João Pedro Leite Castro

Caracterização Citogenética e Análise da Expressão dos Genes *Mycn* e *Erbb2* da Linha Celular Tumoral de *Rattus norvegicus*, CLS-ACI-1

2.º Ciclo em Biotecnologia para as Ciências da Saúde

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Vila Real, 2012

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia para as Ciências da Saúde (Decreto-Lei n.º 74/2006 com as alterações introduzidas pelos Decretos-Lei n.º107/2008 e n.º230/2009). Dissertação elaborada sob orientação da Doutora Maria Filomena Adega e da Professora Doutora Raquel Chaves.

Para ser grande sê inteiro: nada

Teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa. Põe quanto és

No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda

Brilha porque alta vive.

Fernando Pessoa

Agradecimentos

Ao terminar mais uma etapa do meu percurso académico, não posso deixar de agradecer a todos aquele que tornaram possível a elaboração deste trabalho.

Ao PROFESSOR DOUTOR CARLOS ALBERTO SEQUEIRA, reitor da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, instituição que me acolheu nesta etapa da minha vida académica.

Ao PROFESSOR DOUTOR ANTÓNIO FONTAINHAS FERNANDES, presidente da escola de Ciências da Vida e Ambiente (ECVA), agradeço a disponibilização dos meios académicos para realizar esta dissertação.

À COORDENAÇÃO DO 2.º CICLO EM BIOTECNOLOGIA PARA AS CIENCIAS DA SAÚDE, na pessoa do PROFESSOR DOUTOR VALDEMAR CARNIDE, por terem aceite o plano de trabalho aqui apresentado e por toda a logística necessária e relacionada com esta dissertação.

Ao INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA E BIOENGENHARIA, CENTRO DE GENÓMICA E BIOTECNOLOGIA (IBB/CGB - UTAD), na pessoa do PROFESSOR DOUTOR HENRIQUE GUEDES-PINTO, o meu sincero agradecimento pela disponibilização dos meios necessários à realização desta dissertação, pelo acolhimento e apoio prestados.

A TODOS OS DOCENTES do 2. Ciclo em Biotecnologia para as Ciências da Saúde, pelo conhecimento transmitido e competências adquiridas durante o mestrado.

À DOUTORA FILOMENA ADEGA, minha orientadora, agradeço, inicialmente, ter-me aceite como orientando. Agradeço, também, pelos conhecimentos transmitidos enquanto docente e orientadora, pela competência, pela forma como me recebeu no laboratório, por toda a ajuda prestada, pela preocupação com o meu bem-estar, pelo exemplo e pela constante disponibilidade.

À PROFESSORA DOUTORA RAQUEL CHAVES, agradeço duplamente por me ter aceite no laboratório e por ser minha coorientadora. Agradeço o apoio incondicional quer a nível cientifico quer a nível pessoal, os conhecimentos

transmitidos desde que ingressei no ensino superior, pela disponibilidade, pela forma como sempre me tratou, pela forma como me recebeu no laboratório, por toda a ajuda na realização desta dissertação e pelo exemplo.

A toda a MALTA DO LABORATÓRIO, por todos os momentos passados durante este ano.

À ANA BORGES (ANA LÚ), à ANA SILVA (NETA), à ANA TEIXEIRA (PAÇO), à DANIELA FERREIRA (DANI), à SARA SANTOS e à SUSANA MELES (SÚ), quero agradecer por tudo. Pela paciência para me aturar, pela ajuda prestada, pela introdução ao trabalho no laboratório, pelos bons momentos passados, por toda a ajuda e pelo constante apoio e disponibilidade. O meu sincero MUITO OBRIGADA.

À ANA CRISTINA, à ANA CLAUDIA e à CARLOTA CONCEIÇÃO as mais recentes do grupo, desejo um ano de trabalho pleno de satisfação.

A todos os amigos e colegas de mestrado, pelos momentos passados.

À CARLOTA CONCEIÇAO, à LISANDRA CASTRO, à RITA FRANCISCO e à RITA PERREIRA, minhas grandes amigas, agradeço por tudo. Pelos bons e menos bons momentos passados, pelos jantares e cafés, pela constante preocupação, por toda a ajuda prestada, pelos risos, pelas idas ao cinema, pelas conversas. OBRIGADA POR TUDO.

Por ultimo, àqueles sem os quais nada disto seria possível, a minha FAMÍLIA. À minha MÃE PAULA LEITE, ao meu PAI MÁRIO CASTRO, às minhas irmãs LÍDIA BULHÕES e JOANA CASTRO, ao meu cunhado JAY BULHÕES, à minha sobrinha SOFIA BULHÕES, aos meus avôs JOSÉ LEITE e MARIA FURTADO, à minha madrinha FÁTIMA LEITE, aos meus primos DANIEL e VÂNIA ROCHA, à FÁTIMA CASTANHO e a todos os restantes membros, agradeço pelo apoio incondicional, por todos os momentos que passamos juntos, pelos conselhos, pelos sacrifícios, pela força que me deram durantes estes anos para atingir os meus objetivos. Agradeço-vos verdadeiramente do fundo de meu coração. MUITO MUITO OBRIGADA POR TUDO.

Resumo

O cancro da mama é uma doença genética e celular de carácter multifatorial, na qual a desregulação génica desempenha um papel fulcral na sua iniciação e progressão. As linhas celulares de ratazana (RNO) têm, devido à similaridade mecanística da tumorigénese verificada entre Homem (HSA) e RNO, vindo a ser utilizadas como modelos em vários estudos de carácter fundamental e no desenvolvimento de novas terapias. A caracterização das linhas celulares usadas como modelos, é fundamental na seleção dos modelos celulares mais adequados para determinado estudo e para a interpretação correta de qualquer resultado.

Neste trabalho caracterizou-se citogeneticamente e ao nível da expressão dos genes *Mycn* e *Erbb2* uma linha celular tumoral comercial de RNO, proveniente de um adenocarcinoma mamário, denominada CLS-ACI-1.

Os resultados obtidos mostram que a linha CLS-ACI-1 apresenta, pelo menos, três subclones e um complemento cromossómico quase triploide, caracterizado pela presença de alterações cromossómicas estruturais e numéricas. Alguns dos cromossomas alterados na linha CLS-ACI-1, encontram-se recorrentemente alterados noutras linhas tumorais de RNO e, em cromossomas homólogos, alterados no cancro da mama humano. Uma análise *in silico* utilizando várias bases de dados revelou a existência de 29 genes potencialmente afetados pelos "breakpoints" e que se encontram envolvidos em vários processos celulares (e.g. ciclo, proliferação, estabilidade genómica, vias WNT, RAS e MAPK).

Posteriormente analisou-se a expressão relativa e regulação epigenética dos oncogenes *MYCN* e *ERBB2* (envolvidos na tumorigénese humana) por "Real-Time Reverse Transcription - quantitative" PCR na linha em estudo.

No que diz respeito ao gene *Mycn*, a análise revelou que este se encontra sobrexpresso na linha CLS-ACI-1 (181 vezes superior a uma linha normal). A sobrexpressão detetada pode ser explicada pela possível amplificação génica evidenciada pela caracterização citogenética e pela análise *in silico* dos "breakpoints" das alterações cromossómicas detetadas. No que diz respeito à sua regulação, este gene

não parece encontrar-se diretamente regulado por metilação das citosinas, à semelhança do que foi descrito em HSA e *Mus musculus*. No entanto, o aumento significativo observado após remoção da 5-azacitidina pode ser consequência de alterações ao nível da (des)metilação de genes envolvidos na regulação da expressão do *Mycn*.

Por sua vez o *Erbb2* não apresentou na linha CLS-ACI-1 variação biologicamente significativa de expressão, o que não seria expectável pelos dados citogenéticos, que evidenciam o ganho de cópias do cromossoma onde este gene se localiza. Quando o genoma da linha CLS-ACI-1 foi globalmente desmetilado, verificou-se um aumento da expressão do gene, o que é indicativo de que o *Erbb2* se encontrava transcripcionalmente suprimido, por metilação das citosinas; tal como em algumas linhas de HSA e MMU. Este aumento continuou após remoção da 5-azacitidina, o que é indicativo de mecanismos compensatórios na linha tumoral em análise.

Os resultados obtidos permitem concluir que a linha CLS-ACI-1 é um bom modelo para o estudo do cancro da mama, pois apresenta similaridade a nível citogenético com rearranjos cromossómicos recorrentes no cancro da mama humano. Esta linha é, também, um bom modelo para o estudo epigenético dos oncogenes *Mycn* e *Erbb2*, pois o seu perfil de regulação é similar ao descrito em HSA.

Palavras-chave: cancro da mama, linha celular tumoral, citogenética, "breakpoints" cromossómicos, expressão génica, epigenética, oncogenes (*Mycn* e *Erbb2*).

Abstract

Cytogenetic characterization and *Mycn* and *Erbb2* gene expression analysis in the *Rattus norvegicus* tumour cell line, CLS-ACI-1.

Breast cancer is a genetic and cellular disease characterized by a multi-factorial nature, being gene deregulation one of its widespread marks. Due to the mechanistic similarity verified between the tumoral process in human (HSA) and rat (RNO), cell lines derived from RNO tumours can be successfully applied in breast cancer fundamental research and new therapy development. For a cell line to reach its full potential as a model, it should be properly characterized, as that characterization enable the choice of the most appropriate cell lines to a specific study and the correct result interpretation.

In this work, the commercial RNO tumour cell line CLS-ACI-1, derived from a breast adenocarcinoma, was cytogenetically characterized and an expression analysis of the *Mycn* and *Erbb2* genes was also performed.

Our results show that, at least, three sub-clones are present in the CLS-ACI-1 cell line. A near triploid chromosomal content was detected, in which several structural and numerical alterations were present. Some of these chromosomes are recurrently implicated in chromosomal alterations in RNO tumour cell lines, and those homologous HSA chromosomes, have been implied in human breast cancer. An *in silico* analysis was performed in several databases and it revealed that 29 genes were potentially affected by CLS-ACI-1's breakpoints. Those genes have been associated to several cellular processes (e.g. cycle, proliferation, genomic stability and WNT, RAS and MAPK pathways).

Afterwards, the relative expression and the epigenetic regulation of *MYCN* and *ERBB2* oncogenes (implied in human tumourigenesis) was analyzed by Real-Time Reverse Transcription - quantitative PCR (RT-qPCR), in the tumour cell line under study.

The RT-qPCR analysis revealed that the gene *Mycn* presents a 181 times-fold expression increase in the cell line CLS-ACI-1. This expression increment can be explained by the possible gene amplification (indicated by the cytogenetic characterization) and by the deregulation of several regulatory genes (revealed by the *in silico* analysis). *Mycn* does not seems to be directly epigenetically regulated by DNA methylation. This lack of epigenetic regulation, through cytosine methylation, have been described in HSA and *Mus musculus* (MMU). The significant expression increase, detected 10 days after 5-azacytidine removal, can be due to (de)methylation changes of several genes implied in *Mycn* regulation.

In the CLS-ACI-1 cell line, *Erbb2* doesn't show significant biological expression variation. These results are the opposite of what was expected, as the cytogenetic results show a copy gain of the chromosome where *Erbb2* is located. After CLS-ACI-1's global genome demethylation, a gene expression increase was detected. This indicates that *Erbb2* is transcriptionally suppressed by DNA methylation, as described in HSA and MMU. *Erbb2* gene up-fold expression was also verified after removal of 5-azacytidine, indicating the existence of compensatory mechanisms in CLS-ACI-1 cell line.

The similarity of the chromosomal rearrangements detected in this cell line with those described in human breast cancer and the similar epigenetic regulation, of the *Mycn* and *Erbb2* genes, with the epigenetic marks described in HSA, render the CLS-ACI-1 tumor cell line as a well suited *in vitro* model for human breast cancer research.

Keywords: breast cancer, tumor cell lines, cytogenetics, chromosome breakpoints, gene expression, epigenetics, *Mycn* and *Erbb2* oncogenes

Índice geral

Agradecimentos ..... **VII**

Resumo ..... **IX**

"Abstract" ..... **XI**

Índice geral ..... **XIII**

Índice de figuras ..... **XIX**

Índice de gráficos ..... **XXI**

Índice de tabelas ..... **XXIII**

Índice de anexos ..... **XXV**

Lista de abreviaturas e símbolos utilizados no texto ..... **XXVII**

Lista de abreviaturas das espécies utilizadas ..... **XXIX**

Capítulo I - Introdução **1**

I.1 - A natureza celular do cancro **1**

I.2 - Cancro da mama: teorias para a sua génese e evolução **6**

I.2.1 - Teoria da mutação somática **6**

I.2.2 - Teoria estaminal **7**

I.2.3 - Teorias da mutação somática e estaminal e a progressão tumoral **9**

I.3 - Organismos modelo, linhas celulares e o estudo do cancro da mama. **11**

I.3.1 - Linhas celulares como modelos para o estudo do cancro da mama. **12**

I.4 - Instabilidade genómica **15**

I.4.1 - Causas que levam ao surgimento de instabilidade genómica **17**

I.4.2 - Manifestações da instabilidade genómica.....**21**

I.4.2.1 - Instabilidade cromossómica – CIN.....**21**

I.4.2.1a - *Whole Chromosomal Instability* - W-CIN **21**

I.4.2.1b - *Structural or Segmental Chromosomal Instability* - S-CIN **23**

I.4.2.2 - Instabilidade associada à maior frequência de alterações nucleotídicas .**24**

I.4.2.3 - Instabilidade dos microsatélites **24**

I.4.2.4 - Alterações epigenéticas.....**25**

I.5 - Ciclo celular, oncogenes e genes supressores tumorais.....**26**

I.5.1 - Genes supressores tumorais **28**

I.5.2 - Oncogenes.....**29**

I.5.2.1 - Ativação por ocorrência de mutações pontuais **29**

I.5.2.2 - Ativação por formação de genes de fusão **29**

I.5.2.3 - Ativação por aumento do nível da transcrição.....**29**

I.5.2.4 - Ativação por amplificação génica.....**30**

I.5.2.4.1 - Iniciação da amplificação génica: modelos **31**

I.5.2.4.1a - Ciclos de BFB **32**

I.5.3 - *ERBB2* e *MYCN*: proto-oncogenes e o cancro.....**33**

I.5.3.1 - ERBB2 .....**33**

I.5.3.1a - Sinalização intracelular **34**

I.5.3.1b - ERBB2 e o cancro.....**36**

I.5.3.2 - MYCN.....**37**

I.5.3.2a - MYCN e o cancro **38**

Capitulo II - Objetivos **43**

Capitulo III - Material e Métodos **47**

III.1 - Cultura de células e obtenção de preparações cromossómicas **47**

III.2 - Citogenética **47**

III.2.1 - Técnicas de bandeamento **47**

Protocolo 1 - Bandeamento-G por ação da tripsina e coradas com Giemsa - bandas-GTG **49**

Protocolo 2 - Bandeamento por Restrição *In Situ*. **50**

III.2.2 - Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH) **52**

III.2.2.1 - "Whole Chromosome Painting" - WCP **53**

Protocolo 3 - Amplificação das sondas de para WCP correspondentes aos cromossomas de RNO 1-10, 16-20, X e Y e de MMU1, MMU5, MMU11, MMU14 e MMU16. ..... **55**

III.2.2.2 - Eletroforese em gel de agarose **56**

Protocolo 4 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) ou a 1,2% (p/v) **56**

Protocolo 5 - Marcação das sondas para WCP correspondentes aos cromossomas de RNO 1-10, 16-20, X, Y, MMU1, MMU5, MMU11, MMU14 e MMU16. ..... **57**

Protocolo 6 - Precipitação das sondas, para WCP, de RNO e MMU. **58**

Protocolo 7 - Hibridação *in situ* com sondas para WCP de RNO ou MMU, em preparações cromossómicas de CLS-ACI-1. ..... **59**

III.2.3 - Descrição das fórmulas cromossómicas **60**

III.3 - "Real-Time Reverse Transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction" (RT-qPCR) **61**

III.3.1 - Extração de RNA e purificação destas amostras **62**

Protocolo 8 - Purificação das amostras de RNA (Digestão de DNA) - *TURBO DNA-free™ Kit* da *ambion® by life technologies™* **63**

Protocolo 9 - "Real-Time Reverse Transcription - quantitative" PCR (RT-qPCR)..... **64**

III.4 - Análise *In Silico* **66**

Protocolo 10 - Determinação de homologias cromossómicas entre MMU e RNO. **67**

Protocolo 11 - Análise *in silico* dos "breakpoints" da linha CLS-ACI-1 - comparação com "breakpoints" evolutivos e tumorais/cancro **67**

Protocolo 12 - Análise *in silico* de genes putativamente afetados pelos "breakpoints" da linha celular CLS-ACI-1. ..... **68**

Protocolo 13 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas aos genes *Mycn* e *Erbb2* em MMU e HSA..... **68**

Capitulo IV - Resultados **71**

IV.1 - Características morfológica e comportamental da linha CLS-ACI-1 .... **71**

IV.2 - Caracterização citogenética da linha celular CLS-ACI-1 ..... **74**

IV.2.1 - Análise dos "Breakpoints" da linha celular CLS-ACI-1 ..... **96**

IV.2.2 - Análise *in silico* de genes putativamente afetados pelos "breakpoints" detetados na linha celular CLS-ACI-1 ..... **98**

IV.3 - Análise da expressão dos genes *Mycn* e *Erbb2* sob condições normais e sob condições desmetilantes nas linhas celulares RNO-normal e CLS-ACI-1..... **100**

IV.3.1 - Análise da expressão relativa, dos genes *Mycn* e *Erbb2*, na linha celular CLS-ACI-1 ..... **102**

IV.3.2 - Análise da expressão relativa dos oncogenes *Mycn* e *Erbb2* após exposição das linhas celulares RNO-normal e CLS-ACI-1 a um agente desmetilante..... **105**

IV.3.2a - Resultados obtidos para a linha celular RNO-normal quando exposta à 5-azacitidina.....**106**

IV.3.2b - Resultados obtidos para a linha celular CLS-ACI-1 quando exposta à 5-azacitidina.....**108**

Capitulo V - Discussão **113**

V.1 - Caracterização citogenética da linha celular CLS-ACI-1 .....**113**

V.2 - Análise da evolução clonal da linha CLS-ACI-1 .....**116**

V.3 - Análise dos "breakpoints" da linha celular CLS-ACI-1 - comparação com "breakpoints" tumorais/cancro e evolutivos.....**121**

V.4 - Análise *in silico* para determinação de potenciais genes, associados ao cancro da mama humano, implicados no processo tumoral na linha CLS-ACI-1.....**124**

V.5 - Análise da expressão e possível regulação dos oncogenes *Mycn* e *Erbb2* na linha celular CLS-ACI-1 .....**125**

V.5.1 - Análise da expressão e possível regulação do *Mycn*.....**125**

V.5.2 - Análise da expressão e possível regulação do oncogene *Erbb2* **130**

Capitulo VI - Conclusão e Perspetivas Futuras.....**139**

Capítulo VII - Bibliografia.....**145**

Anexos.....**158**

Índice de figuras

Figura 1 - Esquema ilustrativo da progressão do cancro desde um tumor benigno até um cancro metastizado. **5**

Figura 2 - Esquema representativo das diferenças comportamentais verificadas entre as células estaminais adultas e as células estaminais tumorais.....**8**

Figura 3 - Esquema ilustrativo da evolução tumoral de acordo com as teorias somática e estaminal..*.....**10**

Figura 4 - Esquema representativo do ciclo celular e dos eventos celulares que nele ocorrem e são responsáveis pela manutenção da estabilidade genómica.....**17**

Figura 5 - Esquema representativo das interações entre ligandos, recetores e efetores moleculares associados à família de recetores ERBB. Note-se a referida estrutura em laço.....**35**

Figura 6 - Processos celulares regulados pelo MYC.....**38**

Figura 7 - Painel de imagens ilustrativas da morfologia e comportamento celular da linha CLS-ACI-1. .....**72**

Figura 8 - Exemplos de metafases obtidas por restrição *in situ* e coradas com DAPI. **75**

Figura 9 - Exemplos de metafases obtidas por restrição *in situ* e coradas com DAPI.....**76**

Figura 10 - Metafases ilustrativas da variação do complemento cromossómico e da presença de cromossomas portadores de alterações estruturais na linha celular CLS-ACI-1. .....**77**

Figura 11 - Eletroforese em géis de agarose a 1,5% (p/v), dos produtos de amplificação de sondas de RNO para "Chromosome Painting" e de marcação das mesmas. **79**

Figura 12 - Eletroforese em géis de agarose a 1,5% (p/v), dos produtos de amplificação de sondas de MMU para "Chromosome Painting" e de marcação das mesmas. ..**79**

Figura 13 - Metafases ilustrativas apresentando as alterações cromossómicas identificadas nos cromossomas RNO1, RNO2, RNO4 e RNO8, na linha celular CLS-ACI-1. .....**81**

Figura 14 - Metafases ilustrativas apresentando as alterações cromossómicas identificadas nos cromossomas RNO3, RNO5, RNO7 E RNOX, da linha celular CLS-ACI-1. .....**83**

Figura 15 - Metafases ilustrativas apresentando as alterações cromossómicas identificadas nos cromossomas RNO6, RNO9, RNO10 E RNO16, presentes na linha CLS-ACI-1. .....**86**

Figura 16 - Metafases ilustrativas apresentando as alterações identificadas nos cromossomas RNO17, RNO18 e RNO19, da linha celular CLS-ACI-1.....**88**

Figura 17 - Metafases ilustrativas das alterações identificadas nos cromossomas RNO19 e RNO20, da linha celular CLS-ACI-1. .....**89**

Figura 18 - Metafases ilustrativas apresentando as alterações identificadas nos dos cromossomas RNO11, RNO12, RNO13, RNO14 e RNO15, da linha celular CLS-ACI-1. .....**91**

Figura 19 - Metafases ilustrativas das alterações cromossómicas, do cromossoma RNO11, identificadas na linha celular CLS-ACI-1. .....**92**

Figura 20 - Exemplos de micronúcleos detetados na linha CLS-ACI-1. .....**93**

Figura 21 - Análise dos "breakpoints" da linha celular CLS-ACI-1, num ideograma padrão de *Rattus norvegicus*. **97**

Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose a 1,2% (p/v) dos produtos de amplificação do RT-qPCR. **103**

Figura 23 - Esquema representativo da evolução clonal da linha CLS-ACI-1 **...117**

Índice de gráficos

Gráfico 1 - Número Modal da linha CLS-ACI-1.....**73**

Gráfico 2 - "Amplification Plot" da experiencia "determinação dos níveis de expressão padrão dos genes *Mycn* e *Erbb2*, na linha CLS-ACI-1".....**102**

Gráfico 3 - "Multicomponent Plot". **103**

Gráfico 4 - Nível de expressão padrão dos oncogenes *Mycn* e *Erbb2* na linha celular CLS-ACI-1 comparativamente à amostra controlo RNO-normal.....**104**

Gráfico 5 - Nível da expressão relativa do oncogene *Mycn* , na linha RNO-normal, durante e após tratamento com 5-azacitidina em comparação com RNO-normal não tratada.....**107**

Gráfico 6 - Nível da expressão relativa do oncogene *Erbb2* , na linha RNO-normal, durante e após tratamento com 5-azacitidina em comparação com RNO-normal não tratada.....**107**

Gráfico 7 - Nível da expressão relativa do oncogene *Mycn* durante e após tratamento com 5-azacitidina em comparação com CLS-ACI-1 não tratada.....**109**

Gráfico 8 - Nível da expressão relativa do oncogene *Erbb2* durante e após tratamento com 5-azacitidina em comparação com CLS-ACI-1 não tratada.....**110**

Índice de tabelas

Tabela 1 - Contagem do número de cromossomas por metafase, num total de 120 metafases. **73**

Tabela 2 - Lista de genes associados ao cancro da mama que poderão apresentar algum tipo de alteração na linha CLS-ACI-1 devido à ocorrência de "breakpoints" na banda cromossómica onde se localizam **99**

Tabela 3 - Valores obtidos pelo t-Test (RNO-normal vs CLS-ACI-1) **105**

Tabela 4 - Valores obtidos por t-Test (RNO-normal 5-azacitidina).....**108**

Tabela 5 - Valores obtidos pelo t-Test (CLS-ACI-1 5-azacitidina) **110**

Índice de anexos

Anexo 1 - Ideograma de *Rattus norvegicus* desenvolvido por Levan (1974) e completado por Hamta *et al.* (2006). **158**

Anexo 2 - "TaqMan Gene Expression Assay" ("Applied Biosystem") para o gene *Mycn* (NP:001013096.1). **159**

Anexo 3 - "TaqMan Gene Expression Assay" ("Applied Biosystem") para o gene *Erbb2* (NM_017003.2). **159**

Anexo 4 - "TaqMan Gene Expression Assay" ("Applied Biosystem") para o gene *Gapdh2* (NM_017008.3). **160**

Anexo 5 - Mapa sinténico entre RNO e MMU. **161**

Anexo 6 - Mapa sinténico entre RNO e MMU. **162**

Anexo 7 - Mapa sinténico entre MMU e RNO. **163**

Anexo 8 - Mapa sinténico entre MMU e RNO. **164**

Anexo 9 - Cariótipo representativo do subclone A, da linha CLS-ACI-1. ..... **165**

Anexo 10 - Cariótipo representativo do subclone B, da linha CLS-ACI-1..... **166**

Anexo 11 - Cariótipo representativo do subclone C, da linha CLS-ACI-1..... **167**

Anexo 12 - Mapa sinténico entre HSA e RNO **168**

Anexo 13 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *MYCN* em HSA (parte 1)..... **169**

Anexo 14 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *MYCN* em HSA (parte 2)..... **170**

Anexo 15 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *MYCN* em HSA (parte 3)..... **171**

Anexo 16 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *MYCN* em HSA (parte 4).....**172**

Anexo 17 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *Mycn* em MMU (parte 1).....**173**

Anexo 18 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *Mycn* em MMU (parte 2).....**174**

Anexo 19 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *Mycn* em MMU (parte 3).....**175**

Anexo 20 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *Mycn* em MMU (parte 4).....**176**

Anexo 21 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *ERBB2* em HSA (parte 1).....**177**

Anexo 22 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *ERBB2* em HSA (parte 2).....**178**

Anexo 23 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *ERBB2* em HSA (parte 3).....**179**

Anexo 24 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *ERBB2* em HSA (parte 4).....**180**

Anexo 25 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *Erbb2* em MMU (parte 1).....**181**

Anexo 26 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *Erbb2* em MMU (parte 2).....**182**

Anexo 27 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *Erbb2* em MMU (parte 3).....**183**

Anexo 28 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *Erbb2* em MMU (parte 4).....**184**

Lista de abreviaturas e símbolos utilizados no texto

% - Percentagem

≥ - Maior ou igual

± - Mais ou menos

4xT - "Detergent Wash Solution"

2n, 4n - Número diploide e número tetraploide, respetivamente

Abs - Absorvância

AT GC - Adenina, timina, guanina e citosina, respetivamente

AZA, 5-azacitidina - 5-aza-2'-deoxicitidina

bp - "Base pair" (pares de base)

BFB - "Breakage-fusion-bridge"

BSA - "Bovine Serum Albumin"

ºC - Graus Celsius

CCP - "Comparative Chromosome Painting"

CGH - "Comparative genomic hybridization"

DAPI - 4'- 6 - "diamidino - 2 - phenylindole"

DNA - Ácido Desoxirribonucleíco

dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfato

dUTP - Desoxiuridina trifosfato

e.g. - *Exempli gratia* (por exemplo)

FISH - “Fluorescent *in situ* Hybridization”

FITC - Fluoresceinaisotiocianato

GTD - Bandas-G obtidas com tripsina e coradas com DAPI

HBSS - “Hank’s Balanced Salt Solution”

i.e. - *Id est* (isto é)

ISCN - “International System for Human Cytogenetic Nomenclature”

L, mL, µL - Litro, mililitro, microlitro

mL, µL - Mililitro, microlitro

M, mM - Molar, milimolar

NCBI - “National Center for Biotechnology Information”

ng/µL - Nanogramas por microlitros

nm - Nanómetro

PBS - “Phosphate Buffered Saline”

PCR - “Polymerase Chain Reaction”

RNA - Ácido ribonucleíco

rpm - Rotações por minuto

RT-qPCR - "Real-Time Reverse Transcription -quantitative" PCR

RE - "Restriction endonucleases"

SGTB - Tampão eletroforético

siRNA - "Small interfering" RNA

SSC - “Saline Sodium Citrate”

U e U/µL - Unidades de enzima ativa e unidades de enzima ativa por microlitro

UCSC-ENCODE - "University of California Santa Cruz - Encyclopedia of DNA Elements"

UV - Ultravioleta

V - Voltes

(v/v) e (p/v) - Volume por volume e peso por volume

WCP - "Whole Chromosome Painting"

Lista de abreviaturas das espécies utilizadas

HSA - *Homo sapiens*

MMU - *Mus musculus*

RNO - *Rattus norvegicus*

Capitulo I - Introdução

Capitulo I - Introdução

I.1 - A natureza celular do cancro

O cancro é uma das doenças que mais mortes causa a nível global, tendo em 2008, causado 7,6 milhões de fatalidades (70% destas ocorreram em países com médio ou baixo rendimento), o que conta como 13% de todas as mortes que ocorreram no Globo naquele ano [1]. De acordo com os dados disponíveis, no ano de 2005, registaram-se em Portugal 107 839 mortes tendo sido, o cancro, responsável por 23 232 das mesmas (21,5% do total de mortes) [2]. Nos Estados Unidos da América estima-se que em 2012 surjam 1 638 910 novos casos de cancro (848 170 nos homens e 790 740 nas mulheres) levando a um total de 577 190 mortes [3].

De uma forma muito simplista, o termo cancro é utilizado para definir um conjunto heterogéneo de doenças, com "background" genético e epigenético, que se caracterizam pelo surgimento e rápida multiplicação de células anormais, que crescem para além dos seus territórios tecidulares e adquirem a capacidade de invadir outros órgãos (metastização) [1, 4]. É necessário ter em atenção que um tumor é mais do que uma massa de células heterogéneas anormais que interagem entre si, uma vez que este estabelece, também, uma troca de informação com as células do estroma circundantes, criando, assim, o microambiente tumoral [5, 6].

Para entender a iniciação e progressão do cancro, é necessário compreender de que forma os vários tipos celulares, que compõem cada tecido, cooperam para gerar um tecido apto a nível funcional e estrutural. Nos organismos multicelulares animais, cada linhagem celular (resultante da ativação de programas de diferenciação distintos em células estaminais somáticas (CES) filhas) que compõe o tecido desempenha uma função distinta, ocupa um determinado território e apresenta características estruturais especificas [7, 8].

Todas as células presentes nos tecidos estão sujeitas a regulação para que o seu número seja mantido constante e funcional, ou seja, é necessário que seja mantida a homeostase tecidular. O "turnover" celular dos tecidos é um dos fatores com maior

impacto na manutenção da homeostase e assenta na eliminação periódica de células diferenciadas e substituição das mesmas por novas células diferenciadas, geradas pela divisão celular de células estaminais adultas e subsequente diferenciação de uma das células filhas e da sua descendência [8].

A morte celular por apoptose é o processo pelo qual ocorre, nos tecidos, a eliminação das células danificadas (como resultado de danos mecânicos, físicos, químicos ou biológicos, células hiperproliferativas ou com danos no material genético) e permite manter o número de células ideal para que o tecido possa exercer adequadamente as suas funções [5, 8, 9].

As células estaminais somáticas (CES) adultas são um subgrupo celular tecido-específico que apresenta a capacidade de se dividir e diferenciar de forma a originar linhagens celulares, com diferenciação terminal, que compõem os tecidos dos órgãos adultos [5, 10, 11].

A apoptose, a divisão e a diferenciação celular são finamente controlados por mecanismos bioquímicos que "informam" as células "do caminho" que têm de seguir para suprir necessidades ao nível tecidular [7].

Enquanto comunidade, as células dos tecidos estão em contacto entre si e com o meio extracelular permitindo, ao tecido, coordenar a resposta a determinado estímulo. É importante referir que as células de cada tecido se encontram, constantemente, num estado de sobrevivência, quer isto dizer que, de forma a que cada célula se mantenha, é necessário que receba continuamente fatores de sobrevivência, para os quais tem recetores específicos. Na ausência destes fatores, as células entram em apoptose, sendo esta a via pela qual, num tecido saudável, a população celular é controlada de forma a manter a funcionalidade tecidular [7]. É de referir que a apoptose também é desencadeada noutros contextos celulares.

A divisão celular é controlada por um mecanismo semelhante, ou seja, quando há necessidade de novas células (para substituir as que morrem devido a necessidades fisiológicas, ocorrência de danos ou doença) são sintetizados agentes proliferativos autócrinos ou parácrinos que se ligam aos respetivos recetores e induzem o crescimento e subsequente divisão celular [5, 7].

No caso das células neoplásicas, existe um conjunto de características fenotípicas que estas possuem que permitem compreender de que modo se dá o desenvolvimento tumoral desde a iniciação neoplásica, que ocorre em células normais, até ao surgimento de células tumorigénicas e posteriormente de células malignas [12]. Estas características têm vindo a ser denominadas "hallmarks" do cancro e estão associadas às múltiplas restrições às quais as células normais têm de se evadir de forma a que adquiram um fenótipo neoplásico. Estas "hallmarks" são: a produção alterada de agentes proliferativos, a evasão a supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalização, indução da angiogénese e capacidade invasiva e de metastização [5, 6].

Estas "hallmarks", só podem ser conseguidas se as células apresentarem características permissivas ao seu surgimento, tendo sido sugerido que a inflamação (que promove a progressão tumoral) e a instabilidade genómica (responsável pela génese de mutações que permitam a aquisição das "hallmarks") subjazem a aquisição daquelas [5].

Para além das "hallmarks" acima referidas, foi sugerida recentemente a adição, à lista, da reprogramação do metabolismo energético (as células tumorais parecem favorecer a produção de lactato em detrimento da fosforilação oxidativa mitocondrial), da evasão ao sistema imunitário e da aquisição de características estaminais (tumores pouco diferenciados apresentam sobrexpressão de genes normalmente expressos em células estaminais embrionárias e.g. *SOX2*, *MYC* e *OCT4*) [5, 13].

Como foi referido acima, nos tecidos é necessária a existência de homeostase de forma a que estes desempenhem eficientemente as suas funções biológicas. As células tumorais iniciadoras têm, portanto, de adquirir capacidade de evasão às restrições à propagação que lhe são impostas de forma a manter a funcionalidade tecidular. Para tal, desenvolveram várias estratégias que lhes permitem manter a produção de agentes proliferativos. As estratégias, até hoje descritas, são a produção autócrina de fatores de crescimento e respetivos recetores membranares; a indução de produção de fatores de crescimento nas células do estroma circundantes (produção parácrina), para os quais a célula neoplásica produz recetores específicos; a sobreprodução de recetores, desencadeando uma resposta exagerada a uma quantidade normal de fatores proliferativos e a ocorrência de alterações estruturais nos recetores ou vias de

sinalização internas, que causam a ativação constitutiva dos mesmos (neste caso as células neoplásicas adquirem capacidade proliferativa independente de ligandos) [5, 7].

De forma a que as células neoplásicas possam multiplicar-se, verdadeiramente e sem restrições, têm de ultrapassar uma segunda barreira imposta pelos programas celulares internos que regulam negativamente a proliferação celular e que estão frequentemente associados à ação de genes supressores tumorais (e.g. *RB1* e *TP53*). Assim, de forma a que as células tumorais possam proliferar sem restrições tem de ocorrer a inativação destes genes [5].

Outras duas características que as células tumorais têm de adquirir, de forma a sobreviver, são a capacidade para se evadir à morte celular e a capacidade de se multiplicar indefinidamente (imortalização) [5, 7, 14].

As células tumorais adquirem a capacidade de se evadir à apoptose pela inativação de genes que desencadeiam este processo de morte celular (e.g. *TP53*), pelo aumento da produção de fatores anti-apoptóticos (e.g. BCL2) ou de sobrevivência (e.g. IGF1/IGF2), pela diminuição da produção de fatores pró-apoptóticos (e.g. BAX) e/ou pela interferência com as vias de sinalização extrínseca para a ativação da apoptose [5, 7].

Para que as células adquiram imortalidade replicativa têm de ultrapassar as restrições no que se refere ao número limite de divisões em que podem participar. As células normais, após um certo número de ciclos de crescimento e divisão (o número de ciclos que cada célula pode realizar está dependente do comprimento do DNA telomérico) entram em senescência (estado não proliferativo mas viável) ou crise (envolve morte celular) o que determina o final da sua vida replicativa. As células neoplásicas imortalizadas adquirem a capacidade de ultrapassar, indefinidamente, este limite de ciclos, sem entrar em senescência ou crise, devido principalmente à reativação da telomerase que lhes permite evitar a erosão telomérica [5, 14].

À semelhança dos tecidos normais, as massas tumorais necessitam de suprir as suas necessidades no que diz respeito a nutrientes, oxigénio e eliminação de "lixo" metabólico; para tal, a massa tumoral tem de possuir capacidade angiogénica, ou seja, o tumor tem de ser capaz de gerar novos vasos sanguíneos funcionais que permitam suster

o desenvolvimento tumoral. A neovascularização do tumor está assim dependente da produção de VEGF ("vascular endotelial growth factor") [5, 7, 14].

À medida que o tumor se desenvolve, as suas células apresentam alterações na morfologia, nas ligações com outras células e nas ligações com a matriz extracelular, tal como sucede quando há perda de E-caderina (proteína que desempenha um papel de relevo nas adesões célula-a-célula). Esta perda de contacto intercelular facilita a invasão, por parte das células neoplásicas, dos tecidos circundantes, podendo ocorrer, à medida que o cancro evolui, intravasão (entrada de células cancerosas nos vasos sanguíneos ou linfáticos) seguida de extravasão (saída dos vasos sanguíneos ou linfáticos e entrada no parênquima de outros tecidos) e formação de micrometástases que se desenvolvem até à formação de tumores macroscópicos (colonização) (figura 1) [5, 7, 14].

