas em um outro *pool* contendo 232.606 *SAGEtags* (Grupo Tumor).

Para se definir os genes diferencialmente expressos, primeiramente foi realizado a normalização das frequências das *SAGEtags* incluídas nestes grupos. Para isto, o grupo Normal (N) foi normalizado usando-se um fator *R* calculado da seguinte forma:

$$R = \text{total de } SAGEtags \text{ grupoT} / \text{total de } SAGEtags \text{ grupoN};$$

$$\text{Frequência grupo N normalizado} = \text{Frequência grupo N} \times R;$$

Após a normalização, foram considerados hipo-expressos todos aqueles genes que apresentaram no mínimo 5 vezes mais *SAGEtags* no *pool* das bibliotecas de tecido normal em relação ao *pool* das bibliotecas de tecido tumoral e os genes considerados hiper-expressos foram aqueles que apresentaram 5 vezes mais *SAGEtags* no *pool* das bibliotecas tumorais do que no *pool* das bibliotecas normais.

Para o cálculo do valor de  $p$  foi utilizado o teste de comparação de proporção (ALTMAN 1991).

### **3.3 AMOSTRAS DE TECIDOS**

As amostras de astrocitomas e tecidos cerebrais não neoplásicos foram obtidos de ressecções ou biópsias de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP de São Paulo e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Todos os tecidos foram imediatamente submetidos a congelamento rápido em nitrogênio líquido e armazenamento em freezer à temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , assim mantidos até a etapa de extração. A coleta e armazenamento destes tecidos foram realizados pelo grupo do Projeto Genoma Clínico.

Foram incluídas neste estudo 29 amostras de tecido cerebral, sendo que 7 amostras eram de astrocitomas pilocíticos (grau I), 8 eram de astrocitomas difusos (grau II) e 14 eram de glioblastomas (grau IV). Algumas das características clínicas dos pacientes envolvidos nesse estudo podem ser observadas na tabela 1.

Em tumores de sistema nervoso central, a obtenção de amostras não-neoplásicas a partir da margem tumoral não é possível, por isso este estudo optou por

utilizar como controle “normal” tecido obtido de neocórtex de pacientes submetidos à cirurgia de epilepsia, macroscopicamente longe da área de esclerose tida como epileptogênica. Foram incluídas neste estudo 3 amostras normais.

Os tecidos normais utilizados para quantificação da expressão dos genes *NRGN* e *OLFM1*, provenientes de cérebro, bexiga, cólon, pulmão e mama, foram adquiridos comercialmente (*Clontech*).

**Tabela 1** - Características gerais dos 29 pacientes incluídos no estudo.

Nome	Anátomo-patológico	Sexo	Idade*	Data cirurgia	Óbito
JRS	Astrocitoma grau I	M	35	23/8/2002	
RFC	Astrocitoma grau I	M	13	18/9/2002	
IAPV	Astrocitoma grau I	F	16	15/1/2003	
WGG	Astrocitoma grau I	M	18	10/2/2003	
EMS	Astrocitoma grau I	F	16	21/3/2003	
ASJM	Astrocitoma grau I	F	8	21/5/2003	
RJB	Astrocitoma grau I	M	32	28/5/2003	
CHR	Astrocitoma grau II	M	39	17/7/2002	
JNO	Astrocitoma grau II	F	23	4/6/2001	
MBC	Astrocitoma grau II	F	30	11/3/2002	22/4/2003
MGSJ	Astrocitoma grau II	F	25	15/3/2002	
AMM	Astrocitoma grau II	M	43	1/4/2002	
ARV	Astrocitoma grau II	F	38	11/11/2002	
MRS	Astrocitoma grau II	M	42	10/3/2003	
ML	Astrocitoma grau II	M	28	9/8/2002	
AOC	Glioblastoma	F	46	26/6/2002	20/7/2003
MRC	Glioblastoma	F	68	18/1/2002	10/6/2002
OSF	Glioblastoma	F	67	16/7/2002	11/2/2003
MOS	Glioblastoma	F	63	23/7/2002	4/10/2002
JRV	Glioblastoma	M	39	8/8/2002	19/8/2003
MM	Glioblastoma	M	62	11/9/2002	05/04/05 paciente bem KPS 90%
MVC	Glioblastoma	F	40	18/11/2002	22/1/2004
JCPS	Glioblastoma	M	34	7/2/2003	2/5/2004
DS	Glioblastoma	M	54	29/11/2002	18/4/2003
AJS	Glioblastoma	F	51	23/1/2003	13/7/2003
WJG	Glioblastoma	M	61	28/1/2003	01.08.04
AV	Glioblastoma	M	69	13/3/2003	09.10.04
ISS	Glioblastoma	M	55	8/5/2003	03.02.04
ARM	Glioblastoma	F	72	28/5/2003	3/6/2003

\* Idade ao diagnóstico

### 3.4 LINHAGENS CELULARES

No presente estudo, foram utilizadas duas linhagens celulares derivadas de glioblastoma multiforme (A172, T98G), três linhagens derivadas de câncer de bexiga (SCABER, HT-1376 e J82), três linhagens derivadas de câncer de cólon (DLD-1, HCT116 e SW480), três derivadas de câncer de pulmão (H1299, H1155 e H249) e duas derivadas de câncer de mama (MDA-MB-435 e MDA-MB-231). Todas as linhagens celulares são provenientes da ATCC-American Type Culture Collection (<http://www.atcc.org/>).

As linhagens T98G e A172 foram crescidas nos meios D10 (DMEM complementado com 10% de soro bovino fetal) e R20 (RPMI complementado com 20% de soro bovino fetal), respectivamente. As linhagens SCABER, HT-1376 e J82 foram cultivadas no meio MEM (complementado com 10% de soro bovino fetal). Para as linhagens DLD-1, HCT116 e SW480, o meio utilizado foi McCoy's (complementado com 10% de soro bovino fetal). O meio utilizado para as linhagens H1299 e H249 foi R10 (RPMI complementado com 10% de soro bovino fetal) e para a linhagem H1155 foi R5 (RPMI complementado com 5% de soro bovino fetal). Para o cultivo das linhagens de mama MDA-MB-435 e MDA-MB-231 foi utilizado o meio R10. As culturas foram mantidas a 37°C até atingirem 80% de confluência (5 dias em média), tratadas com tripsina, coletadas por centrifugação e estocadas a -70°C.

### 3.5 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

O RNA total de todas as linhagens celulares utilizadas nesse estudo foi extraído utilizando-se o método de sedimentação através de gradiente de Cloreto de Césio (CsCl) (CHRIGWIN et al. 1979). Resumidamente, as células foram homogeneizadas em 9 mL de Solução de Lise (4M de Isotiocianato de Guanidina; 25mM de Citrato de Sódio – pH 7,0; 0,1M de  $\beta$ -mercaptoetanol). O lisado foi transferido para um tubo de ultracentrífuga contendo 4mL de Solução de Cloreto de Césio (5,7M de CsCl; 1M de Acetato de Sódio) e então submetido a ultracentrifugação a 29.000 rpm por 20 horas a 20°C (rotor SW 40Ti). Após a centrifugação e a remoção do sobrenadante, o *pellet* de RNA foi solubilizado em 100 $\mu$ L de água DEPC sendo que este último passo foi repetido por mais 2 vezes consecutivas para uma maior recuperação do RNA. O RNA presente em cada uma das 3 alíquotas obtidas foi quantificado com o auxílio de um espectrofotômetro *GENEQUANT* (Amersham Pharmacia Biotech).

Após a extração, a integridade das amostras de RNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1% contendo 20  $\mu$ g/mL de brometo de etídio.

As moléculas de cDNA foram sintetizadas pela ação da enzima *SuperScript II* (Invitrogen) segundo as recomendações do fabricante. Em resumo, 2 $\mu$ g de RNA total foram misturados a 1 $\mu$ L dNTPs (10mM) e a 1 $\mu$ L de oligo dT (500 $\mu$ g/mL) em um volume final de 12 $\mu$ L. Essa mistura foi mantida a uma temperatura de 65°C por 5 minutos e, em seguida, foi adicionado 2 $\mu$ L de DTT (0,1M), 4 $\mu$ L de tampão de reação 5X, 1 $\mu$ L de Rnase OUT (40U/ $\mu$ L) e 1 $\mu$ L da enzima *SuperScript II* (200U/ $\mu$ L). A reação foi incubada a 42°C por 1 hora, sendo finalizada com uma incubação a 75°C

por 15 minutos. No final, cada amostra de cDNA obtida foi diluída dez vezes com água milliQ.

A presença de moléculas de cDNA longas e completas foi avaliada através da amplificação por PCR de um fragmento da região 5' do gene *NOTCH 2* (NM 024408) com a utilização dos *primers* NOTCH2-F (5'-TGTGGC CAACCAGTTCTCCT-3') e NOTCH2-R (5'-GGCAGTCATCAATATTCCTC-3'). Para isto foram utilizados 5µL de cDNA diluído 10X; 1X tampão de reação; 1mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2mM de dNTPs; 0,4µM de cada *primer*, 1U de *Taq DNA Polymerase* (*Invitrogen*) em um volume final de reação de 25µL, e as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial por 2 minutos a 94°C seguida de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 60 segundos, com uma fase de alongamento final a 72°C por 7 minutos. Os fragmentos foram visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e coloração com prata (SANGUINETTI et al. 1994).

Todas as amostras tumorais foram analisadas em um corte de 4 µm por coloração com Hematoxilina e Eosina a fim de se verificar a qualidade do tecido. Em seguida, elas foram submetidas a microdissecção manual para remover áreas de necrose, restos celulares e áreas não-neoplásicas. Após esse procedimento, o RNA foi extraído dos tecidos de interesse com o reagente Trizol (*Invitrogen*), seguindo as especificações fornecidas pelo fabricante, quantificado em espectrofotômetro e sua integridade foi avaliada em de gel agarose. As moléculas de cDNA foram sintetizadas conforme descrito acima. Todo o processo de extração de RNA e síntese de cDNA das amostras tumorais foi realizado pelo grupo do Prof. Marco Antonio Zago no Hemocentro da Faculdade de Medicina da USP-Ribeirão Preto.

### 3.6 DESENHO DOS *PRIMERS*

Foram desenhados *primers* para os quatro genes candidatos: *olfactomedin 1* (*OLFM1*), *chitinase 3 like 1* (*CHI3L1*), *neurogranin* (*NRGN*) e *tropomiosin beta 2* (*TPM2*). Todos os *primers* foram desenhados em exons diferentes de cada um destes genes.

Os *primers* foram desenhados nos exons 4 e 6 do gene *OLFM1*, permitindo a amplificação de um fragmento de 486 pb. As seqüências dos *primers* direto e reverso são, respectivamente, 5'-TGGATGAACTTAGGCCTTTGATACC-3' e 5'-TGATGTGGCTCTGGAACTTGTTG-3'.

O gene *chitinase 3 like 1* (*CHI3L1*) tem 10 exons e os *primers* foram desenhados nos exons 7 e 10, gerando um fragmento de 465 pb. As seqüências dos *primers* direto e reverso utilizados foram, respectivamente, 5'-CCGAGGTCAGGAGGATGCAAG-3' e 5'-TCCTTGATGGCATTGGTGAGAG-3'.

Os *primers* foram desenhados nos exons 2 (direto - 5'-ATGGCGCGGAAGAAGATAAAG-3') e 4 (reverso - 5'-GCGCACAGAACGAAAGAACTC-3') do gene *NRGN*, permitindo a amplificação de um fragmento de 543 pb.

No caso do gene *TPM2* que possui 9 exons, os *primers* foram desenhados nos exons 3 e 9, amplificando um fragmento de 535 pb. As seqüências dos *primers* direto e reverso usados foram 5'-CGCCGCATTCAGCTGGTTG-3' e 5'-CGTTCTCCTCCTTGGCACTGG-3', respectivamente.

O gene *GAPDH* foi utilizado como normalizador nas reações de PCR em tempo real. Este gene que possui 9 exons e os *primers* foram desenhados nos exons 7 e 8, amplificando um fragmento de 379 pb. As seqüências dos *primers* direto e

reverso são 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' e 5'-CAGTGTAGCCCAGGATGCCCTTG AG-3', respectivamente.

### **3.7 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR**

As condições de reação de PCR para cada um dos genes selecionados foram estabelecidas em gel de poliacrilamida. A condição básica utilizada foi: 1X Tampão *Taq Platinum (Invitrogen)*, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 μM de cada *primer* (direto e reverso), 2U de *Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen)*, 5% de DMSO, 2 μL de cDNA diluído 10X, num volume final de 25μL. O programa de PCR utilizado era composto de uma desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto (desnaturação), temperatura de anelamento específica para cada par de *primers* (fornecida na bula do *primer*) por 1 minuto e 72°C por 1 minuto (extensão). Por último adicionou-se um passo de extensão a 72°C por 7 minutos. As quantidades de cDNA e Cloreto de Magnésio adicionadas em cada reação, bem como a temperatura de anelamento, foram padronizadas para cada gene analisado. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e visualizados através de coloração com prata (SANGUINETTI et al. 1994).

### **3.8 REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL**

Após a etapa de padronização, as condições de PCR estabelecidas foram utilizadas nas reações de PCR em tempo real. A condição básica desta reação foi: 1X

Tampão *Taq Platinum* (*Invitrogen*), 2 mM de  $MgCl_2$ , 0,2 mM de dNTPs, 0,4  $\mu M$  de cada *primer*, 2U de *Taq Platinum DNA Polimerase* (*Invitrogen*), 5% de DMSO, 1% SYBR-Green (diluído 1:100) (*Sigma*) e 2  $\mu L$  de cDNA diluído 10X, num volume final de reação de 25 $\mu L$ .

