

Caracterização dos padrões de metilação durante a progressão tumoral de tumores de Wilms

Pesquisador Responsável: **Mariana Maschietto** (LNBio/CNPEM)

Colaboradores:

Dr. Paulo Sérgio Lopes de Oliveira

Prof. Dr. Beatriz de Camargo

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Metilação de DNA

Mecanismos epigenéticos regulam a expressão dos genes sem alterar a sequência de DNA. Essas modificações são determinadas durante a embriogênese e remodeladas durante o desenvolvimento para definir a especificação dos órgãos e diferenciação das células. Após o término da diferenciação, o epigenoma é mantido para sustentar a identidade celular. A metilação de DNA é um dos principais mecanismos de controle epigenético e consiste na adição de radicais metil ao carbono 5 da citosina através de modificação covalente que ocorre pela ação de enzimas DNA-metiltransferases (DNMTs) ^{1,2}. Mais comumente, a metilação ocorre em dinucleotídeos 5'CG3' (CpG), que geralmente estão agrupados nas chamadas ilhas CpG, distribuídas desigualmente pelo genoma e frequentemente associadas com a região 5' não traduzida de genes ³. Cerca de 70% dos genes apresentam ilhas CpG localizadas em promotores gênicos, e quando metilados, serve como marca de repressão ou silenciamento da expressão gênica através do bloqueio direto ou indireto da ligação a fatores reguladores de transcrição ¹.

Apesar dos padrões de metilação em células somáticas diferenciadas serem geralmente estáveis e herdáveis, durante o desenvolvimento de mamíferos há ocorrência de ao menos dois períodos nos quais há uma reprogramação global nos padrões de metilação pela remoção destas marcas epigenéticas, seguida por novas ondas de metilação ⁴. Essa reprogramação parece ter um papel crucial no estabelecimento de diferentes potenciais de transformação e desenvolvimento de células mais diferenciadas, e estabelecimento de padrões de expressão específicos nos diferentes tecidos ². Enquanto esta arquitetura ajustável permite a expressão temporal e regulada das vias de sinalização celular, quando perturbada (durante o desenvolvimento ou somaticamente), podem desempenhar um papel importante na iniciação e progressão do câncer, com efeito semelhante à mutação gênica clássica.

Tumores de Wilms

Os tumores de Wilms (TWs) são tumores embrionários que representam 95% dos tumores renais da infância ⁵; apresentam uma diversidade histológica que recapitula a embriogênese normal do rim ⁶. Consistente com a morfologia, TWs apresentam super expressão de genes normalmente expressos no blastema metanéfrico (rim embrionário) e expressão diminuída de genes expressos nos estágios finais da diferenciação renal ⁷. Da mesma forma, a comparação dos perfis de cromatina dos TWs com células tronco embrionárias (*embryonic stem cells*, ESCs) e rim normal identificou uma rede gênica que apresenta estruturas “bivalentes” semelhantes entre TW and ESCs ⁸. Da mesma forma, o perfil de expressão gênica de cada componente se assemelha a fases distintas do desenvolvimento renal, sendo que o componente blastematoso apresenta um perfil de expressão mais semelhante às fases iniciais ⁹. Em conjunto, esses dados sugerem que a interrupção do

desenvolvimento ocorre nas células progenitoras renais e que pelo menos parte dos genes estão aguardando os sinais para terminar a diferenciação celular.

A tumorigênese dos TWs apresenta grande complexidade, com menos de 30% dos casos descritos apresentarem mutações em genes conhecidos¹⁰⁻¹² e ~70% serem caracterizados por LOI de 11p15¹³, sendo que apenas esses eventos isolados ou em conjunto podem não ser suficientes para causar o tumor¹⁴. Uma análise do perfil global de metilação de TW sugere a existência de pelo menos dois grupos de tumores, o primeiro com perfil de metilação semelhante a restos nefrogênicos, células remanescentes do rim embrionário e consideradas lesões pré-malignas dos TWs, e um segundo grupo cujo perfil é exclusivamente encontrado nos tumores¹⁵. Esses resultados indicam que as alterações epigenéticas estão associadas com a transformação celular em pelo menos parte dos casos de TW.

Justificativa

Com o avanço das técnicas baseadas em *microarray*, plataformas robustas de metilação são capazes de medir quantitativamente a metilação do DNA. A detecção de genes aberrantemente metilados ao longo do genoma pode indicar possíveis candidatos a marcadores prognósticos ou terapêuticos, visto que a hipermetilação em promotores gênicos é relacionada ao silenciamento transcricional e sua ocorrência nos genes supressores tumorais está associada à iniciação e progressão de diversos tumores. Muitos estudos têm explorado a identificação de alterações na metilação do DNA como biomarcadores na detecção precoce de doenças, ferramentas alternativas para classificação tumoral, e biomarcadores preditivos da resposta ao tratamento. Para contribuir para a melhoria do conhecimento dos fatores associados com a progressão dos TWs, este projeto visa investigar o perfil de metilação global em amostras de tecido tumoral e normal de crianças portadoras de TW.