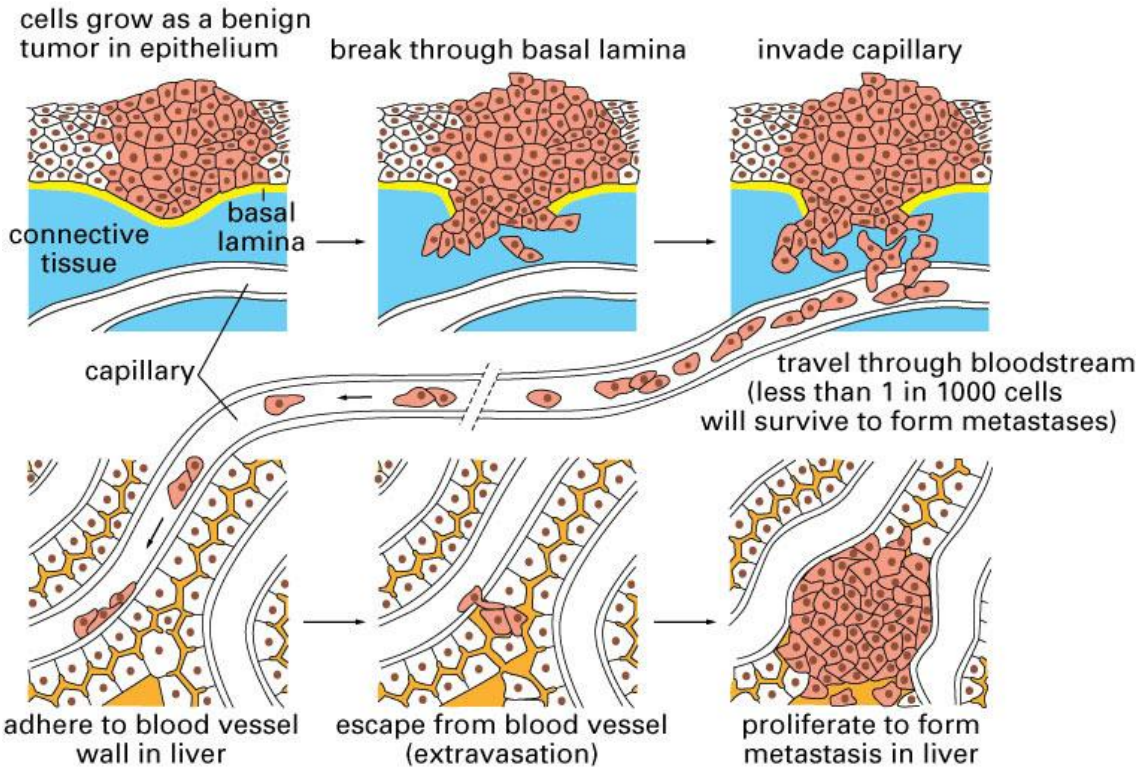


Figura 1 - Esquema ilustrativo da progressão do cancro desde um tumor benigno até um cancro metastizado. Na imagem podem ser observados as diferentes fases de progressão tumoral, nomeadamente a aquisição da capacidade de invasão, seguida da ocorrência de intravasão e de extravasão, com a subsequente formação de micrometástases. De ***http://thefutureofthings.com/articles/1012/smart-bombing-cancer.html***

I.2 - Cancro da mama: teorias para a sua génese e evolução

O cancro da mama é uma patologia que apresenta elevados níveis de heterogeneidade quer a nível histológico quer a nível molecular [15, 16], sendo uma das patologias que mais afeta as mulheres ocidentais [17].

Várias têm sido as teorias criadas ao longo do tempo para explicar a carcinogénese; de seguida serão apresentadas duas das mais aceites atualmente pela comunidade científica: a teoria da mutação somática e a teoria estaminal. De notar que estas duas teorias não são mutuamente exclusivas.

I.2.1 - Teoria da mutação somática: esta teoria tem prevalecido desde a sua criação, que se deu há cerca de 50 anos atrás [18]. Esta estabelece três premissas para explicar a origem do cancro, sendo estas: o cancro é de origem monoclonal, tendo origem numa célula que acumulou um conjunto de mutações no DNA; o cancro é uma doença que afeta o ciclo celular, tendo por causa a ocorrência de mutações em genes que controlam a proliferação e o ciclo celulares e, finalmente; as células encontram-se nos mamíferos, regra geral, num estado quiescente (fase G1/G0), pelo que a intensa atividade mitótica celular, que leva à génese da massa tumoral, é um estado celular anormal para o tecido [18, 19]. Dada a visão de que o cancro é uma doença de ciclo celular, surgem dois grupos de genes, com grande relevo para explicar a carcinogénese, que segundo os pressupostos desta teoria, são os oncogenes e os genes supressores tumorais (genes "gatekeeper" e genes "caretaker") [18-20]. Os oncogenes originam-se a partir dos proto-oncogenes e constituem um grupo cuja função, nas células normais, é promover a proliferação celular. Por sua vez os genes supressores tumorais são um grupo de genes cuja função, nas células normais, é bloquear a entrada, a progressão no ciclo celular ou impedir a ocorrência de mutações genómicas [21, 22]. Estes genes podem ser subdivididos em dois grupos os genes "gatekeeper" e os genes "caretaker" [22]. Os genes "gatekeeper" são aqueles cuja inativação contribui diretamente para a iniciação e progressão tumoral, enquanto os genes "caretaker" são um conjunto de genes cuja perda de função não é diretamente responsável pelo desenvolvimento tumoral. A inativação dos genes "caretaker" leva ao aumento da frequência de mutações genómicas [22].

O cancro, dado o acima exposto, seria o resultado da ocorrência de "hits" mutacionais genéticos que desencadeariam a inativação de genes supressores tumorais e a ativação de proto-oncogenes, em qualquer célula com capacidade proliferativa, pois a ocorrência de mutações em células com diferenciação terminal estariam destinadas a desaparecer, devido à incapacidade destas células de deixar descendência celular [7].

I.2.2 - Teoria estaminal: esta teoria para explicar a origem celular do cancro, tem vindo a ganhar cada vez mais relevo no meio científico. Esta afirma que o cancro é originado a partir de uma subpopulação celular com características estaminais.

A mama é um órgão bastante dinâmico a nível celular e apresenta parte do seu desenvolvimento pós-parto. Tal como em todos os tecidos, na mama, foi proposta a existência de células estaminais somáticas (CES) adultas, no entanto, a identidade e as características moleculares destas células, no homem, permanecem ainda desconhecidas [10, 23].

As CES adultas possuem capacidade proliferativa autorenovadora e a habilidade de originar as diferentes linhagens celulares que compõem os órgãos. As CES adultas possuem uma "plasticidade" limitada, quando comparadas com as células estaminais embrionárias e fazem parte de um sistema celular hierárquico bem definido, que é responsável pela homeostase tecidular [10, 11, 23, 24].

As CES encontram-se, normalmente, num estado quiescente, mas quando sujeitas a um estímulo proliferativo, têm a capacidade de se dividir simétrica ou assimetricamente gerando duas CES ou uma CES e uma célula "transit-amplifying", que possui um grau de diferenciação superior às CES e retém a capacidade proliferativa. As células "transit-amplifying" geradas são responsáveis pela génese das linhagens celulares com diferenciação terminal que compõem os tecidos dos órgãos adultos [10, 11].

Segundo a teoria estaminal, a génese tumoral ocorre através da desregulação (devido à ocorrência de mutações genéticas ou epigenéticas [25]) das vias envolvidas na replicação celular, nas CES ou em células com fenótipo estaminal [adquirido através da ativação de oncogenes indutores de plasticidade em células com graus de diferenciação

superiores às CES (inclusive células diferenciadas)]. Esta desregulação do ciclo celular leva à expansão destas populações celulares que poderão acumular mais alterações genéticas e epigenéticas. O uso do termo células iniciadoras tumorais para definir a origem celular do cancro é menos propensa a interpretações erróneas. De acordo com esta hipótese, as células tumorais iniciadoras são responsáveis pelo surgimento de todas as populações celulares tumorais, no entanto, são as únicas que possuem a capacidade de manter o crescimento tumoral, estando as restantes células destinadas à morte apesar de possuírem capacidade replicativa [24, 26-32].

As células estaminais e as células tumorais apresentam um conjunto de características em comum, sendo estas: a capacidade para a autorrenovação e proliferação extensiva; período de vida longo devido à existência de atividade antiapoptótica e telomerase ativa (permitindo a acumulação de alterações oncogénicas); mobilidade celular; e resistência a toxinas. A partilha destas características entre CES e células tumorais implica que menos passos são requeridos para gerar células tumorais iniciadoras a partir das CES, quando comparadas com as células diferenciadas (figura 2) [10, 11, 24, 27, 33].

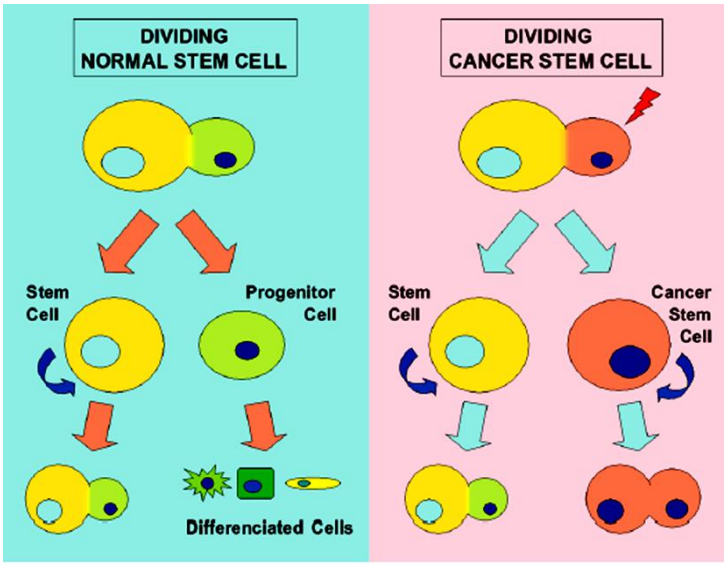


Figura 2 - Esquema representativo das diferenças comportamentais verificadas entre as células estaminais adultas (a azul) e as células estaminais tumorais (a cor de rosa). Na imagem pode-se verificar que da divisão de uma célula estaminal normal resultam uma célula estaminal e uma célula progenitor que se diferencia, no entanto, para as células estaminais tumorais, da divisão resultam duas células estaminais. De Martínez-Climent *et al*, 2006 [28].

I.2.3 - Teorias da mutação somática e estaminal e a progressão tumoral

O cancro, de acordo com as teorias da mutação somática e estaminal, tem a sua origem em qualquer célula com capacidade proliferativa ou em células com características estaminais, respetivamente, que, devido a mutações genéticas ou epigenéticas, perdem o controlo do ciclo celular, adquirindo a capacidade de proliferar sem as restrições a que as células normais estão sujeitas [5, 7, 34].

Apesar das duas teorias acima referidas permitirem explicar convincentemente a evolução tumoral, estas têm implicações diferentes no que se refere ao motor celular da evolução tumoral. Segundo a teoria da mutação somática, qualquer célula com capacidade proliferativa pode ser responsável pela evolução tumoral devido à aquisição de mutações de diferentes naturezas [18]. Assim a massa tumoral é composta por vários clones celulares com capacidade proliferativa, em competição entre si, sendo que qualquer um destes clones pode vir a dominar o microambiente tumoral [34]. De acordo com a teoria estaminal, apenas as células estaminais tumorais têm capacidade para fazer evoluir o tumor. Assim sendo, a massa tumoral será, de acordo com esta teoria, composta por várias populações celulares com graus de diferenciação distintos em que, apesar de algumas células possuírem capacidade mitótica, não têm um papel ativo na evolução tumoral, papel este que cabe inteira e unicamente às células estaminais tumorais [34].

De acordo com ambas as teorias, o cancro é de origem monoclonal, quer isto dizer que o cancro tem origem numa única célula que adquire várias alterações, sendo estas alterações posteriormente transmitidas às células filhas. Após o surgimento da célula iniciadora, é frequente a ocorrência de longos períodos de latência em que ocorre proliferação e acumulação sucessiva de alterações de diferentes naturezas nas diferentes células filhas, de acordo com a teoria da mutação somática, ou na população de células estaminais tumorais, de acordo com a teoria estaminal; ou seja, ocorre uma diversificação celular clonal em que cada um dos novos clones gerados possui as alterações que deram origem à célula iniciadora mais as novas mutações características de cada clone [21, 35].

O cancro surge, assim, como uma doença genómica e epigenómica, cuja evolução está dependente da ocorrência de mutações e da ação da seleção natural sobre os clones

que as possuem, sendo favorecidos os clones que apresentam algum tipo de vantagem. Estas vantagens podem ser, por exemplo, a capacidade de um determinado clone para concluir o ciclo celular em menos tempo que os restantes ou de se evadir à apoptose, permitindo, ao clone, multiplicar-se mais vezes, deixando, assim, mais descendência, etc. Um tumor desenvolvido é, assim, constituído por células com fenótipos variados, originados por sucessivas rondas de mutação e expansão clonal, onde se verifica dominância dos clones com maior vantagem seletiva. É necessário ter em consideração que, de acordo com a teoria estaminal, parte da variabilidade fenotípica observada nos tumores, resulta da plasticidade fenotípica celular e da diferenciação das células tumorais iniciadoras, pelo que aquela variabilidade fenotípica não é hereditável. Esta diversidade fenotípica, resultante da plasticidade e diferenciação celulares, permite eliminar algum do ruído evolutivo tumoral, porque parte da variabilidade celular observada resulta da ocorrência de mutações em células não estaminais (células que entraram num programa de diferenciação e que, por isso, têm menor potencial proliferativo), pelo que não é passível de ser transmitida clonalmente (figura 3) [21, 34-41].

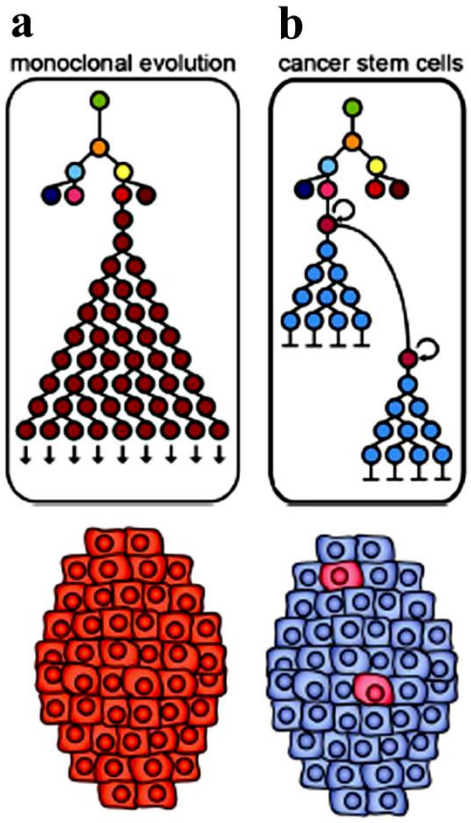


Figura 3 - Esquema ilustrativo da evolução tumoral de acordo com as teorias somática (a) e estaminal (b). Legenda: Verde - célula normal, restantes cores representam clones diferentes. Como pode ser observado em **(a)** de acordo com a teoria somática qualquer clone pode impulsionar a evolução tumoral, no entanto de acordo com a teoria estaminal **(b)** apenas as células com características estaminais possuem esta capacidade. Adaptado de Navin e Hicks, 2010 [34]

É necessário salientar que, durante a evolução tumoral, as mutações ocorrem ao acaso, ou seja, não há intencionalidade tumoral para que ocorram mutações específicas que o levem à fase seguinte. Como consequência deste processo mutacional ao acaso, apenas uma pequena fração destas mutações confere vantagem seletiva a determinado clone, sendo os clones, nos quais ocorrem mutações desvantajosas, eliminados pelo processo de seleção darwiniana. É de referir que o processo de seleção não é 100% restritivo, permitindo a retenção de clones que apresentam mutações de carácter neutro ou ligeiramente desvantajoso, podendo ocorrer alguma expansão destes clones devido a fenómenos de deriva genética [36, 37].

Outro aspeto de relevo é o facto da seleção darwiniana, que atua sobre os diferentes clones, ser específica de um determinado microambiente tumoral e "cega" no que se refere às condições futuras e à natureza da mutação (mutações genéticas e epigenéticas possuem o mesmo peso microevolutivo). Isto leva a que, numa determinada fase da evolução tumoral, um clone possa apresentar características vantajosas que levam à sua expansão, mas que, numa outra fase, levem a um "dead end" evolutivo. As células de um determinado tumor estão, portanto, sujeitas a alterações de pressão seletiva causadas pela alteração do microambiente tumoral em função da sua progressão [36].

I.3 - Organismos modelo, linhas celulares e o estudo do cancro da mama

Os organismos modelo representam apenas uma pequena fração da diversidade biológica existente no planeta Terra [42], no entanto estes são a base sobre a qual o conhecimento fundamental biológico e os estudos clínicos assentam e evoluem [42, 43]. O desenvolvimento de modelos animais para o estudo do cancro da mama tem vindo a ser realizado desde há 100 anos atrás e, para este tipo de estudo, assumem particular interesse os roedores *Mus musculus* (MMU, ratinho) e *Rattus norvegicus* (RNO, ratazana) [44]. Várias estirpes destes roedores, com suscetibilidade para o desenvolvimento de cancro da mama foram geradas com recurso a "inbreeding" seletivo, sendo, também, utilizadas tecnologias "Knockout", transgénese e carcinogénese química [44].

Com o advento da genómica comparativa, o uso de animais modelo, como o RNO, foi propulsionado para um nível de utilidade superior ao previamente existente, devido ao desenvolvimento de "softwares" e à criação de bases de dados, que tendo por base as sintenias entre as espécies e a conservação das funções entre genes homólogos, facilitam a identificação de vias bioquímicas e genes envolvidos na tumorigénese, para além de facilitar a associação de informação genética entre *Homo sapiens* e *Rattus norvegicus* [45, 46].

O RNO é um dos animais modelo mais usados em estudos sobre o cancro da mama, porque a carcinogénese mamária em RNO e humanos apresenta várias similaridades no que diz respeito: à suscetibilidade da glândula mamária à iniciação tumoral durante o desenvolvimento, à progressão tumoral [47, 48], à histopatologia e à ausência de etiologia viral [49]. No estudo do cancro da mama assumem grande importância os modelos carcinogénicos químicos [induzidos por DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno) ou por MNU (*N*-metil-*N*-nitrosurea)] ou hormonais (induzidos por 17β-estradiol - E_2). Estes agentes, em fêmeas intactas/virgens, induzem uma elevada incidência de adenocarcinomas mamários que apresentam um perfil histológico e de biomarcadores similares ao Humano, 2 a 5 meses após a administração do agente carcinogénico [50].

I.3.1 - Linhas celulares como modelos para o estudo do cancro da mama.

As linhas celulares são amplamente utilizadas em diversos estudos, no entanto, a sua aplicação enquanto modelos para o estudo *in vitro* de cancro, assume particular relevo [51], tendo permitido a análise de vários processos celulares com grande impacto naquela patologia, nomeadamente os mecanismos envolvidos na desregulação da proliferação, apoptose e migração celulares [52].

As linhas celulares derivadas de tumores/cancro, enquanto modelos, apresentam várias vantagens, tais como o facto de serem de manuseamento fácil, possuírem capacidade de proliferação ilimitada (permite a aquisição de grandes quantidades de material biológico), apresentam um grau relativamente elevado de homogeneidade, são facilmente substituídas por "stocks" criopreservados no caso de ocorrer contaminação

[51, 53], têm acessibilidade facilitada à comunidade científica [45] e permitem, sob as condições apropriadas, obter resultados reprodutíveis [54].

As desvantagens associadas a estes modelos *in vitro* são a tendência para a ocorrência de variações fenotípicas e genotípicas como consequência de cultura prolongada, possibilidade de ocorrência de seleção de alguns clones em particular, perdendo-se assim parte da heterogeneidade celular tumoral [51], a instabilidade genómica (pode levar ao surgimento de clones pouco relacionados com as células tumorais de origem), possibilidade de contaminação com outras linhas celulares ou microrganismos, as caixas de cultura apresentam diferenças fundamentais em relação ao local de origem das células (pode causar alterações na morfologia e/ou nos padrões de expressão génica) [54] e a dificuldade em obter culturas de longa duração de alguns tipos tumorais [55]. As variações fenotípicas e genotípicas e a perda de representatividade de todas as linhagens tumorais são desvantagens preocupantes, principalmente se se quiser considerar as linhas celulares como modelos válidos para o estudo da patobiologia do cancro e a resposta a novas terapias químicas [51]. Estas desvantagens podem, no entanto, ser minimizadas se forem utilizadas linhas celulares primárias ou "short-term cultures", pois estas apresentam, regra geral, níveis superiores de representatividade celular e níveis menores de deriva fenotípica e/ou genotípica [51].

Atualmente está disponível uma enorme variedade de linhas celulares de cancro provenientes de várias espécies (e.g. *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus, Mus musculus*), de diversos tecidos e de tumores espontâneos ou induzidos [45, 53, 56]. Um aspeto fundamental, para aumentar o valor científico destas linhas celulares, enquanto modelos para o estudo de cancro, é a caracterização das mesmas [45]. Isto porque, em linhas caracterizadas, é possível extrair uma maior quantidade de informação, no que diz respeito à identificação dos processos genéticos e epigenéticos envolvidos na oncogénese, na microevolução tumoral, na identificação de novos alvos terapêuticos e na determinação dos mecanismos moleculares associados à resistência/suscetibilidade a agentes terapêuticos [45, 57, 58].

Tradicionalmente existem seis parâmetros que devem ser contemplados para a caracterização de uma linha celular, sendo estes [59]:

1. Demonstração da ausência de contaminação cruzada;
2. Confirmação da espécie de origem;
3. Correlação com o tecido de origem, o que compreende:
    - Identificação da linhagem à qual a linha celular pertence;
    - Posição das células na linhagem (isto é, as células apresentam um *status* estaminal, percursor ou diferenciado?).
4. Determinar se a linha celular se encontra transformada ou não:
    - A linha celular è finita ou contínua?
    - A linha expressa propriedades associadas à malignidade?
5. Avaliar a propensão da linha celular para a instabilidade genética e para a variação fenotípica;
6. Identificação de linhas celulares específicas dentro do mesmo grupo de origem.

A caracterização das linhas celulares pode, também, ser feita a outros níveis, complementares entre si, tais como comportamento celular (curva de crescimento, "doubling time", capacidade de gerar tumores em "nude" MMU, dependência de ancoragem, capacidade de invasão, migração), morfologia celular, citogenómica, genómica, epigenómica, transcriptómica, proteómica, entre outros, dependendo da natureza dos estudos em que as células serão aplicadas [45, 58, 60, 61]. De forma a caracterizar as linhas celulares várias metodologias têm sido aplicadas tais como o bandeamento-G, FISH ("Fluorescent *in situ* Hybridization"), "microarrays" de metilação e de expressão, CGH ("Comparative Genomic Hybridization"), "array"-CGH, RT-qPCR ("Real-Time Reverse Transcriptase - quantitative" PCR) [45, 53, 58, 60], etc.

A caracterização das linhas celulares deve ser feita em vários pontos de progressão após a cultura inicial, isto porque, ao longo do tempo, as células acumulam mutações que podem levar à alteração da morfologia e do metabolismo celular. Isto pode ter como consequência a menor adequação da linha para o tipo de estudos em que seria inicialmente aplicada [51, 62]. A caracterização celular quando realizada a intervalos de passagens regulares permite, também, detetar a presença de contaminações

cruzadas com outras linhas, o que permitirá descartar a linha celular contaminada, não comprometendo assim o estudo a ser realizado [51, 58, 62].

A nível citogenómico, a caracterização das linhas celulares a ser usadas como modelo, é de extrema importância, porque a identificação e caracterização das alterações estruturais e numéricas cromossómicas e dos "breakpoints" envolvidos nos rearranjos cromossómicos tem o potencial de revelar que genes se poderão encontrar desregulados, que processos celulares poderão estar implicados na instabilidade cromossómica (e.g. disfunção dos "checkpoints" ou vias de reparação de danos no DNA) e quais os potenciais alvos terapêuticos [45, 63]. Um aspeto essencial na caracterização de uma linha celular tumoral/cancro é a determinação da ocorrência de amplificação e a caracterização deste ganho de DNA, uma vez que a sobrexpressão de determinados genes (e.g. *ERBB2* em alguns tumores da mama ou *MYCN* em alguns neuroblastomas) pode estar associada ao processo oncogénico. Estes genes podem, também, revelar ser potenciais alvos terapêuticos [58, 64].

A caracterização genómica, no que se refere à determinação do perfil molecular génico da linha a ser utilizada, quando aliada à caracterização citogenómica permite refinar as causas subjacentes à instabilidade cromossómica, permitindo também, estabelecer os mecanismos moleculares responsáveis pela perda do controlo do ciclo celular e explorar potenciais alvos terapêuticos [57, 58, 65]. A determinação do perfil molecular das linhas usadas como modelos, permite identificar os tipos e subtipos de cancro e, consequentemente, definir quais as linhas celulares mais adequadas para determinados tipos de estudo [63].

I.4 - Instabilidade genómica

A ocorrência de diversidade morfológica e molecular é frequentemente observada nas células tumorais e surge como resultado da instabilidade genómica. A instabilidade genómica é uma "hallmark" do cancro [66] e pode ser definida como um aumento da frequência de ocorrência de alterações no genoma e pensa-se que seja fulcral para que as células tumorais adquiram as várias mutações essenciais para a evolução tumoral [67-

69]. A instabilidade genómica está correlacionada com a evolução clínica, sendo que os tumores mais instáveis estão associados, regra geral, a um pior prognóstico [70].

A cada ciclo celular somático as células têm de duplicar fidedignamente o seu genoma para que cada célula filha possua um complemento cromossómico igual à da célula progenitora. Quando ocorrem falhas ou há um aumento da frequência de erros, no processo de síntese ou de segregação do material genético, podem ser geradas variadas alterações no genoma das células filhas, cuja acumulação pode levar à desregulação da divisão celular e à perda do equilíbrio entre os processos de morte e crescimento celular. Estas alterações podem, consequentemente, originar cancro [71].

Durante a divisão celular, a instabilidade genómica está associada à incapacidade das células parentais duplicarem e segregarem fidedignamente o seu genoma [71]. Para que ocorra instabilidade genómica é importante que os genes "caretaker" (conjunto de genes responsáveis pela reparação do DNA ou pelos "checkpoints") estejam totalmente ou parcialmente disfuncionais, de forma a permitir a ocorrência de mutações de várias naturezas, tais como os rearranjos estruturais cromossómicos e mutações pontuais [67, 72]. Existem quatro mecanismos responsáveis pela manutenção da estabilidade genómica sendo estes a alta fidelidade de replicação do DNA durante a fase S, a segregação precisa dos cromossomas durante a mitose, a reparação livre-de-erros de danos esporádicos no DNA e a coordenação do ciclo celular por intermédio dos "checkpoints" (figura 4) [71].

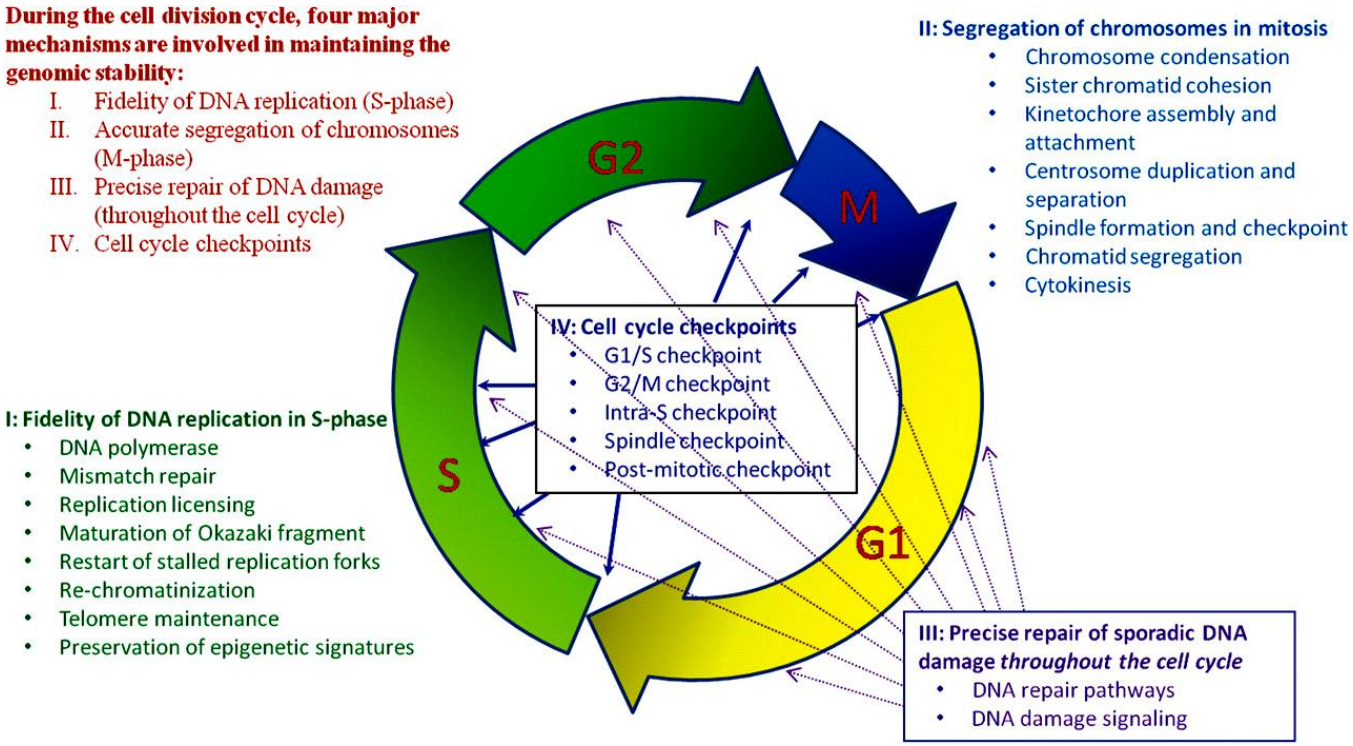


Figura 4 - Esquema representativo do ciclo celular e dos eventos celulares que nele ocorrem e são responsáveis pela manutenção da estabilidade genómica. De Shen, 2011 [71].

I.4.1 - Causas que levam ao surgimento de instabilidade genómica

Várias têm sido as causas implicadas no surgimento de instabilidade genómica, tais como os locais frágeis do genoma, a heterocromatina, a aneuploidia, a erosão telomérica e a epigenética. Estes serão de seguida abordados.

Os locais frágeis são sequências de DNA que revelam quebras ou *gaps* após tratamento, das células, com agentes que causam inibição parcial da síntese de DNA. Estes estão frequentemente associados, por exemplo, a "hotspots" para a ocorrência de alterações estruturais cromossómicas, amplificação génica ou integração de DNA exógeno [69]. Estão descritos, até à data, dois tipos de locais frágeis os comuns e os raros. Os locais frágeis comuns constituem 95% do total e estão naturalmente presentes no genoma dos mamíferos [69]. Os locais frágeis raros, também conhecidos como mutações dinâmicas, representam os restantes 5% e surgem como consequência da expansão de DNA repetitivo [69].

Outra causa apontada na instabilidade genómica é a heterocromatina. Esta, na maioria dos seres eucariotas, está concentrada nas regiões centroméricas, pericentroméricas e teloméricas e é constituída por sequências altamente repetidas em *tandem* (as sequências de DNA satélite) e elementos transponíveis, sendo zonas com baixa densidade génica [73]. A heterocromatina desempenha funções fulcrais na segregação cromossómica, na estabilidade genómica (supressão de recombinação entre sequências repetitivas e proteção contra a mutagénese insercional causada por elementos transponíveis), na regulação génica [74], etc.

A elevada concentração de sequências repetitivas nas zonas heterocromáticas representa, por si só, uma ameaça à estabilidade genómica, isto porque, graças à natureza repetitiva das sequências, é mais frequente a ocorrência de erros na replicação, reparação ou recombinação destas sequências que, por sua vez, podem gerar rearranjos cromossómicos ou aneuploidia [73].

A teoria aneuploide estipula que a perda do balanço cromossómico diploide natural da espécie, ou seja a aneuploidia, é a causa da instabilidade genómica que se verifica em células neoplásicas e pré-neoplásicas [75]. A aneuploidia, devido à alteração do complemento cromossómico, leva a que proteínas altamente conservadas e coordenadas responsáveis pela segregação, síntese e reparação dos cromossomas percam a sua coordenação, tendo como consequência o aumento da taxa de mutações no genoma, o que, por sua vez, leva ao aumento da ocorrência de alterações génicas [75]. Assim, segundo a teoria aneuploide, a heterogeneidade genómica e fenotípica apresentada pelas células tumorais surge como consequência da instabilidade genómica inerente às células aneuploides, sendo esta instabilidade suficiente para que ocorra a evolução somática de células neoplásicas a partir de precursores celulares aneuploides, que surjam ao acaso [75, 76].

A erosão telomérica também desempenha um papel de relevo na instabilidade genómica. Os telómeros, nas células normais, desempenham uma função essencial na proteção dos cromossomas e consequentemente na estabilidade do genoma. Nos estados iniciais da progressão tumoral, em células sem telomerase ativa, as rondas de divisão celular levam à redução do comprimento dos telómeros. Quando estes atingem um comprimento crítico, ocorrem fusões cromossómicas seguidas de ciclos de "breakage-

fusion-bridge" (BFB), que levam ao surgimento de rearranjos cromossómicos complexos e não equilibrados. A crise telomérica é, no entanto, transiente. A estabilização do genoma, após os eventos de crise telomérica, é atingida pela reativação da telomerase [67, 77].

Finalmente, a epigenética. Esta é a área científica que estuda as alterações na expressão génica de carácter hereditário que surgem sem que ocorram alterações na sequência nucleotídica [78, 79]. Existem três tipos de eventos epigenéticos, até à data descritos, que possuem os critérios de heritabilidade necessários: a metilação do DNA, as modificações histónicas e RNAs não-codificantes.

A metilação do DNA refere-se à ocorrência de uma ligação covalente de um grupo metilo a uma citosina, que se encontre ligada na extremidade 5' a um nucleótido de guanina, formando um dinucleótido CpG. O grupo metilo, usado na modificação da citosina, provem de uma molécula de S-adenosil-L-metionina (SAM), sendo a reação de transferência do grupo metilo catalisada por uma das DNA metiltransferases (DNMTs) [4, 80, 81].

As modificações histónicas dizem respeito a um conjunto de modificações covalentes que ocorrem nas histonas após tradução. Estas modificações podem ser acetilações, metilações, fosforilações ou ubiquitinações, entre outras, e provocam a condensação ou descondensação da cromatina, o que impede ou facilita a ocorrência da transcrição [4]. As modificações histónicas podem ter vários efeitos no *status* da cromatina e consequentemente na integridade estrutural cromossómica, por exemplo a acetilação de histonas tem sido associada a translocações cromossómicas, em que a proteína de fusão resultante exibe ganhos de função [4].

Os RNAs não-codificantes são a classe mais recentemente descrita, entre os mecanismos epigenéticos, e traduz a regulação da expressão génica, de forma hereditária, por ação de microRNAs [4]. Estes controlam, também, a metilação histónica e do DNA por intermédio de siRNAs ("small interfering" RNAs) [82]. Os RNAs não-codificantes têm vindo a ser implicados, em estudos recentes, no controlo de vias reguladoras da arquitetura cromossómica, na modulação da cromatina, nas modificações epigenéticas, na transcrição, na maturação do RNA e na tradução [74].

A alteração das marcas epigenéticas normais do genoma tem vindo a ser associada ao desenvolvimento de instabilidade genómica. De grande impacto, para o desenvolvimento de instabilidade genómica, é a ocorrência de hipometilação de sequências repetitivas em *tandem* ou interdispersas [83]. A hipometilação deste tipo de sequência sugere que ambas desempenham um papel de relevo na carcinogénese, provavelmente ao favorecer a ocorrência de rearranjos cromossómicos [25, 84]. De facto têm vindo a ser descritas zonas genómicas hipometiladas e que estão co-localizadas com "breakpoints" de rearranjos cromossómicos, locais frágeis, "clusters" génicos e genes supressores tumorais [85]. As sequências de DNA repetitivas, nas células normais, deveriam apresentar maiores níveis de recombinação do que as sequências presentes em baixo número de cópias, no entanto tal não ocorre, pois a recombinação nestas é amplamente reprimida por vários mecanismos entre eles um elevado grau de metilação das citosinas, hipoacetilação histónica e heterocromatização [83, 86, 87]. Esta repressão está associada à adoção de uma estrutura heterocromática que torna o DNA repetitivo menos acessível ao reconhecimento de homologia inter- ou intracromossómica. Assim sendo, a perda de metilação do DNA favorece, parcialmente, a recombinação entre sequências de DNA repetitivo devido à adoção de uma estrutura heterocromática mais relaxada [83].

A hipometilação do DNA também fomenta a instabilidade genómica por levar à ativação de elementos transponíveis (principalmente os elementos LINE-1, Alu e elementos da família HERV-K) ou de vírus endógenos, que aumentam a predisposição para a ocorrência de rearranjos cromossómicos e para a mutagénese insercional [83, 84].

I.4.2 - Manifestações da instabilidade genómica

A instabilidade genómica, pode ser manifestada sob várias formas, tais como a instabilidade cromossómica, o aumento da frequência de mutações nucleotídicas, a instabilidade dos microsatélites e alteração dos padrões de metilação [67, 69, 72, 88].

I.4.2.1 - Instabilidade cromossómica – CIN

A instabilidade cromossómica é muito frequente nos tumores e traduz o aumento da frequência da ocorrência de perdas, ganhos e alterações estruturais cromossómicas [89, 90].

Este tipo de instabilidade tem sido considerada uma das alterações com maior impacto na progressão tumoral [91]. Esta deve-se à ocorrência de anomalias no "checkpoint" mitótico, no "checkpoint" de danos no DNA, desregulação centrossómica [77, 92, 93], anomalias nos sistemas de reparação e replicação do DNA [77], defeitos na coesão dos cromossomas metafásicos [92] e pode, também, ocorrer por intermédio de tetraploidia, que, por sua vez, surge devido a falhas na citocinese [90, 92, 93].

A instabilidade cromossómica está clinicamente associada a um pior prognóstico [91] e pode ser subdividida em dois tipos: a instabilidade cromossómica associada a cromossomas inteiros ("whole chromosomal instability" - W-CIN) e a instabilidade cromossómica estrutural ou segmentar ("structural or segmental chromosomal instability" - S-CIN) [90].

I.4.2.1a - "Whole Chromosomal Instability" - W-CIN

A "whole chromosomal instability" é manifestada cariotipicamente sob a forma de aneuploidia, no entanto é necessário ter em conta que apenas células que apresentam cariótipos aneuploides em constante alteração, devido à ocorrência de mutações genéticas que promovem a segregação incorreta dos cromossomas, podem ser classificadas como possuidoras de "whole chromosomal instability" [90, 93]. Esta distinção é necessária pois existem células aneuploides, resultantes de erros esporádicos

na segregação cromossómica, que não são necessariamente instáveis, podendo, no entanto, desenvolver instabilidade cromossómica à medida que o tumor evolui [90].

- **Aneuploidia e o impacto desta na progressão tumoral**

Nos tumores epiteliais têm vindo a ser descritas várias alterações cariotípicas estruturais e numéricas. Dentro das variações numéricas, podem ser encontrados fenómenos de poliploidia, caracterizados pelo aumento do conteúdo de DNA celular, como resultado do aumento, em múltiplos, de todo o complemento cromossómico celular e de aneuploidia, que pode ser definida como um desvio do complemento cromossómico normal (2n), causado por ganhos ou perdas cromossómicas, sendo normalmente acompanhada por alterações estruturais [94].