O programa de PCR utilizado foi: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 45 ciclos de 94°C por 15 segundos, 30 segundos à temperatura de anelamento padronizada para cada gene e extensão a 72°C por 30 segundos. Todas as reações foram realizadas em duplicata utilizando-se o equipamento SDS 7000 (*Applied Biosystems*). Para o cálculo da quantificação relativa do nível de expressão dos genes *NRGN*, *OLFM1* e *CHI3L1* foi utilizada a equação  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , descrita por LIVAK e SCHMITTGEN (2001). O gene GAPDH foi utilizado como normalizador.

### **3.9 TRATAMENTO DE LINHAGENS CELULARES COM 5-AZA-DEOXCITIDINA (5-Aza-dC)**

As linhagens celulares A172, T98G e H1299 foram colocadas em cultura com meio apropriado e crescidas até uma confluência de 90%. O número de células foi estimado através de contagem em Câmara de *Newbauer*. Cerca de  $5 \times 10^5$  células foram transferidas para novas garrafas de cultura e crescidas por 4 dias consecutivos com meio apropriado acrescido com 1 $\mu M$  e 5 $\mu M$  de 5-Aza-dC. O meio de cultura e a droga foram trocados diariamente. Como controle,  $5 \times 10^5$  células das mesmas linhagens foram cultivadas, simultaneamente, nas mesmas condições, mas sem a adição de 5-Aza-dC. Vinte e quatro horas após a última troca de meio, as células foram recolhidas por tripsinização e centrifugação e estocadas a -70°C.

### 3.10 EXTRAÇÃO DE DNA E TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

O DNA das linhagens celulares A172 e T98G sem tratamento prévio com 5-Aza-dC foi extraído com auxílio do kit *Perfect gDNABlood Mini (Eppendorf)* conforme instruções do fabricante. Em seguida, esses DNAs foram submetidos ao tratamento de Bissulfito de Sódio conforme descrito por GOLDENBERG et al. (2004) com algumas adaptações. Este tratamento converte as citosinas não-metiladas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas.

Resumidamente, à 2 $\mu$ g do DNA genômico foi adicionado água para um volume final de 17 $\mu$ l. A esse DNA foi adicionado 3 $\mu$ l de uma solução contendo 3M de Hidróxido de Sódio (NaOH) e esta mistura foi mantida por 20 minutos a 50°C. Em seguida adicionou-se 500 $\mu$ l da solução de Bissulfito de Sódio (3M de Bissulfito de Sódio, 1M de Hidroquinona, 2M de NaOH) e incubou-se por 3 horas a 70°C. O DNA tratado foi purificado com o kit *Wizard DNA Clean-up System (Promega)*, conforme protocolo fornecido pelo fabricante, eluído em 45 $\mu$ l de água e dessulfonado pela adição de 5 $\mu$ l de uma solução contendo 3M de NaOH e incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. O DNA foi então precipitado pela adição de 45 $\mu$ l de Acetato de Amônio (7,5M), 350 $\mu$ l de etanol absoluto, 1 $\mu$ l de glicogênio (20mg/ml) e incubação a -20°C por 16 horas. Após 15 minutos de centrifugação a 13.000 rpm a 4°C, o DNA foi lavado com 500 $\mu$ l de etanol 70%, solubilizado em 50 $\mu$ l de água e estocado a -70°C até o uso.

### 3.11 REAÇÃO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DOS PROMOTORES GÊNICOS *NRGN* E *OLFM1*

Para a amplificação da região promotora dos genes *NRGN* e *OLFM1* foi utilizada a estratégia *nested PCR*, onde foram realizadas duas reações, sendo a segunda feita com *primers* internos aos primeiros e utilizando o produto da primeira reação como molde.

As condições de amplificação para o fragmento do promotor do gene *NRGN* foram iguais para as duas reações: 1mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25μM de dNTPs, 0,5μM de cada *primer*, 1X Tampão *Taq Platinum (Invitrogen)*, 1,5U *Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen)* e 2μL de DNA tratado com Bissulfito de Sódio (ou 1μL do produto da primeira PCR diluído 5 vezes para o gene *NRGN* e 50 vezes para o gene *OLFM1*), em um volume final de 20μL. As seqüências dos *primers* utilizados na primeira reação para o gene *NRGN* foram NRGN GF (5'-AAGTATGGAGGGATGGTGAGGGGT-3') e NRGN GR (5'-CTCACTAAAAAAAATTTCCTCCTATCATCCAAC-3'). As seqüências dos *primers* utilizados na segunda reação foram: NRGN PF (5'-GTGTTTAGATGTGGGTGTTTGTGTT-3') e NRGN PR (5'-TCCCAATCCAACCTAAACTATCTAA-3'). As condições de amplificação da primeira reação apresentaram dois minutos iniciais a 95°C, dez ciclos com trinta segundos a 94°C, um minuto a 72°C e um minuto a 72°C novamente, dez ciclos com trinta segundos a 94°C, um minuto a 70°C e um minuto a 72°C, quinze ciclos com trinta segundos a 94°C, um minuto a 68°C, um minuto a 72°C e elongação final de 7 minutos a 72°C. As condições de amplificação da segunda reação apresentaram dois minutos iniciais a 95°C, vinte ciclos com um minuto a 95°C, um minuto a 64°C, um

minuto a 72°C e elongação final de 7 minutos a 72°C. O tamanho esperado do produto amplificado era de 724pb.

As seqüências dos *primers* utilizados na primeira reação para o gene *OLFM1* foram: OLFM1 GF (5'-GGTTTATTTTTGTTTAGGGGTTTAGGTTTTTA-3') e OLFM1 GR (5'-CCATCAAATAAAAAAAAAAACTAAAAACTTC-3'). As seqüências dos *primers* utilizados na segunda reação foram: OLFM1 PF (5-AGGATGGAGTTTTTTATTTTAGTTTA-3') e OLFM1 PR (5'-ACCTAACATACAAAACCCTAAATACTAA-3'). As condições de amplificação da primeira reação apresentam dois minutos iniciais a 95°C, dez ciclos com trinta segundos a 94°C, um minuto a 62°C e um minuto a 72°C, dez ciclos com trinta segundos a 94°C, um minuto a 60°C e um minuto a 72°C, quinze ciclos com trinta segundos a 94°C, um minuto a 58°C, um minuto a 72°C e elongação final de 7 minutos a 72°C. As condições de amplificação da segunda reação apresentam dois minutos iniciais a 95°C, cinco ciclos com trinta segundos a 94°C, um minuto a 62°C e um minuto a 72°C, cinco ciclos com trinta segundos a 94°C, um minuto a 60°C e um minuto a 72°C, dez ciclos com trinta segundos a 94°C, um minuto a 58°C e um minuto a 72°C e elongação final de 7 minutos a 72°C. O tamanho esperado do produto amplificado era de 524pb.

Os produtos obtidos foram visualizados em gel de poliacrilamida 8%, com coloração por prata (SANGUINETTI et al. 1994).

### 3.12 CLONAGEM E SEQÜENCIAMENTO

Os fragmentos obtidos pela amplificação das regiões contendo as ilhas de CpG dos genes *NRGN* e *OLFMI* foram introduzidos no plasmídio *pGEM T* utilizando-se o kit *pGEM T-Easy vector* (Promega) segundo instruções do fabricante. Os plasmídios recombinantes obtidos foram introduzidos em células de *E. Coli DH10B* por eletroporação (0,1 cm *Bio Rad Cuvette*, 1,8kV, 25µF e 200 ohms). O DNA destes clones foi extraído com auxílio do *GFX Micro Plasmid Prep Kit* (*Amersham Pharmacia Biotech*) e foram seqüenciados utilizando-se os *primers* M13F 5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3' e M13R 5'-TCACACAGG AACAGCTATGAC-3' e o kit *Big Dye terminator sequencing* (*Applied Biosystems*). As reações de seqüenciamento foram analisadas no seqüenciador *ABI3100* (*Applied Biosystems*).

### 3.13 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Câncer do Hospital do Câncer A.C. Camargo - Fundação Antônio Prudente em reunião realizada no dia 27/05/2003, sob o título "Identificação de marcadores moleculares para glioblastoma multiforme por meio de análise da expressão gênica", número 502/03, conforme documento em anexo (anexo 1).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 SELEÇÃO DOS GENES CANDIDATOS

O grupo de pesquisadores envolvido no Projeto Genoma Clínico analisou o banco de dados públicos de *SAGE* disponibilizado no *site* do *CGAP* (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>) (dados disponíveis em junho de 2002) e selecionou 3 bibliotecas geradas a partir de tecidos cerebral não-neoplásicos e 4 bibliotecas geradas a partir de glioblastoma para serem incluídas neste estudo. As *SAGEtags* presentes em cada biblioteca foram reunidas em 2 grupos (*Pool Normal* e *Pool Tumor*), suas frequências foram normalizadas e comparadas. Utilizando um valor de corte de 5 vezes mais ou menos *SAGEtags* no tecido tumoral em comparação com tecido normal, esta primeira análise selecionou 242 genes diferencialmente expressos em glioblastomas (MARIE et al. 2005 – Anexo 2). Deste grupo de 242 genes, 13 genes foram selecionados para validação por PCR em tempo real (Tabela 1). Estes 13 genes estão envolvidos com diversos processos biológicos, tais como, adesão celular, indução de apoptose, invasão, proliferação celular, controle do crescimento celular, formação de neurônios e regulação neuronal da plasticidade sináptica e envolvimento na organização do citoesqueleto. Dentre esses 13 genes, 7 apresentaram uma hipo-expressão no *pool* de bibliotecas de glioblastomas, sendo que, o número de *SAGEtags* destes genes era de 6 a 82 vezes menor no *pool* de bibliotecas tumorais do que no *pool* de bibliotecas de tecido cerebral normal. Por outro lado, 6 genes apresentaram um número de *SAGEtags* de 13 a 31 vezes maior

no *pool* de bibliotecas tumorais em relação ao *pool* de bibliotecas de tecido cerebral normal e foram considerados hiper-expressos.

Destes 13 genes selecionados, 4 foram enviados para validação no Laboratório de Genética do Câncer do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (GNC-ILPC): *tropomyosin beta 2 (TPM2)*, *neurogranin (NRGN)*, *chitinase 3 like 1 (CHI3L1)* e *olfactomedin 1 (OLFM1)* (Tabela 2).

**Tabela 2** – Lista dos genes com expressão diferencial em glioblastomas selecionados a partir das análises das bibliotecas de *SAGE* de tecido cerebral normal e glioblastoma.

ID Gene	Nome do Gene (símbolo)	Tumor (n° tags)	Normal (n° tags)	Razão*
<b>Genes hipo-expressos</b>				
NM_012324	<i>MAPK8 Interacting protein 1 (MAPK8IP1)</i>	6	81	-13
NM_003289	<i>Tropomyosin 2 Beta (TPM2)</i>	17	99	-6
NM_004408	<i>Dynamin 1 (DNM1)</i>	10	176	-17
NM_000358	<i>TGF Beta Induced (TGFBI)</i>	11	338	-31
NM_014279	<i>Olfactomedin 1 (OLFM1)</i>	3	248	-82
NM_006176	<i>Neurogranin (NRGN)</i>	27	964	-35
NM_000820	<i>Growth Arrest Specific 6 (GAS6)</i>	4	42	-12
<b>Genes hiper-expressos</b>				
NM_001831	<i>Clusterin (CLU)</i>	384	16	24
NM_014302	<i>Sec61 gama (SEC61G)</i>	295	13	23
NM_002306	<i>Galectin 3 (LGALS3)</i>	291	12	24
NM_000582	<i>Osteopontin (SPP1)</i>	91	7	13
NM_001276	<i>Chitinase 3 like 1 (CHI3L1)</i>	56	2	28
NM_000041	<i>Apolipoprotein E (APOE)</i>	189	6	31

\* Razão entre o maior número de *SAGEtags* sobre o menor. Valores negativos indicam nível de expressão maior no tecido normal (genes hipo-expressos), enquanto que, valores positivos indicam nível de expressão maior no tecido tumoral (genes hiper-expressos).

**Tabela 3** - Genes com expressão diferencial entre tecido cerebral normal e tumoral submetidos ao processo de validação por PCR em tempo real no Laboratório de Genética do Câncer do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer.

Nome	TAG	Nº tags tumor	Nº tags normal	Razão T/N*	valor de <i>p</i>
<b>Gene hiper-expresso</b>					
<i>CHI3L1</i>	GTATGGGCCC	56	2	28	< 0,001
<b>Genes hipo-expressos</b>					
<i>TPM2</i>	GACCAGGCC	17	99	-6	< 0,001
<i>OLFM1</i>	TAACCTTAAG	3	248	-82	< 0,001
<i>NRGN</i>	TGACTGTGCT	27	964	-35	< 0,001

São indicados os símbolos e a *SAGEtags* de cada gene. Também são fornecidos o número normalizado de *SAGEtags* presentes no *pool* de bibliotecas tumorais, no *pool* de bibliotecas normais e a razão entre estes números. O valor de *p* foi determinado através do teste de comparação de proporção (ALTMAN 1991).

\* Razão entre o maior número de *SAGEtags* sobre o menor. Valores negativos indicam nível de expressão maior no tecido normal (genes hipo-expressos), enquanto que valores positivos indicam nível de expressão maior no tecido tumoral (genes hiper-expressos).