OBJETIVO

Caracterizar o perfil epigenético por meio da análise de metilação em tumores primários e metástases de tumores de Wilms afim de avaliar os mecanismos envolvidos com a progressão tumoral.

METODOLOGIA

Em colaboração com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), foram selecionados 7 pacientes bem caracterizados cujas amostras pareadas de tumor primário, rim normal e metástase foram armazenadas (Comitê de Ética em Pesquisa do INCA 170/13).

Experimentos para avaliação da metilação global

O DNA será extraído com o kit DneaseBlood and Tissue (Qiagen), seguindo protocolo do fabricante; e então tratado com o *kit EZ DNA Methylation* (Zymo Research) que converte citosinas não metiladas em timinas, permitindo diferenciá-las em experimentos hibridação. O DNA convertido será hibridizado na plataforma *HumanMethylation450 BeadChip*, que interroga >485.000 sítios de metilação, incluindo 99% dos genes listados no *RefSeq database* e 96% de todas as ilhas CpG do genoma humano. A proporção de DNA metilado é calculada pela razão metilado/(metilado+não metilado) gerando um valor (β -value) que reflete o nível de metilação da população de células estudadas.

Análise dos dados gerados

Os dados gerados deverão ser analisados por pacotes do Bioconductor (www.bioconductor.org), como o pacote RnBeads¹⁶, que apresenta um fluxograma para análise e

interpretação de dados de metilação. Os resultados deverão ser comparados com os bancos de dados de processos biológicos (*Gene Ontology*) e vias celulares (KEGG) as alterações encontradas podem estar associadas.

REFERÊNCIAS

1. Branco, M. R., Ficz, G. & Reik, W. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 7–13 (2012).
2. Reik, W., Dean, W. & Walter, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**, 1089–93 (2001).
3. Robertson, K. D. DNA methylation and human disease. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 597–610 (2005).
4. Smith, Z. D. & Meissner, A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 204–20 (2013).
5. Rivera, M. N. & Haber, D. A. Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 699–712 (2005).
6. Beckwith, J. B., Kiviat, N. B. & Bonadio, J. F. Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' tumor. *Pediatr. Pathol.* **10**, 1–36 (1990).
7. Maschietto, M. *et al.* Temporal blastemal cell gene expression analysis in the kidney reveals new Wnt and related signaling pathway genes to be essential for Wilms' tumor onset. *Cell Death and Disease* **2**, e224 (2011).
8. Aiden, A. P. *et al.* Wilms tumor chromatin profiles highlight stem cell properties and a renal developmental network. *Cell Stem Cell* **6**, 591–602 (2010).
9. Maschietto, M. *et al.* Molecular profiling of isolated histological components of Wilms tumor implicates a common role for the Wnt signaling pathway in kidney and tumor development. *Oncology* **75**, 81–91 (2008).
10. Torrezan, G. T. *et al.* Recurrent somatic mutation in DROSHA induces microRNA profile changes in Wilms tumour. *Nat. Commun.* **5**, 4039 (2014).
11. Walz, A. L. *et al.* Recurrent DGCR8, DROSHA, and SIX Homeodomain Mutations in Favorable Histology Wilms Tumors. *Cancer Cell* **27**, 286–97 (2015).
12. Wegert, J. *et al.* Mutations in the SIX1/2 Pathway and the DROSHA/DGCR8 miRNA Microprocessor Complex Underlie High-Risk Blastemal Type Wilms Tumors. *Cancer Cell* **27**, 298–311 (2015).
13. Scott, R. H. *et al.* Stratification of Wilms tumor by genetic and epigenetic analysis. *Oncotarget* **3**, 327–335 (2012).
14. Hu, Q. *et al.* Wt1 ablation and Igf2 upregulation in mice result in Wilms tumors with elevated ERK1/2 phosphorylation. *J. Clin. Invest.* **121**, 174–83 (2011).
15. Charlton, J. *et al.* Comparative methylome analysis identifies new tumour subtypes and biomarkers for transformation of nephrogenic rests into Wilms tumour. *Genome Med.* **7**, 11 (2015).
16. Assenov, Y. *et al.* Comprehensive analysis of DNA methylation data with RnBeads. *Nat. Methods* **11**, 1138–40 (2014).