A correlação entre o cancro e variações na ploidia celular é conhecida desde a publicação dos trabalhos de Boveri em 1902 [95] e 1914 [96], sendo que as células tumorais, regra geral, são aneuploides [94, 97]. Nos tumores epiteliais, é comum encontrar células com complementos cromossómicos quase triploides ou tetraploides e que apresentam, em simultâneo, vários rearranjos cromossómicos tais como amplificações, deleções e translocações não-recíprocas. Apesar da aneuploidia ser uma das características das células tumorais mais descrita, há áreas por explorar, pois ainda não se sabe se este é um fenómeno que contribui ativamente para a tumorigénese ou se é uma alteração secundária da transformação das células [94, 97].

A aneuploidia desempenha um papel de relevo na tumorigénese e é a alteração genética com maior impacto, pois cada cromossoma adquirido ou perdido transporta milhares de genes [76]. No entanto, a aneuploidia, nem sempre tem um impacto positivo na evolução do tumor, pois têm sido descritos casos em que, num determinado contexto (geralmente é o ganho de cromossomas que está associado a uma desvantagem proliferativa), a ocorrência de aneuploidia leva à supressão do tumor [97-99]. No entanto, não se sabe ao certo o porquê desta variação comportamental dependente do contexto tumoral [97].

Para além do acima descrito existem três fatores que têm, também, um papel relevante no comportamento das células aneuploides, sendo estes a combinação

específica de cromossomas numa determinada célula, a estabilidade da célula aneuploide e a ocorrência de mutações adicionais, em oncogenes ou em genes supressores tumorais, que são retidas ou perdidas na célula [97].

A complexidade genética das células tumorais aneuploides tem dificultado o estudo do impacto da aneuploidia na oncogénese, isto porque cada tumor apresenta combinações aneuploides únicas, o que complica a determinação das alterações moleculares que desencadeiam a aneuploidia [94].

I.4.2.1b - "Structural or Segmental Chromosomal Instability" - S-CIN

A "structural or segmental chromosomal instability" manifesta-se cariotipicamente sob a forma de translocações recíprocas ou não-recíprocas, "jumping translocations", deleções, amplificações, inserções e/ou inversões [90, 100].

- **Alterações estruturais cromossómicas e o seu impacto na progressão tumoral**

Os rearranjos estruturais, principalmente as translocações, são frequentemente observados nos tumores sólidos e hematopoiéticos [101]. Estes são um dos mecanismos fulcrais para a génese de alterações génicas, tendo por consequência a desregulação de vários processos celulares, tais como a proliferação, apoptose, angiogénese e estabilidade do genoma [102].

A evolução tumoral está, também, associada às alterações estruturais cromossómicas, uma vez que estas podem promover a passagem para uma fase tumoral maligna por gerarem alterações no número de cópias de regiões subcromossómicas específicas, que podem resultar na deleção de genes supressores tumorais ou na amplificação de oncogenes [66, 103, 104]. Para além das deleções/amplificações, resultantes maioritariamente das alterações estruturais não equilibradas, as alterações estruturais, neste caso principalmente as equilibradas, estão, também, associadas à formação de genes de fusão e à desregulação transcripcional como resultado direto da ocorrência de translocações, inserções ou inversões [103, 104].

Já há algum tempo que se sabe do impacto dos rearranjos cromossómicos, principalmente das translocações, na génese/evolução tumoral dos cancros da linha hematopoiética [101, 105], no entanto, devido a limitações técnicas e à complexidade dos cariótipos, assumia-se que o papel das translocações e inversões eram pouco significantes nos cancros de origem epitelial. Esta noção está a ser desafiada devido à descoberta de inúmeros genes de fusão nos mais variados tipos de tumores sólidos, tais como o da mama, próstata e pulmão [101, 104, 106].

I.4.2.2 - Instabilidade associada à maior frequência de alterações nucleotídicas

Este tipo de instabilidade está associada à perda de função dos mecanismos de reparação do DNA e à perda de função dos "checkpoints" do ciclo celular. A instabilidade associada à maior frequência de alterações nucleotídicas é caracterizada pelo aumento da ocorrência de substituições, deleções e/ou inserções de um ou mais nucleótidos. Associados à ocorrência destas mutações, em zonas codificantes, podem surgir vários efeitos, tais como, mutações silenciosas, mutações "missence", mutações "nonsense" e mutações que causam "frameshifts" [77]. Estas podem levar a duas situações, ambas com impacto considerável na evolução tumoral: o ganho de atividade de oncogenes ou a perda de função de genes supressores tumorais.

I.4.2.3 - Instabilidade dos microsatélites

A instabilidade dos microsatélites é caracterizada pela expansão de repetições nos microsatélites e resulta da ocorrência de defeitos na maquinaria de reparação de bases emparelhadas de forma não complementar [67, 68, 93]. Associada às alterações nas sequências dos microsatélites está a ocorrência de "frameshifts" [67, 68].

I.4.2.4 - Alterações epigenéticas

A desregulação dos mecanismos epigenéticos está fortemente implicada no desenvolvimento do cancro e tem sido evidenciado que esta doença tem tanto de caracter genético quanto de epigenético [4]. O cancro é, regra geral, caracterizado pela instabilidade do epigenoma ao nível do DNA (metilação das citosinas) e da cromatina (modificações histónicas e da conformação cromática) [84].

Tendo em conta a metilação do genoma, a alteração do *status* inicial de metilação de uma dada sequência pode ocorrer tanto nos momentos iniciais da tumorigénese, como durante a evolução tumoral [83, 84]. Em vários tipos de cancro as alterações epigenéticas parecem preceder as genéticas e ambos os tipos de alterações (genéticas e epigenéticas) coexistem em muitos, se não mesmo em todos os cancros, no entanto ainda se desconhecem quais são os eventos primários e secundários na carcinogénese [4].

As alterações epigenéticas mais evidentes associadas ao cancro são a hipometilação e a hipermetilação do DNA e a perda de "imprinting" [83, 84]. É, no entanto, necessário evidenciar o facto de que os estados de hipo- ou de hipermetilação serem termos relativos utilizados para evidenciar o ganho ou perda de metilação, tendo por referência cadeias de DNA standard. Quando se estuda cancro o standard utilizado é, regra geral, o DNA de células normais do mesmo tecido, da mesma espécie [83].

A hipermetilação tem vindo a ser descrita numa grande variedade de cancros e ocorre de forma frequente e extensiva em algumas ilhas CpG presentes em promotores génicos [4]. Esta está associada ao silenciamento génico quer de genes com impacto real ou putativo na carcinogénese (por exemplo os genes supressores tumorais), quer em genes não implicados/associados ao cancro [83, 84].

A hipometilação do genoma, como anteriormente descrito, afeta grandemente a fração repetitiva do genoma e parece estar associada à instabilidade genómica, no entanto a perda de metilação também afeta sequências de cópia única tais como genes e sequências reguladoras [80, 83]. Apesar da hipometilação de sequências reguladoras da transcrição ser menos frequente que a hipermetilação das sequências reguladoras, esta ocorre e parece estar associada à sobrexpressão génica [84, 107].

Outra alteração do epigenoma associada ao cancro é a perda de "imprinting". O "imprinting" origina a ocorrência de silenciamento alélico dependente do progenitor do qual o alelo provém. Este resulta da ocorrência de uma marca epigenética que leva a que a expressão de um determinado alelo seja muito reduzida ou mesmo nula nas células somáticas da descendência [25, 107]. Este mecanismo de regulação génica afeta vários genes envolvidos em vários eventos celulares, tais como a regulação do crescimento celular, sinalização, ciclo celular, etc. [25]. A perda de "imprinting" diz respeito à ativação de alelos normalmente silenciados ou ao silenciamento de alelos normalmente ativos transcripcionalmente e tem vindo a ser associado à suscetibilidade aumentada para o desenvolvimento de certos tipos de cancro, a um possível efeito na regulação da população de células progenitoras tumorais e à ativação/silenciamento de genes em vários tipos de cancro [25].

Dado o impacto e a forte associação com o desenvolvimento tumoral, as alterações epigenéticas, principalmente a metilação do DNA e as modificações histónicas, têm vindo a ser definidas como importantes alvos terapêuticos, sendo de particular interesse devido à sua reversibilidade. Vários têm sido os agentes terapêuticos desenvolvidos com o intuito de inibir a ação das DNMTs e HDAC ("histone deacetylases"), tendo sido realizados ensaios clínicos em pacientes com cancro da mama [78, 81].

I.5 - Ciclo celular, oncogenes e genes supressores tumorais

O ciclo celular, nas células somáticas adultas, compreende várias fases que culminam na génese de duas células filhas a partir de uma célula mãe. Este ocorre pela passagem sucessiva, da célula mãe, por interfase (fases G1, S e G2) seguida de fase M (mitose e citocinese) [7]. A passagem da célula pelas fases acima descritas é molecularmente controlada por uma vasta gama de proteínas, sendo as de maior importância as ciclinas e as CDKs ("ciclin dependent kinases") [7, 108, 109].

Nos mamíferos estão descritas quatro CDKs (CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6) envolvidas na regulação do ciclo e dez ciclinas que pertencem a quatro classes distintas (classes A, B, D e E). Os níveis celulares de cada ciclina variam ao longo do ciclo e são

regulados temporalmente por síntese e degradação. A ativação das CDKs está dependente da associação destas às respetivas ciclinas, sendo que cada complexo ciclina-CDK apresenta especificidade para um determinado grupo de alvos, pelo que a sua ação é específica de determinadas fases do ciclo [7, 110].

De uma forma reducionista e direta, a progressão pelo ciclo celular, inicia-se pela ligação de mitogénios aos respetivos recetores, desencadeando a síntese de ciclinas do tipo D (ciclinas D1, D2 e D3) que se ligam e ativam as CDK 4 e 6, durante a fase G1. A ativação dos complexos CiclinaD-CDK4/6 leva à inativação parcial das proteínas sequestradoras de fatores de transcrição, retinoblastoma (RB), RBL1 e RBL2 ("retinoblastoma like protein") o que, por sua vez, permite a síntese de ciclinas do tipo E (ciclinas E1 e E2). Estas ligam-se à CDK2 e levam à inativação total das RB, RBL1 e RBL2, para além de desencadearem a transição da fase G1 para a fase S. O complexo ciclina E/CDK2 é, também, responsável pelo despoletar da fase S, onde ocorre a síntese do DNA. De seguida a CDK2 liga-se à ciclina A2, durante a fase S tardia e desencadeia a passagem da fase S para a mitose (fase G2). Para finalizar a interfase a CDK1 liga-se a ciclinas do tipo A para facilitar a entrada na fase M. Após a degradação da membrana nuclear, ocorre formação de complexos Ciclina B-CDK1 que levam a célula a progredir e completar a mitose [108-111].

Durante o ciclo celular as CDKs são controladas por CKIs (CDK "inhibitors") de forma a que o ciclo ocorra ordeiramente e apenas quando necessário. As famílias de CKIs a atuar durante o ciclo celular são a INK4 (composta por INK4A, B, C e D) e as CIP e KIP (composta por CDKN1A, CDKN1B e CDKN1C) [7, 110].

Para além do controlo das CDKs por ação das CKIs, a progressão da célula pelas várias fases do ciclo celular é, também, monitorizada por vários "checkpoints". Estes funcionam como sensores de erros que possam eventualmente ocorrer durante a replicação do DNA e a segregação cromossómica, desencadeando a paragem no ciclo caso algum erro seja detetado. A paragem do ciclo é levada a cabo por modulação da atividade das CDKs e permite a reparação de possíveis erros no DNA que tenham ocorrido. No caso da reparação não ser possível, devido à grande extensão de danos ou à presença de anomalias nos "checkpoints" ou na maquinaria de reparação, as células entram em senescência ou em apoptose, impedindo, assim, a perpetuação de erros às

células filhas. No entanto é possível que a acumulação de alterações não reparadas, no DNA, em vez de desencadear senescência ou apoptose leve à ocorrência de instabilidade genómica, conduzindo à transformação da célula numa célula iniciadora tumoral [7, 110].

I.5.1 - Genes supressores tumorais:

Os genes supressores tumorais são um grupo de genes cuja função, nas células normais, é bloquear a entrada ou progressão do ciclo celular, quando ocorrem anomalias; desencadear apoptose em células danificadas; manter a estabilidade do genoma; manter baixas taxas de mutação e assegurar a replicação, reparação e segregação fidedigna do DNA. De forma a que as células neoplásicas possam progredir livremente pelo ciclo e acumular mutações têm de perder ambos os alelos destes genes, pelo que a ação dos genes supressores tumorais pode ser classificada como recessiva [21].

Os mecanismos pelos quais se dá a perda de função de ambos os alelos de um gene supressor tumoral são variados, estando descritos, para os indivíduos heterozigóticos portadores de um alelo funcional e de um alelo mutado: a perda do cromossoma portador do alelo funcional, por não disjunção mitótica; a perda do cromossoma portador do alelo funcional, seguida de reduplicação do cromossoma portador do alelo mutado; a ocorrência de recombinação mitótica perto do *locus* do gene supressor seguida de segregação dos cromossomas portadores de alelos mutados para a mesma célula filha; a deleção do alelo funcional; a ocorrência de uma mutação pontual no alelo funcional, levando à perda de função e a inativação transcripcional do alelo funcional por mecanismos epigenéticos [21].

I.5.2 - Oncogenes:

As formas "wild type" dos oncogenes são denominadas proto-oncogenes e constituem um grupo cuja função, nas células normais, é promover a proliferação celular. A conversão de proto-oncogenes em oncogenes pode ocorrer por vários mecanismos que causam ganho de função quantitativa (e.g. amplificação génica ou ativação transcripcional) ou qualitativa (e.g. mutação pontual, fusão génica). A ação destes genes sobre o ciclo celular é de carácter dominante, quer isto dizer que é necessária apenas a ocorrência de alteração num dos alelos para que o fenótipo celular seja alterado [21].

I.5.2.1 - Ativação por ocorrência de mutações pontuais: neste mecanismo a ocorrência de uma mutação, num dos alelos do proto-oncogene, gera uma proteína mutante que apresenta atividade anormal (nalguns tipos de oncogenes ocorre ativação constitucional e noutro tipo de oncogenes ocorre redução da atividade proteica). Este mecanismo de ativação afeta, geralmente, recetores de superfície ou proteínas envolvidas nas vias de transdução de sinal [21].

I.5.2.2 - Ativação por formação de genes de fusão: este mecanismo é raro nos tumores epiteliais e resulta da ocorrência de translocações cujos pontos de quebra se encontram no interior de genes. Gera-se, assim, um gene de fusão que dá origem a uma proteína quimérica que apresenta propriedades de transformação únicas [21].

I.5.2.3 - Ativação por aumento do nível da transcrição: este mecanismo de ativação pode ser dividido em dois tipos, os que envolvem alteração do DNA e os epigenéticos. Os mecanismos que envolvem alteração do DNA, também, assentam na ocorrência de uma translocação, no entanto, neste caso, os pontos de quebra colocam um proto-oncogene numa zona da cromatina transcripcionalmente ativa, levando, assim, à transcrição inapropriada do oncogene [21].

O mecanismo epigenético que leva ao aumento da transcrição dos oncogenes, é a hipometilação dos promotores e das sequências reguladoras "cis-acting" que se encontram, normalmente, transcripcionalmente inativas, devido à ocorrência de metilação. A hipometilação leva, assim, à ativação transcripcional de genes, entre os quais se encontram alguns que regulam a proliferação celular [83, 84].

I.5.2.4 - Ativação por amplificação génica: A amplificação génica, descrita inicialmente por Alt *et al.* em 1978 [112], é definida como o aumento do número de cópias, por genoma, de uma região definida de um braço cromossómico e pode surgir sob a forma de unidades repetidas confinadas a um único *locus*, dispersas no genoma ou como elementos extracromossómicos. Este fenómeno é uma das alterações genéticas mais frequentes no cancro e contribui para a evolução tumoral, pois induz alterações na expressão dos genes amplificados [113, 114].

Ao nível citogenético, a amplificação génica pode ser detetada sob duas formas, sendo estas a presença de regiões homogeneamente coradas (do inglês "homogeneously satining regions" - HSR) e "double minutes" (DMs) [115, 116].

As HSR são o resultado da expansão, em *tandem*, invertida ou em "head-to-tail", de um determinado segmento cromossómico. Estes segmentos amplificados permanecem nos cromossomas. Os DMs são segmentos extracromossómicos circulares, normalmente sem centrómero ou telómeros com capacidade replicativa autónoma e que surgem, regra geral, aos pares. Os DMs apesar de serem usualmente acêntricos possuem alguma estabilidade de transmissão mitótica pois têm a capacidade de se ligar à parte terminal dos cromossomas mitóticos, sendo segregados como passageiros dos mesmos [114-117].

I.5.2.4.1 - Iniciação da amplificação génica: modelos

Até à data, 3 modelos para a iniciação da amplificação génica foram propostos, sendo estes a ocorrência de quebras duplas no DNA, a presença de locais frágeis no genoma e a disfunção telomérica [113, 114].

É importante salientar que a amplificação génica pode ocorrer, apenas, em células com a capacidade de progredir inapropriadamente no ciclo celular, pois, para que se dê a amplificação, é necessária a ocorrência de danos no DNA genómico que, numa célula normal, levariam à ativação de "checkpoints", desencadeando a paragem do ciclo celular [113].

- **Quebras duplas no DNA**

A ocorrência de quebras duplas no DNA nuclear é frequente em células que se encontrem em fase S. Estas quebras podem ser originadas pelo colapso das "replication forks", quando impedidas de progredir pela presença de danos no DNA. As quebras duplas resultantes, por apresentarem terminais desprotegidos, fornecem uma oportunidade para a ocorrência de amplificação génica pelo despoletar de ciclos de "breakage-fusion-bridge" (BFB) [113, 114].

- **Locais frágeis**

Os locais frágeis, como referido anteriormente, são regiões cromossómicas onde ocorrem, frequentemente, quebras quando as células são sujeitas a situações de "stress" [113, 114].

Os vários locais frágeis descritos são de natureza heterogénea e possuem características específicas (como grande flexibilidade), estando associados a eventos de recombinação frequentes que levam ao surgimento de alterações cromossómicas (e.g. translocações, deleções), desempenhando, possivelmente, um papel de grande relevo no desenvolvimento do cancro [113, 114].

Em 1997, Coquelle [118] e a sua equipa demonstraram que os locais frágeis despoletam o processo de amplificação, pois têm a capacidade de induzir ciclos de BFB quando as células são sujeitas a "stress" replicativo (e.g. quando as células são tratadas com agentes que interferem com a replicação do DNA). É de salientar que a

contribuição dos locais frágeis, para o processo de amplificação, na ausência de agentes indutores de "stress" ainda necessita de ser elucidado [113, 114, 118].

- **Disfunção telomérica**

Os telómeros localizam-se nos terminais cromossómicos e desempenha um papel central na manutenção da estabilidade e integridade do genoma, pois impedem a fusão entre cromossomas [113, 119, 120].

A disfunção telomérica desencadeia a amplificação génica, pela indução de ciclos de BFB, como resultado da replicação de cromossomas sem telómeros nos quais ocorre fusão entre as cromátides irmãs, resultando na formação de cromátides dicêntricas (isocromátides) [121]. As assinaturas, a nível citogenético, dos ciclos de BFB resultantes da disfunção telomérica, são a presença de cópias amplificadas no braço cromossómico que possui o *locus* do gene em células sem amplificação, a ocorrência de repetições palindrómicas, a formação de pontes anafásicas e a fusão de cromátides irmãs [114].

I.5.2.4.1a - Ciclos de BFB

Os ciclos de "breakage-fusion-bridge" (BFB), inicialmente descritos por McClintock em 1951 [122], resultam da formação de extremidades livres, devido à perda de telómeros ou quebra do DNA, seguida de fusão entre extremidades livres e quebra dos cromossomas dicêntricos, que formam pontes anafásicas, durante a anafase. As pontes anafásicas, formadas como resultado da fusão entre cromátides irmãs ou cromossomas, quebram como resultado da existência de tensão mecânica formada pelo fuso mitótico [113, 114, 117, 121].

Uma vez que a quebra do cromossoma dicêntrico formado nem sempre ocorre no local onde se deu a fusão, uma das células filhas recebe um cromossoma com uma duplicação invertida na região terminal, enquanto a outra célula filha recebe um cromossoma com uma deleção terminal [113, 114, 117, 121].

Os ciclos de BFB são responsáveis, não só pela amplificação génica, mas também pela instabilidade genómica devido à promoção de recombinação entre cromossomas. Como resultado desta recombinação podem ocorrer translocações não recíprocas,

transferência dos genes amplificados para outros cromossomas e rearranjos cromossómicos complexos [121, 123].

A amplificação génica, resultante da ocorrência de ciclos de BFB não resulta num elevado número de cópias, como é comprovado pela não existência de estruturas relacionadas com os ciclos de BFB em células com elevados números de cópias génicas [121, 123].

Um fenómeno já observado, envolvendo os genes amplificados por ciclos de BFB, foi a conversão das zonas amplificadas em DMs. As células que apresentam os genes amplificados sob a forma de DMs parecem possuir uma vantagem seletiva; tal deve-se, possivelmente, ao facto da amplificação génica ser mais extensa e eficiente por intermédio dos DMs do que é pelos ciclos de BFB. A interconversão dos DMs em HSR secundárias foi, também, demonstrada e é possível por intermédio da ativação de locais frágeis presentes nos DMs, como foi descrito por Coquelle [124] e colaboradores em 1998 [114, 121, 123, 124].

I.5.3 - *ERBB2* e *MYCN*: proto-oncogenes e o cancro

No âmbito da realização desta dissertação de mestrado assume particular relevo a análise de dois proto-oncogenes, o *ERBB2* e o *MYCN*, e do impacto destes no cancro.

I.5.3.1 - ERBB2

Nos tecidos dos organismos multicelulares, as células são continuamente expostas a uma multitude de estímulos que podem advir de fatores endócrinos ou parácrinos. Para a manutenção da homeostase tecidular é de grande importância que estes estímulos sejam corretamente interpretados e integrados, de forma a assegurar um desenvolvimento dos órgãos ou resposta proliferativa adequados. A superfamília de recetores tirosina cinase (RTK) desempenha um papel central na integração e transdução destes sinais [125, 126].

A subclasse I dos RTKs é composta por quatro membros pertencentes à família do recetor do fator de crescimento epidermal (EGFR), sendo estes elementos o EGFR (símbolo oficial) ou ERBB1, o ERBB2 (símbolo oficial), Neu ou HER2, o ERBB3 (símbolo oficial) ou HER3 e o ERBB4 (símbolo oficial) ou HER4. A família de genes ERBB/EGFR é expressa em vários tecidos de origem epitelial, mesenquimal ou neuronal e desempenha múltiplas funções, tais como o controlo da divisão, da diferenciação, da morte, da mobilidade e da adesão celulares. Os membros desta família desempenham um papel central no desenvolvimento do cérebro, da pele, dos pulmões, do coração, do trato gastrointestinal, do sistema nervoso periférico e da glândula mamária [125-129].

Sob condições fisiológicas normais, a ativação dos recetores ERBB é controlada pela expressão espacial e temporal de ligandos solúveis específicos para esta família de recetores [125, 126].

A nível estrutural os recetores ERBB possuem três domínios distintos, sendo estes o domínio extracelular, onde ocorre a ligação com os ligandos, um domínio transmembranar hidrofóbico e um domínio tirosina cinase intracelular altamente conservado [125, 127, 129, 130].

No que respeita à organização estrutural do domínio extracelular, o recetor ERBB2, é um caso particular. Foi descoberto que este recetor se encontra numa conformação fixa similar à apresentada pelos recetores EGFR ativados, ou seja, o recetor ERBB2 apresenta o "loop" de dimerização continuamente exposto. Esta conformação explica o porquê deste recetor não ter capacidade de ligar nenhum dos ligandos e o porquê do ERBB2 ser o parceiro de dimerização preferencial dos restantes recetores [125, 127, 130-132].

I.5.3.1a - Sinalização intracelular

A sinalização pelos recetores ERBB é complexa dada a existência de uma grande variedade de ligandos, que se ligam a recetores específicos e desencadeiam uma multitude de eventos intracelulares, no que tem vindo a ser descrito como uma estrutura de sinalização em laço (do inglês "bow-tie") [133].

A determinação das vias de sinalização intracelulares que serão ativadas está dependente de uma série de fatores tais como a natureza do ligando, a composição dos dímeros de recetores ERBB, o padrão de fosforilação do domínio intracelular, a disponibilidade das moléculas de ligação aos locais de ancoragem e a presença de reguladores negativos dos sinais [128, 131]. Como resultado da ativação dos recetores ERBB, várias vias de sinalização podem ser ativadas, sendo as vias melhor caracterizadas até à data a via RAS-MAPK ("Ras-mitogen-activated protein kinase"), a via PI3K-PKB/A ("phosphatidylinositol3' kinase - protein kinase B ou A") e a via PLC-PKC ("phospholipase C - protein-kinase C") [126, 128, 130, 134].

Estas vias permitem a transdução de sinal e causam alterações na atividade de vários fatores de transcrição (e.g. JUN, o FOS, o MYC, NFKB e o SP1). Estes ativam a transcrição de grupos de genes que irão determinar a resposta celular (proliferação, diferenciação, sobrevivência, adesão ou migração) (figura 5). Outros fatores que, também, determinam a resposta celular são a duração e intensidade do sinal resultante da ativação dos recetores ERBB [131, 134-136].

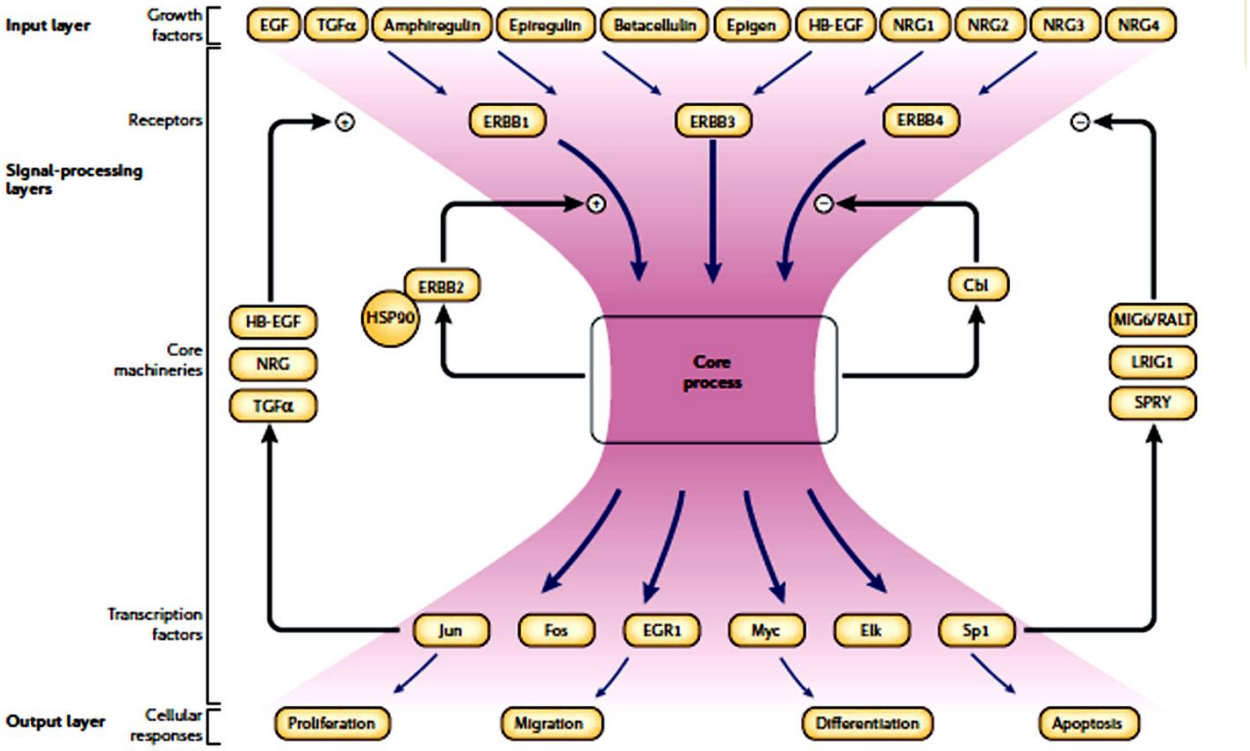


Figura 5 - Esquema representativo das interações entre ligandos, recetores e efetores moleculares associados à família de recetores ERBB. Note-se a referida estrutura em laço. Na figura pode ser observado que vários ligandos (e.g. EGF, Amphireulin) interagem com um número relativamente reduzido de recetores (ERBB1/2/3/4) levando à ativação de várias respostas celulares por intermédio de vários efetores (e.g. Jun, Fos, Myc). De Citri e Yarden, 2006 [136].

I.5.3.1b - ERBB2 e o cancro

Como foi referido anteriormente os recetores ERBB estão implicados numa grande variedade de processos celulares, pelo que a desregulação (hiperactivação) das vias intracelulares, ativadas por estes recetores, leva ao desenvolvimento de variadas características inerentes às neoplasias, tais como migração e proliferação celulares, angiogénese, invasão do estroma e resistência à apoptose, conferindo vantagem seletiva a estas células e desencadeando a sua expansão clonal [128].

Os recetores que assumem maior importância no desenvolvimento neoplásico são os recetores EGFR e ERBB2. A sobrexpressão ou mutação destes têm sido descritas em tumores sólidos da cabeça e do pescoço, pulmão, mama, ovários, pele, bexiga e trato gastrointestinal [126, 130, 131]. O efeito promotor de neoplasias exibido pelo ERBB2 surge como resultado de mutações (inserções ou substituições "missense" no domínio cinase intracelular), expressão de variantes de "splice" ou sobrexpressão (geralmente devido à ocorrência de amplificação génica). A ocorrência de mutações no *ERBB2* é rara e a sobrexpressão, devido à amplificação génica, é de longe o mecanismo mais frequente de ativação deste recetor [126-128, 130].

A sobrexpressão do ERBB2 é utilizada como marcador e está associada a um mau prognóstico, a uma maior agressividade tumoral, ao desenvolvimento de resistência a terapias hormonais, a intervalos de tempo livres de doença curtos, risco aumentado de desenvolver metástases e resistência à quimioterapia [126-128, 130, 131, 137]. Para além do referido acima, a sobrexpressão do ERBB2 parece desempenhar alguma função na carcinogénese mamária por intermédio da regulação da população de células estaminais, pois há evidências que apontam para o aumento da proporção da população daquelas células devido à sobrexpressão do recetor ERBB2 [26].

Este conjunto de características associadas à sobrexpressão do ERBB faz com que este seja um atrativo alvo terapêutico. Três estratégias terapêuticas anti-ERBB foram exploradas com o intuito de tratar pacientes com cancro da mama com sobrexpressão do ERBB, sendo elas a terapia génica, o uso de inibidores de baixo peso molecular e o uso de anticorpos. Destas a que revelou maior potencial foi o uso de anticorpos específicos para o ERBB, encontrando-se as terapias com anticorpos em contínuo aperfeiçoamento [128, 131, 138].

I.5.3.2 - MYCN

A superfamília MYC/MAD/MNT é composta por um conjunto de fatores de transcrição do tipo "helix-loop-helix zipper" básicos (bHLHZ) que regulam vários processos celulares, tais como o crescimento, diferenciação e proliferação celulares e a apoptose [139, 140]. Estes heterodimerizam com a proteína do tipo bHLHZ, MAX e após formação do dímero, adquirem a capacidade de se ligar à sequência E-box (CACGTG) [139]. Os membros desta superfamília têm efeitos antagónicos na expressão dos genes que regulam, sendo, regra geral, os membros da família myc (MYC, MYCN e MYCL) ativadores transcripcionais e os membros da família MAD/MNT inibidores da transcrição [139]. A ativação/inibição transcripcional promovida pelos heterodímeros MYC-MAX ou MAD-MAX dá-se através do recrutamento de complexos remodeladores da cromatina [e.g. HATs ("Histone acetyltransferases"), no caso do MYC e HDACs, no caso da MAD] que levam a que a cromatina adquira uma conformação transcripcional permissiva, no caso do MYC, ou inibitória, no caso da MAD [139].

A família de proto-oncogenes *MYC* (*MYC*, *MYCN* e *MYCL*) foram dos primeiros oncogenes a ser identificados e, desde então, tem vindo a ser associado a uma vasta gama de cancros humanos [141]. Para além da participação nos variados processos celulares acima descritos esta família foi ainda implicada no despoletar do "switch" angiogénico, na instabilidade genómica [142], na adesão celular [143], na indução/manutenção de pluripotência celular e na regulação do balanço entre os estados hetero- e eucromáticos (figura 6) [140, 144]. Os membros da família MYC são um conjunto de efetores de várias vias de sinalização celular, tais como as vias WNT, NOTCH e ERBB2 [143]. Os mecanismos subjacentes à ativação destes oncogenes são a mutação insercional, a amplificação génica, a ocorrência de translocações cromossómicas, com consequente formação de proteínas de fusão [142] e a ocorrência de alterações nas vias de sinalização que regulam a atividade transcripcional, os níveis de RNA ou os níveis da proteína [143].

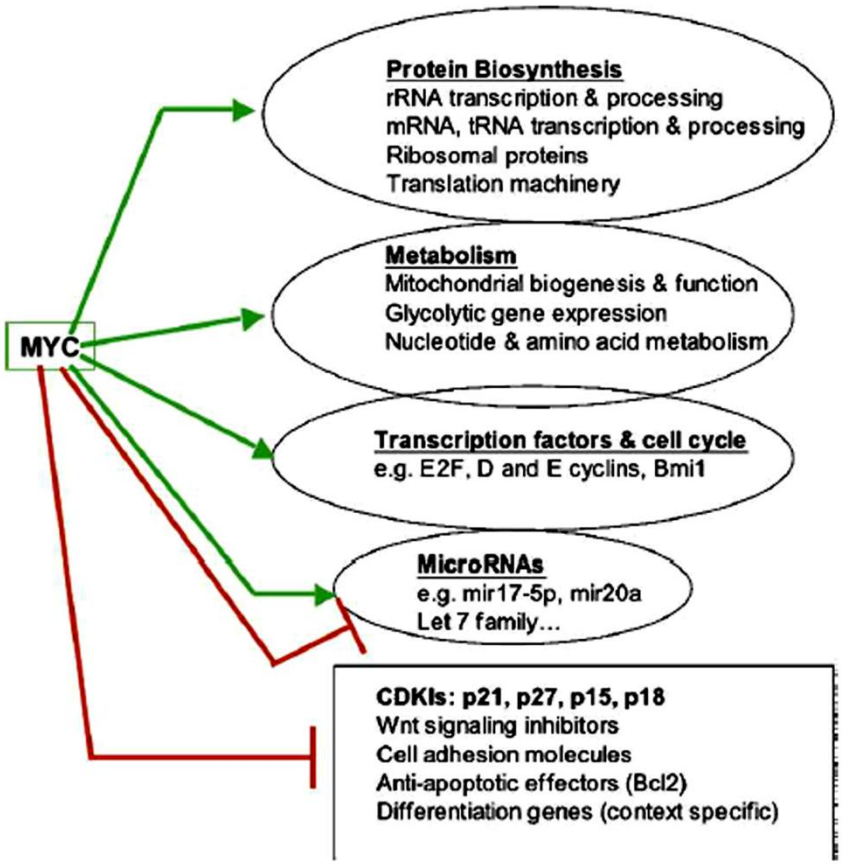


Figura 6 - Processos celulares regulados pelo MYC. De Eilers e Eisenman, 2008 [144]. Legenda: verde - vias ativadas pelo MYC; vermelho - vias inibidas pelo MYC.

I.5.3.2a - MYCN e o cancro

O *MYCN* é normalmente expresso em células de linhagens neuronais primárias, na retina, intestino e rins, durante o desenvolvimento dos mamíferos [145]. Este oncogene tem vindo a ser associado frequentemente ao neuroblastoma e outros tipos de tumores com origem neuroectodérmica [64], onde a amplificação deste gene foi detetada, sob a forma de DMs ou HSR [146], em cerca de 25% dos casos clínicos [145]. Nestes tipos de cancro a amplificação do *MYCN* está associada com estágios avançados de doença, maior idade, rápida progressão tumoral e pior resultado clínico [147].

A sobrexpressão deste oncogene foi, também, detetada no cancro da mama inflamatório [45, 148], no retinoblastoma e nos carcinomas das células pequenas pulmonares, onde está, também, associado a um mau prognóstico [149].

Dada a forte associação entre o neuroblastoma e a amplificação do *MYCN*, este gene surge como um alvo terapêutico de interesse no tratamento daquela patologia. Algumas metodologias têm vindo a ser criadas e testadas com o intuito de minimizar a ação do MYCN, entre estas encontra-se a diminuição da transcrição deste oncogene com recurso a metodologias de siRNA, o desenvolvimento de moléculas com capacidade de interferir na dimerização entre a MYC e a MAX e o desenvolvimento de moléculas com capacidade de inibir as vias de sinalização celulares responsáveis pela ativação transcripcional do *MYCN* [145].

Capítulo II - Objetivos

Capitulo II - Objetivos

Com o trabalho realizado nesta dissertação pretende-se reafirmar a utilidade das linhas celulares de *Rattus norvegicus* no estudo do cancro da mama, colocando em relevo a capacidade que as linhas celulares apresentam de elucidar vários aspetos do percurso evolutivo tumoral a nível citogenético, genético e epigenético.