## 4.2 DESCRIÇÃO DOS GENES ESTUDADOS

Para se obter informações sobre a função de cada um dos genes incluídos neste estudo foram utilizadas as ferramentas *on line* disponíveis nos sites *NCBI-GENE* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=search&term=>), *NCBI-UNIGENE* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=unigene>), *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org/>), *GeneCards* (<http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards/index.shtml>) e *Source* (<http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/source/>)

O gene humano *neurogranin* (*NRGN*), localizado na posição 11q24, é homólogo ao gene *neurogranin/RC3* de rato e está envolvido na origem e formação dos neurônios. O gene *NRGN* codifica uma proteína de 78 aminoácidos, a qual

consiste em um substrato específico de proteína Quinase C localizado pós-sinápticamente e altamente expresso em corpos celulares e dendritos neuronais do hipocampo, neocórtex, amígdala e corpo estriado (WU et al. 2002). A proteína Quinase C fosforila a NRGN, e dessa maneira a NRGN regula a disponibilidade de Calmodulina livre nos dendritos. Isso é importante pois a concentração de Calmodulina livre determina a ativação de alvos distantes como Calmodulina Quinase II, Adenilato Ciclase, Óxido Nítrico Sintase, Calcineurina, entre outros. É sugerido que a NRGN seja um alvo direto do hormônio tireoidiano T<sub>3</sub> no cérebro humano, e o controle da expressão desse gene pode estar associado a muitas das conseqüências do hipotireoidismo no estado mental tanto durante o desenvolvimento cerebral quanto em cérebro adulto (MARTINEZ DE ARRIETA et al. 1999).

A proteína *Olfactomedin 1 (OLFM1)* apresenta 3 isoformas, sendo que a mais longa possui 467 aminoácidos. O gene *OLFM1*, localizado na posição 9q34.3, codifica uma glicoproteína de matriz extracelular sintetizada nas glândulas de Bowman's e células sustentaculares do neuroepitélio olfatório, sendo secretada em uma camada de muco viscosa que circunda os dendritos apicais dos neurônios olfatórios (KARAVANICH e ANHOLT 1998). A proteína OLFM1 esta presente na membrana celular e no retículo endoplasmático, apresentando atividade de receptor da latrotoxina, uma potente neurotoxina pré-sináptica que induz mudanças na atividade celular. Acredita-se que a OLFM1 tenha um papel importante associada ao olfato, neurogênese e neurosecreção (KARAVANICH e ANHOLT 1998).

O terceiro gene selecionado para validação foi o *chitinase 3 like 1 (CHI3L1)* que está localizado na posição 1q32.1 e codifica uma proteína de 383 aminoácidos também chamada YKL-40 ou HCgp-39 (*human cartilage glycoprotein-39*). Esta

proteína tem atividade de hidrolase, interage seletivamente com carboidratos mono-, di- ou trissacarídeos e contribui para integridade estrutural da matriz extracelular, estando localizada na própria matriz e no espaço extracelular. Membro da família das 18-glicosil-hidrolases, a *CHI3L1* é secretada por condrócitos articulares e células sinoviais e é expressa em macrófagos derivados do sangue periférico que sofrem maturação de monócitos para macrófagos. Sugere-se que também tenha um papel importante na remodelação de tecidos e defesa contra patógenos. Dados de *ESTs* e *SAGE* disponibilizados pelo *CGAP* ([http://cgap.nci.nih.gov/Tissues/Virtual Northern ?TEXT=0&ORG=Hs&CID=382202](http://cgap.nci.nih.gov/Tissues/Virtual%20Northern%20Blot)) indicam que esse gene é pouco expresso em cérebro normal (5,64 *ESTs* / 200.000 e 14 *SAGEtags* / 200.000). Altos níveis de *CHI3L1* já foram descritos em glioblastomas e sua expressão também está associada a macrófagos ativados em estágio tardio de diferenciação dos monócitos de sangue periférico. Macrófagos são participantes-chaves da angiogênese e já foi demonstrado que infiltração de macrófagos está fortemente correlacionado com neovascularização em gliomas humanos (SHOSTAK et al. 2003). Também já foi sugerido que *CHI3L1* está envolvida com a degradação da matriz extracelular em câncer colorretal primário, câncer de mama metastático e em outras condições patológicas (TANWAR et al. 2002).

O quarto gene selecionado para a validação foi o gene *tropomiosin beta 2* (*TPM2*) que está localizado na posição 9p13.2-p13.1. Esse gene codifica uma proteína de 284 aminoácidos, que possui duas isoformas (as duas possuem o mesmo número de aminoácidos, sendo diferentes somente na sequência dos últimos 27 resíduos da porção carboxi-terminal) e está presente nos filamentos finos musculares e no citoesqueleto. A proteína TPM2 tem a função de se ligar aos filamentos de

actina e contribuir para integridade estrutural da fibra muscular. Também está envolvida na regulação da contração muscular.

### 4.3 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR

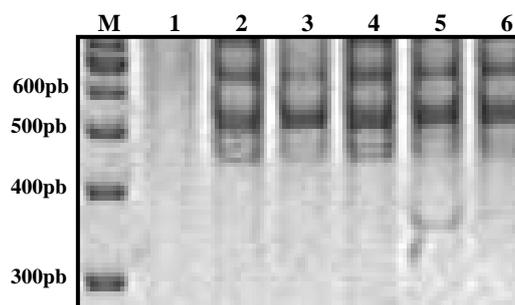
A quantificação dos genes selecionados por PCR em tempo real foi realizada utilizando o sistema de detecção *Sybr Green*. O *Sybr green* é um fluoróforo que tem sua fluorescência aumentada quando está intercalado ao DNA de fita dupla, portanto, o aumento da quantidade de produto formado durante a reação de PCR é diretamente proporcional ao aumento da quantidade de fluorescência emitida. Uma desvantagem de se usar essa forma de detecção é que o *Sybr green* é um corante inespecífico e se liga a qualquer molécula de DNA de fita dupla formada durante a reação de PCR, como por exemplo, *primer-dimers* e produtos inespecíficos, sendo que, a fluorescência destas moléculas também poderá contribuir para a fluorescência total obtida na reação. Por essa razão, para utilização do sistema de detecção por *Sybr Green* é necessário que as condições da reação de PCR estejam bem padronizadas, de modo a permitir apenas a formação do produto específico.

Para o gene *NRGN*, iniciou-se a padronização da reação de PCR com a condição padrão descrita em Materiais e Métodos, utilizando-se uma temperatura de anelamento de 66°C, 2mM de MgCl<sub>2</sub> e 2 µL de cDNA das linhagens celulares T98G, A172, MDA-MB435, SW480 e H249. Como se pode observar na figura 1, esta condição de reação permitiu a amplificação de vários fragmentos inespecíficos. Em seguida, mantendo-se a mesma concentração de MgCl<sub>2</sub> e cDNA, variou-se a temperatura de anelamento de 65°C a 82°C. Conforme mostra a figura 2, com a

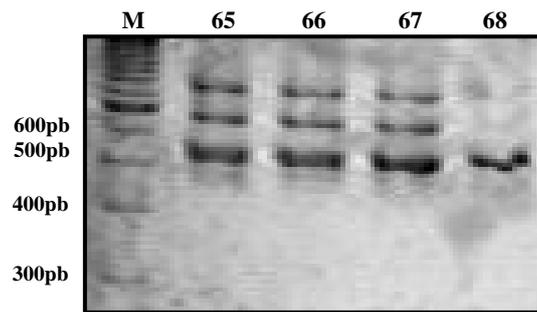
temperatura de 68°C as bandas inespecíficas desapareceram e somente o fragmento de tamanho esperado (543pb) foi amplificado, por isso esta foi a temperatura escolhida para ser utilizada nos experimentos de PCR em tempo real.

A figura 3 mostra a curva de desnaturação produzida após a dosagem do nível de expressão do gene *NRGN* em diferentes linhagens celulares (T98G, A172, MDA-MB435, SW480 e H249) através de PCR em tempo real. A presença de um pico único de fluorescência de boa amplitude demonstra a amplificação de um fragmento único. A análise da curva de desnaturação tem o propósito de determinar a temperatura de fusão característica (*melting temperature* -  $T_m$ ) dos fragmentos amplificados. O  $T_m$  determinado para o produto amplificado do gene *NRGN* foi de cerca de 90°C (Figura 3).

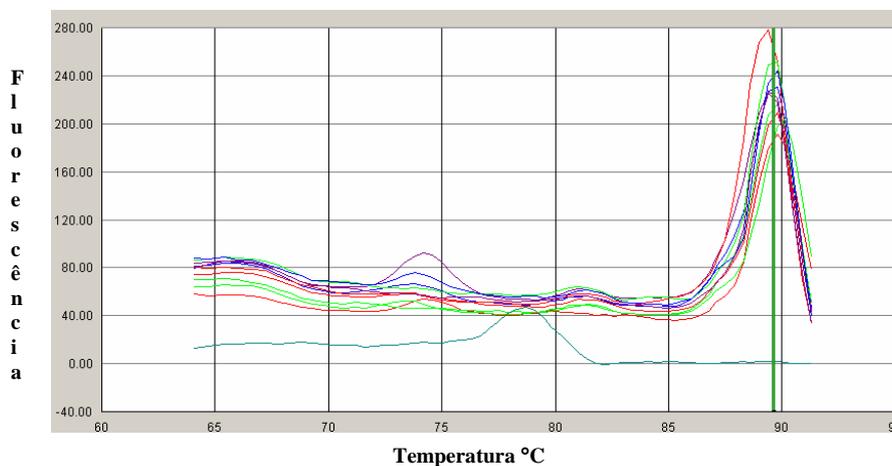
As condições de PCR foram otimizadas de maneira semelhante para os genes *CHI3L1* e *OLFM1*. Para o gene *CHI3L1* a condição otimizada para a realização das reações de PCR em tempo real foi: temperatura de anelamento de 70°C, 2mM de  $MgCl_2$  e 2  $\mu L$  de cDNA. Para o gene *OLFM1* a condição otimizada foi de 65°C para o anelamento, 2mM de  $MgCl_2$  e 2  $\mu L$  de cDNA.



**Figura 1** - Amplificação do fragmento de 543pb do gene *NRGN*. Para estas reações utilizou-se 66°C de temperatura de anelamento, 2 $\mu L$  de cDNA e 2 mM de  $MgCl_2$ . 1 - controle negativo (reação sem cDNA); 2 - linhagem MDA435; 3 - H249; 4 - SW480; 5 - A172 e 6 - T98G. Na canaleta M está o marcador *DNA ladder 100 pb* (Invitrogen).



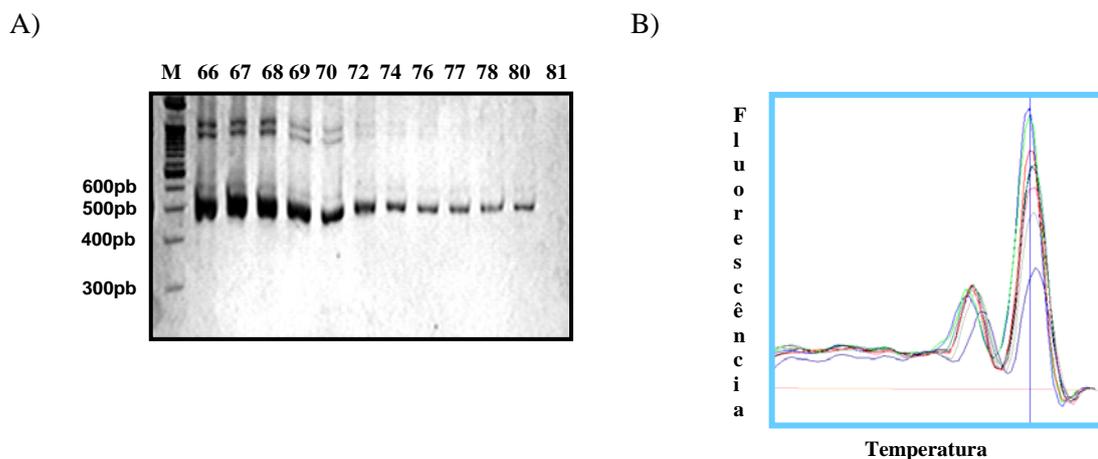
**Figura 2** - Padronização da reação de PCR para o gene *NRGN*. Para estas reações utilizou-se 2 $\mu$ L de cDNA da linhagem celular MDA435 e diferentes temperaturas de anelamento. Os números acima da figura indicam a temperatura de anelamento em  $^{\circ}$ C.



**Figura 3** - Curva de desnaturação para análise de especificidade da reação de PCR em tempo real do gene *NRGN*.

A padronização da reação de PCR do gene *TPM2* não foi satisfatória. Embora se tenha variado a temperatura de anelamento (66 a 81 $^{\circ}$ C) e a concentração de MgCl<sub>2</sub> (de 0,5 a 3mM), não foi possível a amplificação de uma banda única de 535pb, pois houve sempre a amplificação de outras bandas inespecíficas (Figura 4). Conforme a temperatura de anelamento foi aumentada, as bandas inespecíficas diminuíram de intensidade, contudo a intensidade da banda alvo também diminuiu. Foi feita uma reação de PCR em tempo real com duas linhagens derivadas de glioblastoma (A172 e

T98G), utilizando-se uma temperatura de anelamento de 80°C, entretanto, mesmo utilizando-se esta alta temperatura de anelamento, a análise da curva de desnaturação demonstrou a presença de 2 picos distintos, evidenciando a presença de pelo menos 2 produtos (Figura 4). Uma alternativa para se contornar este problema poderia ser o desenho de novos *primers*, entretanto, esta estratégia não foi implementada e o estudo prosseguiu com a análise dos demais genes selecionados.



**Figura 4** - Padronização da reação de PCR para o gene *TPM2*. **(A)** Gradiente de temperatura de anelamento na PCR do gene *TPM2* utilizando-se 5µL de cDNA da linhagem celular SW480. *M* representa o marcador de peso molecular *DNA ladder 100 bp (Invitrogen)*. Os números representam a temperatura de anelamento em °C. **(B)** Curva de desnaturação da PCR em tempo real utilizando-se 76°C como temperatura de anelamento

#### 4.4 QUANTIFICAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DOS GENES SELECIONADOS EM AMOSTRAS DE PACIENTES

A expressão gênica relativa foi calculada através da equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  descrita por LIVAK e SCHMITTGEN (2001). O valor inferido à  $\Delta Ct$  equivale à diferença entre o *Ct* do gene de interesse e o *Ct* do gene normalizador, onde o valor do *Ct* representa o ciclo do PCR em que a quantidade de fluorescência produzida na reação

atinge um limite pré-estabelecido. O cálculo da fórmula  $\Delta\Delta Ct$  envolve a subtração do valor de  $\Delta Ct$  de cada amostra de tecido neoplásico do valor de  $\Delta Ct$  do tecido não-neoplásico. O resultado representa o número de vezes que o gene analisado tem a sua expressão aumentada ou diminuída no tecido tumoral em relação ao tecido normal.

Foram consideradas como tendo um aumento ou diminuição de expressão aquelas amostras que apresentaram valores de  $\Delta\Delta Ct$  maiores que 5 ou menores que 0,2 (representando um diminuição de pelo menos 5 vezes). Todas as comparações foram feitas em relação a um pool de 3 amostras de cérebro não-neoplásico.

O nível de expressão gênica dos genes *OFLM1*, *NRGN* e *CHI3L1* foi determinado através de PCR em tempo real em 29 amostras de astrocitomas, sendo 7 amostras de astrocitomas pilocíticos (grau I), 8 de astrocitomas difusos (grau II) e 14 de glioblastomas (grau IV). Não foi possível avaliar o nível de expressão destes genes em amostras de astrocitomas anaplásicos (grau III) pois amostras desse grau histológico não estavam disponíveis no banco de tumores gerado pelo Projeto Genoma Clínico.

De um modo geral, o gene *CHI3L1* apresentou um aumento de expressão em 59% (17/29) das amostras de astrocitomas, enquanto que, os genes *NRGN* e *OLFM1* apresentaram uma diminuição da expressão gênica em 90% (26/29) e 59% (17/29) das amostras avaliadas, respectivamente, em relação ao *pool* de amostras normais.

O gene *CHI3L1* apresentou-se hiper-expresso em 71% das amostras de astrocitomas pilocíticos e em 93% das amostras de glioblastomas. Este gene não apresentou aumento de expressão em nenhuma das amostras de astrocitomas difusos (Tabela 3), sendo que, em 3 delas foi possível detectar, até mesmo, uma diminuição do nível de expressão deste gene (dados não apresentados). O aumento de expressão

observado nas amostras de astrocitomas pilocíticos foi, em média, de 73 vezes enquanto que nas amostras de glioblastomas foi de 158 vezes. Já nas amostras de astrocitomas difusos, o aumento de expressão, quando detectado, foi, em média, de 4 vezes.

O gene *NRGN* apresentou-se hipo-expresso em 62% das amostras de astrocitomas difusos e em 100% das amostras de astrocitomas pilocíticos e de glioblastomas (Tabela 4). A diminuição de expressão observada nas amostras de astrocitomas difusos foi em média de 12 vezes enquanto que nas amostras de glioblastomas foi de 160 vezes. Nas amostras de astrocitomas pilocíticos, o nível de expressão desse gene ficou abaixo do nível de detecção do equipamento de PCR em tempo real e não pode ser detectado.

A diminuição da expressão do gene *OLFMI* foi detectada em 71% das amostras de astrocitomas pilocíticos e em 78% das amostras de glioblastomas analisadas. Este gene apresentou uma diminuição de expressão em apenas 12% das amostras de astrocitomas difusos (Tabela 4). A diminuição de expressão desse gene observado nas amostras de astrocitomas difusos foi, em média, de 5 vezes, enquanto que nas amostras de astrocitomas pilocíticos e nos glioblastomas a diminuição de expressão foi em média de 17 e 48 vezes, respectivamente. Os valores absolutos obtidos nos experimentos de PCR em tempo real referentes aos níveis de expressão de cada um dos genes avaliados nas amostras dos pacientes estão apresentados no Anexo 3.

Os níveis de expressão (hiper-ou hipo-expressos) dos três genes (*CHI3L1*, *NRGN* e *OLFMI*) determinados pelos experimentos de PCR em tempo real foram semelhantes aos dados preditos pelas análises de *SAGE*.

**Tabela 4** - Porcentagem das amostras de astrocitomas que apresentaram hiper-expressão do gene *CHI3L1*.

<b>Diagnóstico Anátomo Patológico</b>	<b><i>CHI3L1</i></b>
Astrocitoma pilocítico (grau I)	71% (5/7)
Astrocitoma difuso (grau II)	0% (0/8)
Glioblastoma (grau IV)	93% (13/14)

Foram consideradas como hiper-expressas todas as amostras que apresentaram uma expressão superior a 5 vezes nas amostras tumorais quando comparadas ao tecido cerebral normal através dos experimentos de PCR em tempo real. Entre parênteses é fornecido o número de amostras hiper-expressas em relação ao número total de amostras de cada tipo de astrocitoma incluídas no estudo.

**Tabela 5** - Porcentagem das amostras de astrocitomas que apresentaram hipo-expressão dos genes *NRGN* e *OLFM1*.

<b>Diagnóstico Anátomo Patológico</b>	<b><i>NRGN</i></b>	<b><i>OLFM1</i></b>
Astrocitoma pilocítico (grau I)	100% (7/7)	71% (5/7)
Astrocitoma difuso (grau II)	62% (5/8)	12% (1/8)
Glioblastoma (grau IV)	100% (14/14)	78% (11/14)

Foram consideradas como hipo-expressas todas as amostras que apresentaram uma expressão igual ou inferior a 0,2 vezes nas amostras de astrocitoma quando comparadas com as amostras de tecido cerebral normal nos experimentos de PCR em tempo real. Entre parênteses é fornecido o número de amostras hipo-expressas em relação ao número total de amostras de cada tipo de astrocitoma incluídas no estudo.

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES *NRGN* E *OLFM1* EM TECIDOS NORMAIS E LINHAGENS TUMORAIS

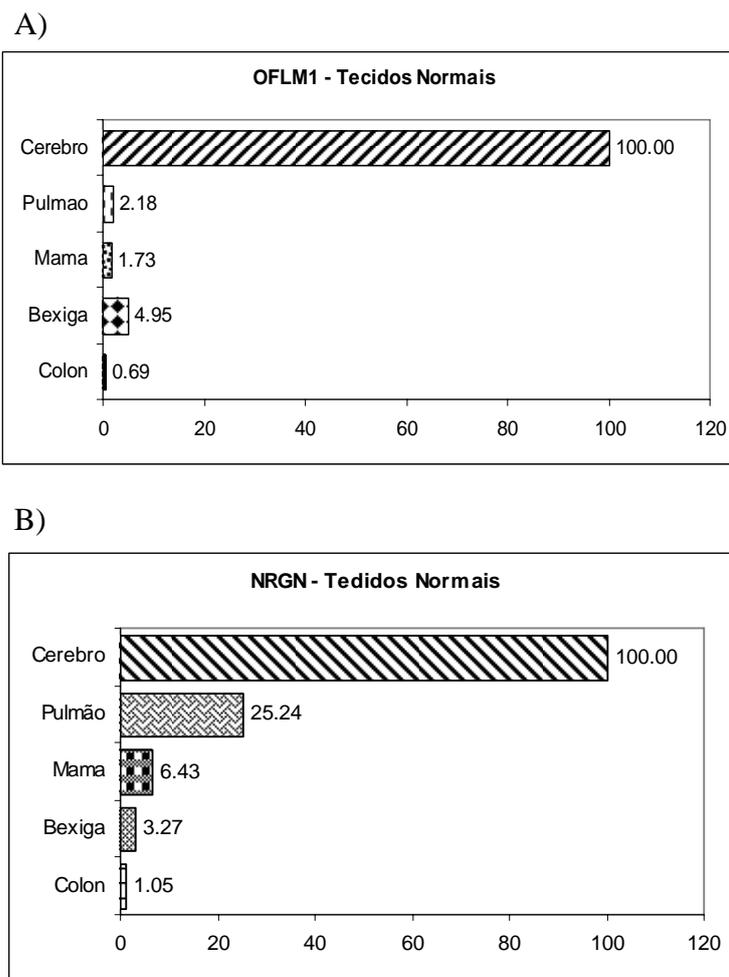
Os experimentos de quantificação relativa demonstraram que os genes *NRGN* e *OLFM1* encontram-se hipo-expressos nos três tipos de tumores astrocíticos. Com o intuito de se averiguar o comportamento destes genes em outros tecidos, foram realizados novos experimentos de PCR em tempo real com amostras de tecidos não-neoplásicos de pulmão, mama, bexiga, cólon e cérebro e diferentes linhagens celulares.

Primeiramente foi realizada a quantificação dos níveis de expressão dos genes *NRGN* e *OLFM1* nos diversos tecidos normais em relação ao tecido cerebral normal. Conforme se pode observar na figura 5, considerando-se a expressão do gene *NRGN* em tecido cerebral normal como sendo de 100 unidades arbitrárias (U), o tecido pulmonar normal apresentou uma expressão de 25U (ou seja, um quarto da expressão observada em cérebro normal), enquanto que nos demais tecidos (mama, bexiga e cólon) esse gene apresentou um nível de expressão inferior a 7U. O gene *OLFM1* se mostrou pouco expresso (menos de 5U) em todos os tecidos analisados exceto cérebro (100U) (Figura 5). Estes dados demonstram que ambos os genes, *NRGN* e *OLFM1*, parecem ter uma expressão bem maior ser em cérebro normal do que nos demais tecidos normais analisados.

De acordo com a ferramenta *Monochromatic SAGE/cDNA Virtual Northern* (<http://cgap.nci.nih.gov/Tissues/VirtualNorthern?TEXT=0&ORG=Hs&CID=52411>), disponível no *site* do *CGAP*, o tecido em que *NRGN* está mais expresso é cérebro

(47 *ESTs* / 200.000), apresentando também expressão em cólon (12 *ESTs* / 200.000) e pulmão (10 *ESTs* / 200.000). Os dados de *SAGE* também disponibilizado na mesma ferramenta do *site* do *CGAP*, também demonstram que o gene o *NRGN* é bastante expresso em cérebro normal (285 *SAGEtags* / 200.000), moderadamente expresso em pulmão normal (29 *SAGEtags* / 200.000) e pouco expresso em glândula mamária (1,3 *SAGEtags* / 200.000).

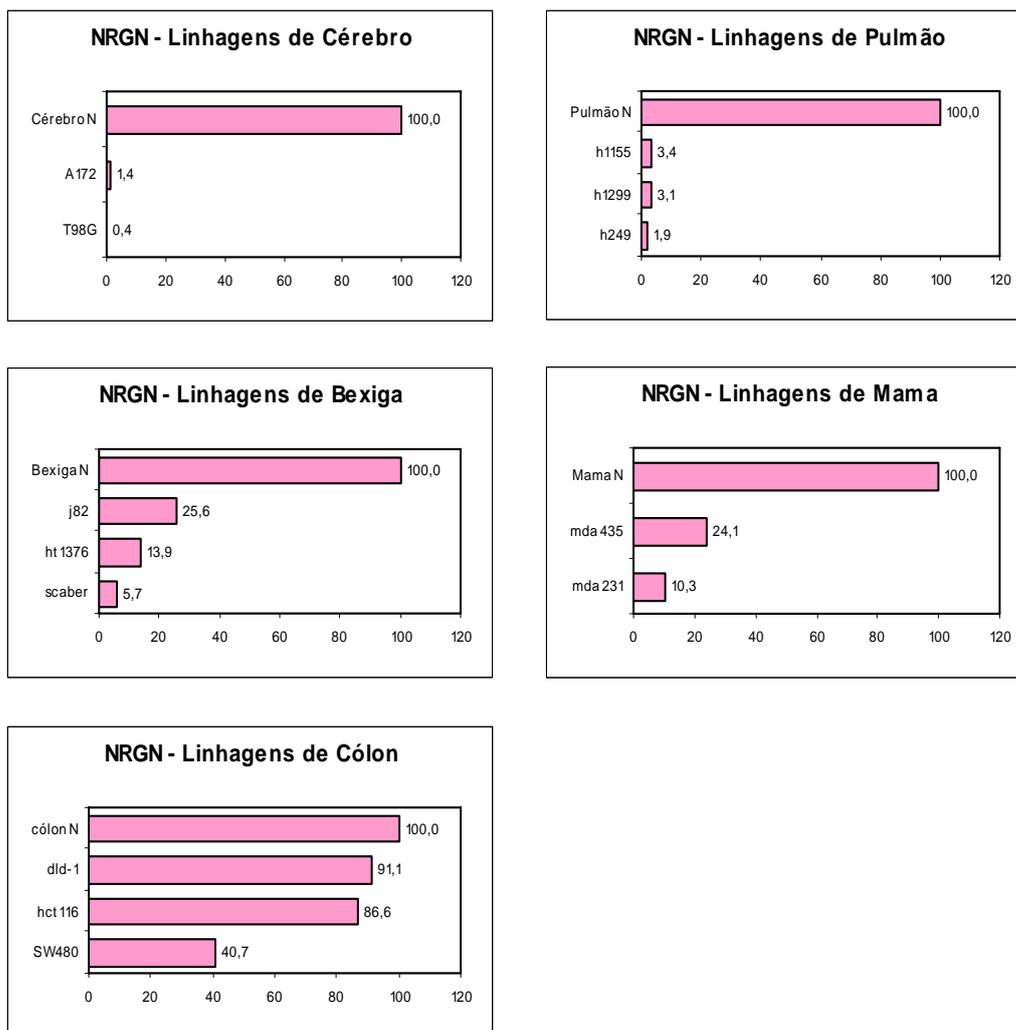
De acordo com os dados de *ESTs*, o gene *OLFMI* é bastante expresso em cérebro (265 *ESTs* / 200.000) e pouco expresso em pulmão (3,9 *ESTs* / 200.000). Os dados de *SAGE* também confirmam esta alta expressão em cérebro (75 *SAGEtags* / 200.000). Segundo estes mesmos dados, este gene possui uma baixa expressão em glândula mamária (4,5 *SAGEtags* / 200.000).