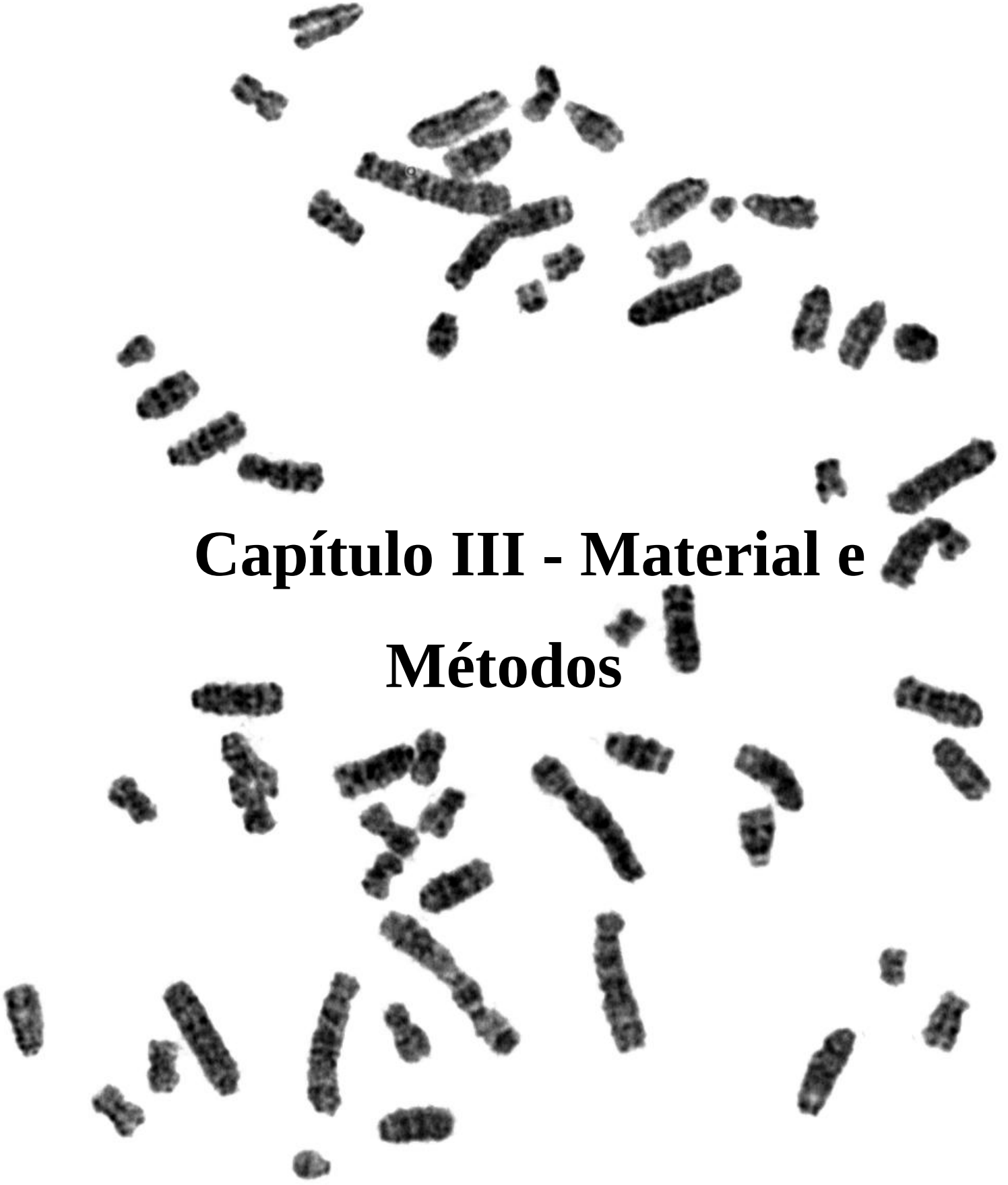
Este trabalho pode ser dividido em duas etapas:

1. Caracterização citogenética da linha celular tumoral CLS-ACI-1.

   - Esta etapa tem por objectivos analisar citogenéticamente a linha celular tumoral, nomeadamente, a determinação o número modal, a identificação e caracterização das alterações cromossómicas presentes, a elaboração de hipóteses mais prováveis para explicar a evolução clonal da linha e a análise dos "breakpoints" cromossómicos presentes na linha CLS-ACI-1;

2. Caracterização molecular dos perfis de expressão dos genes *Erbb2* e *Mycn*:

   - Esta etapa tem por objetivos determinar os níveis de expressão relativa dos oncogenes *Mycn* e *Erbb2* na linha CLS-ACI-1 e analisar a regulação epigenética destes oncogenes, no que se refere à metilação/desmetilação do DNA, pela desmetilação global do genoma.



Capítulo III - Material e Métodos

Capitulo III - Material e Métodos

III.1 - Cultura de células e obtenção de preparações cromossómicas.

Neste trabalho foram utilizadas as linhas celulares RNO-normal e CLS-ACI-1. Esta última foi adquirida, pelo laboratório de acolhimento IBB-CGB (Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia/Centro de Genómica e Biotecnologia - UTAD), à empresa "Cell Lines Service". A cultura e a obtenção de preparações cromossómicas desta linha foram realizadas de acordo com procedimentos instaurados no laboratório.

III.2 - Citogenética

III.2.1 - Técnicas de bandeamento

Desde a publicação da primeira metodologia para bandeamento-**Q**, por Caspersson, em 1968 [150] e 1971 [151], várias metodologias foram desenvolvidas com o intuito de identificar ou evidenciar cromossomas ou regiões cromossómicas, nomeadamente as técnicas de bandeamento clássicas **G**, **T**, **C** e **NOR** [152] e as técnicas de bandeamento com endonucleases de restrição (restrição *in situ*) ou com fluorocromos com especificidade para sequências de DNA enriquecidas em bases AT ou GC [153]. Cada uma das técnicas acima referidas gera padrões longitudinais cromossómicos distintos, sendo que bandas evidenciadas como escuras com um método, podem surgir claras ou não aparecer de todo noutro [152]. As bandas são definidas, de acordo com o ISCN, como a parte do cromossoma que é claramente distinta dos segmentos que lhe estão adjacentes, por surgir em tons mais claros ou mais escuros, quando se empregam uma ou mais técnicas de bandeamento. É de salientar que o conceito de interbanda não existe quando aplicado ao bandeamento cromossómico [152].

As bandas cromossómicas surgem como consequência da organização funcional do genoma e sabe-se, que a nível molecular, os métodos de bandeamento evidenciam variações da composição nucleotídica da sequência de DNA e das proteínas associadas a este [152], no entanto, apesar de se conhecer a natureza dos fatores moleculares

responsáveis pelo bandeamento, ainda se desconhecem os fatores exatos que levam ao surgimento de bandeamento em algumas das técnicas existentes [154].

Os padrões de bandas cromossómicas que se obtêm com as diferentes técnicas de bandeamento revelaram ser muito úteis numa panóplia de situações, nomeadamente na organização de cariótipos, na identificação de rearranjos estruturais cromossómicos, na evidenciação de alterações numéricas cromossómicas e na comparação da arquitetura cromossómica entre diferentes espécies [154].

- **Bandeamento-G**

O bandeamento-G foi descrito, pela primeira vez, por Sumner *et al.* (1971) [155] e é amplamente utilizado como técnica de bandeamento cromossómico de rotina [153]. Nesta metodologia de bandeamento, o padrão de bandas é obtido pela digestão dos cromossomas metafásicos com uma enzima proteolítica inespecífica, regra geral é utilizada a tripsina, seguindo-se um passo de deteção das bandas geradas com corantes (e.g. Giemsa) ou fluorocromos (e.g. DAPI) [153, 154]. De acordo com Bickmore (2001) [156], nesta técnica de bandeamento são evidenciados locais ricos em bases AT, pobres em metilcitosina e com baixa densidade génica. Várias têm sido as hipóteses apresentadas para explicar a origem dos padrões de bandas gerados por esta metodologia, no entanto o mecanismo que leva ao realce das bandas-G ainda não é totalmente compreendido [153, 156, 157].

Protocolo 1 - Bandeamento-G por ação da tripsina e coradas com Giemsa - bandas-GTG.

Soluções usadas:

- **Tripsina Stock:** NaCl 8% (p/v) + Na_2HPO_4 3% (p/v) + KH_2PO_4 0,2% (p/v) + tripsina "Difco" 1:250 ("Gibco", "Life Technologie") 2.5% (p/v) em H_2O ultrapura

- **Tripsina a 20% (v/v):** 20 ml de tripsina "stock" + 80ml de PBS 1×

- **Giemsa a 2% (v/v):** 2 ml de Giemsa ("Gibco", "Life Tecnologie") + 5 ml de tampão fosfato, pH 6.8 ("Gibco", "Life technologie") + 93 ml de H2O ultrapura

- **Tampão Fosfato:** ("Gurr", pH 6.8 *GIBCO BRL*)

- **HBSS** ("Invitrogen Life Tecnologies")

1. Foram preparadas lâminas a partir de preparações cromossómicas fixadas (foi realizado "droping" para espalhar os cromossomas), sendo as lâminas posteriormente envelhecidas a 65ºC, numa estufa, durante cerca de 16 horas;

2. No dia seguinte as lâminas foram retiradas da estufa e deixadas a arrefecer até atingirem a temperatura ambiente;

3. Colocaram-se as lâminas a digerir na solução de tripsina a 20% (v/v), durante 3 a 15 segundos. O tempo foi ajustado até se obter um bom bandeamento;

4. De seguida as lâminas foram transferidas para uma solução de HBSS previamente arrefecido, durante 1 minuto;

5. Após a solução de HBSS frio as lâminas foram colocadas numa solução de HBSS a temperatura ambiente, durante 3 minutos;

6. As lâminas foram de seguida coradas em Giemsa a 2% (v/v), durante 10 minutos, sendo posteriormente lavadas em água destilada e secas ao ar. Depois de secas as lâminas foram observadas num microscópio ótico de campo claro (Para a coloração standard com Giemsa foram efetuados apenas os passos 1, 2 e 6) .

- **Bandeamento por Restrição *In Situ***

Gould *et al.* (1976) [158] e Jones (1977) [159] foram os pioneiros na digestão de cromossomas fixados com enzimas de restrição (RE, do inglês "restriction endonucleases"). Neste tipo de bandeamento os cromossomas são digeridos com RE bacterianas, que cortam DNA de cadeia dupla na proximidade ou no interior das sequências de reconhecimento [154]. Uma das teorias para explicar este bandeamento sugere que nas regiões em que existe um maior número de sequências de reconhecimento da RE utilizada são gerados, devido ao corte, um grande número de pequenos fragmentos de DNA. Nestas regiões, devido ao pequeno tamanho dos fragmentos, há perda preferencial de DNA, levando ao decréscimo da intensidade de coloração com Giemsa ou DAPI, o que está na base da formação das bandas [154]. Gosálvez *et al*. (1997) [160], apresentaram uma teoria alternativa para explicar o padrão de bandas formado após a digestão de cromossomas com REs. Esta teoria enuncia que as bandas surgem como resultado da maior capacidade de ligação do Giemsa aos "nicks" formados pelas REs, levando a que os locais com maior frequência de corte surjam mais intensamente corados [161].

Protocolo 2 - Bandeamento por Restrição *In Situ*.

Soluções utilizadas:

- **1xPBS**
- **1% Formaldeído -** 1% (v/v) formaldeído/1xPBS
- **70% Formamida -** 70% (v/v) formamida/2xSSC, pH 7
- **Etanol 70%** (70% (v/v) etanol/H_2O)**, Etanol 90%** (90% (v/v) etanol/H_2O) **e Etanol 100%**

1. Foram preparadas lâminas a partir de preparações cromossómicas fixadas (foi realizado "droping" para espalhar os cromossomas), sendo as lâminas posteriormente postas a envelhecer a 65ºC, numa estufa durante cerca de 16 horas. Após este tempo foram arrefecidas, até atingirem a temperatura ambiente;

2. De seguida foi preparada a solução enzimática, de acordo com os dados presentes na tabela abaixo, tendo sido aplicado 100 µL da mistura de reação a cada lâmina;

Enzimas	**Sequência de reconhecimento**	**Concentração inicial**	**Tampão 10x**	
ApaI	GGGCCC	15 U/µL	REACT® 4	
BamHI	GGATCC	40 U/µL	10 K	
DraI	TTTAAA	15 U/µL	10 M	
PstI	CTGCAG	10 U/µL	REACT® 2	
Enzimas	**µL de enzima**	**µL de tampão**	**µL de H_2O**	**Quantidade de enzima final**
ApaI	2	10	88	30 U
BamHI	0,75	10	89,25	30 U
DraI	2	10	88	30 U
PstI	3	10	87	30 U

3. Colocou-se uma lamela em cada lâmina, de forma a obter um espalhamento uniforme da solução enzimática;

4. As lâminas foram colocadas numa câmara húmida previamente preparada, sendo incubadas "overnight" a 37ºC;

5. No dia seguinte foi retirada a lamela e as lâminas foram lavadas, duas vezes, em água desionizada e autoclavada, sendo posteriormente colocadas a secar ao ar;

6. Após secas as lâminas foram sujeitas a duas passagens, de 5 minutos cada, em 1xPBS;

7. De seguida foram colocadas, durante 20 minutos, em 1% formaldeído à temperatura ambiente. Após este período foram realizadas duas lavagens, de 5 minutos cada, em 1xPBS;

8. Foi então realizada a desidratação das lâminas. Para tal estas foram colocadas em 3 soluções sequenciais de etanol, previamente arrefecidas e com concentrações crescentes, a 70%, 90% e 100%. Após a desidratação em etanol as lâminas foram secas ao ar;

9. De seguida as lâminas foram desnaturadas a 65ºC, numa solução de 70% formamida/2xSSC, durante 1 minuto e 30 segundos;

10. As lâminas foram transferidas para etanol a 70% previamente arrefecido, durante 5 minutos, sendo de seguida passadas por soluções de etanol a 90% e a 100%, previamente arrefecidas, permanecendo 5 minutos em cada um dos etanóis;

11. Findo o tempo em etanol a 100% as lâminas foram deixadas a secar ao ar. Quando secas foram montadas com DAPI e observadas no microscópio ótico de epifluorescência para avaliar a qualidade do padrão de bandeamento.

III.2.2 - Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH)

A hibridação *in situ* fluorescente é uma técnica que permite a deteção de DNA ou RNA alvo, em preparações citológicas ou cromossómicas, por ação de sondas marcadas [162, 163]. Esta metodologia apresenta elevada sensibilidade, se se tiver em atenção alguns parâmetros essenciais tais como, a partilha de níveis de elevada similaridade entre a sonda e o DNA/RNA alvo e o uso de sondas com comprimento suficiente. Se os alvos a detetar são sequências de cópia única ou de baixo número de cópias é necessário realizar a supressão das sequências repetitivas da sonda, tal pode ser efetuado através do uso de DNA genómico competidor e/ou de frações de DNA repetitivo (cot1) [161, 162].

Atualmente esta técnica é utilizada com vários fins, tais como o mapeamento físico de sequências de DNA génicas ou repetitivas, identificação e caracterização de cromossomas ou segmentos cromossómicos e deteção de alterações estruturais ou numéricas cromossómicas [161, 162, 164].

A nível prático esta metodologia pode ser subdividida em várias etapas, sendo estas a preparação do material alvo (preparações cromossómicas), pré-tratamento cromossómico, preparação e marcação da sonda, desnaturação da sonda e dos cromossomas, hibridação da sonda com os alvos cromossómicos, lavagens pós-hibridação, deteção dos locais de hibridação (não é necessário se forem usadas sondas marcadas diretamente com fluorocromos) e finalmente a montagem das lâminas [162]. Cada uma destas etapas influencia a qualidade dos resultados obtidos, pelo que é de suma importância que sejam realizadas de forma adequada [157, 162].

III.2.2.1 - "Whole Chromosome Painting" - WCP

A "Whole Chromosome Painting" (WCP) é uma aplicação da técnica de FISH que consiste no uso de misturas complexas de sequências de DNA marcadas, provenientes de um dos cromossomas de um qualquer complemento cromossómico. Esta variante da técnica de FISH permite visualizar diretamente o cromossoma de onde provém a sonda, em preparações cromossómicas e em núcleos interfásicos da própria espécie ou de uma espécie diferente (conhecido como "Comparative Chromosome Painting" - CCP), desde que o grau de similaridade entre a espécie de onde provêm as sondas e a espécie alvo e a restringência da experiência sejam adequadas [161, 162, 165].

Esta metodologia tem vindo a ser usada frequentemente na deteção e identificação de alterações cromossómicas estruturais e numéricas na citogenética clínica e do cancro. A WCP é também aplicada na construção de mapas físicos e em estudos evolutivos, onde é utilizada na comparação de cariótipos entre espécies [162, 166].

Preparação das sondas

Neste trabalho foram utilizadas sondas representativas dos cromossomas de RNO 1 - 10, 16-20, X e Y e dos cromossomas de MMU 1, 5, 11, 14 e 16 isoladas por "Flow Sorting" (sondas cedidas pelo Doutor Johannes Wienberg e pela Doutora Andrea Kofler - "Chrombios Molecular Cytogenetics", Alemanha) e amplificadas e marcadas no laboratório de acolhimento. Estas sondas foram utilizadas com o intuito de identificar as alterações estruturais e numéricas cromossómicas da linha celular em análise.

As sondas para WCP foram marcadas indiretamente, por incorporação de nucleótidos modificados com um hapten (digoxigenina-11-dUTP ou biotina-16-dUTP - "Roche Molecular Biochemicals") durante a PCR. A marcação foi realizada por DOP-PCR ("Degenerated Oligonucleotide Primed" - PCR). Esta técnica modificada de PCR faz uso de um "primer" universal (e.g. 6-MW ou F/S), que apresenta uma sequência parcialmente degenerada, e de um programa de PCR em que a temperatura de "annealing", nos primeiros ciclos de amplificação, é baixa (apenas aplicável à PCR primária, que é aquela que se realiza após "flow sorting" dos cromossomas) [153]. A PCR secundária, utilizada neste trabalho, permite a amplificação e marcação de sondas a partir dos produtos da PCR primária. A PCR secundária é em tudo semelhante à primária, no entanto a temperatura de "annealing" utilizada não varia ao longo da reação e é mais elevada (62ºC) [161].

Após amplificação e marcação as sondas são avaliadas por eletroforese em gel de agarose, onde se espera um "smear" com comprimentos compreendidos entre os 200 e os 2000 bp.

Protocolo 3 - Amplificação das sondas de para WCP correspondentes aos cromossomas de RNO 1-10, 16-20, X e Y e de MMU1, MMU5, MMU11, MMU14 e MMU16.

1. De forma a amplificar, por PCR, as sondas dos cromossomas de RNO e de MMU foi preparada a seguinte mistura de reação:

Reagentes	**Quantidade (µL)**	
	RNO	**MMU**
Sequências cromossómicas amplificadas	5	5
Tampão PCR 10x TAPS	5	5
Mistura de dNTP's (2,5 mM)	4	4
Detergente W1 a 0,1% (p/v) (sigma)	2,5	2,5
Primer universal 6-MW a 140 µM (1)	2	0
Primer universal F/S a 140 µM (2)	0	1
H_2O ultrapura	30,5	31,5
Homogeneizou-se a solução num vortex e centrifugou-se		
Taq DNA polimerase (Fermentas)	1	1
Volume final	50	50

(1) - "Primer" universal 6-MW: 5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3', N pode ser A, C, G ou T

(2) - "Primer" universal F/S: 5'-CGG ACT CGA GNN NNN NTA CAC C-3', N pode ser A, C, G ou T

2. A mistura de reação preparada foi colocada num termociclador e sujeita ao seguinte programa:

Temperatura	**Tempo (minutos)**	**Processo**
94ºC	9	Desnaturação inicial
94ºC	1	Desnaturação
62ºC	1e 30s	"Annealing"
72ºC	3	Extensão
72ºC	10	Extensão final
4ºC	Pausa	Pausa

Nota: os ciclos de Desnaturação, "Annealing" e Extensão foram repetidos 24 vezes

3. Após a PCR os produtos de amplificação foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v).

III.2.2.2 - Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose é uma técnica que permite separar fragmentos de DNA por comprimento, após deposição destes num gel de agarose sendo posteriormente sujeitos a um campo elétrico para migração eletroforética. O DNA migra em direção ao polo positivo, passando através dos poros formados pelo gel de agarose. A resolução do gel depende do tamanho dos poros, que por sua vez está relacionado com a concentração de agarose [162, 163]. Após a migração eletroforética, a visualização do DNA é realizada por incorporação de brometo de etídeo ou outro corante na hélice de DNA [162]. O gel, após estar corado é exposto a luz ultravioleta (UV), com comprimento de onda entre os 260 e 320 nm, levando a que o brometo de etídeo fluoresça no espetro da luz visível, permitindo a visualização do DNA [162].

Protocolo 4 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) ou a 1,2% (p/v).

1. Preparou-se um tabuleiro molde com um pente, numa superfície plana, onde se irá colocar a solução de agarose a polimerizar;

2. Colocaram-se 100 mL de SGTB 1x num recipiente de vidro e uma percentagem de agarose ("Invitrogen Life Technologies") a 1,5% (p/v) ou a 1,2% (p/v);

3. A solução de agarose foi dissolvida, num micro-ondas, até se obter uma solução translúcida e sem partículas em suspensão;

4. Transferiu-se a solução de agarose para outro recipiente de vidro e adicionaram-se 5 µL de brometo de etídeo (0,005% (v/v)). Homogeneizou-se e colocou-se a agarose no tabuleiro molde previamente preparado;

5. Após polimerizar, retirou-se o pente e verificou-se se os poços formados estavam intactos, para que não ocorra perda do DNA durante a migração;

6. O gel foi transferido para uma tina de eletroforese, com os poços do lado do polo negativo, e coberto numa solução de SGTB 1x. As amostras e o marcador foram depositados e de seguida sujeitos a um campo elétrico a uma voltagem de 100 V;

7. Após a corrida eletroforética o gel foi visualizado e fotografado num sistema de aquisição de imagem ("Uvidoc").

Protocolo 5 - Marcação das sondas para WCP correspondentes aos cromossomas de RNO 1-10, 16-20, X, Y, MMU1, MMU5, MMU11, MMU14 e MMU16.

1. Para marcar, por PCR, as sondas de RNO e MMU preparou-se a seguinte mistura de reação:

Reagentes	**Quantidade (µL)**	
	RNO	**MMU**
Produto de amplificação de DOP-PCR	5	5
Tampão PCR 10x TAPS	5	5
Mistura de dNTP's para marcação (1)	5	5
Detergente W1 a 0,1% (p/v) (sigma)	2,5	2,5
"Primer" universal 6-MW a 140 µM (2)	2	0
"Primer" universal F/S (3)	0	1
Digoxigenina-11-dUTP (1 mM) ou Biotina-16-dUTP	1,5	1,5
H_2O ultrapura	28	29
Homogeneizou-se a solução num vortex e centrifugou-se		
Taq DNA polimerase (Fermentas)	1	1
Volume final	50	50

(1) - A mistura de nucleótidos contém dATP, dCTP e dGTP a 2 mM e dTTP a 1,5 mM.

(2) - "Primer" universal 6-MW: 5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3', N pode ser A, C, G ou T

(3) - "Primer" universal F/S: 5'-CGG ACT CGA GNN NNN NTA CAC C-3', N pode ser A, C, G ou T

2. A mistura de reação preparada foi sujeita ao mesmo programa de PCR apresentado anteriormente para a amplificação das sondas. Após a marcação por DOP-PCR, os produtos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v).

Protocolo 6 - Precipitação das sondas, para WCP, de RNO e MMU.

1. As sondas, após marcação, foram precipitadas em 3 volumes de etanol a 100% à temperatura ambiente, de acordo com a mistura de precipitação abaixo apresentada, sendo depois colocadas a -4ºC "overnight":

Reagentes	**Volume (µL)**			
	RNO		**MMU**	
	Precipitação simples	**Precipitação dupla**	**Precipitação simples**	**Precipitação dupla**
Sonda de "Painting" marcada por DOP-PCR	20	20 (de cada sonda)	45	45 (de cada sonda)
DNA esperma de salmão (SS-DNA, "Gibco", "Life Technologies")	5	10	10	20
Cot 1-DNA Mouse ("Gibco", "Life Technologies")	5	10	20	40
RNO "blocking"	40	80	0	0
Etanol a 100%	210	420	225	450
Volume total	280	560	300	600

2. No dia seguinte, centrifugou-se a mistura de precipitação a 14000 rpm, durante 30 minutos a 0ºC;

3. Rejeitou-se o sobrenadante e colocou-se o "pellet" numa estufa a 65ºC, para que os vestígios de etanol restantes evaporassem;

4. Após evaporação do etanol, a sonda foi ressuspendida em 8 µL de solução de hibridação (solução de 50% formamida em 2xSSC) e colocada a agitar a 500 rpm, a 37ºC, "overnight" num "thermomixer".

Protocolo 7 - Hibridação *in situ* com sondas para WCP de RNO ou MMU, em preparações cromossómicas de CLS-ACI-1.

Preparação das lâminas:

1. As lâminas foram preparadas de acordo com o protocolo 2, passos 1 a 10. Às lâminas secas foi adicionada a sonda após o período de "pre-anneal" (descrito a seguir);

Desnaturação da sonda e "pre-anneal":

2. A sonda foi desnaturada num termociclador a 80ºC durante 15 minutos. Findo este tempo foi colocada em "pre-anneal" (para supressão de sequências repetitivas, como referido acima) a 37ºC, num "thermomixer" sem agitação, durante 3 horas;

Hibridação *in situ*

3. Colocaram-se 8 µL de sonda em cada "drop" da lâmina. De seguida posicionou-se por cima da "drop" uma lamela 22x22 mm, para espalhar a sonda e selou-se a lamela com "Fixogum";

4. As lâminas foram de seguida incubadas a 37ºC, em câmara húmida e escura, durante 2 dias, para as sondas de RNO, ou 5 dias, para as sondas de MMU;

Lavagens pós-hibridação

5. Após o período de hibridação retiraram-se as lamelas, mergulhando as lâminas em 2xSSC a 37ºC para auxiliar a remoção do "Fixogum";

6. As lâminas foram posteriormente submetidas a banhos sequenciais de 5 minutos cada a 37ºC, em soluções de 2xSSC, seguida de 2 banhos de 50% (v/v) formamida/2xSSC e de novo banho em 2xSSC;

7. De seguida as lâminas foram colocadas, durante 5 minutos, em 4xT (4xSSC e 0,05% (v/v) Tween 20) à temperatura ambiente;

Deteção e montagem das lâminas

8. Removeu-se o excesso de 4xT e colocaram-se 100 µL de BSA 3% (3% (p/v) de BSA ("Bovine serum albumin" da "Sigma") em 4xSSC) na lâmina. Colocou-se uma lamela em cima da lâminas para espalhar o BSA 3% e incubaram-se, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. De seguida as lâminas foram transferidas para 4xT;

9. Enquanto as lâminas se encontravam a incubar com BSA 3% prepararam-se os anticorpos. Para tal foi realizada uma diluição de 1:200 de anticorpo (anti-digoxigenina-rodamina ou avidina-FITC) em 4xSSC, em tubos protegidos da luz, de forma a não degradar o anticorpo fluorescente. A solução diluída de anticorpo foi centrifugada durante 10 minutos a 13000 rpm;

10. Adicionou-se 85 µL de anticorpo diluído em cada lâmina, tendo o cuidado de não agitar o precipitado, pois este aumenta muito o "background" na etapa de visualização. Colocou-se uma lamela em cima das lâminas e incubaram-se, a 37ºC, durante 1 hora em camara húmida protegida da luz;

11. Após o período de deteção, as lâminas foram lavadas 3 vezes em 4xT, 5 minutos cada lavagem. Removeu-se o excesso de 4xT e montaram-se as lâminas com DAPI. As lâminas foram observadas em microscópio ótico de epifluorescência.

III.2.3 - Descrição das fórmulas cromossómicas

Para a descrição das fórmulas cromossómicas foi utilizada a nomenclatura proposta pelo "International System for Human Cytogenetic Nomenclature" (ISCN 2009) e o ideograma desenvolvido por Levan (1974) e completado por Hamta *et al*. (2006) (anexo 1) [167].

III.3 - "Real-Time Reverse Transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction" (RT-qPCR)

A "Real-Time" PCR é uma variante da técnica de PCR que permite a deteção, em tempo real, da amplificação dos produtos de PCR devido à incorporação de uma molécula repórter fluorescente na mistura de reação. Esta variante da PCR requer o uso de termocicladores equipados com um sistema de deteção de fluorescência e permite vários tipos de análise quantitativa e/ou qualitativa, dependendo das capacidades do equipamento [168, 169].

A deteção da amplificação que ocorre a cada ciclo é possível devido à introdução de uma sonda oligonucleotídica, que possui um "quencher" não fluorescente na extremidade 3' e uma molécula fluorescente repórter na extremidade 5' [170]. Nas sondas intactas o "quencher" tem a capacidade de absorver a radiação emitida pelo repórter fluorescente. Esta sonda é desenhada de forma a hibridar no interior da sequência alvo, pelo que a cada ciclo de amplificação as sondas que hibridam com a sua sequência alvo são clivadas pela atividade 5' exonucleásica da Taq polimerase [170]. Esta clivagem liberta o repórter fluorescente da capacidade de absorção do "quencher" levando à emissão de fluorescência que é detetada pelo sistema de deteção da máquina de "Real-Time" PCR [170]. Na mistura de reação está, também, presente um fluorocromo exógeno à reação de PCR, que não participa da reação. A fluorescência, por ele emitida, deve permanecer constante ao longo de todo o período de reação, constituindo um bom controlo, pois permite detetar a ocorrência de anomalias (e.g. evaporação). Neste trabalho o fluorocromo exógeno utilizado foi o ROX e a fluorescência por este emitida é utilizada para normalizar a fluorescência emitida pelo repórter fluorescente da sonda, esta normalização permite aumentar o grau de precisão da quantificação pelo equipamento de "Real-Time" PCR [170].

A técnica de RT-qPCR foi aplicada neste trabalho com o intuito de avaliar a variação relativa na expressão dos genes *Erbb2* e *Mycn*, pelo que o material biológico em análise são amostras de RNA. Devido ao uso de RNA é necessário efetuar um passo inicial de conversão deste em cDNA. Esta conversão é realizada por uma enzima com atividade de transcriptase reversa (RT - do inglês "Reverse Transcriptase"), neste caso a

enzima utilizada apresenta simultaneamente as funções de RT e de DNA polimerase o que permite a realização das experiências num único passo ("One Step").

III.3.1 - Extração de RNA e purificação destas amostras.

A extração de RNA das linhas celulares, RNO-normal e CLS-ACI-1, foi realizada em três etapas: antes da exposição à 5-azacitidina (sem AZA), depois da exposição à 5-azacitidina (AZA) e após remoção da 5-azacitidina das linhas celulares previamente expostas (AZA STOP). A recolha de amostras, correspondentes ao período de exposição à 5-azacitidina, foi efetuada 72 horas após o tratamento das linhas celulares RNO-normal e CLS-ACI-1 com o agente desmetilante. A concentração de 5-azacitidina utilizada foi de 3 µM, sendo renovada a cada 24 horas. Para a obtenção das amostras correspondente à AZA-STOP o material biológico foi recolhido 10 dias após a remoção da 5-azacitidina do meio de cultura.

A extração de RNA das duas linhas celulares foi efetuada utilizando o "mirVana^{TM} miRNA Isolation Kit" da "ambion® by life technologies^{TM}", tendo sido seguido o protocolo fornecido pela empresa (a quantidade de células em cada extração foi adequada para o uso de 600 µL das soluções de extração). A quantificação das amostras extraídas é abaixo apresentada.

Amostra	Concentração ng/µL	Abs260:Abs280	Abs260:Abs230
RNO-normal Total	121,4	1,95	1,31
RNO-normal Total sem AZA	98,3	2,01	1,58
RNO-normal AZA	266,0	2,10	2,00
RNO-normal AZA STOP	460,0	2,07	1,90
CLS-ACI-1 Total sem AZA	309,0	2,06	1,23
CLS-ACI-1 Total AZA	284,3	2,06	1,92
CLS-ACI-1 Total AZA STOP	161,1	2,04	1,75

Protocolo 8 - Purificação das amostras de RNA (Digestão de DNA) - "TURBO DNA-free™ Kit da ambion® by life technologies™".

1. De forma a digerir o DNA, que poderá estar a contaminar as amostras de RNA, foi preparada a seguinte mistura de digestão:

	Quantidade (µL)						
	RNO-normal Total	RNO-normal Total sem AZA	RNO-normal Total AZA	RNO-normal Total AZA STOP	CLS-ACI-1 Total sem AZA	CLS-ACI-1 Total AZA	CLS-ACI-1 Total AZA STOP
RNA	41,2	50,0	18,8	10,9	16,2	17,6	31
Tampão Turbo DNase 10x ("Ambion")	5	5	5	5	5	5	5
Turbo DNase 2 U/µL ("Ambion")	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
H_2O DEPC	8,8	0,0	31,2	39,1	33,8	32,4	19
Volume final	56,5	56,5	56,5	56,5	56,5	56,5	56,5

2. Colocou-se a mistura de digestão a incubar, num termociclador, durante 1 hora a 37ºC;

3. Adicionaram-se mais 1,5 µL de Turbo DNAse e voltou-se a incubar durante 2 horas;

4. De seguida, adicionaram-se 10 µL de "DNase Inactivating Reagent", para inativar a DNase, homogeneizou-se com o auxílio de um vortex e deixou-se 5 minutos à temperatura ambiente;

5. Centrifugaram-se os produtos de digestão a 10000 rpm durante 1 minuto e 30 segundos, com o intuito de precipitar o reagente de inativação e a enzima;

6. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo e quantificaram-se as amostras num fotómetro ("nanodrop"). Os dados obtidos são apresentados na tabela a seguir.

Amostra após digestão	Concentração ng/µL	Abs260:Abs280	Abs260:Abs230
RNO-normal Total	63,85	1,92	1,19
RNO-normal Total sem AZA	70,5	1,93	1,27
RNO-normal Total AZA	38,5	1,78	0,94
RNO-normal Total AZA STOP	33,2	1,68	0,95
CLS-ACI-1 Total sem AZA	60,7	1,91	0,96
CLS-ACI-1 Total AZA	38,3	1,91	1,03
CLS-ACI-1 Total AZA STOP	30,2	1,85	0,84

Protocolo 9 - "Real-time Reverse Transcription - quantitative" PCR (RT-qPCR).

1. Antes de se preparar a mistura para RT-qPCR, fizeram-se as seguintes diluições e soluções:

Amostra após digestão	RNO-normal Total	RNO-normal Total sem AZA	RNO-normal Total AZA	RNO-normal Total AZA STOP	CLS-ACI-1 Total sem AZA	CLS-ACI-1 Total AZA	CLS-ACI-1 Total AZA STOP
Concentração inicial (ng/µL)	63,85	70,5	38,5	33,2	60,7	38,3	30,2
Volume de amostra (µL)	15,5	18	29	34	16,5	26	33
Volume de H_2O DEPC (µL)	24,5	32	16	11	23,5	14	7
Concentração Final (ng/µL)	25	25	25	25	25	25	25
Volume Final (µL)	40	50	50	50	40	40	40

Soluções	**Quantidade (µL)**		
	Mix *Gapdh* (anexo 4)	**Mix *Erbb2* (anexo 3)**	**Mix *Mycn* (anexo 2)**
TaqMan RT-PCR Mix (2x)	120	120	120
"Primer/probe Assay mixture"	12	12	12
"RT enzyme mix"	6	6	6
H_2O DEPC	54	54	54
Volume Total	192	192	192

2. Após preparadas as soluções e diluições acima referidas colocou-se, em cada poço de uma 48-"well optical plate", a seguinte quantidade:

Solução/Diluição	**Quantidade (µL)**
Mix (*Gapdh*, *Erbb2* ou *Mycn*)	16
Amostra de RNA	4
Volume Total	20

Nota: foram realizadas 3 repetições para cada gene (*Erbb2*, *Mycn* e *Gapdh*) em cada amostra (RNO-normal, RNO-normal sem AZA, RNO-normal-AZA, RNO-normal-AZA-STOP, CLS sem AZA, CLS-AZA, CLS-AZA-STOP)

3. Após distribuição das amostras na placa, esta foi submetida, num equipamento "StepOne Real-Time PCR System", ao seguinte programa de PCR:

	Temperatura	**Tempo**	
1.º Passo	48ºC	15 minutos	
2.º Passo	95ºC	10 minutos	
3.º Passo	95ºC	15 segundos	40 ciclos
4.º Passo	60ºC	1 minuto	

4. Os dados foram de seguida, sujeitos a uma análise do tipo "Comparative" C_T ($\Delta\Delta C_T$) no programa "StepOne^{TM} Software" v2.2.2. Os produtos de amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, para avaliar a reação.

III.4 - Análise *In Silico*

Com o advento das tecnologias de sequenciação dos genomas, das análises de alto "throughput" de marcas epigenéticas (i.e. ENCODE) e das bases de dados construídas e disponibilizadas para a análise destas sequências/marcas, passou a ser possível efetuar uma série de análises *in silico*. Entre as análises possíveis de se realizar encontram-se a extrapolação de regiões cromossómicas sinténicas entre genomas de diferentes espécies, a determinação de genes potencialmente envolvidos na tumorigénese/carcinogénese, a evidenciação de semelhanças entre os processos macro e microevolutivos e a análise de potenciais marcas epigenéticas envolvidas na regulação da transcrição génica [162, 171].

A análise *in silico* é possível graças à disponibilização de dados citogenómicos, genómicos e epigenómicos "on line" em bases de dados altamente organizadas, que permitem uma consulta simples e variada. No estudo do cancro, as bases de dados evolutivas são de particular interesse, uma vez que permitem a extrapolação de dados obtidos em organismos modelo, fornecendo dados que de outra forma poderiam ser difíceis de obter, por falta de modelos humanos adequados para o estudo [162, 171]. Para esta patologia são, também, de grande relevo as bases de dados especializadas, pois permitem reunir num só local genes, cromossomas ou regiões cromossómicas, perfis de expressão génicos e marcas epigenéticas que se apresentam recorrentemente alteradas em determinado tipo de tumor, facilitando a identificação de potenciais alvos terapêuticos [162, 171].

Protocolo 10 - Determinação de homologias cromossómicas entre MMU e RNO.

1. Para identificar que sondas de MMU usar para colmatar a falta das sondas de RNO representativas dos cromossomas RNO11, RNO12, RNO13, RNO14 e RNO15 recorram-se aos mapas comparativos das espécies *Rattus norvegicus* e *Mus musculus* disponíveis na base de dados Ensembl (http://www.ensembl.org/index.html - "release" 69, 2012), e escolheram-se aqueles cromossomas de MMU que apresentavam sintenias *in toto*, ou cromossomas com grandes segmentos homólogos e que permitissem identificar os cromossomas de RNO em falta.

Protocolo 11 - Análise *in silico* dos "breakpoints" da linha CLS-ACI-1 - comparação com "breakpoints" evolutivos e tumorais/cancro.

1. Para determinar se os "breakpoints" da linha em estudo se encontram co-localizados com outros "breakpoints" identificados em tumores sólidos consultou-se a base de dados dbCRID (http://dbcrid.biolead.org/records.php). Como esta é uma base para dados humanos, usou-se o mapa comparativo entre RNO e HSA para localizar os "breakpoints" descritos em HSA nos cromossomas de RNO.

2. De seguida, para complementar a análise previamente efetuada, realizou-se uma análise de forma a determinar se os "breakpoints" da linha celular CLS-ACI-1 se encontram co-localizados com "breakpoints" evolutivos. Para tal acederam-se aos mapas comparativos das espécies *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* e *Homo sapiens* presentes na base de dados Ensembl (http://www.ensembl.org/index.html - "release" 69, 2012), para localizar os "breakpoints" evolutivos ancestrais ("breakpoints" evolutivos entre HSA e RNO e os em comum entre HSA, RNO e MMU) e os "breakpoints" evolutivos derivativos ("breakpoints" entre RNO e MMU, excetuando os em comum com HSA);

Protocolo 12 - Análise *in silico* de genes putativamente afetados pelos "breakpoints" da linha celular CLS-ACI-1.