**Figura 5** - Quantificação relativa através de PCR em tempo real dos níveis de expressão dos genes (A) *NRGN* e (B) *OLFM1* em diferentes tecidos normais. Para estes experimentos utilizou-se tecidos normais de cérebro, pulmão, mama, bexiga e cólon obtidos comercialmente (*Clontech*). Os níveis de expressão relativa foram determinados em relação a expressão em cérebro normal utilizando-se a equação  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Os valores estão expressos em uma unidade arbitrária (U).

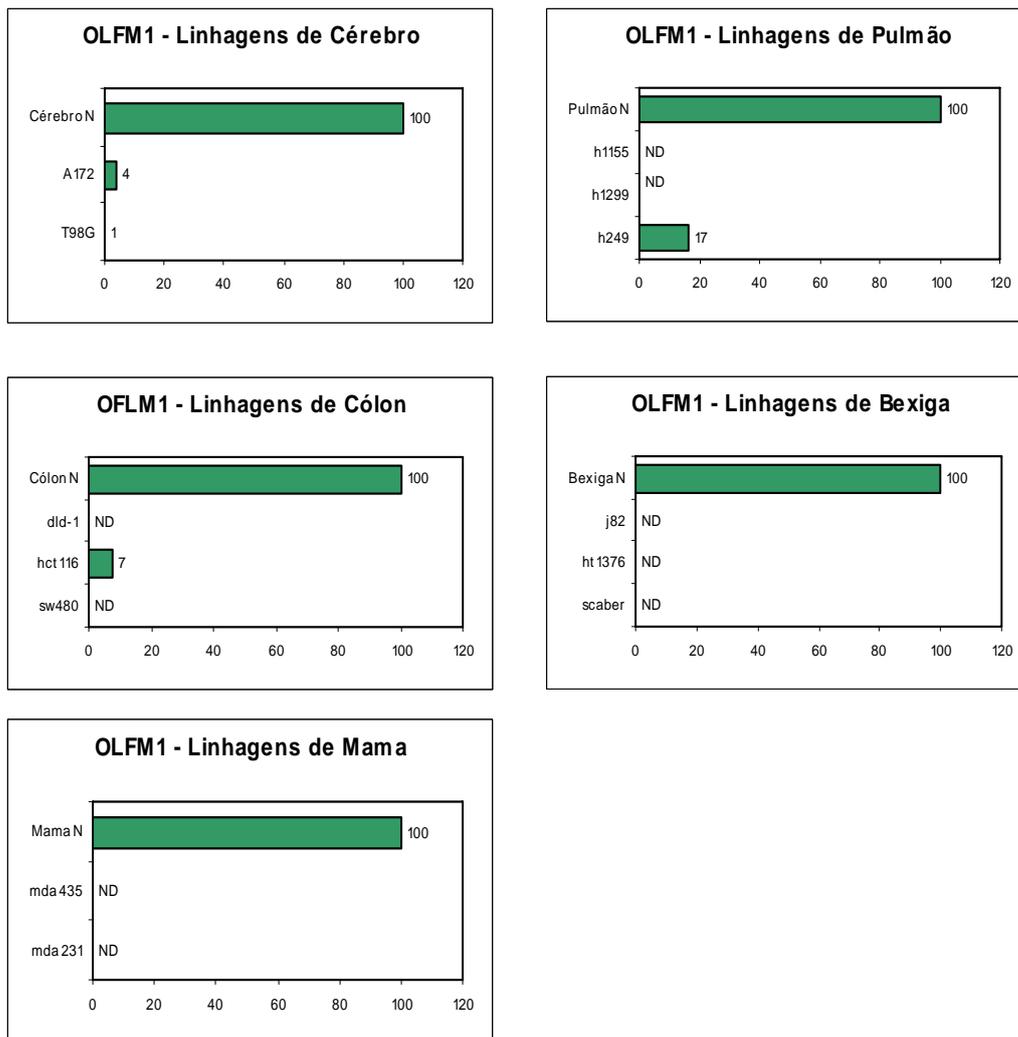
O passo seguinte foi verificar o nível de expressão desses genes nas diferentes linhagens celulares tumorais. Nestes experimentos, sempre foram utilizados como referência os níveis de expressão obtidos nos tecidos normais correspondentes. Conforme a figura 6, o gene *NRGN* apresentou uma baixa expressão nas linhagens derivadas de glioblastoma multiforme (A172 e T98G) (menos de 2U) e nas linhagens tumorais derivadas de pulmão (H1299, H1155 e

H249) (menos de 4U). Algumas das linhagens derivadas de tumor de bexiga (J82) e de mama (MDA-MB-435) apresentaram um nível de expressão moderado deste gene (cerca de 25U), enquanto que, as linhagens derivadas de tumor de cólon (DLD-1 e HCT116) apresentaram níveis de expressão do gene *NRGN* semelhantes aos observados no tecido normal correspondente. Estes dados parecem indicar que existe uma grande diminuição no nível de expressão do gene *NRGN* nos tumores de cérebro e de pulmão, uma moderada diminuição nos tumores de bexiga e de mama e uma redução discreta nos tumores de cólon. Outros experimentos, utilizando amostras tumorais precisam ser realizados para confirmar estas suspeitas.



**Figura 6** – Quantificação relativa através de PCR em tempo real dos níveis de expressão do gene *NRGN* em diferentes linhagens tumorais. Foram utilizadas linhagens celulares tumorais derivadas de cérebro (T98G e A172), pulmão (H1299, H1155 e H249), mama (MDA-MB-231 e MDA-MB-435), bexiga (J82, H1376 e SCABER) e cólon (DLD-1, HCT116 e SW480). A expressão relativa foi calculada em relação aos respectivos tecidos normais utilizando-se a equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Os valores estão expressos em uma unidade arbitrária (U).

O gene *OLFMI* também se apresentou hipo-expresso (menos de 5U) nas linhagens derivadas de glioblastoma multiforme (A172 e T98G) em relação ao tecido cerebral normal. Na maioria das outras linhagens tumorais avaliadas, o nível de expressão desse gene foi muito baixo e, por diversas vezes, não pôde se quer ser determinado, pois estava abaixo do nível de sensibilidade do aparelho (Figura 7).



**Figura 7** – Quantificação relativa através de PCR em tempo real dos níveis de expressão do gene *OLFM1* em diferentes linhagens tumorais. Foram utilizadas linhagens celulares tumorais derivadas de cérebro (T98G e A172), pulmão (H1299, H1155 e H249), mama (MDA-MB-231 e MDA-MB-435), bexiga (J82, H1376 e SCABER) e cólon (DLD-1, HCT116 e SW480). A expressão relativa foi calculada em relação aos respectivos tecidos normais utilizando-se a equação  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Os valores estão expressos em uma unidade arbitrária (U).

#### 4.6 IDENTIFICAÇÃO DAS ILHAS DE CpG

Para a identificação das possíveis ilhas de CpG existentes nas regiões promotoras dos genes *NRGN* e *OLFM1* foram utilizadas as ferramentas disponíveis *on line* nos sites *UCSC Genome Bioinformatics* (<http://genome.cse.ucsc.edu>), *MethPrimer* (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) e *EMBL-EBI CpGPlot* (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>). Para a identificação das ilhas CpGs foi adotado o mesmo critério definido por TOYOTA et al. (1999), ou seja, tamanho da ilha CpG maior que 200pb, porcentagem de CG maior que 50% e que a proporção entre CG e GC seja maior que 60%. Para os estudos posteriores, as seqüências consenso obtidas pela comparação das seqüências identificadas por cada um dos três *sites* foram consideradas como sendo as ilhas de CpG presentes em cada um dos genes.

Desta forma, foi possível identificar uma ilha de CpG (57 CpGs) ao longo de 698 nucleotídeos compreendendo parte promotor, do primeiro exon e do primeiro intron do gene *NRGN* (figura 8). No gene *OLFM1* a ilha com 62 CpGs foi identificada ao longo de 451 nucleotídeos do gene compreendendo parte promotor e do primeiro exon (figura 8).

**A**

gctcatgtagacagatcgataatagatacgtcatgccgacagcttgagttgggtgactgtccgtgtgctgctgta  
 gcgcgcgggcgcccgcaacaggtgtccgcatttacctgcaactgaagggtgctgctagttatTTTTgcaggttgta  
 tctgcagtgctgtatgctggaagaaggcctgggaaaatcatalgtggacatgtggggcttgtgagcttttgtgtg  
 gacgcatgcccacgcccaggtgtaccaacaggtttctccgtctgtagcaggagtgatgatgagacctttttaccg  
 ccggttagggagccttctttgaggactgagggggagtgaagtgaaggagccatatttgggactcctgctaggt  
 tgtggaagtatggagggatgggtgaggggtgctggttttctctgagcgggagtaggtgctgtgcccagatgtggg  
 tgtttgtgctcgggggtg**cgggggcctccttctgctactc**cggcg**tacatctgctggcagctg**cg**cctagca**  
**agccaggggattg**cgcccg**gggagatggagtggttaggaggcttgatacaag**cg**tgtagg**cg**gagggctggggc**  
**aggag**cg**gggag**cg**cg**cg**gagagagc**cg**cgagaggg**cg**tggccctccCTCCACTTCTCC**CG**CCACCTGC**CG**GA**  
**GGCTGCTCCTGATTGGCTTCC**CG**CC**CG**GGGGCTCAGGTTACATT**CG**CGAG**CG**GAG**CG**AG**CG**CGGAGAC**CG**GAC**  
**CCGAGAGCAGAGCTGCTGTTTT**CG**CG**CG**GGT**CG**GCTGG**CG**CC**CG**ACTGCCCCAGAGCCCCAC**CG**CACACACA**  
**GACCCACCC**CG**CCCTG**CG**CCAGCCTT**CG**TCC**CG**CAGAGGACCC**CG**ACACCAGC**AT**GGACTGCTGCAC**CG**ta**  
 agtttagagggcc**cg**ggggaggggcacttgg**cg**gggt**cg**ctg**cg**agaggg**cg**cctgagaaagccctggaggg**cg**gaga  
 gagggtggaagtggatgcggaagacctaggagcagaaagaaaagggtccttgc**cg**agag**cg**tgggtggatgg  
 tggaaagg**cg**cc**cg**gacttggaaagccctaggaataatgctcctcaact**cg**cggggg**cg**tctgag**cg**ccat**cg**  
 ttagacagcctaggtggactggga**g**ct**cg**gcagggtctgcaagaggggaact**cg**gggttggatgacaggaggaa  
 ctctctcccagtgagag**cg**ctggcaaccat**cg**cctggagacactgcag**cg**actcctcctcc**cg**tcttt**cg**gccc  
 cacc**cg**ttccccatcccactg**cg**cg**cg**t**cg**gtggg**cg**gacaggctgatcctcatgaccctccaa**cg**at**cg**cct  
 aag**cg**cctgtgcbag**cg**caggctggtccatatt

**B**

actcatcagggtgctgctgcccaggtgaccagggttctaacctggcttccctccctgacccctcctcctggaaacatc  
 ctctcctgaccagcctcagtttacctcattgaagggtgaattttaaggaccattcagcttttatctcctgtcact  
 ccatagacatcaagacttaacatcccatccctcccactcccagctgtcattcccccccccaatctctcgccact  
 ccctgtccagggcccaggtccccagcgcgggcaaccctctgtccccattcccgggacctggagcccgcgagggc  
 tcaggccggccaggtatggagttctctatcccagttcaatttccccgcctttttgatgtcacatcctgtcccagcc  
 tgcttccc**cg**cg**cg**cg**cg**cctcctcccc**cg**ggagagag**cg**agg**cg**cg**cg**gggtccctctg**cg**ccacc**CG**CCCC  
**CG**CCCC**TT**CC**CG**AGCAA**ACT**TTTTGGCACCCAC**CG**CAGCCCAG**CG**CG**CG**T**TC**GTGCTCC**CG**CAGGG**CG**CG**CG**CCTCTCTCC  
**G**CCA**AT**GCCAGG**CG**CG**CG**GGGGAGCCATTAGGAGG**CG**AGGAGAGAGGAGGG**CG**CAGCTCC**CG**CCAGCCAGCCCT  
 GCCCAGCCCTGCC**CG**GAGGCAGAC**CG**CG**CG**CGGA**ACC**GGGAC**CG**CG**CG**ATAAATATGCAGAG**CG**GAGGCT**TC**CG**CG**CAGCAG  
 AGCC**CG**CG**CG**CC**CG**CTCCGGGTGCTGAATCCAGGCGTGGGGACAC**CG**AGCCAGG**CG**CG**CG**CG**CG**CGGAGCCAG**CG**  
 GAGCC**CG**GGCCAGAGCC**CG**GAG**CG**CG**CG**TCC**CG**CGTCCAC**CG**CAGCC**CG**CG**CG**CG**CG**CGCCAGCACCCAGGGCCCTGCATGCCA  
 GGT**CG**TTGGAGGTGGCAG**CG**AGACATGCACCC**CG**CC**CG**GAA**AG**CTCCTCAGCCTCCTTCTCCTCCTCCTGATGGGCA  
 CTGAACTACTCAAgtacgtgcatccaacgccatttctcctcctgcccagg**cg**cc**cg**gccc**cg**gcccct**cg**gggagccc  
 caaaagtc**cg**gggaa**cg**gctctggctc**cg**cg**cg**cccc**cg**cgcccc**cg**gctggg**cg**cc**cg**gaagtgc**cg**gggttggg  
 gagggggccaggg**cg**ttaggtggacctgggtgggagggga

**Figura 8** - Ilhas de CpG presentes nas regiões promotora dos genes *NRGN* e *OLFM1*. Em letras maiúsculas encontra-se indicado o primeiro exon enquanto que as letras minúsculas indicam a região promotora e parte do primeiro intron. Os dinucleotídeos CpG presentes nesta região estão destacados em negrito. O códon ATG de início de tradução esta sublinhado. A região consenso para ilha de CpG identificada pelas ferramentas disponíveis nos *sites UCSC Genome Bioinformatics, MethPrimer e EMBL-EBI CpGPlot* está demarcada pelo quadrado cinza. **(A)** gene *NRGN* e **(B)** gene *OLFM1*.