1. De forma a determinar que genes ou rearranjos cromossómicos, previamente associados ao cancro da mama humano, se podem encontrar alterados na linha CLS-ACI-1, recorreu-se à base de dados "Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology" (http://atlasgeneticsoncology.org/) para identificar estes genes/rearranjos e aos mapas comparativos entre HSA e RNO da base de dados Ensembl (http://www.ensembl.org/index.html - "release" 69, 2012), para determinar a posição citogenética dos mesmos genes e dos rearranjos nos cromossomas de RNO.

2. Após identificação dos genes candidatos, os resultados foram confirmados na base de dados NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) para assegurar que estes se localizam nas bandas em que ocorreram os "breakpoints" detetados.

Protocolo 13 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas aos genes *Erbb2* e *Mycn* em MMU e HSA.

1. Para averiguar que marcas epigenéticas se encontram associadas aos genes em análise neste trabalho consultou-se a base de dados UCSC-ENCODE (http://genome.ucsc.edu/ENCODE/), tendo sido efetuada uma busca das marcas epigenéticas nos genomas de HSA ["assembly" - Feb. 2009 (GRCh37/hg19)] e MMU ["assembly" - July 2007 (NCBI37/mm9)].

Capitulo IV - Resultados

Capitulo IV - Resultados

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos através das várias metodologias descritas no capítulo anterior. Estas foram realizadas com o intuito de caracterizar citogenética e molecularmente a linha celular CLS-ACI-1.

IV.1 - Características morfológica e comportamental da linha CLS-ACI-1

A linha CLS-ACI-1 foi adquirida, pelo laboratório de acolhimento, à empresa "Cell Lines Service". De acordo com a informação disponibilizada pela empresa esta é uma linha celular proveniente de um adenocarcinoma mamário de *Rattus norvegicus*, da estirpe ACI, que apresenta uma morfologia celular do tipo epitelial (figura 7a) e tem capacidade tumorigénica em "nude mice" [172]. Aquando da cultura no laboratório, foi possível verificar que esta linha apresenta, também, células com uma morfologia do tipo linfoblastóide e que possuem, aparentemente, capacidade para crescer em suspensão apesar de não terem sido realizados testes que permitissem confirmar a independência de ancoragem (figuras 7b e 7c). Nas figuras 7d, 7e e 7f podem, também, ser encontradas imagens ilustrativas de células em mitose e de diferentes etapas do processo de crescimento celular em cultura *in vitro*.

Numa primeira abordagem, a nível cromossómico, foi determinado o número modal. Para tal, lâminas preparadas por "drop" foram coradas com Giemsa a 2% (v/v) e visualizadas em microscópio de campo claro. Foram contados os cromossomas de 120 metafases. Esta análise inicial revelou que a linha celular CLS-ACI-1 apresenta um complemento cromossómico quase triploide (em relação ao padrão: RNO, 2n=42), sendo mais frequentes as células com 59, 60 e 63 cromossomas (Gráfico 1 e Tabela 1).

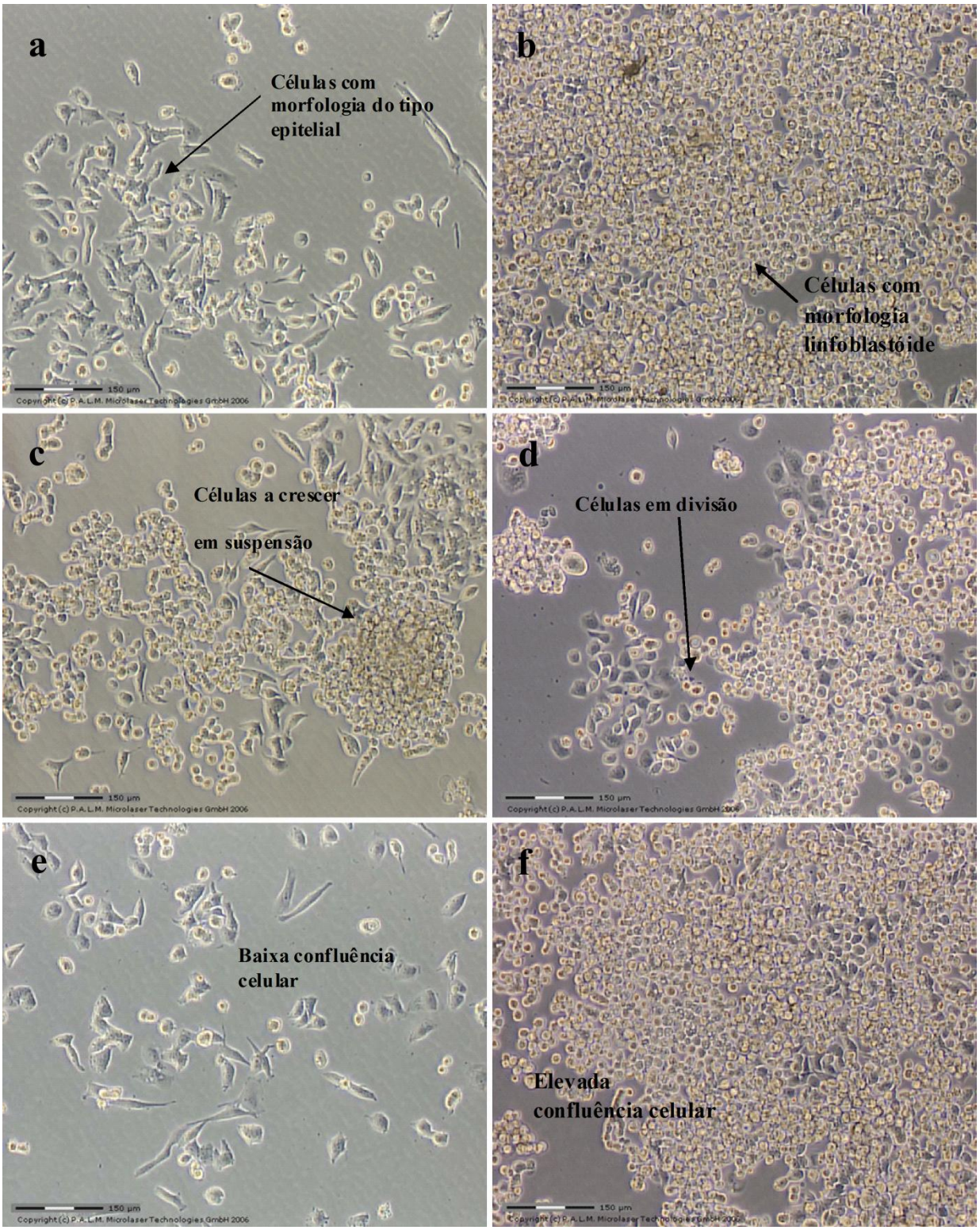


Figura 7 - Painel de imagens ilustrativas da morfologia e comportamento celular da linha CLS-ACI-1. Nesta figura podem ser observadas células com morfologia do tipo epitelial (**a**) e do tipo linfoblastóide (**b**), células a crescer em suspensão (**c**), células em divisão (**d**). As imagens **e** e **f** são ilustrativas do "aspeto" de caixas de cultura em diferentes graus de confluência celular.

Tabela 1 - Contagem do número de cromossomas por metafase, num total de 120 metafases.

Número de cromossomas por metafase	Percentagem	Número de cromossomas por metafase	Percentagem	Número de cromossomas por metafase	Percentagem
38	0,8%	57	4,2%	66	4,2%
42	0,8%	58	6,7%	67	4,2%
47	0,8%	59	9,2%	68	3,3%
48	1,7%	60	10,8%	69	0,8%
50	0,8%	61	5,8%	70	0,8%
51	1,7%	62	7,5%	84	0,8%
52	2,5%	63	10%	86	0,8%
53	0,8%	64	6,7%	104	1,7%
55	1,7%	65	2,5%	≥120	2,5%
56	5,8%				

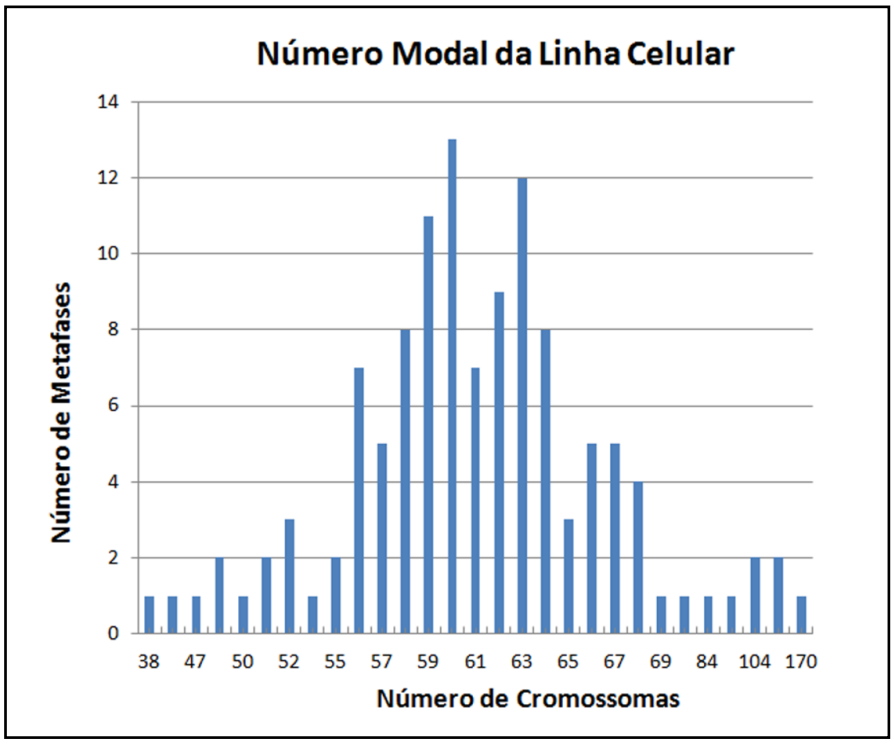


Gráfico 1 - Número Modal da linha CLS-ACI-1. Para estabelecer este número foram contados os cromossomas de 120 células.

IV.2 - Caracterização citogenética da linha celular CLS-ACI-1

Como referido anteriormente, o cancro evolui clonalmente, estando a sua evolução dependente da aquisição de novas mutações. As linhas celulares, principalmente as linhas celulares tumorais, apresentam algum nível de instabilidade, que se manifesta a nível morfológico, citogenético, genético e epigenético. A nível citogenético a instabilidade do genoma das células tumorais é manifestada pela presença de alterações cromossómicas estruturais e numéricas [66, 83, 90] características, sendo que o conceito de clone surge como central no deslindamento da evolução de cada tumor. O termo clone é definido como uma população celular derivada de uma única célula progenitora [152]. De relevância é a referência ao facto de um clone não ter de ser necessariamente homogéneo, uma vez que vários subclones podem surgir durante a sua evolução. De acordo com a ISCN um clone deve apresentar pelo menos duas células com a mesma alteração cromossómica, se esta alteração for um rearranjo estrutural ou um ganho cromossómico; e pelo menos três células, se a alteração for uma perda cromossómica [152].

Neste trabalho, de forma a caracterizar citogeneticamente a linha CLS-ACI-1, recorreu-se a metodologias de bandeamento cromossómico e de "Chromosome Painting".

Numa primeira abordagem aplicou-se uma técnica de bandeamento clássico, o bandeamento-G que mostrou ser pouco reprodutível, pelo que se optou posteriormente por uma técnica alternativa de bandeamento menos sujeita a variações, a restrição *in situ*, que produz um padrão de bandeamento tipo-G. Várias lâminas foram preparadas por "droping" e sujeitas a bandeamento-GTG (bandas-G obtidas por ação da tripsina e coradas com Giemsa) de acordo com o protocolo 1 ou a bandeamento por restrição *in situ* com coloração por DAPI, de acordo com o protocolo 2. Após bandeadas, as lâminas foram visualizadas num microscópio ótico de campo claro, no caso das bandas-G clássicas ou num microscópio ótico de epifluorescência, no caso da restrição *in situ*. É de referir que várias enzimas foram testadas, nomeadamente ApaI, BamHI, DraI, e PstI (Figuras 8 e 9), de forma a escolher a que originava um melhor padrão de bandeamento, tendo sido selecionada a enzima PstI. As imagens obtidas foram tratadas para análise no programa Adobe Photoshop® 7.0.

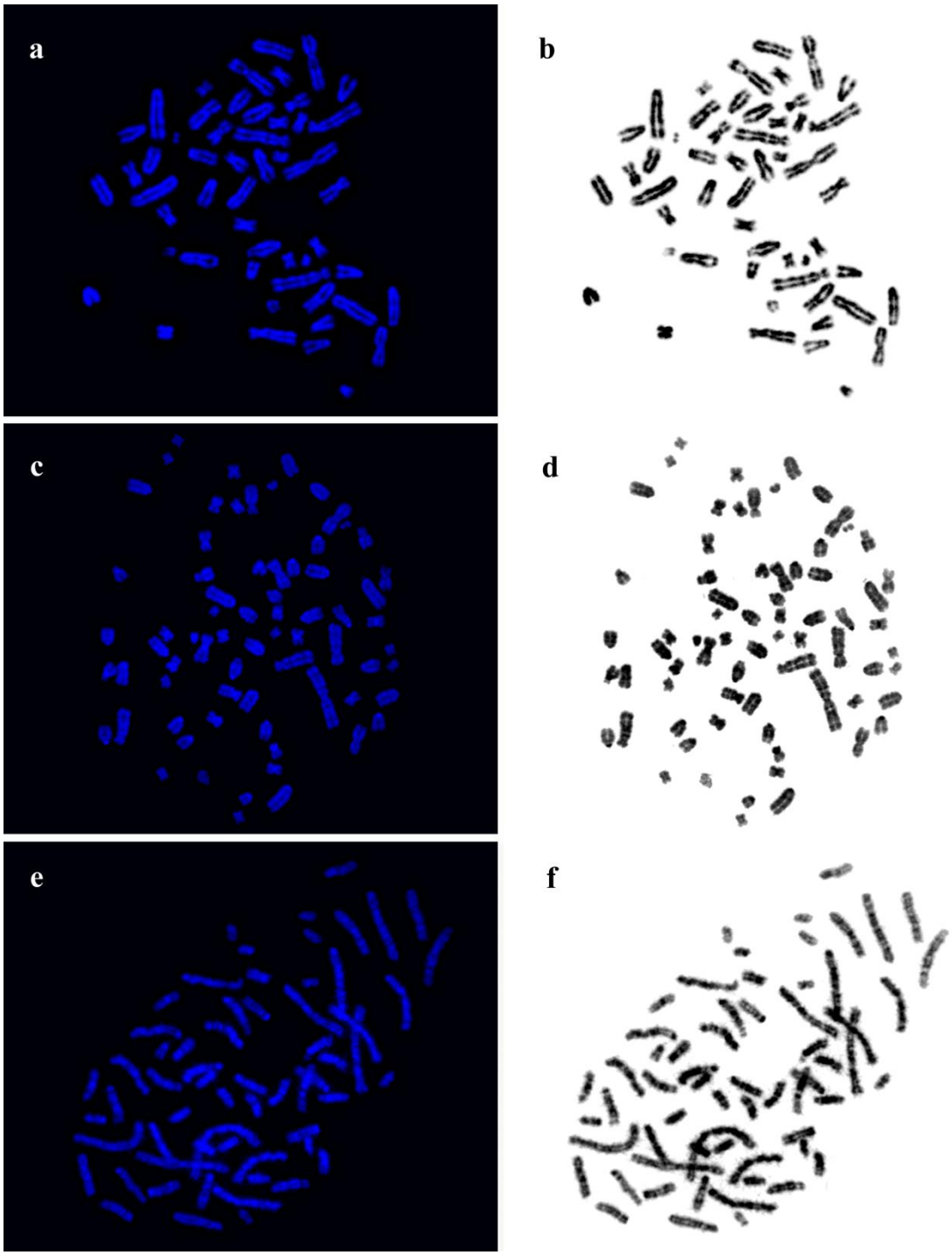


Figura 8 - Exemplos de metafases obtidas por restrição *in situ* e coradas com DAPI. a - digestão por ApaI; **b** - o mesmo que em **a** mas invertido; **c** - digestão por BamHI; **d** - o mesmo que em **c** mas invertido; **e** - digestão por DraI; **f** - o mesmo que em **e** mas invertido.

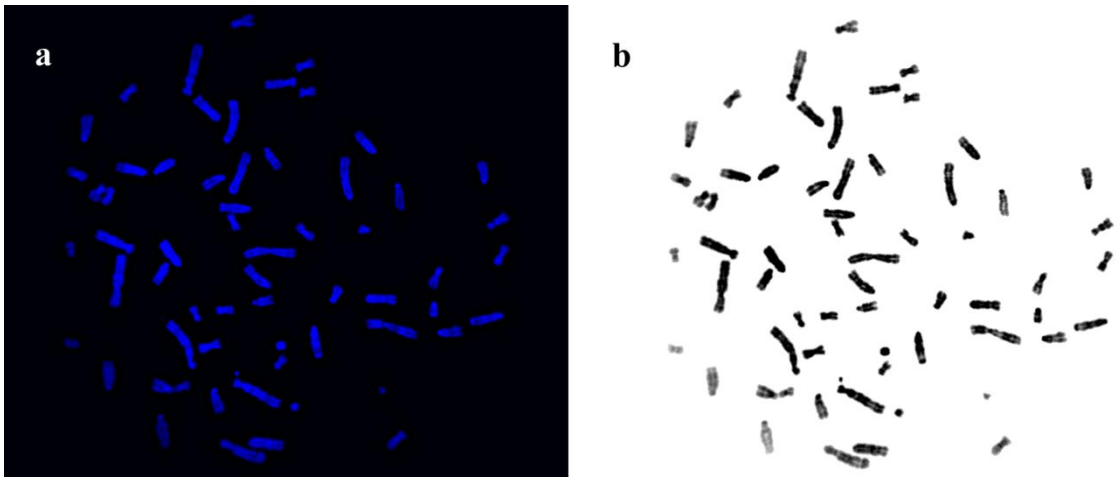


Figura 9 - Exemplos de metafases obtidas por restrição *in situ* e coradas com DAPI. a - digestão por PstI. **b -** o mesmo que em **a** mas invertido.

Esta abordagem, a nível citogenético, permitiu determinar que a linha celular CLS-ACI-1 apresenta instabilidade cromossómica numérica e estrutural, como se pode verificar pela presença de vários cromossomas portadores de rearranjos estruturais, identificados com setas na figura 10, e pela elevada amplitude do complemento cromossómico por célula (figura 10), que como se pode observar varia entre os 40 e os 141 nas células apresentadas e tendo sido anteriormente evidenciado na tabela1 e no gráfico 1.

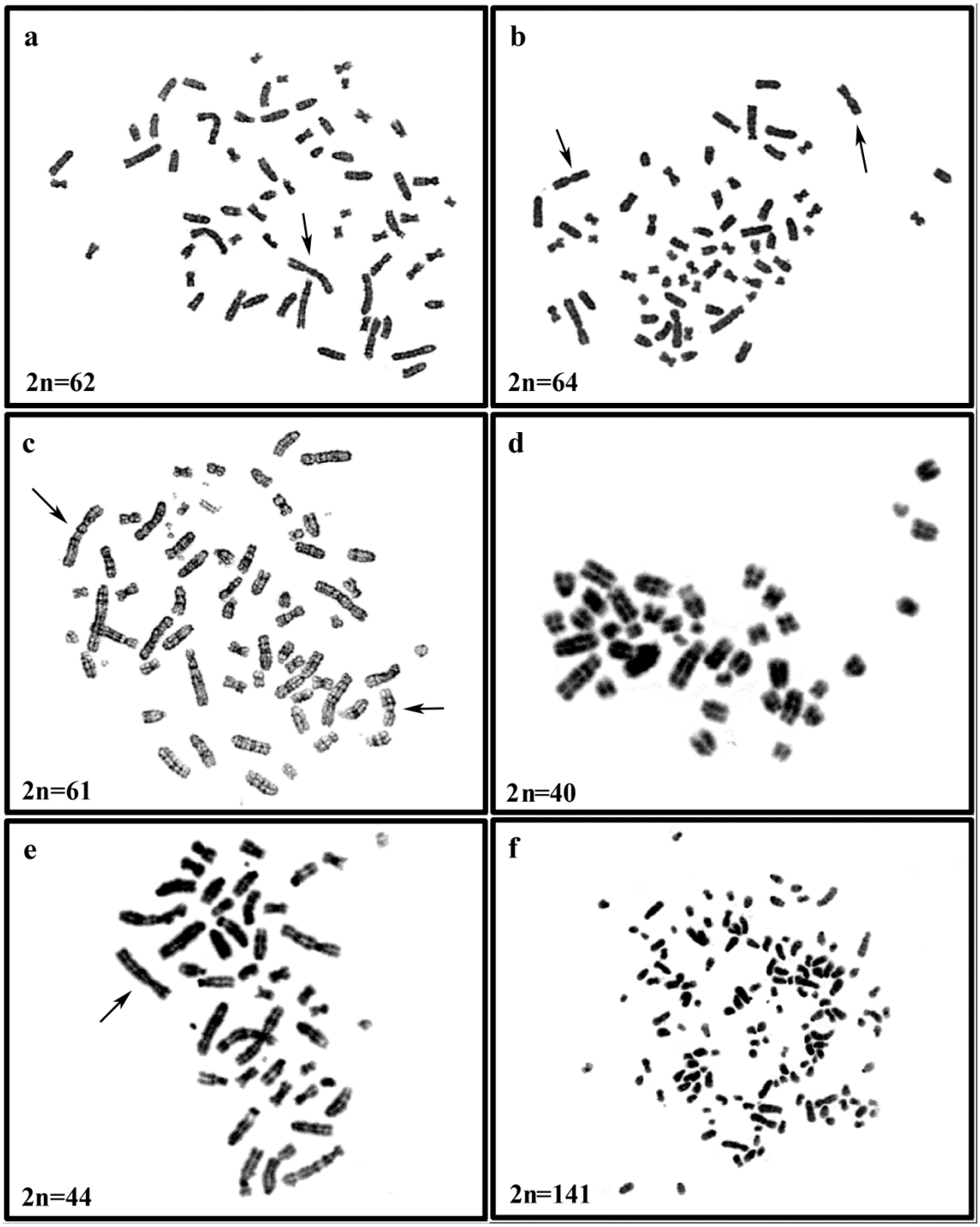


Figura 10 - Metafases ilustrativas da variação do complemento cromossómico e da presença de cromossomas portadores de alterações estruturais na linha celular CLS-ACI-1. As bandas nas imagens **a**, **b** e **c** foram obtidas por bandeamento-GTG e as das imagens **d**, **e** e **f** foram obtidas por restrição *in situ* com a enzima PstI, coradas com DAPI e posteriormente invertidas para preto e branco. As setas indicam exemplos de cromossomas rearranjados.

Após esta abordagem inicial recorreu-se à técnica de "Chromosome Painting", para uma análise mais detalhada das alterações numéricas e estruturais e dos cromossomas nestas envolvidos. Para tal foram utilizadas sondas representativas dos cromossomas inteiros de RNO, com exceção das sondas dos cromossomas RNO11, RNO12, RNO13, RNO14 e RNO15 pois estas não estão disponíveis no laboratório. Em alternativa recorreu-se a sondas de MMU (MMU1, MMU5, MMU11, MMU14 e MMU16) que apresentam sintenia *in toto* (exceção do MMU11) para os cromossomas em falta, como é mostrado nos anexos 5-8. As sondas para "Chromosome Painting" acima referidas foram amplificadas e marcadas por DOP-PCR de acordo com os protocolos 3 e 5. Os resultados da amplificação e marcação das sondas foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) (protocolo 4), onde se visualizou o característico "smear" de tamanho compreendido entre os 200 e os 2000 bp (figuras 11 e 12).

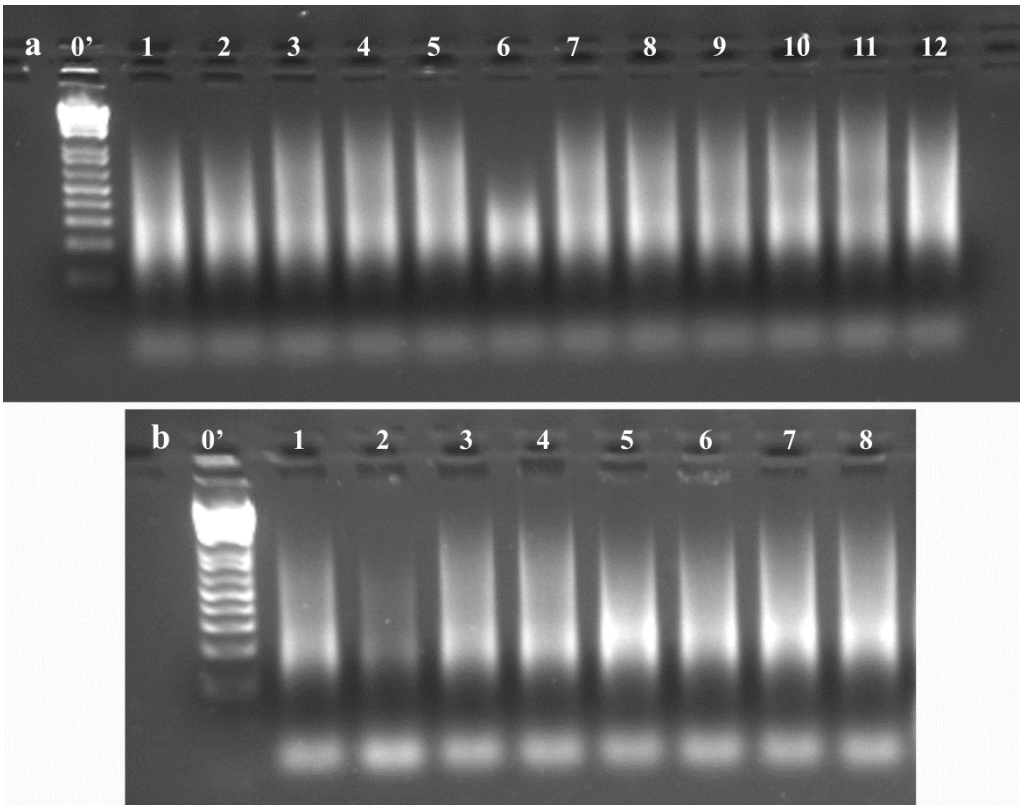


Figura 11 - Eletroforese em géis de agarose a 1,5% (p/v), dos produtos de amplificação de sondas de RNO para "Chromosome Painting" (a) e de marcação das mesmas (b). Legenda: 0', marcador, 1 - RNO1, 2 - RNO2, 3 - RNO3, 4 - RNO4, 5 - RNO5, 6 - RNO6, 7 - RNO7, 8 - RNO8, 9 - RNO9, 10 - RNO10, 11 -RNO16 e 12 - RNO17. Note-se o "smear" característico com comprimento compreendido entre os 200 e os 2000 bp.

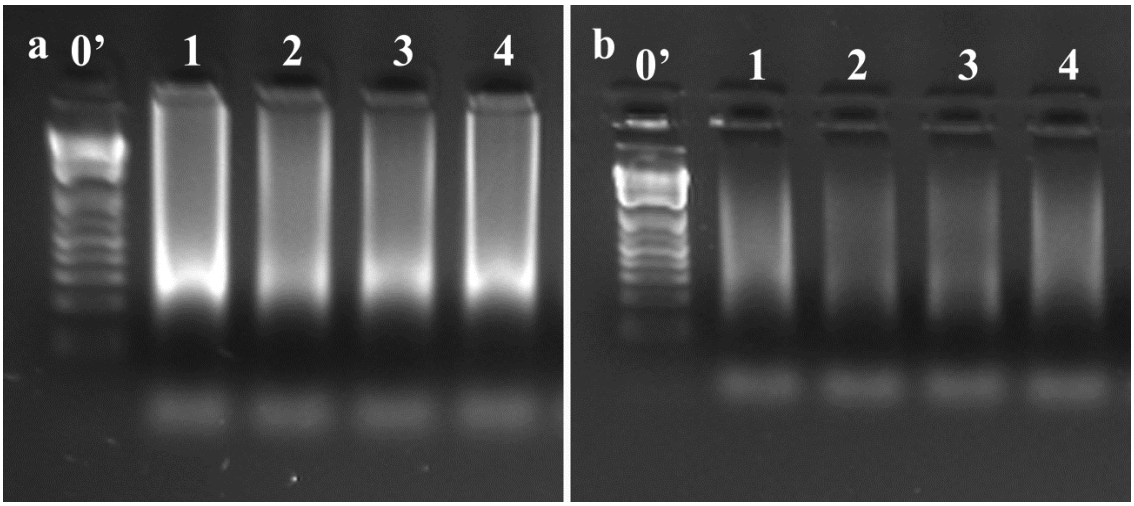


Figura 12 - Eletroforese em géis de agarose a 1,5% (p/v), dos produtos de amplificação de sondas de MMU para "Chromosome Painting" (a) e de marcação das mesmas (b). Legenda: 0', marcador, 1 - MMU1, 2 - MMU5, 3 - MMU11, 4 - MMU16. Note-se a presença do "smear" característico com comprimento compreendido entre os 200 e os 2000 bp.

Os resultados obtidos com as sondas representativas dos vários cromossomas do complemento serão de seguida apresentados.

Para o RNO1 foi demonstrado, com recurso à sonda representativa do mesmo, que se encontra em dissomia (frequência de 14% - não clonal), tri- e tetrassomia (figura 13a, 13b), surgindo com frequências de 50% e 36 %, respetivamente. Foi simultaneamente detetado um cromossoma 1 derivativo, em 57% das metafases analisadas, resultante da ocorrência de duas translocações, definido como der(1)t(1;3)(p13;q35)t(1;6)(q55;?) (figuras 13b, 14g e 15n). O uso da sonda representativa do cromossoma RNO2 mostrou que este não parece apresentar alterações estruturais, sendo encontrado num estado trissómico (figura 13c) em 86 % das células analisadas. Este cromossoma foi, também, detetado nos estados di- e tetrassómicos com uma frequência de 7%, no entanto, de acordo com o ISCN, estes não podem ser considerados clonais, pois a sua frequência é inferior a 14% (para o ganho cromossómico) e 21% (para a perda cromossómica).

A análise do cromossoma RNO4, com a sonda representativa do mesmo, revelou que este se encontra em dissomia (7% das células analisadas), tetrassomia (14% das células), pentassomia (71% das células) e hexassomia (7% das células) - figuras 13d e 13e. Apenas os estados tetra- e pentassómicos podem ser considerados clonais, não tendo este cromossoma apresentado qualquer rearranjo estrutural. Por sua vez o cromossoma RNO8 foi encontrado em di- e trissomia, em 43% e 57% das metafases, respetivamente, não apresentando alterações estruturais (figura 13f).

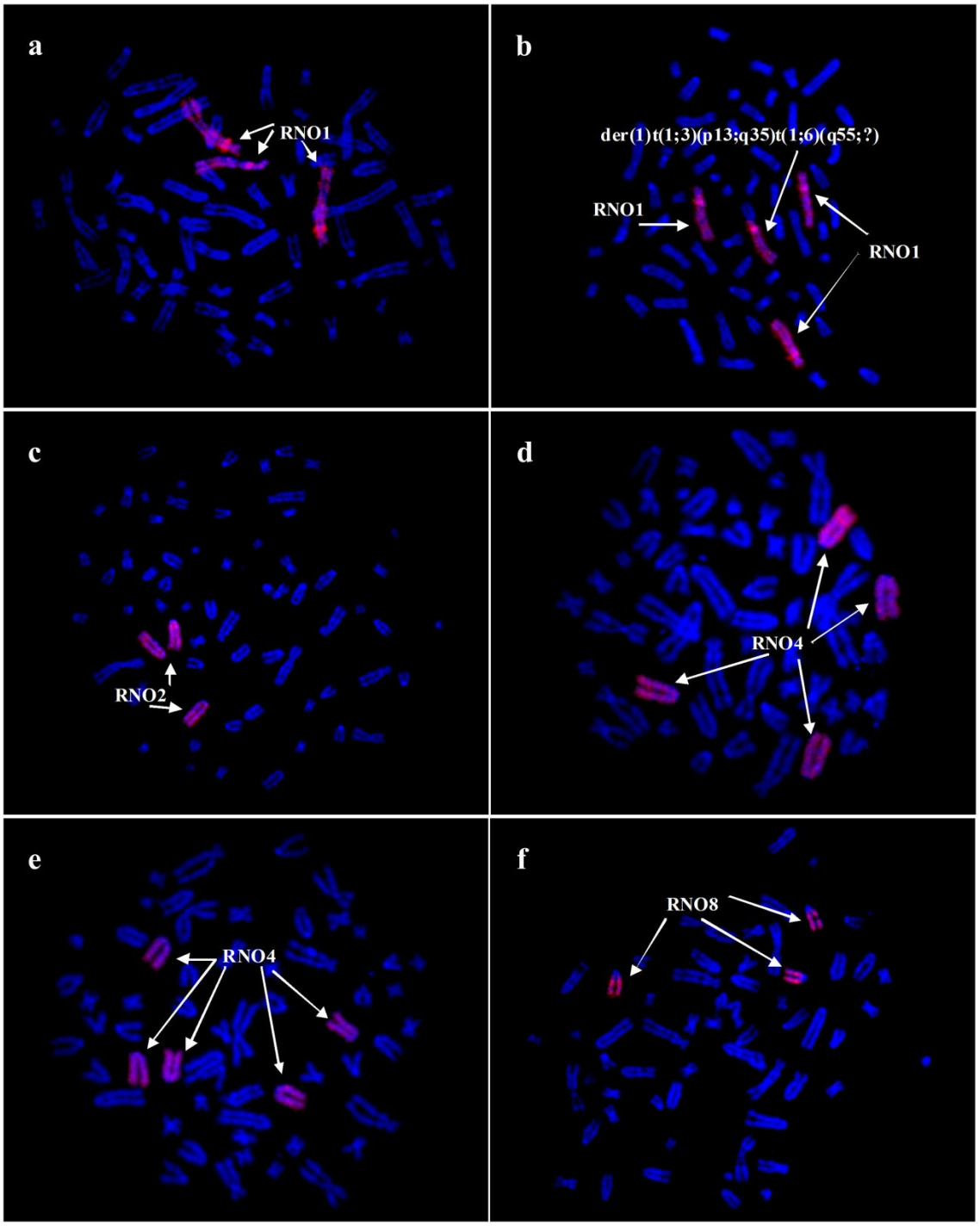


Figura 13 - Metafases ilustrativas apresentando as alterações cromossómicas identificadas nos cromossomas RNO1, RNO2, RNO4 e RNO8, na linha celular CLS-ACI-1. Nas imagens **a** e **b** foi utilizada a sonda de RNO representativa do cromossoma 1. Na imagem **c** e **f** foi utilizada a sonda de RNO representativa do cromossoma 2 e do cromossoma 8, respetivamente. Nas imagens **d** e **e** foi utilizada a sonda de RNO representativa do cromossoma 4. Todas as sondas foram marcadas com digoxigenina e detetadas com anti-dig-rodamina (surge a magenta).

O uso da sonda representativa do cromossoma RNO3 revelou que este foi um dos cromossomas que apresenta mais rearranjos estruturais, encontrando-se translocado com o cromossoma X (t(X;3)(q32;q36) - figuras 14h e 14i) e com o cromossoma RNO5 (der(5)t(5;3)(q36;?) - figura 14j), em todas as células analisadas; com o cromossoma RNO1 (der(1)t(1;3)(p13;q35)t(1;6)(q55;?) - figura 14g), com uma frequência de 57%. Foram também detetadas translocações com o cromossoma RNO12 ou RNO14, gerando três rearranjos distintos, der(3;?)t(3;?)(p10;?)t(?;16)(?;p1?) - figuras 14g, 18h1 e 18g1, der(3;?)(p10;?)del(3)(q3?)t(?;3)(?;q31) - figuras 14i e 18g1 e der(3;?)t(3;?)(p10;?)del(3)(q3?) - figuras 14g e 18f1, com frequências de 100%, 71% e 29%, respetivamente. Este cromossoma apresenta, também, duas deleções, dando origem ao cromossoma der(3)del(3)(p10)del(3)(q3?) (figura 14g), surgindo em 86% das metafases analisadas.

Por sua vez o cromossoma RNO5 apresenta-se em trissomia, composta por um cromossoma normal e dois cromossomas translocados com o cromossoma RNO3 (der(5)t(5;3)(q36;?) - figura 14j) em 100% das metafases analisadas. O cromossoma RNO7 foi detetado, com recurso à sonda representativa deste, em dissomia (frequência de 14% - não clonal), trissomia (frequência de 79%) e tetrassomia (frequência de 7% - não clonal), não apresentando qualquer alteração estrutural nas células analisadas (figuras 14k e 14l).

Com recurso à sonda representativa do cromossoma RNOX foi possível averiguar que este se apresenta translocado com o cromossoma RNO3 (t(X;3)(q32;q36) - figuras 14h e 14i), em 100% das metafases analisadas, com o cromossoma 14 (der(14)t(X;14)(q?;p2?)dup(14)(q21q22) - figura 18g1) em 93% das células e com o cromossoma RNO20 (t(X;20)(q?;p12) - figuras 14h e 17b1), em 21% das metafases analisadas. Uma cópia deste cromossoma sem alterações estruturais foi também detetada (figuras 14h e 14i) em 79% das células analisadas.

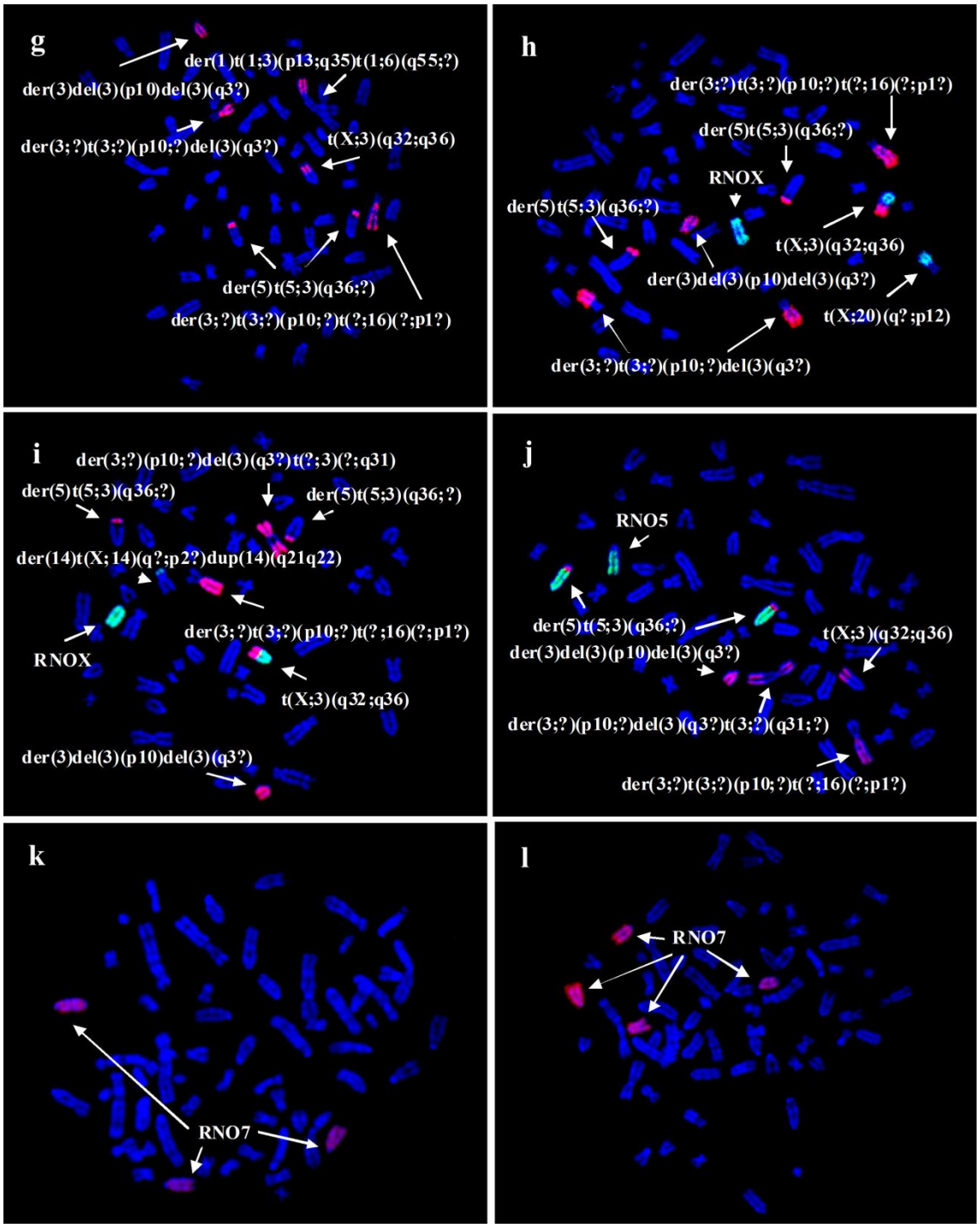


Figura 14 - Metafases ilustrativas apresentando as alterações cromossómicas identificadas nos cromossomas RNO3, RNO5, RNO7 E RNOX , da linha celular CLS-ACI-1. Na imagem **g** foi utilizada a sonda de RNO representativa do cromossoma 3 (marcada com digoxigenina e detetada com anti-dig-rodamina - magenta). Nas imagens **h** e **i** foram utilizadas as sondas de RNO representativas dos cromossomas 3 (marcada com digoxigenina e detetada com anti-dig-rodamina - magenta) e X (marcada com biotina e detetada com FITC - verde). Na imagem **j** foram utilizadas sondas de RNO representativas dos cromossomas 3 (marcada com digoxigenina e detetada com anti-dig-rodamina - magenta) e 5 (marcada com biotina e detetada com FITC - verde). Nas imagens **k** e **l** foi utilizada a sonda de RNO representativa do cromossoma 7 (marcada com digoxigenina e detetada com anti-dig-rodamina - magenta)

O uso da sonda representativa do cromossoma RNO6 mostrou que este cromossoma se apresenta altamente rearranjado, apresentando uma translocação robertsoniana entre dois RNO6 (rob(6;6)(q10;q10) - figura 15m) em 100% das metafases analisadas; uma translocação robertsoniana t(6;6) e uma deleção dando origem aos cromossomas: der(6;6)(q10;q10)del(6)(q1?) (figura 15n) e der(6;6)(q10;q10)del(6)(q23) (figura 15o), ambos com uma frequência de 29%.

Foram também detetados cromossomas formados por uma translocação robertsoniana t(6;6), uma deleção e uma translocação com o cromossoma RNO9 (der(6;6)(q10;q10)del(6)(q23)t(6;9)(q31;q3?) - figura 15p), com uma frequência associada de 100%; por uma translocação com o cromossoma 14 e uma inserção com o cromossoma RNO12 ou RNO14 (der(14)t(6;14)(q?;q21)ins(6;?)(q23~31;?) - figuras 15m, 18f1 e 18g1), em 43% das metafases analisadas; por uma translocação com o cromossoma RNO1 (der(1)t(1;3)(p13;q35)t(1;6)(q55;?) - figura 15o), com uma frequência associada de 57% e por uma deleção, gerando o cromossoma del(6)(q22~24) (figura 15m) em 100% das metafases.

O uso da sonda representativa do cromossoma RNO9 revelou que este é encontrado num estado tri- e tetrassómico, sendo a trissomia composta por dois cromossomas RNO9 normais e um portador de uma deleção (del(9)(q21) - figura 15p), surgindo com uma frequência de 14%. O estado tetrassómico é constituído por dois cromossomas RNO9 normais e dois portadores de deleção (del(9)(q21) e del(9)(q13) - figura 15p), com uma frequência associada de 79%. Um estado trissómico, composto por um cromossoma RNO9 normal, um del(9)(q21) e um del(9)(q13), foi encontrado em 7% das metafases, não sendo clonal. Foi, também, detetada uma translocação deste cromossoma com o cromossoma RNO6 (der(6;6)(q10;q10)del(6)(q23)t(6;9)(q31;q3?) - figura 15p) em 100% das metafases analisadas.

A análise do cromossoma RNO10, com recurso à sonda representativa deste cromossoma e dos cromossomas MMU11 e MMU5, revelou que este se encontra presente num estado trissómico composto por um cromossoma RNO10 normal e dois cromossomas que apresentam uma translocação com o cromossoma RNO12 ou RNO14 (der(10)t(10;?)(q32;?) - figuras 15q e 18f1 e 18g1) em 86% das metafases analisadas. Dois estados dissómicos distintos foram identificados para o cromossoma RNO10, no entanto nenhum dos dois provou ser clonal. A análise com a sonda representativa do cromossoma RNO16, revelou que este está presente em monossomia (14 % das metafases analisadas - não clonal), dissomia (64% das metafases analisadas) e trissomia (21% das metafases analisadas) (figura 15r). O cromossoma 16 foi encontrado, em 100% das metafases analisadas, envolvido numa translocação - der(3;?)t(3;?)(p10;?)t(?;16)(?;p1?) (figura 18f1 e 18h1).

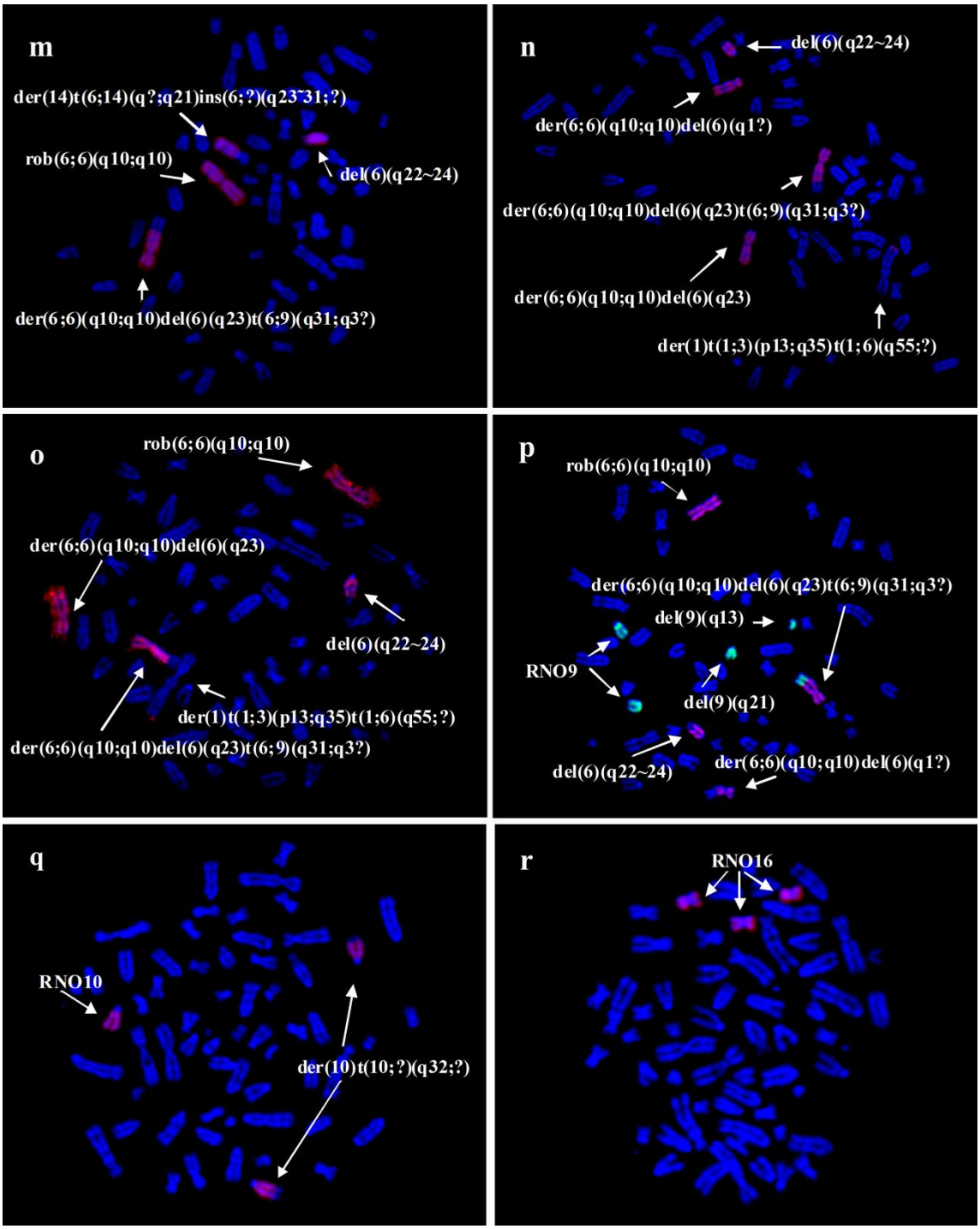


Figura 15 - Metafases ilustrativas apresentando as alterações cromossómicas identificadas nos cromossomas RNO6, RNO9, RNO10 E RNO16, presentes na linha CLS-ACI-1. Nas imagens **m**, **n** e **o** foi utilizada a sonda de RNO representativa do cromossoma 6 (marcada com digoxigenina e detetada com anti-dig-rodamina - magenta). Na imagem **p** foram utilizadas as sondas de RNO representativas dos cromossomas 6 (marcada com digoxigenina e detetada com anti-dig-rodamina - magenta) e 9 (marcado com biotina e detetada com FITC - verde). Nas imagens **q** e **r** foram utilizadas, respetivamente, sondas de RNO representativas dos cromossomas 10 e 16, marcadas com digoxigenina e detetadas com anti-dig-rodamina (magenta).

O uso da sonda representativa do cromossoma RNO17 revelou que este se encontra em monossomia (frequência de 14% - não clonal), dissomia (frequência de 57%) e trissomia (frequência de 29%), não apresentando alterações estruturais (figura 16s).

O cromossoma 18 não apresenta rearranjos estruturais, sendo encontrado em monossomia (7% das metafases analisadas - não clonal) dissomia (21% das metafases analisadas), trissomia (43% das metafases analisadas), tetrassomia (29% das metafases analisadas) e pentassomia (7% das metafases analisadas - não clonal) (figuras 16t e 16u).

O uso da sonda representativa do cromossoma RNO19 revelou que este se encontra em monossomia (frequência de 21%), dissomia (36% das metafases analisadas), trissomia (frequência de 36%) e tetrassomia (frequência de 7% - não clonal), não apresentando rearranjos estruturais (figuras 16v, 16w, 16x e 17y).

Por sua vez o uso da sonda representativa do cromossoma RNO20 mostrou que este cromossoma se encontra translocado com o cromossoma X (t(X;20)(q?;p12) - figuras 14h e 17b1), em 21% das células analisadas. Este cromossoma foi, também, detetado em monossomia (frequência de 21%), dissomia (36% das metafases analisadas), trissomia (29% das metafases analisadas), tetrassomia (frequência de 14%), pentassomia, hexassomia e heptassomia, no entanto estas ultimas três aneuploidias não são clonais (figuras 17z, 17a1, 17b1, 17c1 e 17d1).

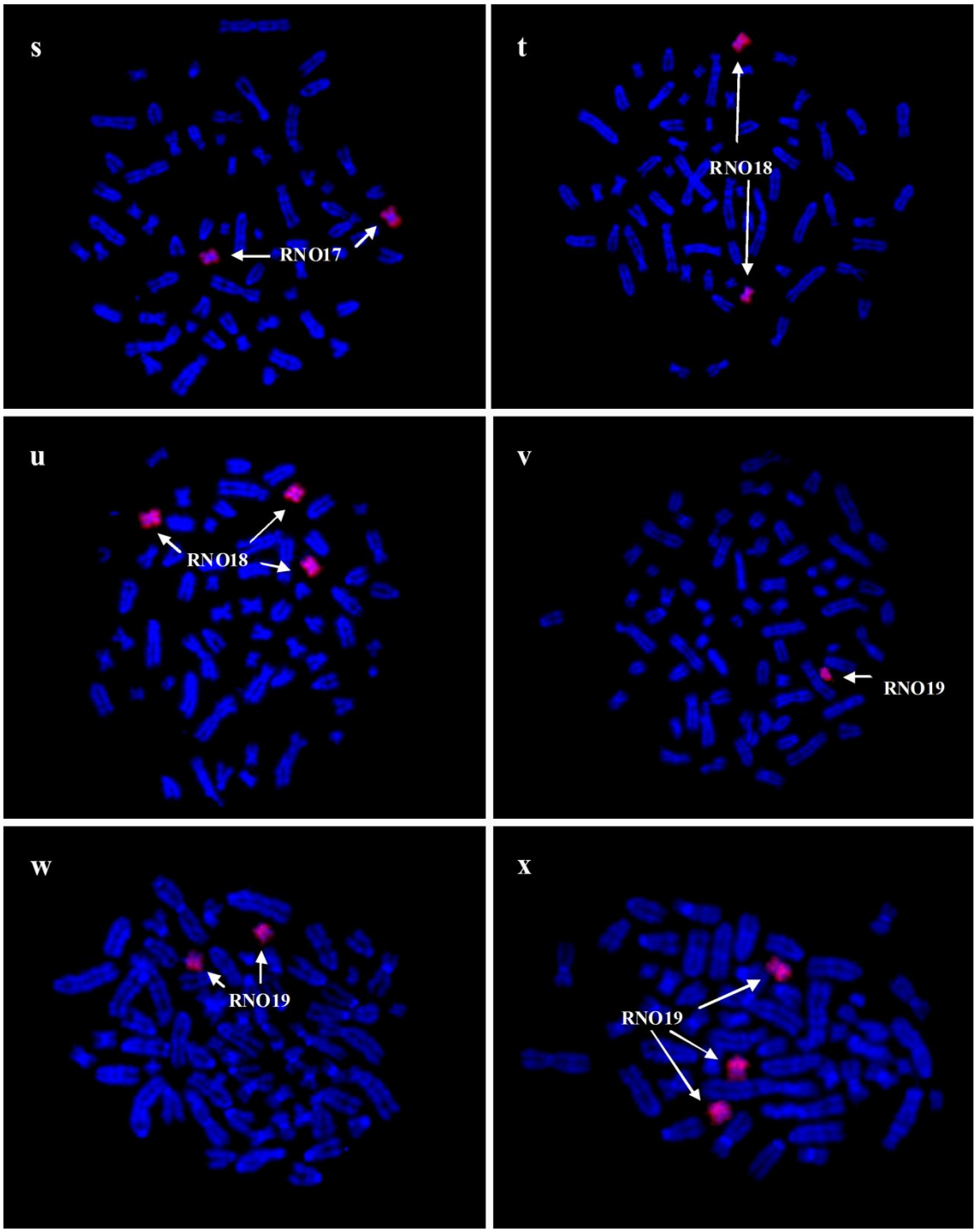


Figura 16 - Metafases ilustrativas apresentando as alterações identificadas nos cromossomas RNO17, RNO18 e RNO19, da linha celular CLS-ACI-1. Nas imagens **s**, **t**, **u**, **v**, **w** e **x** foram utilizadas sondas de RNO representativas do cromossoma 17 (imagem **s**), do cromossoma 18 (imagens **t** e **u**) e do cromossoma 19 (imagens **v**, **w** e **x**). Estas sondas foram marcadas com digoxigenina e detetadas com anti-dig-rodamina (magenta).

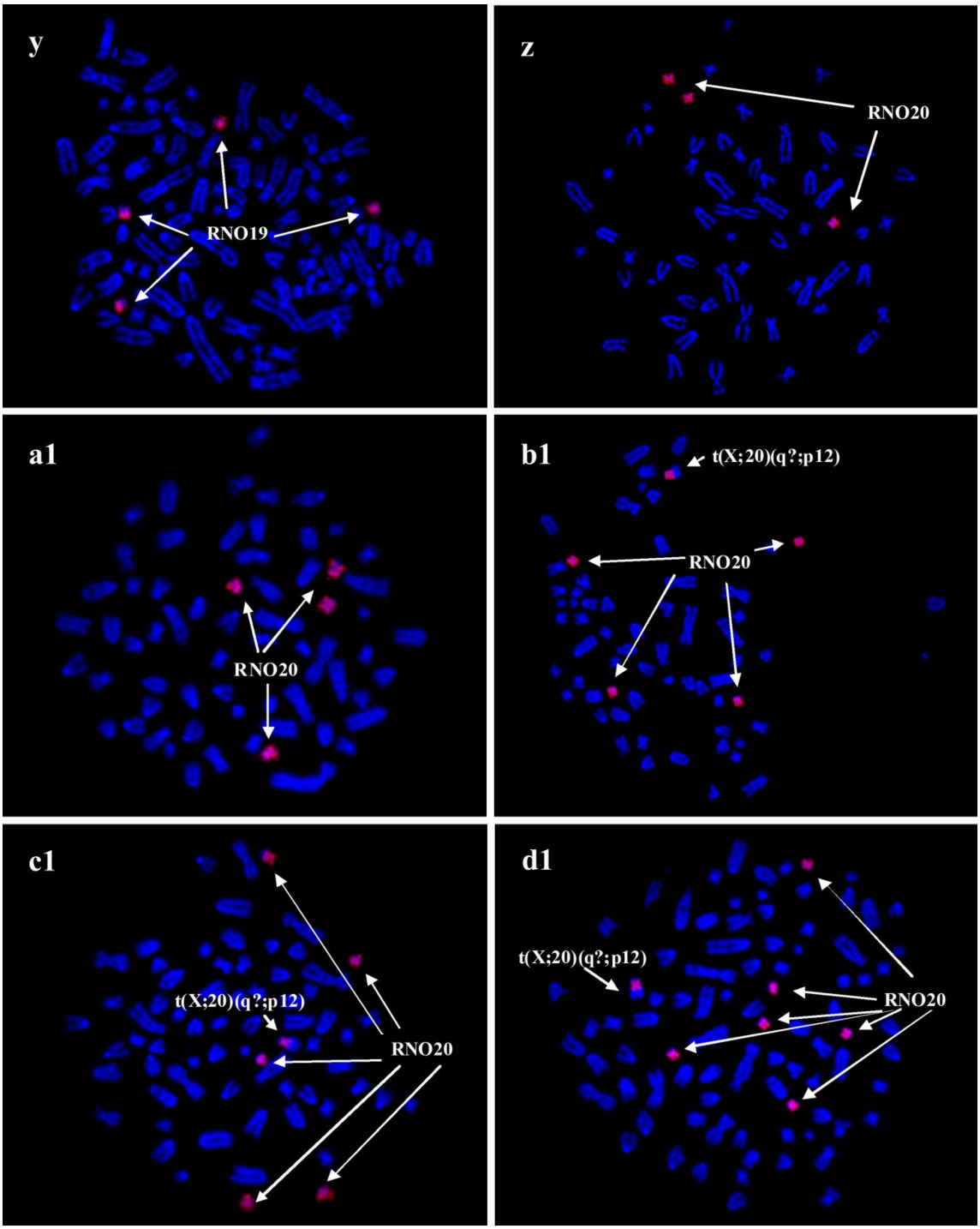


Figura 17 - Metafases ilustrativas das alterações identificadas nos cromossomas RNO19 e RNO20, da linha celular CLS-ACI-1. Nas imagens **y**, **z**, **a1**, **b1**, **c1** e **d1** foram utilizadas sondas de RNO representativas dos cromossomas 19 (imagem **y**) e do cromossoma 20 (imagens **z**, **a1**, **b1**, **c1** e **d1**). As sondas utilizadas foram marcadas com digoxigenina e detetadas com anti-dig-rodamina (magenta).

O cromossoma RNO 11 foi detetado, com recurso à sonda representativa do cromossoma MMU16 (para o qual apresenta homologia *in toto*), num estado mono-, di- e trissómico em 7% (não clonal), 57% e 36% das metafases analisadas, não apresentando alterações estruturais (figuras 18j1, 19k1 e 19l1).

O uso das sondas de MMU representativas dos cromossomas MMU5 e MMU11 revelou que o cromossoma RNO12 se encontra presente num estado monossómico (frequência de 21%), dissómico (frequência de 50%) e trissómico (frequência de 29%) sem alterações estruturais. Por sua vez o cromossoma RNO14 foi detetado em monossomia (frequência de 7% - não clonal) e em dissomia, sendo esta composta por um cromossoma RNO14 normal e um cromossoma translocado com o cromossoma X e com uma duplicação - der(14)t(X;14)(q?;p2?)dup(14)(q21q22) (figuras 18f1 e 18g1), surgindo em 93% das células analisadas.

Ambos os cromossomas (RNO12 e RNO14) estão possivelmente envolvidos na formação dos cromossomas der(10)t(10;?)(q32;?) (frequência de 100%), der(14)t(6;14)(q?;q21)ins(6;?)(q23~31;?) (frequência de 43%), der(3;?)t(3;?)(p10;?)t(?;16)(?;p1?) (frequência de 100%) , der(3;?)t(3;?)(p10;?)del(3)(q3?) (frequência de 29%) e der(3;?)(p10;?)del(3)(q3?)t(?;3)(?;q31) (frequência de 71%) - figuras 18f1 e 18g1.

O uso da sonda representativa do cromossoma MMU1 revelou que o cromossoma RNO13 é detetado nos estados dissómico (14% das metafases - não clonal), trissómico (57% das metafases) e tetrassómico (29% das metafases), não apresentando alterações estruturais (figura 18e1). Por sua vez o uso da sonda representativa do cromossoma MMU14 revelou que o cromossoma RNO15 se encontra presente em dissomia (frequência de 79%), trissomia (frequência de 14%) e tetrassomia (frequência de 7% - não clonal), não se encontrando envolvido em rearranjos estruturais (figuras 18h1 e 18i1).

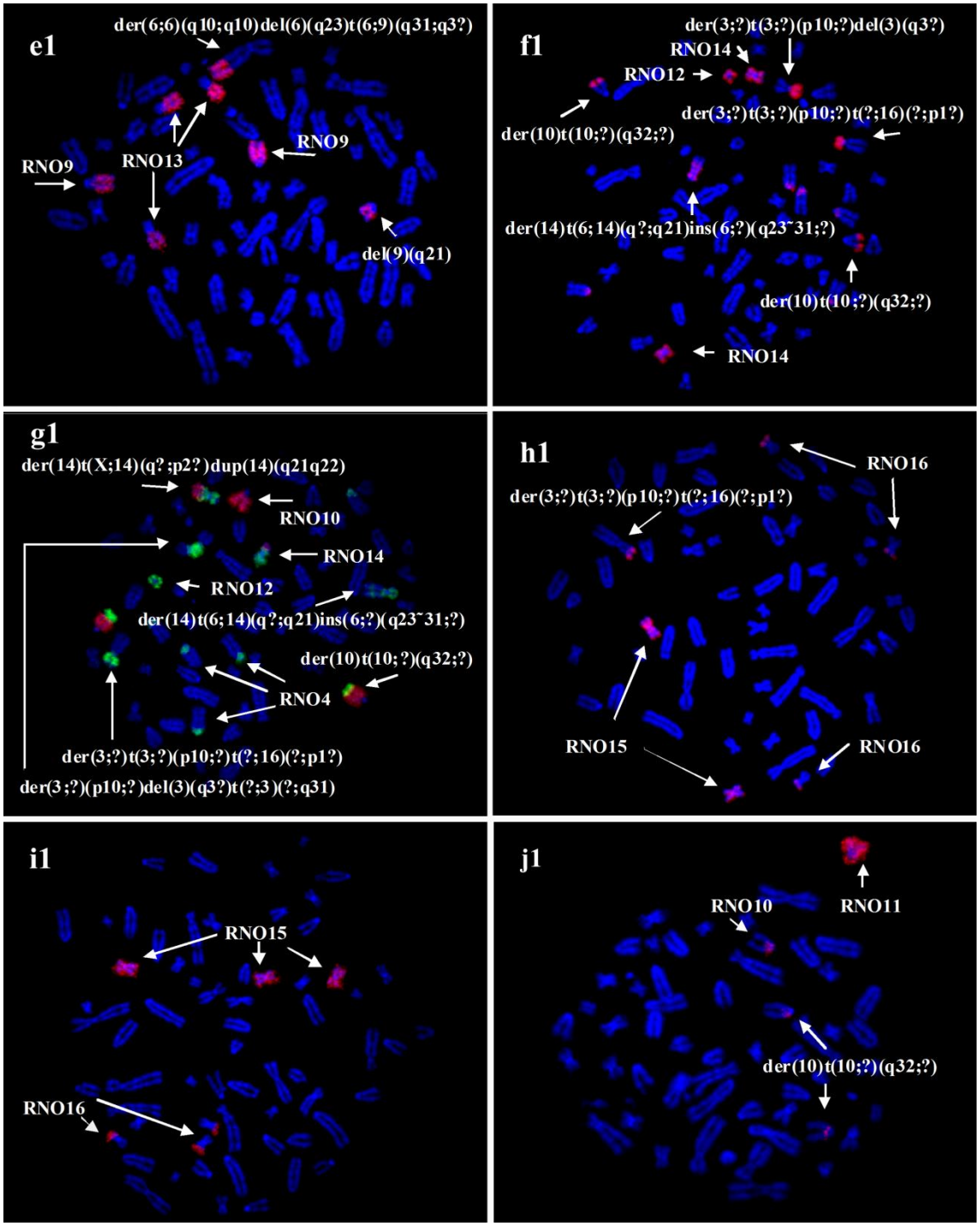


Figura 18 - Metafases ilustrativas apresentando as alterações identificadas nos dos cromossomas RNO11, RNO12, RNO13, RNO14 e RNO15, da linha celular CLS-ACI-1. Na imagem **e1** foi utilizada a sonda de MMU representativa do cromossoma 1 (este cromossoma tem homologia com os cromossomas RNO9 e RNO13) marcada com digoxigenina e detetada com anti-dig-rodamina (magenta). Na imagem **f1** foi utilizada a sonda de MMU representativa do cromossoma 5 (este cromossoma tem homologia com os cromossomas RNO4, RNO12 e RNO14) marcada com digoxigenina e detetada com anti-dig-rodamina (magenta). Na imagem **g1** foram utilizadas as sondas de MMU representativas dos cromossomas 5 (marcada com biotina e detetada com FITC - verde) e 11 (marcada com digoxigenina e detetada com anti-dig-rodamina - magenta). O cromossoma MMU11 tem homologia com os cromossomas RNO10 e RNO14). Nas imagens **h1** e **i1** foi utilizada a sonda de MMU representativa do cromossoma 14 (este cromossoma apresenta homologia com os cromossomas RNO15 e RNO16) marcada com digoxigenina e detetada com anti-dig-rodamina (magenta). Na imagem **j1** foi utilizada a sonda de MMU representativa do cromossoma 16 (este cromossoma tem homologia com os cromossomas RNO10 e RNO11) marcada com digoxigenina e detetada com anti-dig-rodamina (magenta).

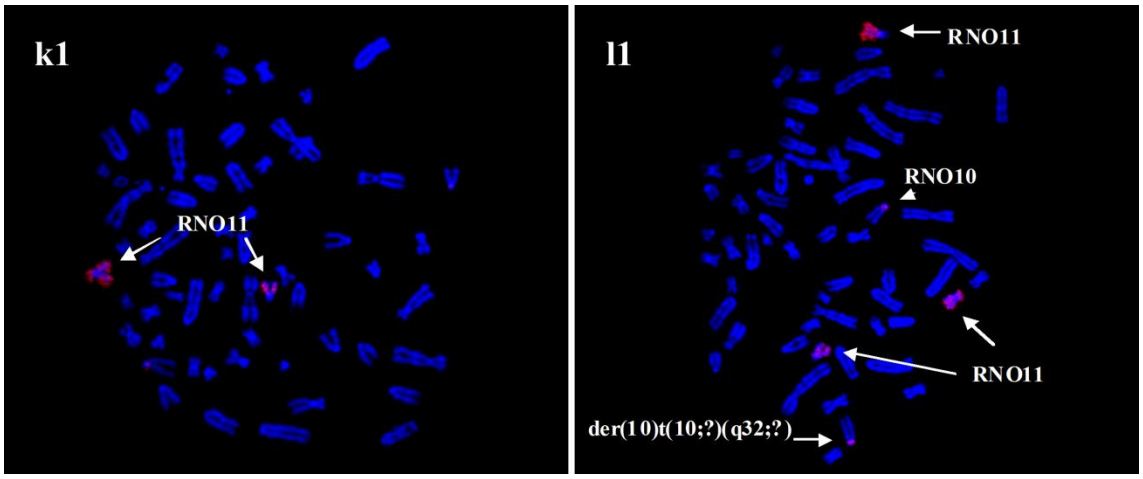


Figura 19 - Metafases ilustrativas das alterações cromossómicas, do cromossoma RNO11, identificadas na linha celular CLS-ACI-1. Nas imagens **k1** e **l1** foi utilizada a sonda de MMU representativa do cromossoma 16 (este cromossoma tem homologia com os cromossomas RNO10 e RNO11) marcada com digoxigenina e detetada com anti-dig-rodamina (magenta).

Para além das sondas acima apresentadas foi, também, utilizada a sonda de RNO representativa do cromossoma Y. Esta sonda não mostrou sinal de hibridação o que indica que esta linha, provavelmente, provém de uma fêmea (42, XX), no entanto não pode ser descartada a hipótese da linha CLS-ACI-1 ser proveniente de um macho (42, XY), tendo ocorrido perda do cromossoma Y nos primeiros estágios da evolução clonal da linha.

O uso das sondas representativas dos cromossomas RNO1, RNO2, RNO4, RNO7, RNO8, RNO10, RNO16, RNO17, RNO18, RNO19, RNO20 e RNOX demostrou, também, a presença de micronúcleos com sinal dos cromossomas acima referidos (figura 20 - evidenciado pelas setas). Os micronúcleos são formados a partir de fragmentos cromossómicos, cromossomas acêntricos ou cromossomas cêntricos que, por algum motivo, não foram corretamente ligados ao fuso acromático, sendo portanto uma das manifestações celulares da instabilidade cromossómica [173]. Vários cientistas aceitam como facto o conteúdo de DNA destas estruturas celulares ser frequentemente reduzido ou eliminado das células [173], fornecendo assim uma mecanismo provável para explicar o acentuado grau de aneuploidia exibido pela linha celular CLS-ACI-1.

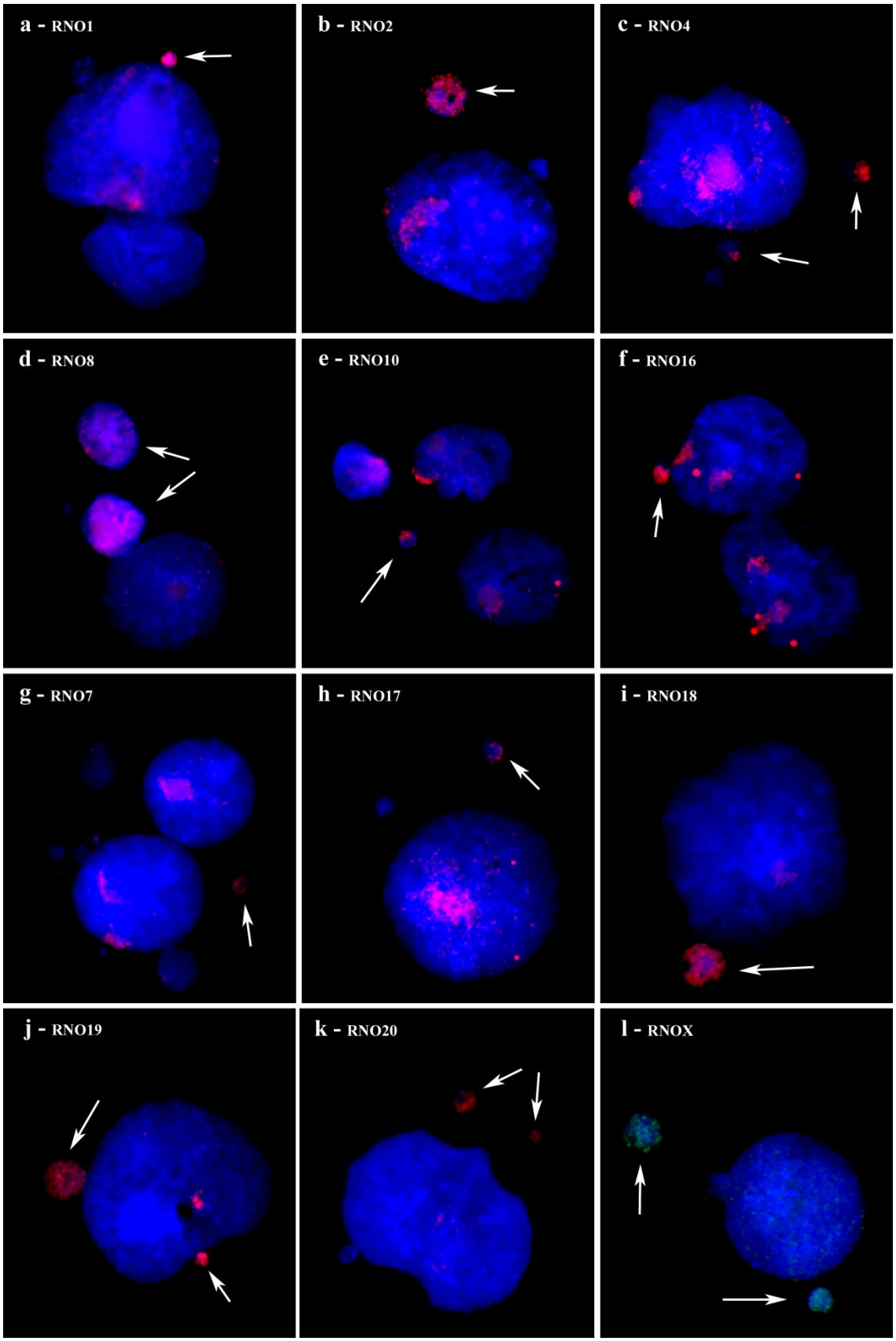


Figura 20 - Exemplos de micronúcleos detetados na linha CLS-ACI-1. No canto superior esquerdo de cada imagem está identificada a sonda utilizada. Imagens **a** até **k**, sondas marcadas com digoxigenina e detetadas com anti-dig-rodamina. Imagem **l**, sonda marcada com biotina e detetada com avidina-FITC.

Com os resultados obtidos pela técnica de "Chromosome Painting" foi possível determinar que a linha celular CLS-ACI-1 é composta por pelo menos 3 subclones (clones A, B e C) cujas fórmulas cromossómicas são:

Subclone A:

53~64,X,-X,-X,t(X;3)(q32;q36),+der(1)t(1;3)(p13;q35)t(1;6)(q55;?),
der(3;?)t(3;?)(p10;?)t(?;16)(?;p1?),der(3)del(3)(p10)del(3)(q3?),
+der(3;?)t(3;?)(p10;?)del(3)(q3?),+4,+4,der(5)t(5;3)(q36;?)x2,rob(6;6)(q10;q10),
der(6;6)(q10;q10)del(6)(q23)t(6;9)(q31;q3?),del(6)(q22~24),
+der(6;6)(q10;q10)del(6)(q23),-8, del(9)(q21),+del(9)(q13),der(10)t(10;?)(q32;?)x2,
-11,-12,-12,-14,-14, der(14)t(X;14)(q?;p2?)dup(14)(q21q22),-15,-15,-16,-17,+18,-19,
-19,+mar,+2mar[cp4] (anexo 9)

Subclone B:

58~62,X,-X,-X,t(X;3)(q32;q36),der(1)t(1;3)(p13;q35)t(1;6)(q55;?),
der(3;?)t(3;?)(p10;?)t(?;16)(?;p1?),der(3)del(3)(p10)del(3)(q3?),
+der(3;?)(p10;?)del(3)(q3?)t(?;3)(?;q31),+4,+4,der(5)t(5;3)(q36;?)x2,rob(6;6)(q10;q10),
der(6;6)(q10;q10)del(6)(q23)t(6;9)(q31;q3?),del(6)(q22~24),
+der(6;6)(q10;q10)del(6)(q1?),-8,-8,del(9)(q21),+del(9)(q13),der(10)t(10;?)(q32;?)x2,
-11,-11,-12,-12,-14,-14,der(14)t(X;14)(q?;p2?)dup(14)(q21q22),-15,-15,-16,+mar[cp4]
(anexo 10)

Subclone C:

57~61,X,-X,-X,t(X;3)(q32;q36),-1,der(3;?)t(3;?)(p10;?)t(?;16)(?;p1?),
der(3)del(3)(p10)del(3)(q3?),+der(3;?)(p10;?)del(3)(q3?)t(?;3)(?;q31),+4,+4,
der(5)t(5;3)(q36;?)x2,rob(6;6)(q10;q10),der(6;6)(q10;q10)del(6)(q23)t(6;9)(q31;q3?),
del(6)(q22~24),-8**,**del(9)(q21),+del(9)(q13),der(10)t(10;?)(q32;?)x2,-11,-12,+13,-14,
der(14)t(X;14)(q?;p2?)dup(14)(q21q22), der(14)t(6;14)(q?;q21)ins(6;?)(q23~31;?),-15,
-16,-17,+18,-19,-20,-20,+mar,+2mar[cp6] (anexo 11)

Tendo em conta os cariótipos de cada subclone acima descrito é possível elaborar o cariótipo composto da linha CLS-ACI-1, sendo este:

Clone CLS-ACI-1:

53~64, X,-X,-X,t(X;3)(q32;q36),t(X;20)(q?;p12),-1,
der(1)t(1;3)(p13;q35)t(1;6)(q55;?),+der(1)t(1;3)(p13;q35)t(1;6)(q55;?),
der(3;?)t(3;?)(p10;?)t(?;16)(?;p1?),der(3)del(3)(p10)del(3)(q3?),
+der(3;?)(p10;?)del(3)(q3?)t(?;3)(?;q31),+der(3;?)t(3;?)(p10;?)del(3)(q3?),+4,+4,
der(5)t(5;3)(q36;?)x2,rob(6;6)(q10;q10),der(6;6)(q10;q10)del(6)(q23)t(6;9)(q31;q3?),
del(6)(q22~24),+der(6;6)(q10;q10)del(6)(q1?),+der(6;6)(q10;q10)del(6)(q23),+7,
-8,del(9)(q21),+del(9)(q13),-10,der(10)t(10;?)(q32;?)x2,-11,-12,-12,+13,-14,
der(14)t(X;14)(q?;p2?)dup(14)(q21q22),der(14)t(6;14)(q?;q21)ins(6;?)(q23~31;?),-15,
-16,-17,-18,+18,-19,-19,-20,-20,+20,+mar,+2mar[cp14]

IV.2.1 - Análise dos "breakpoints" da linha celular CLS-ACI-1.