#### **4.7 TRATAMENTO DE LINHAGENS CELULARES COM 5-AZA-DEOXCITIDINA**

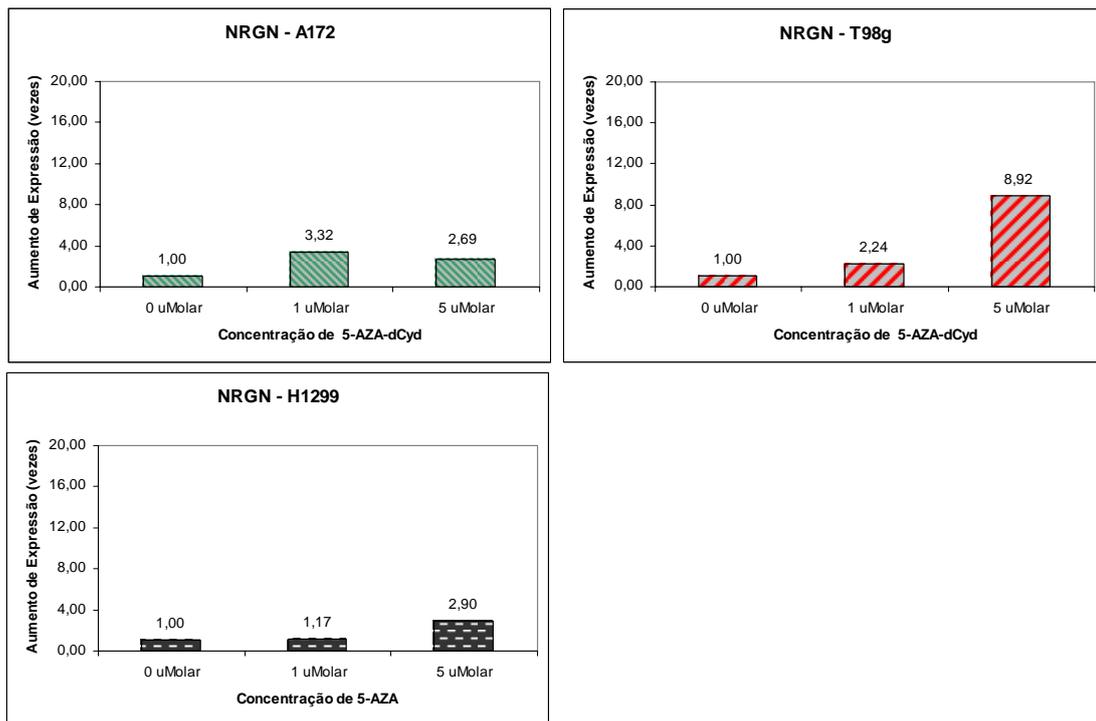
A 5-Aza-deoxicitidina (5-Aza-dC) é classicamente descrita como sendo uma droga capaz de inibir a ação da DNMT1, enzima responsável pela metilação dos dinucleotídeos CpGs. Portanto, o tratamento com este agente desmetilante pode reverter o silenciamento gênico causado pela metilação, promovendo a reativação da expressão de genes que estão sob o controle deste tipo de mecanismo (KARPF e JONES 2002).

Para verificar se a diminuição no nível de expressão dos genes *NRGN* e *OLFM1* observada nos tumores astrocíticos através dos experimentos de PCR em tempo real poderia ser causada por metilação das ilhas de CpG presentes nestes genes, três linhagens celulares, duas cerebrais (A172, T98G) e uma de pulmão (H1299), que apresentavam baixa expressão destes genes, foram submetidas ao tratamento com 5-Aza-dC. Estas culturas celulares foram tratadas com concentrações crescentes de 5-Aza-dC (0, 1, 5 $\mu$ M) durante 4 dias consecutivos e, em seguida, foi realizada a extração de RNA total e síntese de cDNA. O nível de expressão dos genes *NRGN* e *OLFM1* em cada um dos tratamentos a que cada linhagens foi submetida foi quantificado por PCR em tempo real. Nas 3 linhagens analisadas foi possível detectar um aumento de expressão em ambos os genes após o tratamento com o agente desmetilante em relação às culturas celulares que não receberam o tratamento com a droga. O gene *NRGN* apresentou um aumento na expressão de 3,3 vezes na linhagem A172, de 8,9 vezes na linhagem T98G e de 2,9 vezes na linhagem H1299

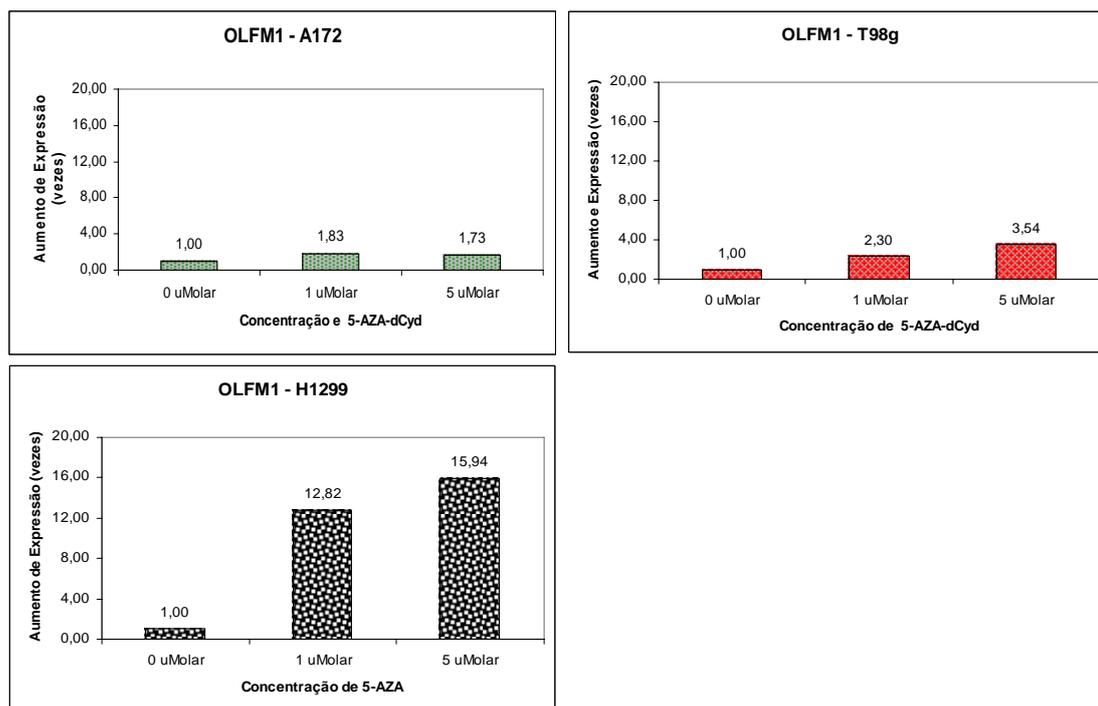
(Figura 9). Enquanto que, o gene *OLFM1* apresentou um aumento de expressão de 1,8 vezes na linhagem A172, de 3,5 vezes na linhagem T98G e de 15,9 vezes na linhagem H1299 (Figura 10).

Em uma situação ideal, quanto maior a concentração de 5-Aza-dC, maior a desmetilação e, conseqüentemente, maior a reativação da expressão gênica. Entretanto, quanto maior for a concentração de 5-Aza-dC, maior será também a morte celular devido a citotoxicidade causada por esta droga. Os resultados obtidos nestes experimentos sugerem que para a linhagem A172, o efeito máximo foi atingido com 1 $\mu$ M de 5-Aza-dC, enquanto que para as linhagens T98G e H1299 o maior nível de reativação gênica foi conseguido com 5 $\mu$ M de 5-Aza-dC.

Os resultados obtidos neste experimento reforçam a hipótese de que a hipermetilação pode ser um dos mecanismos envolvidos com o controle da expressão dos genes *NRGN* e *OLFM1*.



**Figura 9** - Quantificação dos níveis de expressão do gene *NRGN* por PCR em tempo real após tratamento das linhagens celulares com 5-Aza-dC. As linhagens celulares A172, T98G e H1299 foram tratadas por 4 dias consecutivos com diferentes concentrações de 5-Aza-dC (0, 1, 5 $\mu$ M). Os números acima de cada barra representam o aumento de expressão (em número de vezes) observado após cada tratamento com 5-Aza-dC em relação a linhagem não-tratada (0 $\mu$ M).



**Figura 10** – Quantificação dos níveis de expressão do gene *OLFM1* por PCR em tempo real após tratamento das linhagens celulares com 5-Aza-dC. As linhagens celulares A172, T98G e H1299 foram tratadas por 4 dias consecutivos com diferentes concentrações de 5-Aza-dC (0, 1, 5  $\mu$ M). Os números acima de cada barra representam o aumento de expressão (em número de vezes) observado após cada tratamento com 5-Aza-dC em relação à linhagem não-tratada (0  $\mu$ M).

## 4.8 AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DAS ILHAS DE CpG

Para se determinar o perfil de metilação dos genes *NRGN* e *OLFM1* e identificar quais são os dinucleotídeos CpG que realmente encontram-se metilados, a estratégia idealizada foi (1) tratar com Bissulfito de Sódio os DNAs da linhagem celular T98G e A172 (tratada e não-tratada com 5 $\mu$ M 5-Aza-dC), (2) amplificar as regiões que contêm as ilhas CpG de ambos os genes; (3) clonar estes fragmentos no vetor *pGEM-T* e (4) sequenciar 6 clones de cada.

Os DNAs das linhagens celulares T98G e A172 não-tratadas com 5-Aza-dC foram extraídos e tratados com Bissulfito de Sódio conforme descrito em Material e Métodos. Para a amplificação das ilhas de CpG presentes nos genes *NRGN* e *OLFM1* a abordagem adotada foi a de *nested PCR*, ou seja, foram realizadas duas reações sendo que a segunda foi feita com *primers* internos aos primeiros e utilizou-se o produto da primeira PCR como molde. Para isso, dois pares de *primers* foram desenhados para cada gene em regiões que não tivessem dinucleotídeos CG, assim o anelamento dos *primers* ocorrerá de forma independente ao padrão de metilação da região.

Para o gene *NRGN*, o primeiro par de *primers* foi desenhado nas posições -509/-484pb(*NRGN* GF) e +301/+335 (*NRGN* GR), sendo que, a posição +1 corresponde ao nucleotídeo “A” do códon ATG de início de tradução. O segundo par de *primers* foi desenhado nas posições -453/-428 (*NRGN* PF) e +243/+268 (*NRGN* PR). O fragmento do gene *NRGN* amplificado com esta estratégia tem 724pb e

contém todos os 57 CpGs presentes na ilha de CpG consenso identificada pelos 3 *sites* consultados.

Para o gene *OLFM1*, o primeiro par de *primers* foi desenhado nas posições -316/-283pb (*OLFM1 GF*) e +335/+370 (*OLFM1 GR*), sendo que, a posição +1 corresponde ao nucleotídeo “A” do códon ATG de início de tradução. O segundo par de *primers* foi desenhado nas posições -221/-195 (*OLFM1 PF*) e +272/+300 (*OLFM1 PR*). O fragmento amplificado (524pb) contém todos os 62 CpGs presentes na ilha de CpG consenso.

Após a amplificação, os fragmentos contendo as ilhas de CpG presentes nos promotores dos genes *NRGN* e *OLFM1* foram clonados no vetor *pGEM T (Promega)* e alguns clones foram seqüenciados utilizando-se o kit *Big Dye terminator sequencing (Applied Biosystems)*.

Nenhum dos clones do gene *NRGN* derivados da linhagem A172 não-tratada com 5-Aza-dC apresentaram CpGs metilados (Figura 11). O seqüenciamento de 6 clones do gene *NRGN* derivados da linhagem T98G não-tratada com 5-Aza-dC mostrou que um clone não apresentou qualquer CpG metilado, 4 clones apresentaram somente 1 CpG metilado e um clone apresentou 2 CpG metilados (Figura 11). Cabe ressaltar que o CpG na posição 2 apresentou-se metilado em 3 dos 6 clones analisados.

A seqüência do gene *OLFM1* foi obtida a partir de 6 clones da linhagem A172 não-tratada com 5-Aza-dC e 6 clones da linhagem T98G também não-tratada com 5-Aza-dC. Nenhum dos clones da linhagem A172 apresentou CpGs metilados, enquanto que, 2 clones da linhagem T98G apresentaram apenas 1 CpG metilado (Figura 11).