O cancro, como previamente referido, é uma doença de ciclo celular que surge frequentemente associada a alterações cromossómicas numéricas e estruturais. Aquando da análise das alterações estruturais é de particular relevo a determinação dos "breakpoints" que estão na origem dos rearranjos detetados, pois estes denotam zonas frágeis do genoma que poderão estar relacionadas com a iniciação/progressão tumoral e fornecem informação sobre possíveis genes de fusão formados, genes estes que têm grande impacto na génese/progressão tumoral.

Para a linha CLS-ACI-1, os "breakpoints" detetados, foram comparados com "breakpoints" tumorais/cancro até à data descritos, presentes na base de dados dbCRID (http://dbcrid.biolead.org/index.php), para evidenciar locais recorrentemente "usados" na evolução tumoral. Posteriormente os "breakpoints" de linha em estudo foram, também, comparados com os "breakpoints" evolutivos registados entre *Rattus norvegicus, Mus musculus* e *Homo sapiens*, presentes na base de dados Ensembl (http://www.ensembl.org/index.html - "release" 69, 2012), para evidenciar a similaridade na dinâmica evolutiva cromossómica entre os processos macro e microevolutivos.

Esta análise revelou que a maioria dos "breakpoints" detetados na linha CLS-ACI-1 ocorreram em regiões cromossómicas que já haviam sido associadas a "breakpoints" tumorais e/ou evolutivos, nomeadamente os RNO1p13, RNO1q55, RNO3q35, RNO3p10, RNO3q36, RNO5q36, RNO6q10, RNO6q23, RNO6q31, RNO6q22~24, RNO9q13, RNO9q21, RNO10q32, RNO14q21, RNO20p12. A exceção é o cromossoma RNOX, cujo "breakpoint" apresentado na linha CLS-ACI-1 (banda RNOXq32) não está associado a "breakpoints" tumorais/cancro e/ou evolutivos descritos para aquele cromossoma (figura 21). No cromossoma RNO12 não estão indicados "breakpoints" da linha CLS-ACI-1 uma vez que estes não puderam ser determinados exatamente, pois a sonda de MMU5 apresenta sintenias com ambos os cromossomas RNO12 e RNO14. Desta forma, os "breakpoints" apresentados para o cromossoma RNO14 poderão estar sub-representados, não sendo mostrados "breakpoints" no cromossoma RNO12.

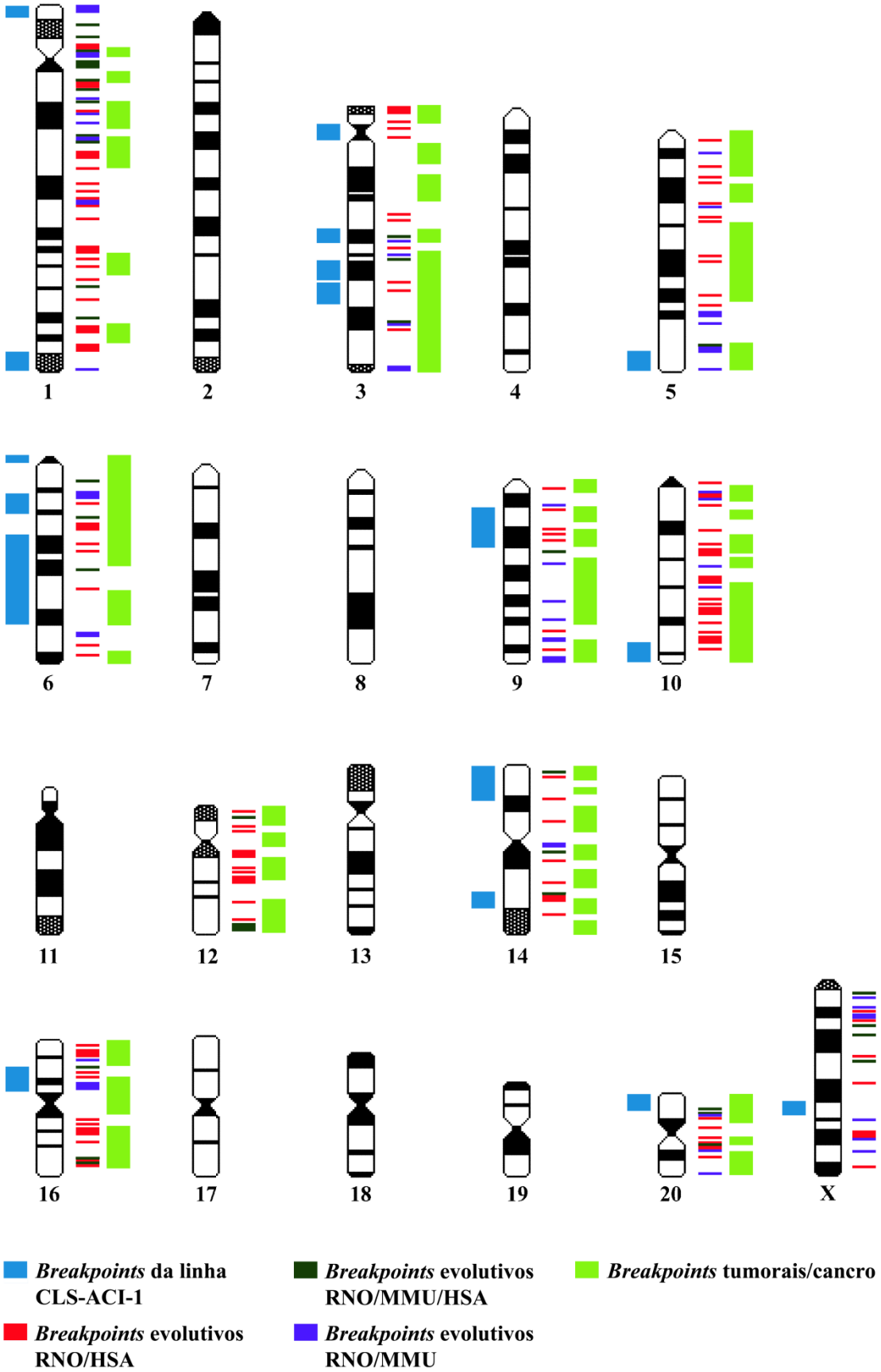


Figura 21 - Análise dos "breakpoints" da linha celular CLS-ACI-1, num ideograma padrão de *Rattus norvegicus*. Os vários "breakpoints" analisados encontram-se assinaladas por diferentes cores. A verde claro encontram-se assinalados, em RNO, os "breakpoints" tumorais/cancro homólogos aos detetados em HSA.

IV.2.2 - Análise *in silico* de genes putativamente afetados pelos "breakpoints" detetados na linha celular CLS-ACI-1.

A alteração da expressão génica é um fator essencial para a tumorigénese e para a progressão tumoral. Vários têm sido os mecanismos descritos que levam à ativação de oncogenes (ativação por ocorrência de mutações pontuais, por formação de genes de fusão, por aumento do nível transcripcional, por amplificação génica) ou à inativação de genes supressores tumorais (e.g. perda dos cromossomas portadores dos genes, deleção do gene, ocorrência de uma mutação pontual e a inativação transcripcional do alelo funcional por mecanismos epigenéticos) [21]. Uma vez que as zonas de "breakpoint" são locais onde podem ocorrer várias alterações génicas, tais como: formação de genes de fusão, deleção e ativação ou supressão da transcrição é de particular interesse averiguar que genes se encontram na proximidade destes "breakpoints", pois estes genes estão potencialmente envolvidos na tumorigénese e/ou progressão tumoral.

Para determinar que genes, previamente associados ao cancro da mama humano, se poderiam encontrar afetados na linha CLS-ACI-1, devido à sua proximidade com os "breakpoints" da linha em estudo, consultaram-se os mapas comparativos entre RNO e HSA, presentes na base de dados Ensembl (http://www.ensembl.org/index.html - "realease" 69, 2012). Esta consulta foi realizada com o intuito de determinar a posição citogenética exata dos "breakpoints" detetados na linha CLS-ACI-1, nos cromossomas de HSA. Posteriormente utilizou-se a base de dados "Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology" (http://atlasgeneticsoncology.org/) para identificar que genes estão localizados nestas mesmas regiões e, assim, elaborar uma lista de genes possivelmente envolvidos na iniciação e progressão tumoral da linha CLS-ACI-1 (tabela 2).

Tabela 2 - Lista de genes associados ao cancro da mama que poderão apresentar algum tipo de alteração na linha CLS-ACI-1 devido à ocorrência de "breakpoints" na banda cromossómica onde se localizam.

RNO		**HSA**		
Breakpoint	**Gene**	**Gene homólogo**	**Região citogenética**	**Descrição do gene**
1p13	*Lats1*	*LATS1*	6q25.1	*Large tumor suppressor, homolog 1*
1q55	*Pdcd4*	*PDCD4*	10q24	*Programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)*
1q55	*Eif3a*	*EIF3A*	10q26	*Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit A*
3p11	*Hspa5*	*HSPA5*	9q33.3	*Heat shock 70kDa protein 5*
3q31	*Cd44*	*CD44*	11p13	*CD44 molecule*
3q36	*Cops2*	*COPS2*	15q21.2	*COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 2 (Arabidopsis)*
3q35	*Plcb2*	*PLCB2*	15q15	*Phospholipase C, beta 2*
3q35	*Spint1*	*SPINT1*	15q15.1	*Serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1*
3q36	*Pcna*	*PCNA*	20pter-p12	*Proliferating cell nuclear antigen*
3q36	*Rassf2*	*RASSF2*	20p13	*Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2*
5q36	*Cdc42*	*CDC42*	1p36.1	*Cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)*
5q36	*Dvl1*	*DVL1*	1p36	*Dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)*
5q36	*Prdm2*	*PRDM2*	1p36.21	*PR domain containing 2, with ZNF domain*
6q15-q16	*Ddx1*	*DDX1*	2p24	*DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 1*
6q11	*Eif2ak2*	*EIF2AK2*	2p22-p21	*Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2*
6q14	*Sdc1*	*SDC1*	2p24.1	*Syndecan 1*
6q24	*Esr2*	*ESR2*	14q23.2	*Estrogen receptor 2 (ER beta)*
6q23-q24	*Foxa1*	*FOXA1*	14q12-q13	*Forkhead box A1*
6q24	*Nin*	*NIN*	14q22.1	*Ninein (GSK3B interacting protein)*
6q31	*Numb*	*NUMB*	14q24.3	*Numb homolog (Drosophila)*
6q24	*Zfp36l1*	*ZFP36L1*	14q22-q24	*Zinc finger protein 36, C3H type-like 1*
10q32.3	*St6galnac1*	*ST6GALNAC1*	17q25.1	*ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1*
10q32.2	*Slc9a3r1*	*SLC9A3R1*	17q25.1	*Solute carrier family 9, subfamily A (NHE3, cation proton antiporter 3), member 3 regulator 1*
10q32.3	*Slc16a3*	*SLC16A3*	17q25	*Solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4)*
14p22	*Rassf6*	*RASSF6*	4q13.3	*Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 6*
14p22	*Areg*	*AREG*	4q13.3	*Amphiregulin*
14p22	*Cxcl10*	*CXCL10*	4q21	*Chemokine (C-X-C motif) ligand 10*
14q21	*Hus1*	*HUS1*	7p13-p12	*HUS1 checkpoint homolog (S. pombe)*
16p14	*Npy1r*	*NPY1R*	4q31.3-q32	*Neuropeptide Y receptor Y1*

IV.3 - Análise da expressão dos genes *Mycn* e *Erbb2* sob condições normais e sob condições desmetilantes nas linhas celulares RNO-normal e CLS-ACI-1.

Como referido anteriormente, os oncogenes *Mycn* e *Erbb2* desempenham um conjunto de funções celulares que conferem, às células tumorais, vantagem proliferativa, tornando-os alvos de interesse no estudo do cancro. Neste trabalho, a análise da expressão relativa daqueles genes, nas linhas celulares CLS-ACI-1 e RNO-normal, foi realizada com recurso à técnica de "Real-Time Reverse Transcription - quantitative" PCR (RT-qPCR). Os resultados obtidos, por RT-qPCR, foram analisados com o programa "StepOne^{TM} Software" v2.2.2., que efetua uma análise do tipo "Comparative" C_T ($\Delta\Delta C_T$). Este tipo de análise é frequentemente aplicada na comparação dos níveis de expressão entre amostras teste e controlo, permitindo a análise da expressão de um determinado gene entre diferentes tecidos ou no mesmo tecido, mas sob condições diferentes (e.g. sujeito a "stress" ou a algum agente químico).

Neste trabalho, a análise $\Delta\Delta C_T$ foi aplicada na comparação da expressão dos genes *Mycn* e *Erbb2* entre as linhas RNO-normal (controlo) e CLS-ACI-1 (teste) e na comparação da expressão daqueles genes, nestas linhas, em condições de cultura padrão (controlo), após a exposição ao agente desmetilante 5-azacitidina (AZA) e 10 dias após a remoção da 5-azacitidina das linhas RNO-normal e CLS-ACI-1 (AZA-STOP). Em todas estas experiências os resultados obtidos por RT-qPCR em tempo real foram normalizados com o gene "housekeeping" *Gapdh*.

De forma a avaliar a expressão relativa de um determinado gene é essencial determinar o valor de C_T deste. O valor de C_T corresponde ao ponto de interceção entre uma curva de amplificação e uma linha de "threshold" e é uma medida relativa da concentração da sequência alvo, na reação de PCR. Para determinar este valor é calculada, a cada ciclo, a variação entre a emissão de fluorescência da molécula repórter da sonda e a absorção por parte do "quencher". Este valor é denominado de ΔR e é uma medida da quantidade de sonda que hibrida e é clivada pela enzima. O valor de ΔR por ciclo é apresentado sob a forma gráfica ("amplification plot"), sendo utilizado para determinar o C_T de cada gene em análise (*Gapdh*, *Erbb2* e *Mycn*) e servindo para uma avaliação visual da reação de PCR. Uma reação bem sucedida deverá apresentar um

gráfico em que a curva de amplificação seja inicialmente exponencial, passando a linear e terminando em "plateau".

Nos estudos de expressão dos genes *Mycn* e *Erbb2*, neste trabalho, será utilizada a "Master Mix TaqMan RNA-to-CT™1-StepKit" da "Applied Biosystems". Esta "Master Mix" apresenta na sua composição um fluorocromo passivo, o ROX, cuja fluorescência é utilizada pelo programa de análise para normalizar a fluorescência emitida pelo fluorocromo repórter FAM. A fluorescência emitida pelo ROX não deve variar ao longo da reação de PCR, sendo que qualquer variação no nível de emissão daquele fluorocromo é sinal de que algo anómalo se passa, tal como, por exemplo, a ocorrência de evaporação. No caso do fluorocromo repórter FAM é de esperar que a emissão de fluorescência deste gere uma curva de amplificação iniciada com uma linha de base, seguida de uma fase exponencial que passa a uma fase linear, terminando numa fase de "plateau". Os dados referentes à emissão de fluorescência por parte do ROX e do FAM, são apresentados sob forma gráfica, denominada "Multicomponent Plot".

Finda esta primeira análise, os dados obtidos foram sujeitos a um tratamento estatístico, por Student t-Test, de forma a determinar se as variações na expressão observadas são estatisticamente significativas. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p<0,05$, o que se traduz num intervalo de confiança de 95%. Os resultados foram considerados biologicamente relevantes quando a variação da expressão foi $\geq\pm3x$ que a verificada no controlo [45].

IV.3.1 - Análise da expressão relativa, dos genes *Mycn* e *Erbb2*, na linha celular CLS-ACI-1.

Nesta experiência foram determinados os níveis da expressão relativa dos oncogenes *Mycn* e *Erbb2* na linha CLS-ACI-1, tendo por referência os níveis de expressão dos mesmos genes numa linha celular RNO-normal (amostra controlo). Esta análise foi realizada para estipular os níveis de expressão, dos oncogenes em estudo, na linha CLS-ACI-1. Os resultados obtidos para a expressão dos genes *Mycn* e *Erbb2* foram normalizados com o gene "housekeeping" *Gapdh*. O "Amplification Plot" desta experiência apresenta um perfil das curvas de amplificação dentro dos parâmetros adequados a uma reação deste tipo (inicialmente exponencial, passando a linear e terminando em "plateau") (gráfico 2) e o "Multicomponent Plot" não apresenta variação na emissão de fluorescência do fluorocromo exógeno ROX (gráfico 3). Para confirmar o sucesso da amplificação dos genes em análise, pelo RT-qPCR, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1,2% (p/v) (protocolo 4). Para os ensaios usados da "Applied Biosystems" seria de esperar, como produto de amplificação, uma banda de 60bp para o gene *Gapdh*, uma banda de 95 bp para o gene *Mycn* e uma banda de 70 bp para o gene *Erbb2*. Como pode ser observado na figura - 22, apesar da baixa resolução do gel, as bandas apresentam o peso molecular esperado e não há qualquer banda para além das espectáveis, confirmando a não ocorrência de contaminação.

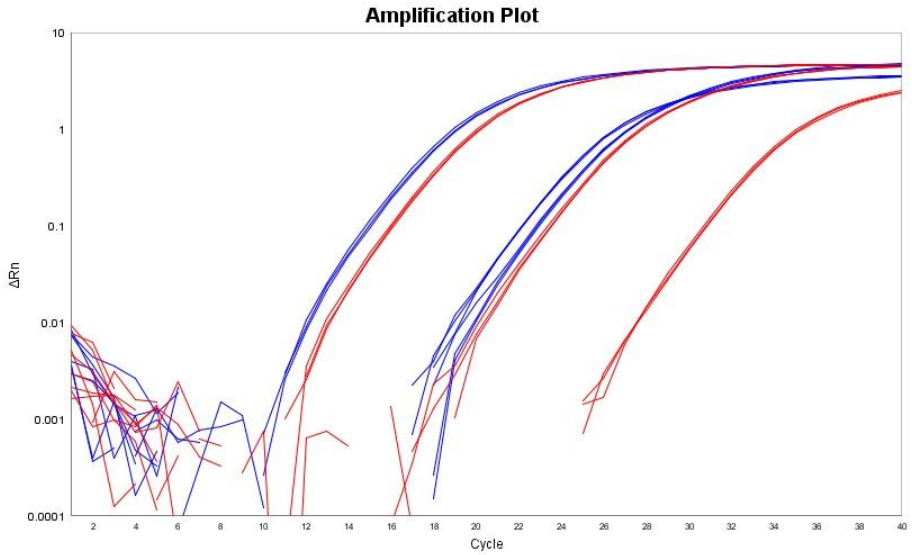


Gráfico 2 - "Amplification Plot" da experiencia "determinação dos níveis de expressão padrão dos genes *Mycn* e *Erbb2*, na linha CLS-ACI-1". Legenda: **azul** - curvas de amplificação dos genes *Mycn*, *Erbb2* e *Gapdh* da linha CLS-ACI-1; **vermelho** - curva de amplificação dos genes *Mycn*, *Erbb2* e *Gapdh* da linha RNO-normal.

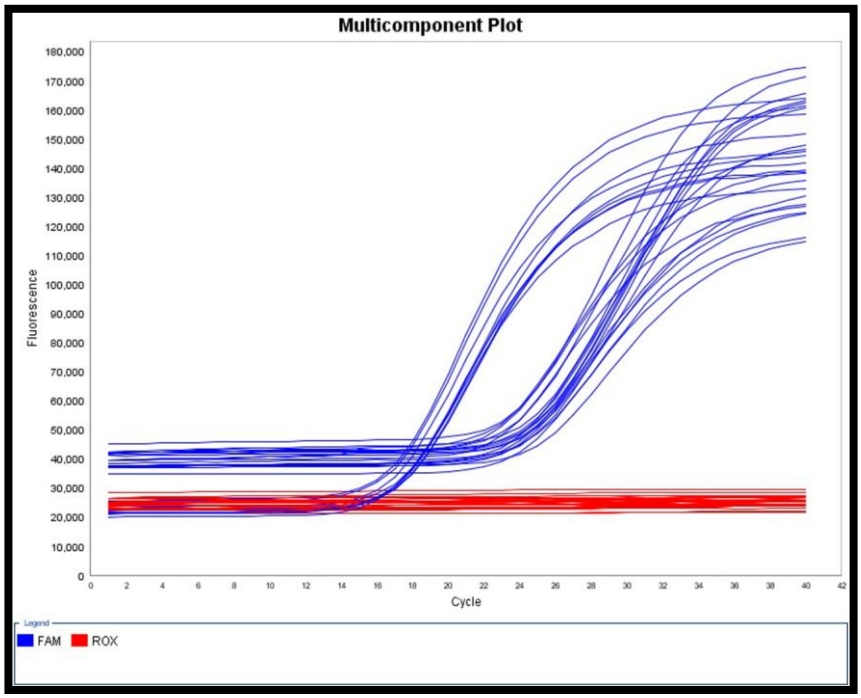


Gráfico 3 - "Multicomponent Plot". Neste gráfico pode ser observada a variação da fluorescência detetada a cada ciclo de PCR. Como pode ser constatado, não ocorre variação na fluorescência do fluorocromo exógeno ROX. Legenda - a **vermelho** encontra-se a fluorescência detetada para o fluorocromo exógeno ROX e a **azul** a fluorescência detetada, a cada ciclo de amplificação, para as amostras em análise (FAM).

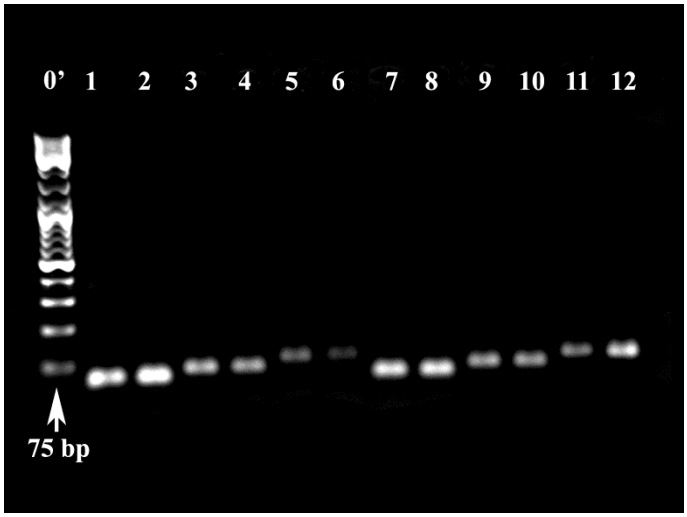


Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose a 1,2% (p/v) dos produtos de amplificação da RT-qPCR. Legenda: 0' - marcador molecular, 1 e 2 - RNO *Gapdh*, 3 e 4 - RNO *Erbb2*, 5 e 6 - RNO *Mycn*, 7 e 8 - CLS *Gapdh*, 9 e 10 - CLS *Erbb2*, 11 e 12 - CLS *Mycn*.

Os dados obtidos nesta experiência mostram que o oncogene *Mycn* apresenta uma expressão 181,27 vezes (SD±7,04) superior na linha CLS-ACI-1 (gráfico 4a), em comparação com a amostra RNO-normal. Esta variação da expressão é estatística e biologicamente significativa, pois o valor de p=0,0005<0,05 e a variação da expressão é superior ao triplo do valor detetado para a amostra controlo (tabela 3).

No caso do oncogene *Erbb2* verificou-se que este se encontra subexpresso, sendo a expressão, na linha CLS-ACI-1, 1,4 vezes (SD±0,02) menor que a verificada na amostra RNO controlo (gráfico 4b). Esta diminuição na expressão é estatisticamente significativa, pois p=0,0017<0,05, no entanto, não o é biologicamente (tabela 3).

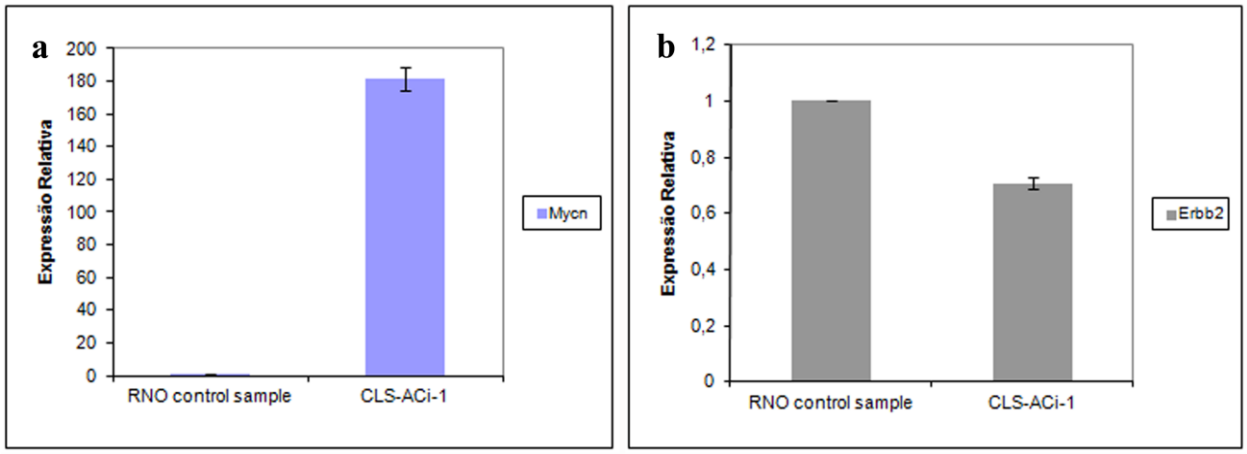


Gráfico 4 - Nível de expressão padrão dos oncogenes *Mycn* e *Erbb2* na linha celular CLS-ACI-1 comparativamente à amostra controlo RNO-normal. Nas imagens **a** e **b** podem ser observadas a variação da expressão dos oncogenes *Mycn* e *Erbb2*, respetivamente, em comparação com a amostra controlo. Os dados apresentados estão normalizados com o gene "housekeeping" *Gapdh* e foram obtidos com o t-Test. Os desvios padrão representados pelas barras de erro são de 7,04 para o *Mycn* e 0,02 para o *Erbb2*.

Tabela 3 - Valores obtidos pelo t-Test.

Gene	Amostras em comparação	Variação do nível de expressão	t-Test (p<0,05)	Significância estatística	Significância biológica ("cut-off" ≥±3)
Mycn	CLS-ACI-1/RNO normal	+181,27x	0,0005	Significativo	Significativo
Erbb2	CLS-ACI-1/RNO normal	-1,4x	0,0017	Significativo	Não significativo

IV.3.2 - Análise da expressão relativa dos oncogenes *Mycn* e *Erbb2* após exposição das linhas celulares RNO-normal e CLS-ACI-1 a um agente desmetilante.

A 5-aza-2'-deoxicitidina é um agente químico, análogo da citosina, que causa a desmetilação global do genoma o que o torna uma ferramenta muito útil no estudo do impacto da metilação de locais CpG na regulação da transcrição génica [45], como já referido.

Neste trabalho, foi realizada, nas linhas RNO-normal e CLS-ACI-1, a análise da expressão dos oncogenes *Mycn* e *Erbb2* quando as linhas são expostas à ação da 5-azacitidina, com o intuito de averiguar se estes oncogenes se encontram epigeneticamente regulados, a nível da metilação do DNA, se esta regulação se apresenta alterada na linha CLS-ACI-1 e se este é um processo reversível. Foi utilizada como controlo a expressão do *Mycn* e do *Erbb2* antes da exposição das linhas à 5-azacitidina. Os níveis de expressão dos oncogenes foram normalizados com o gene "housekeeping" *Gapdh*.

IV.3.2a - Resultados obtidos para a linha celular RNO-normal quando exposta à 5-azacitidina.

Nesta experiência foram analisados os níveis de expressão dos oncogenes *Mycn* e *Erbb2*, na linha RNO-normal após a exposição da linha à 5-azacitidina (RNO-AZA) e 10 dias após a remoção do agente desmetilante do meio de cultura (RNO-AZA-STOP). Como controlo foi utilizada a linha RNO-normal antes da exposição à 5-azacitidina (RNO sem AZA). Os parâmetros de avaliação da reação de PCR ("Amplification Plot", "Multicomponent Plot" e eletroforese) apresentam o perfil adequado (dados não apresentados).

Verificou-se, para o gene *Mycn*, que não há variação significativa da expressão (SD±0,08) deste oncogene quando a linha celular é exposta à 5-azacitidina, no entanto após a remoção do agente desmetilante, em comparação com a amostra controlo, há um aumento, na expressão, de 3,3 vezes (SD±0,21), com um valor de $p=0,0029<0,05$, sendo biologicamente significativo (gráfico 5 e tabela 4). O aumento na expressão do *Mycn* verificado entre a amostra recolhida após a exposição à 5-azacitidina e após a recuperação a esta exposição é estatisticamente significativo e apresenta um valor de p associado de $0,0017<0,05$, não o sendo, no entanto, biologicamente (gráfico 5 e tabela 4).

Para o gene *Erbb2*, os dados obtidos mostram que ocorre um aumento, de 1,6 vezes (SD±0,07), da expressão deste quando a linha é exposta à 5-azacitidina e uma redução de 0,3 vezes (SD±0,01) da expressão, em relação à amostra controlo, após a remoção da 5-azacitidina (gráfico 6). Os valores do t-Test mostram que as variações na expressão verificados entre a amostra controlo e as amostras extraídas após tratamento com o agente desmetilante e após a recuperação ao tratamento com a 5-azacitidina são estatisticamente significativos, no entanto não o são biologicamente. É também estatisticamente significativa a diminuição da expressão verificada entre a amostra recolhida após a exposição à 5-azacitidina e a amostra extraída após a recuperação à exposição, com um valor de $p=0,0017<0,05$, esta variação na expressão não é biologicamente significativa (tabela 4).

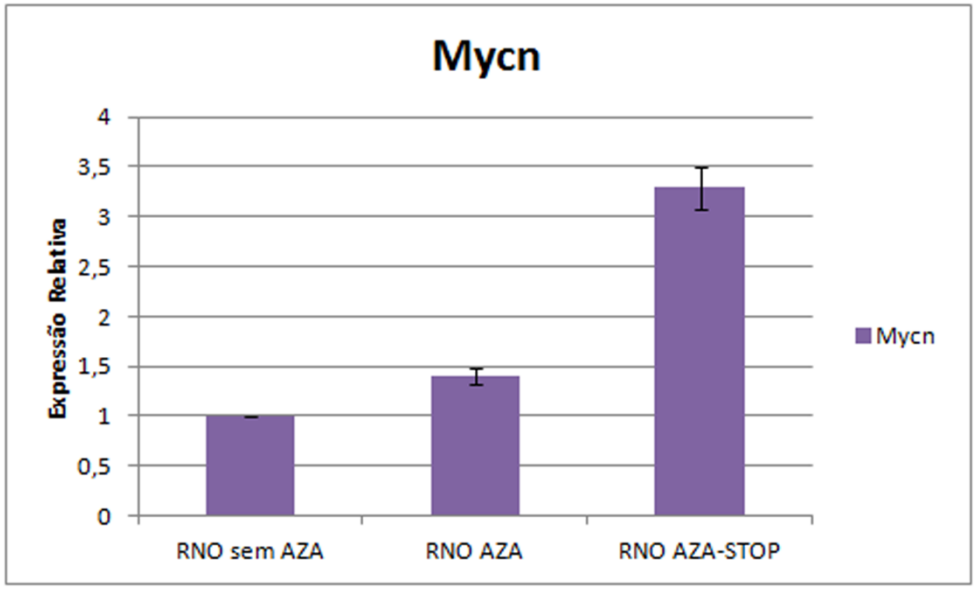


Gráfico 5 - Nível da expressão relativa do oncogene *Mycn*, na linha RNO-normal, durante e após tratamento com 5-azacitidina em comparação com RNO-normal não tratada. Os dados apresentados estão normalizados com o gene "housekeeping" *Gapdh* e foram obtidos com por t-Test. Os desvios padrão representados pelas barras de erro, para o gene *Mycn* são de 0,08, para RNO-AZA e de 0,21, para a RNO-AZA-STOP.

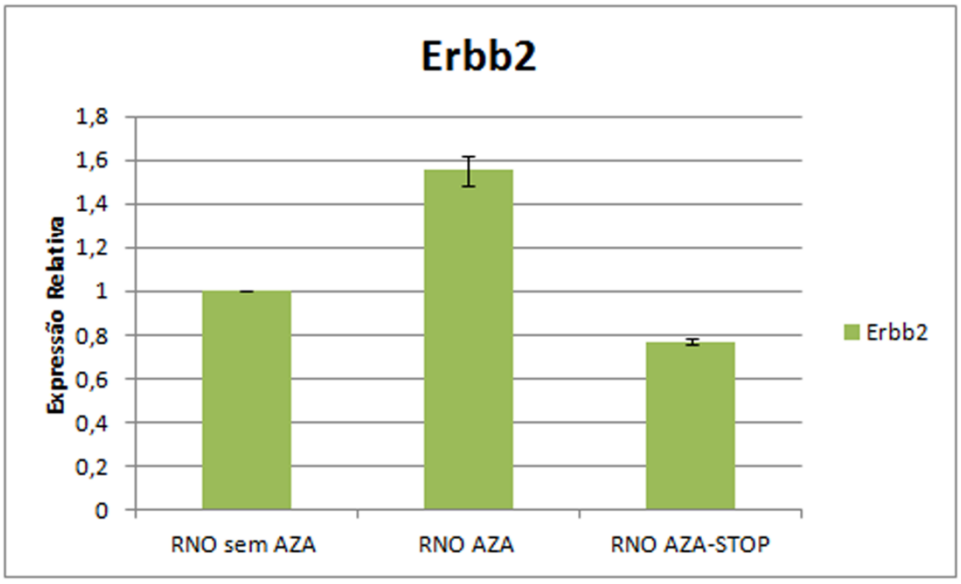


Gráfico 6 - Nível da expressão relativa do oncogene *Erbb2*, na linha RNO-normal, durante e após tratamento com 5-azacitidina em comparação com RNO-normal não tratada. Os dados apresentados estão normalizados com o gene "housekeeping" *Gapdh* e foram obtidos com por t-Test. Os desvios padrão representados pelas barras de erro, para o gene *Erbb2*, são de 0,07, para a RNO-AZA e de 0,01, para a RNO-AZA-STOP.

Tabela 4 - Valores obtidos por t-Test.

Gene	Amostras em comparação	Variação do nível de expressão	t-Test (p<0,005)	Significância	Significância biológica ("cut-off"≥3)
Mycn	RNO-AZA/RNO	+1,4x	0,0129	Não significativo	Não significativo
Mycn	RNO-AZA-STOP/RNO	+3,3x	0,0029	Significativo	Significativo
Mycn	RNO-AZA-STOP/RNO-AZA	+2,3x	0,0017	Significativo	Não significativo
Erbb2	RNO-AZA/RNO	+1,6x	0,0047	Significativo	Não significativo
Erbb2	RNO-AZA-STOP/RNO	-0,3x	0,0010	Significativo	Não significativo
Erbb2	RNO-AZA-STOP/RNO-AZA	-2x	0,0017	Significativo	Não significativo

IV.3.2b - Resultados obtidos para a linha celular CLS-ACI-1 quando exposta à 5-azacitidina.

De forma similar ao realizado para a linha RNO-normal, foram analisados os níveis de expressão dos oncogenes *Mycn* e *Erbb2*, na linha CLS-ACI-1 após exposição ao agente desmetilante (CLS-AZA) e após a recuperação à exposição do mesmo agente (CLS-AZA-STOP). Como controlo foi utilizada a linha CLS-ACI-1 antes da exposição à 5-azacitidina (CLS-ACI-1 sem AZA). Os parâmetros de avaliação da reação de PCR apresentam o perfil adequado (dados não apresentados).

Para o gene *Mycn* verificou-se que não há, estatisticamente, variação significativa da expressão deste oncogene (SD±0,11) quando a linha celular é exposta à 5-azacitidina, no entanto, 10 dias após a remoção, em comparação com a amostra controlo, há um aumento, na expressão, de 1,8 vezes (SD±0,04), com um valor de $p=0,0008<0,05$. Este aumento, apesar de ser estatisticamente significativo não o é biologicamente (gráfico 7 e tabela 5). O aumento na expressão do *Mycn* verificado entre

a amostra recolhida após a exposição à 5-azacitidina e após a recuperação à exposição é estatisticamente significativo e apresenta um valor de p associado de p=0,0021<0,05, no entanto não apresenta significância biológica (gráfico 7 e tabela 5).

Os resultados obtidos, para o gene *Erbb2*, mostram que ocorre um aumento, de 1,7 vezes (SD±0,1), da expressão deste quando a linha é exposta à 5-azacitidina e um aumento de 2,1 vezes (SD±0,07), relativamente à amostra controlo, 10 dias após a remoção do agente desmetilante (gráfico 8). Os valores do t-Test mostram que os aumentos na expressão verificados entre a amostra controlo e as amostras recolhidas após o tratamento com a 5-azacitidina e após remoção do agente são estatisticamente significativos, mas não o são biologicamente (tabela 5). É também estatisticamente significativo, mas não biologicamente, o aumento da expressão verificado entre a amostra recolhida após a exposição à 5-azacitidina e a amostra recolhida após a remoção do agente desmetilante, com um valor de p=0,0301<0,05 (tabela 5).