Estes resultados sugerem que, embora os experimentos com 5-Aza-dC tenham demonstrado haver um aumento no nível de expressão dos genes *NRGN* e *OLFM1* após o tratamento com esta droga desmetilante, aparentemente, os dinucleotídios CpG presentes na região consenso das Ilhas de CpG situadas na região promotora destes genes não se encontram hipermetilados nas linhagens celulares analisadas.



## 5 DISCUSSÃO

A técnica de *SAGE* está sendo utilizada para análise do transcriptoma de vários tipos de câncer na tentativa de se identificar vias metabólicas envolvidas na tumorigênese, de se desenvolver novas ferramentas que possam ser úteis para o diagnóstico ou prognóstico da doença, ou ainda, de se encontrar novos alvos terapêuticos (YE et al. 2002). Atualmente, há um grande volume de dados que foram gerados a partir de bibliotecas de *SAGE* que se encontram disponíveis em bancos de dados públicos e podem ser analisados por meio de ferramentas *on line*. Além de permitir a identificação dos transcritos presentes em um determinado tecido, o número de *SAGEtags* reflete de forma direta a abundância destes transcritos no tecido estudado. O banco de dados público de *SAGE* disponibilizado pelo *CGAP* conta atualmente com mais de 21 milhões de *SAGEtags* geradas a partir de 284 bibliotecas de diferentes tecidos normais e tumorais, sendo, por isso, uma excelente ferramenta para estudos de análise da expressão gênica.

Na tentativa de identificar alvos terapêuticos moleculares para o tratamento de astrocitomas malignos, BOON e colaboradores (2004) utilizaram o banco público de dados de *SAGE* para identificar genes diferencialmente expressos em astrocitomas quando comparados com tecido cerebral normal, principalmente genes altamente expressos associados a matriz extracelular e adesão celular. Foi utilizado para o estudo *in silico* os dados disponíveis de 32 bibliotecas de *SAGE* (8 derivadas de astrocitomas difusos, 10 de astrocitomas anaplásicos, 7 glioblastomas primários e 7 bibliotecas de tecido cerebral normal). Após as análises *in silico*, foram selecionados

para validação por PCR em tempo real 8 genes diferencialmente expressos nos astrocitomas difusos, 16 nos astrocitomas anaplásicos e 10 nos glioblastomas. Sendo que, utilizando-se como valor de corte um nível de expressão maior ou igual a 5 vezes, foram validados 3 genes nos astrocitomas difusos, 8 nos astrocitomas anaplásicos e 8 nos glioblastomas. Em seguida, foi realizado um experimento de *tissue microarray* com dois destes genes validados, *Aquaporin I* e *Topoisomerase 2A*, e os níveis de expressão protéica observados foi consistente com os níveis de expressão preditos por *SAGE* e por PCR em tempo real.

O primeiro objetivo do presente trabalho foi identificar genes diferencialmente expressos em glioblastomas por meio de pesquisa no banco de dados público de *SAGE*. Para isto, foram selecionados 3 bibliotecas de *SAGE* provenientes de tecidos cerebrais não neoplásicos e 4 bibliotecas de *SAGE* geradas a partir de glioblastoma. Das 4 bibliotecas derivadas de glioblastomas, 2 eram bibliotecas geradas a partir de linhagens celulares. É sabido que linhagens celulares podem apresentar um padrão de expressão gênica diferente do observado nos tecidos, pois, as células podem sofrer alterações no seu perfil de expressão gênica em resposta as alterações fisiológicas devido às condições de cultura *in vitro*. Apesar disto, o grupo do Projeto Genoma Clínico envolvido com a análise dos tumores astrocíticos optou por incluir estas bibliotecas na análise, adotando uma abordagem menos restritiva nesta fase inicial, e acreditando que caso a diferença de expressão observada para um determinado gene fosse em resposta ao estresse da cultura *per se* e não representasse um aumento ou diminuição da taxa de transcrição deste gene nos tumores em relação ao tecido normal, este candidato seria facilmente descartado no passo de validação com amostras tumorais de pacientes.

A análise das bibliotecas de *SAGE* derivadas de tecido cerebral normal e glioblastoma permitiu a seleção de 242 genes diferencialmente expressos em glioblastomas. Deste grupo de 242 genes, 13 genes foram selecionados para validação por PCR em tempo real em amostras de pacientes com tumores astrocíticos. Quatro destes genes foram analisados no Laboratório de Genética do Câncer do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (*CHI3L1*, *NRGN*, *OLFM1* e *TPM2*). Estes experimentos demonstraram que realmente estes genes se encontram diferencialmente expressos nas amostras tumorais em relação a tecido cerebral normal, corroborando os dados de *SAGE*.

No presente estudo, 93% das amostras de glioblastoma e 71% dos astrocitomas pilocíticos apresentaram uma hiper-expressão do gene *CH3IL1*. Este gene não apresentou hiper-expressão em nenhuma das amostras de astrocitoma difuso analisadas. O aumento de expressão deste gene (também chamado de *HCgp-39*) em amostras de glioblastoma também foi verificado por SHOSTAK e colaboradores (2003), que também utilizaram o banco de dados públicos de *SAGE* do *CGAP* para comparar o perfil de expressão gênica em glioblastoma e cérebro normal. Neste estudo, a hiper-expressão do gene *CH3IL1* em tecido tumoral foi confirmada por *northern blotting* e foi mostrado que sua expressão é mais pronunciada em glioblastoma e ocasionalmente em astrocitoma anaplásico. Outro estudo realizado por TANWAR e colaboradores (2002), utilizando a técnica de *cDNA microarray*, identificou uma alta expressão do gene *CHI3L1* em glioblastomas quando comparados com o controle de tecido cerebral normal.

Nos experimentos de quantificação da expressão dos genes *CH3IL1*, *NRGN* e *OLFM1* em amostras de pacientes portadores de tumores astrocíticos foi utilizado

como referência tecido cerebral normal (néocortex) de pacientes submetidos a cirurgia de epilepsia. Uma vez que, a origem celular dos astrocitomas (que derivam dos astrócitos) e do néocortex normal (constituído predominantemente por neurônios) é bastante distinta, é provável que o perfil de expressão gênica entre estes tecidos seja diferente. Por isso, talvez néocortex normal não seja a melhor referência para experimentos comparativos de expressão gênica envolvendo astrocitomas. Entretanto, devido a dificuldade em se conseguir tecido cerebral normal, a comparação entre ambos é a única possível de se feita e por isso vários estudos de expressão gênica diferencial em tumores astrocíticos vem sendo desenvolvidos comparando estes dois tecidos. Como exemplo, LOGING e colaboradores (2000) compararam bibliotecas de *SAGE* de glioblastoma multiforme e de tecido cerebral normal e selecionaram 11 genes diferencialmente expressos nestes tecidos. Os autores fizeram a validação por PCR em tempo real utilizando 27 amostras no total, dentre elas, 10 oriundos de pacientes com glioblastoma multiforme e 8 de tecido neuronal normal (néocortex). Em outro trabalho, RICKMAN e colaboradores (2001) estudaram os perfis de expressão gênica de gliomas de baixo e alto graus utilizando a técnica de *cDNA microarray*. Foram analisados 45 gliomas e 6 amostras de tecido cerebral normal oriundos do néocortex de lobo temporal de 6 adultos diferentes. Além disso, também é importante ressaltar que nos experimentos realizados o tecido cerebral normal foi utilizado como referência em todas as análises, desta forma, o desenho experimental adotado permite a comparação do nível de expressão gênica entre os diferentes graus de astrocitomas. Por exemplo, o gene *CHI3L1* está, em média, 115 vezes mais expresso nas amostras de glioblastoma do que no *pool* de tecido normal. Por outro lado, este gene apresenta, em média, um aumento de 2

vezes nas amostras de astrocitomas difusos, portanto, podemos inferir que este gene possui um aumento de expressão de cerca de 57 vezes nas amostras de glioblastomas em relação as amostras de astrocitoma difusos.

Do ponto de vista morfológico os três tipos de astrocitomas incluídos neste estudo são bastante distintos (COLLINS e REIFENBERGER 2004). Os astrocitomas pilocíticos (grau I) são tumores benignos que freqüentemente aparentam ser lesões císticas bem circunscritas e de crescimento lento, apresentando celularidade moderada a pouco aumentada, enquanto que, os astrocitomas difusos (grau II) mostram limites anatômicos mal definidos por causa de sua natureza infiltrativa e apresentam como característica típica, celularidade moderadamente aumentada, atipia nuclear pouco freqüente e raras mitoses (KLEIHUES e CAVENEE 2000). Já os glioblastomas são bastante diferentes dos astrocitomas pilocíticos e difusos, pois são tumores altamente invasivos e letais, com histologia variável e que geralmente mostram alto grau de anaplasia, hiper celularidade, alta atividade mitótica, necrose e/ou proliferação microvascular como principais características. Em alguns casos de glioblastoma secundário é possível visualizar focos de astrócitos neoplásicos diferenciados, resultantes da progressão de astrocitoma difuso (grau II) (KLEIHUES e CAVENEE 2000). Apesar destas diferenças morfológicas, os resultados gerados pelo presente trabalho mostram que 71% das amostras de astrocitomas pilocíticos e 93% das amostras de glioblastoma analisadas apresentaram hiper-expressão do gene *CHI3LI*, enquanto que, em nenhuma das amostras de astrocitomas difusos se observou este comportamento. Além disto, todas as amostras de astrocitomas pilocíticos e de glioblastoma apresentaram diminuição da expressão do gene *NRGN*, entretanto isto aconteceu somente em 62% das amostras astrocitomas difusos. Padrão

semelhante também pode ser observado para o gene *OLFMI*, o qual se apresentou hipo-expresso em mais de 70% das amostras de astrocitomas pilocíticos e de glioblastomas, sendo que o mesmo somente ocorreu em 12% das amostras de astrocitomas difusos. Resultados similares a estes também foram obtidos para os genes *Galectin 3*, *Apolipoprotein E* e *MAPK8 Interacting protein 1*, avaliados no mesmo grupo de amostras por outros laboratórios participantes do Projeto Genoma Clínico (MARIE et al., 2005 – Anexo 2). Todos estes dados reunidos sugerem que deve haver uma maior semelhança entre os perfis de expressão gênica dos glioblastomas e dos astrocitomas pilocíticos do que com o perfil dos astrocitomas difusos. Entretanto, cabe ressaltar que estes dados foram gerados a partir da análise de um pequeno número de genes em um grupo restrito de amostras tumorais. Estudos mais amplos e aprofundados precisam ser realizados para que se tenha uma melhor compreensão destes dados e se possa comprovar a relevância deste achado.

Com o intuito de verificar se a diminuição no nível de expressão dos genes *NRGN* e *OLFMI* observada nos tumores astrocíticos poderia ser um efeito da hipermetilação da região promotora desses genes, linhagens celulares derivadas de glioblastoma (A172 e T98G) e de tecido pulmonar neoplásico (H1299), que apresentavam baixa expressão destes genes, foram tratadas com 5-Aza-dC, um conhecido agente desmetilante. Após o tratamento, foi possível detectar um aumento de 1,8 a 15,9 vezes no nível de expressão de ambos os genes nas 3 linhagens analisadas. O nível de reativação da expressão dos genes *NRGN* e *OLFMI* foi similar ao descrito por outros grupos para este tipo de experimento. Por exemplo, YOUSSEF e colaboradores (2004) observaram que o tratamento com 5-Aza-dC (1  $\mu$ M) por 5 dias reativou a expressão do gene *TIG1* em até 3 vezes em 3 linhagens celulares

derivadas de cólon quando comparadas com as respectivas linhagens não-tratadas. Em outro trabalho, NISHIOKA e colaboradores (2002) avaliaram 14 linhagens celulares derivadas de câncer de pulmão e em 11 delas houve re-expressão do gene *MYO18B* (variando ente 2 e 15 vezes) quando comparada com as linhagens não-tratadas. Já no estudo realizado por AKAHIRA e colaboradores (2004), a expressão do gene *TMSI* sofreu um aumento de 8 a 12 vezes na linhagem celular derivada de câncer de ovário OV90 após tratamento com 5-Aza-dC (0,5 e 1  $\mu$ M) por 3 dias.

O DNA das linhagens celulares A172 e T98G não-tratadas com 5-Aza-dC foram extraídos e tratados com Bissulfito de Sódio. Fragmentos de DNA contendo as ilhas CpGs situadas nas regiões promotoras dos genes *NRGN* e *OLFM1* foram amplificados, clonados e seqüenciados. A análise das seqüências geradas mostrou que, em ambos os genes, a grande maioria dos dinucleotídeos CpGs presentes nas ilhas de CpG não estavam metilados. Estes resultados sugerem que a diminuição do nível de expressão dos genes *NRGN* e *OLFM1* observada nas amostras de astrocitomas não deve estar diretamente relacionada a hipermetilação de suas regiões promotoras. Outros grupos de pesquisa também obtiveram resultados semelhantes, ou seja, genes que apresentaram uma reativação da expressão gênica após o tratamento com agentes desmetilantes, como 5-Aza-dC, e que não possuíam dinucleotídeos CpG metilados em suas regiões promotoras. SCHMELZ e colaboradores (2004) utilizaram a técnica de *cDNA microarray* para investigar as mudanças globais de expressão gênica de células derivadas de LMA e MDS após tratamento com 5-Aza-dC. Essa droga induziu expressão de 81 dos 22.000 genes analisados, sendo que o padrão de metilação da região promotora de 5 destes genes (*RPGR*, *CD14*, *PTPN22*, *calgranulina* e *MPO*) foi analisado. Após o

seqüenciamento de suas regiões promotoras (a partir de DNA genômico de linhagem derivada de LMA não-tratada com 5-Aza-dC), não foi possível detectar a presença de dinucleotídeos CpGs metilados nas regiões promotoras dos genes *RPGR*, *CD14*, *PTPN22*, *calgranulina*. Os autores sugerem que a indução de expressão desses genes após o tratamento com 5-Aza-dC deva ser resultado da desmetilação e conseqüente ativação de elementos regulatórios *upstream* a esses genes. Em outro estudo, ZHU e colaboradores (2001) observaram que os genes *CDKN2A* e *CDKN2D* estavam hipopressos em duas linhagens celulares de câncer de pulmão (H23 e H719), investigando o *status* de metilação destes genes, estes autores demonstraram que a região promotora do gene *CDKN2A* estava metilada enquanto que a ilha CpG situada no promotor do gene *CDKN2D* encontrava-se desmetilada. Após tratamento destas linhagens celulares com 5-Aza-dC, ambos os genes apresentaram um aumento no nível de expressão. Segundo estes autores, a indução de expressão do gene *CDKN2D*, que não possui resíduos metilados em sua região promotora, observada após o tratamento com 5-Aza-dC pode ser explicada pelo fato deste gene poder estar sob o controle de fatores de transcrição codificados por genes que possuam a região promotora metilada ou que a desmetilação de um *enhancer*, elemento regulatório fora da região promotora, poderia promover o aumento da expressão observado. NGUYEN e colaboradores (2002), estudando o promotor do gene *p16*, demonstraram que o tratamento com 5-Aza-dC causa uma substancial desmetilação do promotor deste gene levando a uma reativação da expressão gênica. Segundo estes autores, esta reativação é precedida por uma remodelagem da cromatina na região do promotor do gene, a qual é causada por uma drástica diminuição dos níveis de metilação das lisina 9 da histona H3 (H3-K9) e por um aumento do nível de

acetilação das H3-K9 e metilação das H3-K4. Analisando *status* de metilação do promotor do gene *p14<sup>ARF</sup>*, os mesmos autores verificaram que este gene se encontra normalmente desmetilado e que o tratamento com 5-Aza-dC não causa um aumento de expressão deste gene. Entretanto, através de ensaios de imunoprecipitação de cromatina (ChIP), estes autores notaram uma aumento no nível de acetilação das H3-K9 e de metilação das H3-K4. Diante destes resultados, os autores concluem que o tratamento com 5-Aza-dC induz o remodelamento regional da estrutura da cromatina, reduzindo os níveis de metilação das H3-K9 e aumentando os níveis de acetilação das H3-K9 e de metilação das H3-K4, de modo independente do seu efeito sobre a metilação das citosinas.

Estes resultados permitem a formulação de três possíveis hipóteses para explicar o aumento de expressão dos genes *NRGN* e *OLFMI* observado após o tratamento com 5-Aza-dC apesar destes genes não possuírem CpGs metilados em suas regiões promotoras. (1) O tratamento com 5-Aza-dC pode estar promovendo a desmetilação de promotores que controlam ativadores transcricionais dos genes *NRGN* e *OLFMI* e, desta forma, induzindo a expressão destas proteínas. Se isso for correto, é a presença destes ativadores transcricionais e não a desmetilação direta dos promotores dos genes *NRGN* e *OLFMI*, que induz o aumento de expressão destes genes nas linhagens celulares tratadas com a droga desmetilante. (2) Pode ser que o tratamento com 5-Aza-dC tenha causado a desmetilação de *enhancers*, e com isso, estes elementos regulatórios puderam promover um aumento do nível de expressão dos genes *NRGN* e *OLFMI*. (3) A terceira hipótese seria de que o tratamento com 5-Aza-dC poderia estar induzindo a desmetilação e a acetilação das H3-K9 e a metilação das H3-K4, desta forma, promoveria um remodelamento da cromatina,

tornando-a menos condensada e permitindo o acesso de ativadores da transcrição aos sítios de ligação presentes nos promotores dos genes *NRGN* e *OLFM1e*, com isso, induzindo um aumento de expressão destes genes.

## 6 CONCLUSÕES

1. Os dados de três bibliotecas de *SAGE* geradas a partir de tecido cerebral não-neoplásico e quatro bibliotecas de *SAGE* geradas a partir de glioblastoma disponíveis no banco de dados públicos de *SAGE* do *CGAP* foram comparados e 242 genes diferenciamamente expressos em glioblastoma foram selecionados. Deste grupo, treze genes foram eleitos para terem sua expressão diferencial validada por PCR em tempo real. Os genes *tropomiosin beta 2 (TPM2)*, *neurogranin (NRGN)*, *chitinase 3 like 1 (CHI3L1)* e *olfactomedin 1 (OLFM1)* foram avaliados no Laboratório de Genética do Câncer do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer e fizeram parte deste estudo.
2. Os níveis de expressão (hiper-ou hipo-expressos) dos três genes (*CHI3L1*, *NRGN* e *OLFM1*) determinados pelos experimentos de PCR em tempo real foram semelhantes aos dados preditos pela análise de *SAGE*.
3. A análise da expressão gênica através de experimentos de PCR em tempo real demonstrou que o gene *CHI3L1* estava hiper-expresso em 71% das amostras de astrocitomas pilocíticos e em 93% das amostras de glioblastomas analisadas. Este gene não apresentou aumento de expressão em nenhuma das amostras de astrocitomas difusos.
4. A análise da expressão gênica através de experimentos de PCR em tempo real demonstrou que o gene *NRGN* encontrava-se hipo-expresso em 62% das

amostras de astrocitomas difusos e em 100% das amostras de astrocitomas pilocíticos e de glioblastomas.

5. A análise da expressão gênica através de experimentos de PCR em tempo real demonstrou haver uma diminuição da expressão do gene *OLFMI* em mais de 70% das amostras de astrocitomas pilocíticos e de glioblastomas, e em 12% das amostras de astrocitomas difusos.
6. Os resultados da análise de expressão gênica dos três genes incluídos neste estudo (*CH3IL1*, *NRGN* e *OLFMI*) e de outros três genes avaliados nas mesmas amostras por outros laboratórios participantes do Projeto Genoma Clínico (*MAPK8IP1*, *LGALS3* e *APOE*) sugerem haver uma maior semelhança entre os perfis de expressão gênica dos astrocitomas pilocíticos (grau I) e glioblastomas (grau IV) do que com astrocitomas difusos (grau II).
7. Os genes *NRGN* e *OLFMI* apresentaram uma alta expressão em tecido cerebral normal em relação ao nível de expressão observado nos tecidos normais de bexiga, pulmão, cólon e mama.
8. O gene *NRGN* apresentou uma diminuição de expressão nas linhagens tumorais de cérebro, mama, pulmão e bexiga em relação a seus tecidos normais correspondentes. O nível de expressão do gene *NRGN* nas linhagens tumorais de cólon foram semelhantes aos observados no tecido normal correspondente. O gene *OLFMI* apresentou hipo-expressão em todas as linhagens analisadas em relação aos tecidos normais correspondentes.

9. Foi possível encontrar ilhas de CpG nos promotores dos genes *NRGN* (698 nucleotídeos com 57 CpGs) e *OLFM-1* (451 nucleotídeos com 62 CpGs).
10. O tratamento das linhagens T98G, A172 e H1299 com 5-Aza-dC foi capaz de induzir um aumento de expressão de mais de 8 vezes do gene *NRGN* e de quase 16 vezes do gene *OLFM-1*.
11. As ilhas de CpGs presentes nos promotores dos genes *NRGN* e *OLFM1* foram seqüenciadas utilizando DNA das linhagens A172 e T98G não-tratadas com 5-Aza-dC. Não foi detectada metilação na maioria dos dinucleotídeos CpGs presentes em ambos os promotores gênicos. Por isso, não foi possível estabelecer uma correlação direta entre a diminuição do nível de expressão observada nos genes *NRGN* e *OLFM1* nas amostras de tumores astrocíticos e a hipermetilação da região promotoras desses genes.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akahira J, Sugihashi Y, Ito K, Niikura H, Okamura K, Yaegashi N. Promoter methylation status and expression of TMS1 gene in human epithelial ovarian cancer. **Cancer Sci** 2004; 95:40-3.

Altman DG. **Practical statistics for medical research**. Londres: Chapman & Hall, 1991. Teste de comparação de proporção, p.234-35.

Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cell Mol Life Sci** 2002; 59:241-57.

Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentien AF, Delattre JY. Primary brain tumors. **Lancet** 2003; 361:323-31.

Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. **Clin Chem** 2002;48:1178-85.

Boon K, Edwards JB, Eberhart CG, Riggins GJ. Identification of astrocytoma associated genes including cell surface markers. **BMC Cancer** 2004; 4:39.

Chrigwin MJ, Przybyla EA, MacDonald R, Rutter J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. **Biochemistry** 1979; 18:5294-9.

Collins VP. Cellular mechanisms targeted during astrocytoma progression. **Cancer Lett** 2002; 188:1-7.

Goldenberg D, Harden S, Masayeva BG, et al. Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2004; 130:39-44.

Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Lomas J, et al. Epigenetic changes in pilocytic astrocytomas and medulloblastomas. **Int J Mol Med** 2003a; 11:655-60.

Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Arjona D, et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in astrocytic gliomas. **Int J Oncol** 2003b; 22:601-8.

Herman JG, Baylin SB. Promoter-region hypermethylation and gene silencing in human cancer. **Curr Top Microbiol Immunol** 2000; 249:35-54.

Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science** 2001; 293:1068-70.

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

Kamiryo T, Tada K, Shiraishi S, Shinojima N, Kochi M, Ushio Y. Correlation between promoter hypermethylation of the O6-methylguanine-deoxyribonucleic acid methyltransferase gene and prognosis in patients with high-grade astrocytic tumors treated with surgery, radiotherapy, and 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea-based chemotherapy. **Neurosurgery** 2004; 54:349-57.

Karavanich CA, Anholt RR. Molecular evolution of olfactomedin. **Mol Biol Evol** 1998; 15:718-26.

Karpf AR, Jones DA. Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer. **Oncogene** 2002; 21:5496-503.

Kitange GJ, Templeton KL, Jenkins RB. Recent advances in the molecular genetics of primary gliomas. **Curr Opin Oncol** 2003; 15:197-203.

Kleihues P, Cavenee WK. **Pathology and genetics of tumors of the nervous system**. 2<sup>nd</sup> ed. Lyon: IARC Press, 2000. Tumores astrocíticos; p.10-45.

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

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

Loging WT, Lal A, Siu IM, et al. Genome Identifying potential tumor markers and antigens by database mining and rapid expression screening. **Genome Res** 2000; 10:1393-402.

Martinez de Arrieta C, Morte B, Coloma A, Bernal J. The human RC3 gene homolog, NRGN contains a thyroid hormone-responsive element located in the first intron. **Endocrinology** 1999; 140:335-43.

Morrison TB, Weiss JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR green I monitoring during amplification. **Biotechniques** 1998; 24:954-62.

Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. **Lab Invest** 2001; 81:77-82.

Nguyen CT, Weisenberger DJ, Velicescu M, et al. Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2' deoxycytidine. **Cancer Res** 2002; 62:6456-61.

Nishioka M, Kohno T, Tani M, et al. MYO18B, a candidate tumor suppressor gene at chromosome 22q12.1, deleted, mutated, and methylated in human lung cancer. **Proc Natl Acad Sci** 2002; 99:12269-74.

Reifenberger G, Collins VP. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. **Mol Med** 2004; 82:656-70.

Rickman DS, Bobek MP, Misek DE, et al. Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis. **Cancer Res** 2001; 61:6885-91.

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques** 1994; 17:914-21.

Schena M, Heller RA, Theriault TP, Konrad K, Lachenmeier E, Davis RW. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. **Trends Biotechnol** 1998; 16:301-6.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science** 1995; 270:467-70.

Schmelz K, Sattler N, Wagner M, Lubbert M, Dorken B, Tamm I. Induction of gene expression by 5-Aza-2'-deoxycytidine in acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) but not epithelial cells by DNA-methylation-dependent and -independent mechanisms. **Leukemia** 2005; 19:103-11.

Shostak K, Labunskyy V, Dmitrenko V, et al. HC gp-39 gene is upregulated in glioblastomas. **Cancer Lett** 2003; 198:203-10.

Tanwar MK, Gilbert MR, Holland EC. Gene expression microarray analysis reveals YKL-40 to be a potential serum marker for malignant character in human glioma. **Cancer Res** 2002; 62:4364-8.

Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman J G, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96:8681-6.

Uhlmann K, Rohde K, Zeller C, et al. Distinct methylation profiles of glioma subtypes. **Int J Cancer** 2003; 106:52-9.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. **Science** 1995; 270:484-7.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. **Science** 2001; 291:1304-51.

Walker DG, Kaye AH. Low grade glial neoplasms. **J Clin Neurosci** 2003; 10:1-13.

Wu J, Li J, Huang KP, Huang FL. Attenuation of protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase signal transduction in the neurogranin knockout mouse. **J Biol Chem** 2002; 277:19498-505.

Ye SQ, Usher DC, Zhang LQ. Gene expression profiling of human diseases by serial analysis of gene expression. **Biomed Sci** 2002; 9:384-94.

Youssef EM, Chen XQ, Higuchi E, et al. Hypermethylation and silencing of the putative tumor suppressor Tazarotene-induced gene 1 in human cancers. **Cancer Res** 2004; 64:2411-7.

Zhu WG, Dai Z, Ding H, et al. Increased expression of unmethylated CDKN2D by 5-aza-2'-deoxycytidine in human lung cancer cells. **Oncogene** 2001; 20:7787-96.

***ANEXOS***

---

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)