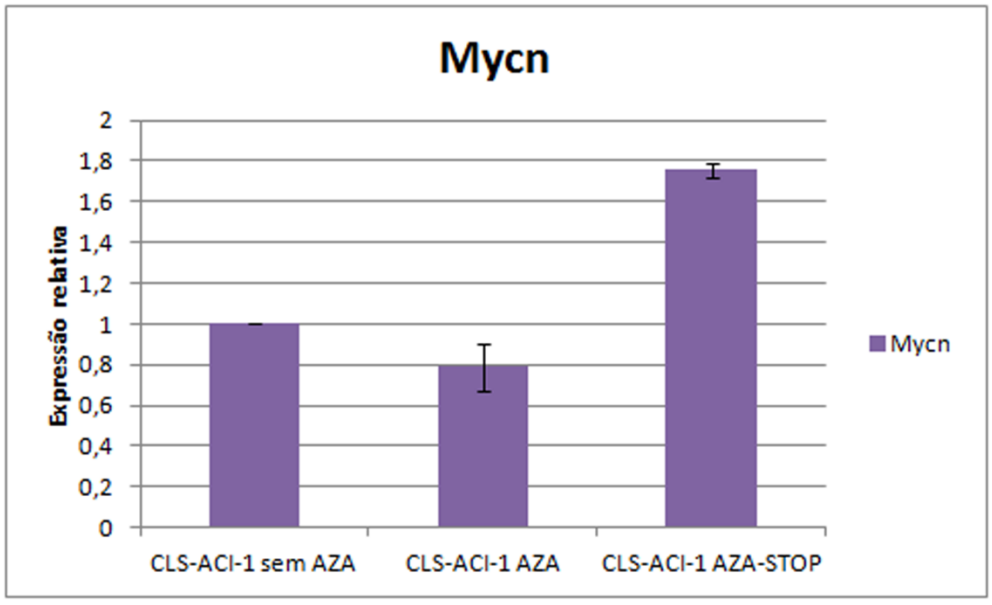


Gráfico 7 - Nível da expressão relativa, do oncogene *Mycn*, após tratamento com 5-azacitidina e após remoção do agente desmetilante em comparação com CLS-ACI-1 não tratada. Os dados apresentados estão normalizados com o gene "housekeeping" *Gapdh* e foram obtidos com o t-Test. Os desvios padrão representados pelas barras para o gene *Mycn* são de 0,11, para a CLS-AZA e de 0,04, para a CLS-AZA-STOP.

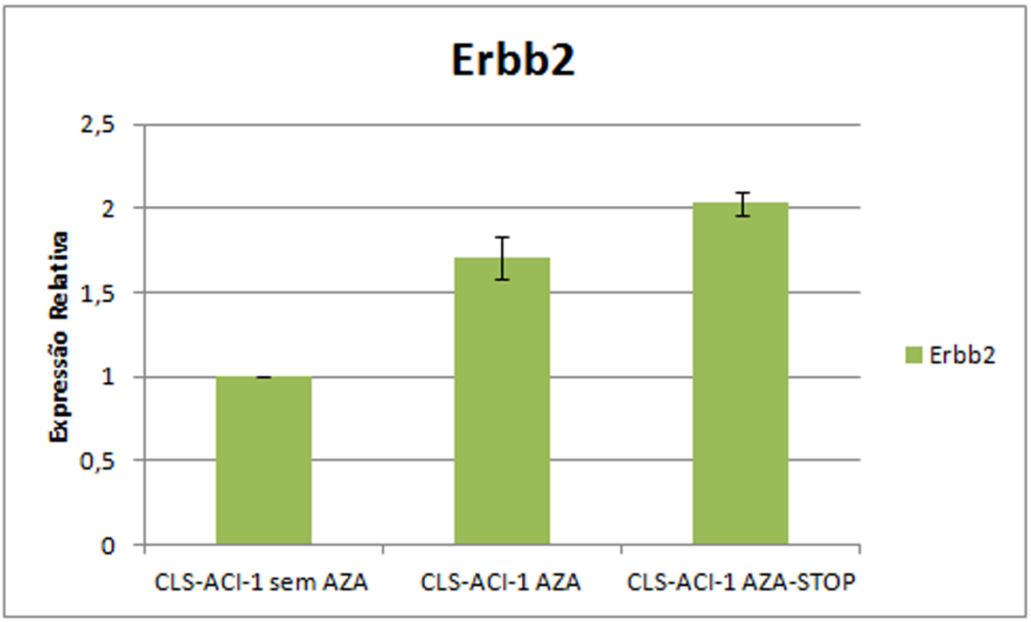
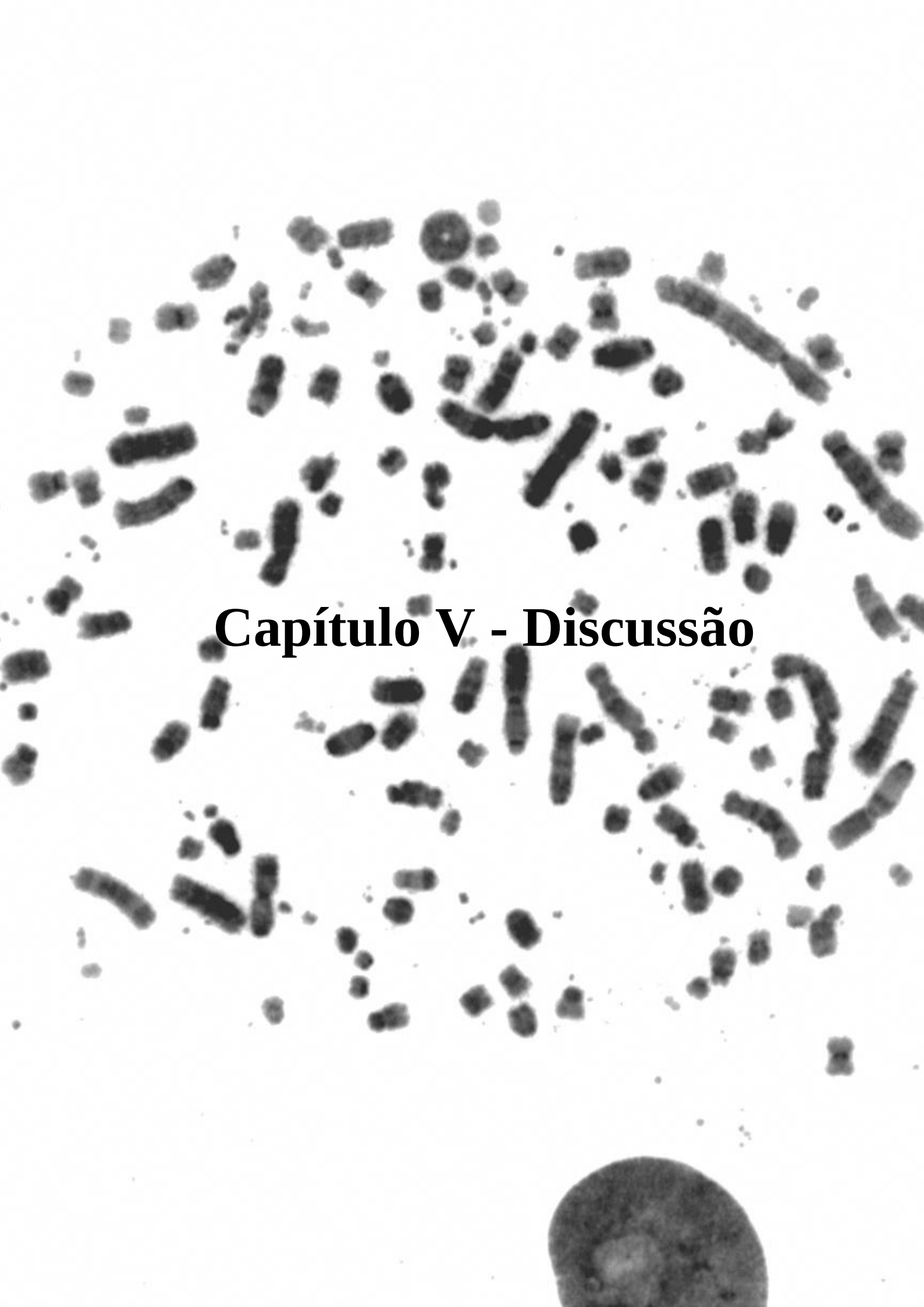


Gráfico 8 - Nível da expressão relativa, do oncogene *Erbb2*, após tratamento com 5-azacitidina e após remoção do agente desmetilante em comparação com CLS-ACI-1 não tratada. Os dados apresentados estão normalizados com o gene "housekeeping" *Gapdh* e foram obtidos com o t-Test. Os desvios padrão representados pelas barras, para o gene *Erbb2*, são de 0,1, para a CLS-AZA e de 0,07, para a CLS-AZA-STOP.

Tabela 5 - Valores obtidos pelo t-Test.

Gene	**Amostras em comparação**	**Variação do nível de expressão**	**t-Test (p<0,05)**	**Significância**	**Significância biológica (*cut-off* ≥3)**
Mycn	CLS-AZA/CLS	-1,3x	0,0830	Não significativo	Não significativo
Mycn	CLS-AZA-STOP/CLS	+1,8x	0,0008	Significativo	Não significativo
Mycn	CLS-AZA-STOP/CLS-AZA	+2,2x	0,0021	Significativo	Não significativo
Erbb2	CLS-AZA/CLS	+1,7x	0,0106	Significativo	Não significativo
Erbb2	CLS-AZA-STOP/CLS	+2,0x	0,0013	Significativo	Não significativo
Erbb2	CLS-AZA-STOP/CLS-AZA	+1,2x	0,0301	Significativo	Não significativo



Capítulo V - Discussão

Capitulo V - Discussão

O uso de linhas celulares derivadas de tumores, enquanto modelos para o estudo desta patologia, permite colmatar a indisponibilidade de amostras frescas nos laboratórios de pesquisa e proporcionar casos-teste e estudos sob condições controladas. Estas constituem, sem dúvida, uma importante ferramenta de estudo para a comunidade científica, tendo sido aplicadas em estudos variados tais como a determinação do comportamento das células tumorais, a identificação das vias bioquímicas celulares que desempenham alguma função nas fases de iniciação e progressão tumorais e no teste e "screening" de novos fármacos [45, 51, 52]. Um ponto fulcral, para o uso de linhas celulares tumorais no estudo do cancro, é a sua caracterização. As linhas, quando caracterizadas, permitem a aquisição de mais informação, na medida em que é possível estabelecer, mais facilmente, uma relação de causa efeito da desregulação de determinado gene ou da ação de um novo fármaco no comportamento celular [59].

V.1 - Caracterização citogenética da linha celular CLS-ACI-1

Como já referido anteriormente, este trabalho incidiu na caracterização de uma linha celular tumoral comercial, proveniente de um adenocarcinoma mamário de *Rattus norvegicus*, denominada CLS-ACI-1.

A caracterização citogenética da linha celular CLS-ACI-1 foi levada a cabo com o recurso a várias técnicas citogenéticas, nomeadamente a coloração standard com Giemsa a 2% (v/v), o bandeamento-G clássico, o bandeamento molecular por restrição *in situ* e pela técnica, de citogenética molecular, "Whole Chromosome Painting".

A primeira abordagem citogenética à linha CLS-ACI-1, com a coloração standard com Giemsa 2% (v/v), permitiu estipular o número modal da linha, os resultados obtidos para a abundância relativa dos clones/subclones identificados encontram-se na tabela 1 e no gráfico 1. Estes mostram uma abundância superior relativa de 3 clones/subclones, com 59, 60 e 63 cromossomas e com uma frequência de 9,2%, 10,8% e 10%, respetivamente. Como pode ser verificado não há uma dominância evidente de um determinado clone ou conjunto de clones, sendo que 81% das metafases analisadas apresentam um número cromossómico compreendido entre 56 e 68 cromossomas

(quase triploide em relação ao padrão: RNO, 2n=42). Quando estes dados são cruzados com os obtidos por "Chromsome Painting" verifica-se que não há uma correlação direta entre o número de cromossomas por metafase e a presença de clones/subclones distintos. Esta linha celular possui na sua composição um conjunto de subclones que apresentam uma variação considerável, dentro de cada clone, do número de cromossomas, principalmente dos cromossomas RNO11, RNO12, RNO16, RNO17, RNO18, RNO19 e RNO20. Os clones com um complemento cromossómico quase diploide, quase tetraploide ou com ploidia superior a 4n apresentam uma frequência demasiado baixa para que possam ser considerados representativos.

A análise realizada na linha com o bandeamento-G revelou um padrão insuficiente de bandeamento, mesmo após otimização do tempo de digestão com a tripsina. A impossibilidade de obter resultados com definição e com bandas suficientes, por bandeamento-GTG, levou a que se procurasse bandear os cromossomas por um método mais adequado. Para tal recorreu-se ao bandeamento por restrição *in situ*, que gera um padrão de bandas do tipo-G. De forma a determinar qual a melhor enzima para gerar bandas foram testadas quatro enzimas a ApaI, a PstI, a DraI e a BamHI (figuras 8 e 9). Entre as enzimas testadas a que apresentou melhores resultados foi a PstI, pelo que a primeira análise citogenética à linha CLS-ACI-1 foi realizada em metafases digeridas por esta.

Os resultados obtidos com o bandeamento por restrição *in situ* permitiram revelar a presença de vários cromossomas alterados, quer a nível numérico quer a nível estrutural. Dada a complexidade dos rearranjos encontrados, o bandeamento por restrição *in situ*, não permitiu identificar claramente os cromossomas nestes envolvidos.

De forma a colmatar a impossibilidade de, pela técnica de bandeamento por restrição *in situ*, identificar todos os cromossomas envolvidos nos rearranjos estruturais, presentes na linha CLS-ACI-1, recorreu-se à técnica de "Whole Chromosome Painting", após restrição *in situ*. O uso acoplado destas técnicas permitiu uma análise mais minuciosa dos cromossomas, permitindo identificar os cromossomas envolvidos nas alterações cromossómicas. Com os dados obtidos foi possível identificar e descrever a fórmula cromossómica de três subclones denominados de A, B e C, cujas fórmulas cromossómicas são apresentadas nas páginas 94 e 95.

É de referir que as metafases analisadas foram as que apresentavam um número cromossómico quase triploide, isto porque já havia sido determinado que este é o complemento cromossómico mais frequente da linha celular em análise. Estes resultados vieram confirmar a hipótese de que a linha celular CLS-ACI-1 apresenta um número relativamente reduzido de subclones representativos, no entanto cada um destes clones apresenta amplitude considerável do complemento cromossómico. É de referir que algumas das alterações cromossómicas identificadas não são recorrentes, pelo que, de acordo com as regras estabelecidas pelo "International System for Human Cytogenetic Nomenclature" (ISCN, 2009), não foram consideradas clonais.

V.2 - Análise da evolução clonal da linha CLS-ACI-1

Tendo em conta as alterações cromossómicas detetadas na linha CLS-ACI-1 e a frequência das mesmas foi elaborada uma hipótese para explicar a evolução clonal, da linha em estudo, a partir do estado diploide normal da espécie RNO, até ao estado quase triploide em que a linha se encontra, passando, provavelmente, por um intermediário tetraploide (figura 23).

Como referido nos resultados o cromossoma RNO4 é frequentemente encontrado em pentaploidia (figura 13e), sugerindo que o ganho de uma cópia deste cromossoma deve ter ocorrido nos estágios iniciais da evolução da linha, antes da ocorrência da duplicação do genoma.

Os rearranjos cromossómicos, que deram origem aos cromossomas der(5)t(5;3)(q36;?) (figura 14j) e der(10)t(10;?)(q32;?) (figura 15q), são, também, candidatos prováveis a rearranjos ancestrais, uma vez que duas cópias, de cada cromossoma rearranjado, são encontradas por metafase. Este é um forte indício de que os rearranjos der(5)t(5;3)(q36;?) e der(10)t(10;?)(q32;?) surgiram antes da tetraploidização da linha celular. Isto porque a probabilidade de um rearranjo ocorrer exatamente da mesma forma em dois períodos de tempo distintos é extremamente baixa.

O rearranjo cromossómico que, também, constitui um bom candidato a rearranjo ancestral é a translocação robertsoniana rob(6;6)(q10;q10), uma vez que os rearranjos cromossómicos der(6;6)(q10;q10)del(6)(q1?), der(6;6)(q10;q10)del(6)(q23) e der(6;6)(q10;q10)del(6)(q23)t(6;9)(q31;q3?) apresentam grande probabilidade de terem sido gerados a partir de uma cópia do cromossoma rob(6;6)(q10;q10). Note-se que para satisfazer a hipótese apresentada para a génese dos cromossomas derivativos do RNO6, a translocação rob(6;6)(q10;q10) deverá ter estado presente em dissomia no cariótipo ancestral diploide.

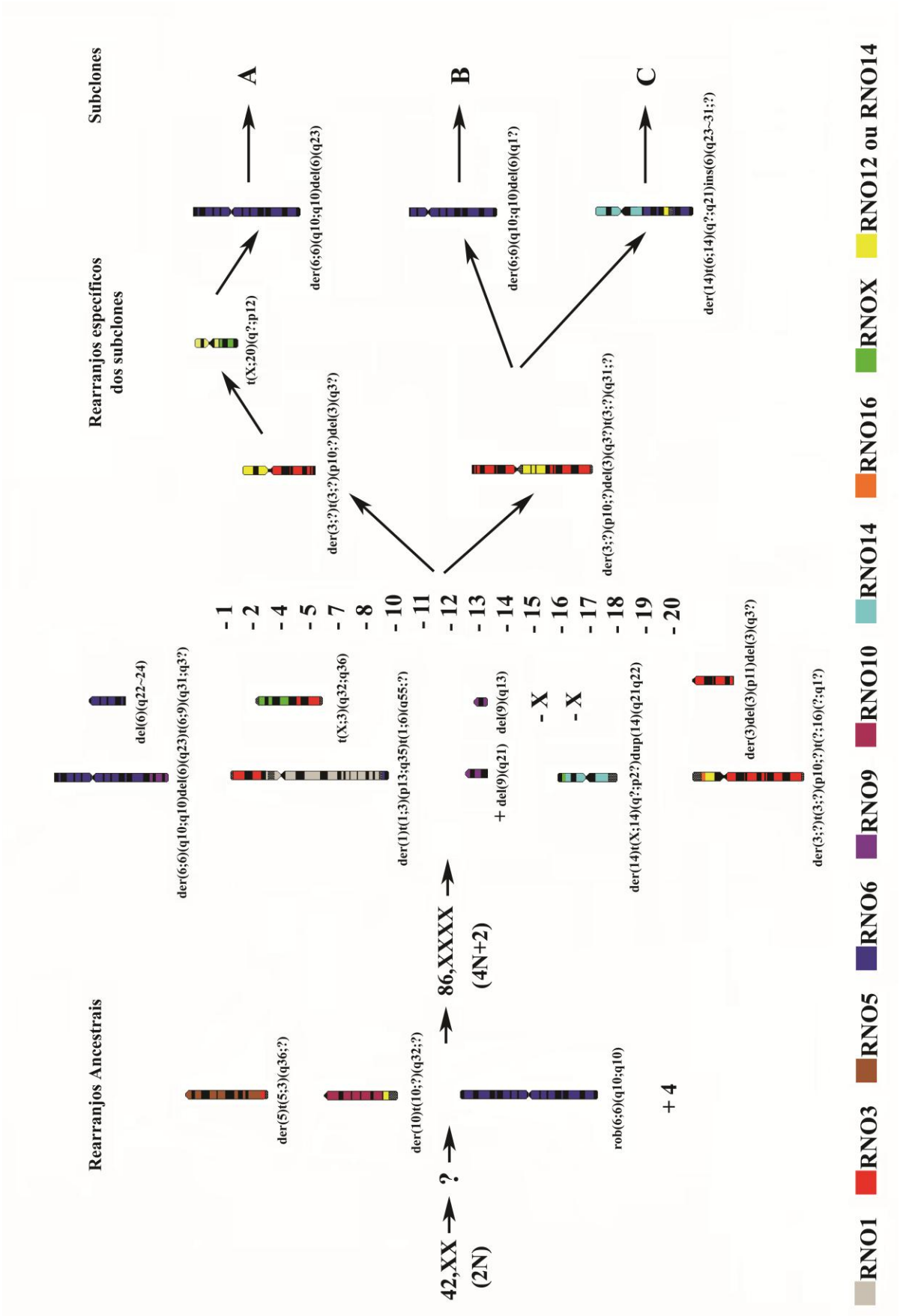


Figura 23 - Esquema representativo da evolução clonal da linha CLS-ACI-1.

O último rearranjo candidato a ancestral é o der(3;?)t(3;?)(p10;?), este rearranjo não foi detetado na linha CLS-ACI-1, no entanto, à semelhança do verificado com a rob(6;6)(q10;q10), este poderá estar na origem dos cromossomas der(3;?)t(3;?)(p10;?)t(?;16)(?;p1?), der(3;?)t(3;?)(p10;?)del(3)(q3?) e der(3;?)(p10;?)del(3)(q3?)t(?;3)(?;q31). É necessário ter em atenção que esta hipótese não é suportada por dados experimentais tão robustos quanto os que suportam a hipótese para a génese dos cromossomas derivativos do RNO6, a partir do cromossoma rob(6;6)(q10;q10). Isto porque não foi possível determinar de forma exata se o cromossoma representado por "**?**" é o RNO12 ou o RNO14, nem se os pontos de quebra são os mesmos para os cromossomas RNO12 ou RNO14 nos três cromossomas derivativos do RNO3 acima referidos. O cromossoma der(3;?)t(3;?)(p10;?) deverá, também, ter estado presente num estado dissómico no cariótipo ancestral.

Assim sendo o cariótipo ancestral da linha CLS-ACI-1 deverá ter sido:

44,XX,der(3;?)t(3;?)(p10;?),+der(3;?)t(3;?)(p10;?),+4,der(5)t(5;3)(q36;?), rob(6;6)(q10;q10),+rob(6;6)(q10;q10),der(10)t(10;?)(q32;?).

Os rearranjos estruturais der(1)t(1;3)(p13;q35)t(1;6)(q55;?), t(X;3)(q32;q36), der(3;?)t(3;?)(p10;?)t(?;16)(?;p1?), der(3)del(3)(p10)del(3)(q3?), der(6;6)(q10;q10)del(6)(q23)t(6;9)(q31;q3?), del(6)(q22~24), del(9)(q21), del(9)(q13) e der(14)t(X;14)(q?;p2?)dup(14)(q21q22) e as aneuploidias dos cromossomas RNO1, RNO2, RNO4, RNO5, RNO7, RNO8, RNO10, RNO11, RNO12, RNO13, RNO14, RNO15, RNO16, RNO17, RNO18, RNO19, RNO20 e RNOX ocorreram provavelmente após a tetraploidização da linha celular CLS-ACI-1, uma vez que estão presentes em todas ou na grande maioria das células analisadas, sendo encontradas em todos os subclones identificados. O elevado nível de aneuploidias verificado nesta linha celular pode ser explicado pela instabilidade cromossómica apresentada pela linha celular CLS-ACI-1, tendo possivelmente sido eliminados por intermédio de micronúcleos (figura 20). Os rearranjos cromossómicos t(X;20)(q?;p12), der(3;?)t(3;?)(p10;?)del(3)(q3?) e der(6;6)(q10;q10)del(6)(q23) (figuras 17b1, 14h e 15o respetivamente) apresentam baixa representatividade e foram identificados como subclone-específicos, surgindo unicamente no subclone A. O cromossoma derivativo der(3;?)(p10;?)del(3)(q3?)t(?;3)(?;q31) (figura 14i) é especifico dos subclones B e C, o

cromossoma der(6;6)(q10;q10)del(6)(q1?) (figura 15p) é especifico do subclone B e o cromossoma der(14)t(6;14)(q?;q21)ins(6;?)(q23~31;?) (figura 15m) é especifico do subclone C. Esta distribuição subclone-específica sugere que estes rearranjos são os mais derivativos da linha CLS-ACI-1.

Vários dos cromossomas que se encontram alterados na linha celular CLS-ACI-1, foram descritos na literatura como recorrentemente alterados, sendo estes os cromossomas RNO1, RNO3, RNO4, RNO6, RNO12, RNO18, RNO19, RNOX [45, 174-177].

Neste trabalho verificou-se que o cromossoma RNO1 se encontra envolvido em translocações com os cromossomas RNO3 e RNO6. Walentinsson *et al*. em 2000 [176], publicaram um artigo onde reportam várias alterações genéticas detetadas, por "Comparative Genome Hybridization" (CGH), em sarcomas de *Rattus norvegicus* induzidos por DMBA. Entre as alterações cromossómicas encontram-se o ganho ou perda recorrente de regiões do cromossoma RNO1 (zona central até a distal dos braços **q** e **p**) [176]. Duplicações, deleções e inversões no cromossoma RNO1 (braço **q**), foram, também, detetadas por Popescu e Greiner (1999) [175] em linhas celulares tumorais de RNO derivadas de DMBA, com origem em tecido epitelial mamário [175]. Como se pode verificar, os resultados obtidos por aquelas duas equipas de investigação, mostram que as zonas distais dos braços **p** e **q** do cromossoma RNO1 parecem constituir *hotspots* para a ocorrência de alterações cromossómicas, tal foi, também, verificado, em menor extensão, na linha CLS-ACI-1 onde se verificou a presença de um *breakpoint* na banda RNO1q55 (zona distal do braço **q**) e outro na banda RNO1p13 (zona distal do braço **p**), do cromossoma RNO1.

O cromossoma RNO3 surge amplamente rearranjado na linha celular CLS-ACI-1. A ocorrência de rearranjos estruturais neste cromossoma foram, também, descritas por Popescu e Greiner (1999) [175]. Esta equipa detetou várias translocações não equilibradas no cromossoma RNO3, sendo os "breakpoints" na banda 3p11. A deleção total do braço RNO3p foi, também, frequentemente observada [175]. Curiosamente a perda total do braço **p** do cromossoma RNO3 foi detetada na linha em estudo. Em tumores pulmonares de *Rattus norvegicus*, Laurent *et al.* em 2001 [177] detetaram, tal como nós, a ocorrência de alterações neste cromossoma [177].

Walentinsson *et al.* (2000) [176], Popescu e Greiner (1999) [175] e Laurent *et al.* em 2001 [177], nos trabalhos acima citados, verificaram a ocorrência de ganhos no número de cópias cromossómicas do RNO4 [175-177], tal foi também detetado na linha CLS-ACI-1 onde este cromossoma surge em pentassomia.

Walentinsson *et al.* (2000) [176] ainda detetou alterações de número de cópias de genes, mas menos frequentes, nos cromossomas RNO12 (especificamente do braço **q**), RNO18 e RNO19 [176], e Popescu e Greiner (1999) [175] descreveram a ocorrência de trissomia do cromossoma RNO14 [175]. Estes cromossomas encontram-se em aneuploidia ou envolvidos em rearranjos estruturais na linha celular em análise.

Na linha CLS-ACI-1 o cromossoma RNO6 encontra-se altamente rearranjado, tal foi, também, detetado por Adamovic *et al.* (2005) [174], ao trabalhar com adenocarcinomas endometriais. Esta equipa detetou várias alterações no cromossoma RNO6, que resultaram no ganho/amplificação da zona proximal deste cromossoma (perto da banda 6q16, onde se encontra o gene *Mycn*) [174]. Este cromossoma apresenta homologias com os cromossomas humanos HSA2 e HSA14, mais especificamente com HSA14q e HSA2p, cujo ganho tem vindo a ser recorrentemente detetado em neuroblastomas e em linhas celulares destes tumores em HSA [174, 178].

Os dados obtidos por Popescu e Greiner (1999) [175], para o cromossoma RNOX (trissomia), são o oposto do verificado na linha CLS-ACI-1, onde se reporta a perda de um dos cromossomas homólogos. Louzada *et al.* (2012) [45], no trabalho de caracterização da linha HH-16 cl.2/1, detetaram um cenário similar ao observado na linha CLS-ACI-1, tendo reportado a perda de um cromossoma RNOX na linha HH-16 cl.2/1. Aquela equipa de investigação detetou, na linha HH-16 cl.2/1, cromossomas RNO15 altamente rearranjados, tendo tal, também, sido reportado por Hamta e Telebbeigy (2010) [179] em adenocarcinomas endometriais [45, 179]. Na linha celular CLS-ACI-1 não foram detetadas alterações estruturais no cromossoma RNO15, mas foi detetada a perda recorrente deste cromossoma.

A presença, na linha CLS-ACI-1, de cromossomas alterados recorrentemente associados a vários cancros faz desta linha um bom modelo para o estudo do impacto destes cromossomas na iniciação e progressão tumoral. Recorde-se que os cromossomas RNO3, RNO4 e RNO6, de acordo com a hipótese apresentada para explicar a evolução

clonal da linha CLS-ACI-1, foram dos primeiros a sofrer alterações numéricas ou estruturais, na linha em análise, o que os torna alvos de interesse no estudo da iniciação tumoral.

V.3 - Análise dos "breakpoints" da linha celular CLS-ACI-1 - comparação com "breakpoints" tumorais/cancro e evolutivos.

Após a caracterização das alterações cromossómicas presentes na linha celular CLS-ACI-1 realizou-se a análise dos "breakpoints" que deram origem aos rearranjos estruturais. Sob um ponto de vista evolutivo, as regiões de "breakpoints" denotam zonas do genoma em que à uma maior probabilidade de ocorrer uma quebra, ou seja, são regiões frágeis. Nesta análise foram comparados, com os "breakpoints" da linha em estudo, os "breakpoints" até à data descritos em tumores/cancro sólidos (figura 21).

Na linha celular CLS-ACI-1 foram identificadas 17 regiões de "breakpoints", destas 11 estão co-localizados com "breakpoints" primitivos e com "breakpoints" tumorais/cancro, 3 estão co-localizados com "breakpoints" derivativos (apenas um está também co-localizado com "breakpoints" tumorais/cancro) e 3 não apresentam associação com qualquer um dos dois tipos de "breakpoints" evolutivos analisados, mas um destes está co-localizado com "breakpoints" tumorais/cancro.

De forma a complementar a análise dos "breakpoints", realizou-se uma análise *in silico* com o intuito de averiguar se as alterações cromossómicas detetadas nesta linha celular são equivalentes às que, até à data, foram associadas ao cancro da mama humano. Para tal recorreu-se às bases de dados "Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology" (2012) e dbCRID (2012) e ao mapa comparativo entre HSA e RNO disponibilizado pelo Ensembl ("release" 69, 2012).

Esta análise permitiu determinar que o cromossoma RNO4, que se encontra em pentaploidia na linha CLS-ACI-1, possui sintenias com o cromossoma HSA7 (anexo 12), cujo ganho tem vindo a ser frequentemente associado com o cancro da mama humano. É neste cromossoma (RNO4/HSA7) que se encontra o oncogene *Kras/KRAS*. Este gene codifica uma GTPase transdutora que está associada ao cancro da mama e

cuja forma de ativação é a amplificação génica. O cromossoma RNO4 encontra-se recorrentemente em pentaploidia, na linha CLS-ACI-1, o que nos leva a antecipar que se encontrem, pelo menos, 5 cópias deste oncogene na linha em estudo, sugerindo a sua importância na tumorigénese/progressão da linha CLS-ACI-1. Tal torna esta linha celular, caso se confirme a amplificação do gene *Kras*, um bom modelo celular *in vitro* para o estudo do impacto deste gene no cancro.

Outra anomalia cromossómica, frequentemente observada no cancro da mama humano, é o ganho do cromossoma 20 inteiro ou do braço 20q (principalmente da banda 20q13) que possuem sintenia com o cromossoma RNO3q (anexo 12), que, por sua vez, se encontra altamente rearranjado e em número de cópias aumentado na linha celular em estudo.

De acordo com a informação presente no "Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology" (2012) os braços cromossómicos HSA8q, HSA17q e HSA20q constituem *hot spots* para ganhos em 60%, 25-30% e 20-25% dos cancros da mama, respetivamente. O braço cromossómico HSA17q apresenta sintenia com o cromossoma RNO10 (anexo 12), que mostra ganho perto da região telomérica distal do centrómero na linha em estudo. Como foi referido anteriormente o braço HSA20q apresenta sintenia com o cromossoma RNO3q, que se encontra envolvido em vários rearranjos na linha CLS-ACI-1.

Em HSA, o ganho ou amplificação recorrentes do braço HSA20q, tem vindo a ser associado com um mau prognóstico clínico e contribui, aparentemente, para vários fenótipos associados ao cancro, tais como alguns aspetos da imortalização, instabilidade genómica, apoptose e aumento da proliferação celulares [180]. A amplificação do cromossoma HSA20, está putativamente implicada na desregulação das vias MAPK e P53 e dos fatores proteicos pertencentes ao grupo Polycomb [181].

Em RNO a região do cromossoma RNO3pter-q12, onde se verificou a presença de "breakpoints" na linha CLS-ACI-1, foi implicada na indução de aneuploidia e está, também, associada à tumorigénese [175]. É na região acima apontada que se encontra a banda RNO3p11, que é, independentemente do tipo de tumor, a região onde se verifica, em RNO, a maior incidência de rearranjos estruturais e está associado à frequente perda do RNO3p [175]. Tal está de acordo com o verificado no cromossoma RNO3 da linha

CLS-ACI-1, onde se verificou a ausência total do braço curto do RNO3 devido à ocorrência de vários "breakpoints" na proximidade imediata do centrómero.

De forma a complementar a análise aos "breakpoints" efetuada anteriormente, comparou-se os "breakpoints" da linha CLS-ACI-1 com os "breakpoints" evolutivos descritos entre RNO e MMU ("breakpoints" derivativos) e os "breakpoints" evolutivos descritos entre RNO e HSA ("breakpoints" primitivos).

Foi determinado que, entre os 17 "breakpoints" exibidos pela linha CLS-ACI-1, 14 se encontram co-localizados com "breakpoints" evolutivos, sendo que 11 destes "breakpoints" estão co-localizados com "breakpoints" primitivos e 3 com "breakpoints" derivativos.

Estes dados estão de acordo com a associação, entre as regiões de "breakpoints" evolutivos e os "breakpoints" tumorais, determinada por Murphy *et al.*, em 2005 [182]. Murphy *et al.* [182], determinaram que os "breakpoints" tumorais mais frequentes se encontram recorrentemente co-localizados com "breakpoints" evolutivos, denotando alguma semelhança, apesar da diferente escala temporal dos acontecimentos, na dinâmica evolutiva entre a macroevolução (evolução das espécies) e a microevolução (evolução tumoral).

É de salientar que apesar das semelhanças verificadas, ao nível dos "breakpoints", entre os processos macro e microevolutivos, as forças evolutivas/seletivas que atuam nestes é de diferente natureza pois pensa-se que, a nível evolutivo, são favorecidos os rearranjos cujas regiões de "breakpoints" são, frequentemente, sequências que não apresentam função codificante ou reguladora [183], minimizando a alteração nos genes. No entanto, na microevolução, são favorecidos os rearranjos que confiram às células algum tipo de vantagem, pelo que são favorecidos os rearranjos que levem à formação de genes de fusão, cujas proteínas apresentam grande capacidade oncogénica; que levem à inativação de genes supressores tumorais ou que aumentem a expressão de um oncogene, ao coloca-lo sob regulação de "enhancers" ou promotores mais fortes, por exemplo [21, 35].

V.4 - Análise *in silico* para determinação de potenciais genes, associados ao cancro da mama humano, implicados no processo tumoral na linha CLS-ACI-1.

Recorrendo à base de dados "Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology" (2012) e ao mapa comparativo entre HSA e RNO disponibilizado pelo Ensembl ("release" 69, 2012) foi, também, possível selecionar um conjunto de genes (tabela 2), que têm vindo a ser associados ao cancro da mama humano, localizados nas regiões de "breakpoint" da linha CLS-ACI-1 e que poderão estar a desempenhar um papel de relevo na manutenção/evolução desta linha celular.

Os resultados obtidos revelaram que os genes *Cd44, Cops2, Esr2, Areg, Cxcl10 Lats1, Cdc42, Rassf2, Pdcd4, Hspa5, Slc9a3r1, Rassf6, Eif3a, Eif2ak2, Zfp36l1, Spintl, Sdc1, Plcb2, Dvl1, Pcna, Ddx1, Hus1, Nin, St6galnac1, Npy1r, Prdm2, Foxa1, Numb e Slc16a3* se encontram na proximidade das regiões de "breakpoint", sendo por isso alvos de interesse no estudo do processo tumorigénico na linha CLS-ACI-1.

Estes genes estão implicados, em RNO, na proliferação/crescimento celulares (*Cdc44, Cops2, Esr2, Areg* e *Cxcl10*), no ciclo celular (*Lats1, Cdc42* e *Rassf2*), na apoptose (*Pdcd4, Hspa5, Slc9a3r1* e *Rassf6*), na tradução (*Eif3a, Eif2ak2* e *Zfp36l1*), na adesão e sinalização célula a célula (*Cd44, Spint1* e *Sdc1*), na sinalização nas vias RAS, MAPK e WNT (*Plcb2, Rassf2, Dvl1, Rassf6* e *Areg*), na reparação do DNA (*Pcna, Ddx1* e *Hus1*), na estabilidade cromossómica (*Lats1* e *Nin*), metabolismo de hidratos de carbono (*St6galnac1* e *Npy1r*), angiogénese (*Cdc42*) e na regulação da transcrição (*Esr2* e *Foxa1*) [184].

Como referido anteriormente, as células tumorais têm de cumprir vários passos até atingirem o estado de malignidade, sendo estes conhecidos como "hallmarks" do cancro. É de notar que vários dos genes acima referidos estão associados às "hallmarks": sustentação da proliferação celular, evasão à apoptose, angiogénese e ativação da invasão e metastização. Vários dos genes apontados estão, também, associados à manutenção da estabilidade genómica. Como referido na introdução, a instabilidade genómica é uma das características que assiste a aquisição das "hallmarks", sendo uma característica ubíqua do cancro. Dada a importância dos genes acima referidos, em todo o processo tumorigénico, estes parecem ser alvos de interesse

para a continuação da caracterização da linha CLS-ACI-1 e quiçá constituírem inclusivamente, importantes alvos terapêuticos.

V.5 - Análise da expressão e possível regulação dos oncogenes *Mycn* e *Erbb2* na linha celular CLS-ACI-1.

Apesar de não terem sido detetados pela análise *in silico* atrás descrita, como possivelmente envolvidos na evolução clonal da linha tumoral em análise, foi dado destaque a dois oncogenes sobejamente conhecidos como estando envolvidos na tumorigénese: os oncogenes *Mycn* e *Erbb2*.

V.5.1 - Análise da expressão e possível regulação do *Mycn*.

Como referido anteriormente, o *MYCN* é um oncogene que tem vindo a ser frequentemente associado com o neuroblastoma e, mais recentemente, com o cancro da mama inflamatório humanos [45, 64]. Este oncogene está implicado na regulação do ciclo celular, da biogénese ribossomal, da síntese proteica, da função mitocondrial e de alguns microRNAs [140].

No neuroblastoma, a amplificação génica, sob a forma de DMs ou de HSR, é o método mais comum para a ativação do *MYCN*, sendo detetada em cerca de 50% dos casos clínicos. A sobrexpressão deste oncogene tem vindo a ser associada com estágios avançados de doença, maior idade, rápida progressão tumoral e pior "outcome" clínico [64, 146, 147].

Neste trabalho, com recurso à técnica de RT-qPCR, foi possível determinar que a linha celular CLS-ACI-1 apresenta um nível de expressão, do oncogene *Mycn*, 181 vezes superior ao nível de expressão apresentado por uma amostra controlo (RNO-normal) (gráfico 4a). Este aumento provou ser biológica e estatisticamente significativo.

Louzada *et al.* (2012) [45], num trabalho de caracterização das linhas celulares de RNO, derivadas de DMBA, HH-16.cl.4 e HH-16.cl.2/1, verificaram por RT-qPCR, que

o oncogene *Mycn* não apresentava variação significativa do nível de expressão, referindo que tal estava em concordância com a inexistência de amplificação génica detetada, em ambas as linhas celulares [45]. Estes dados são o oposto dos obtidos para a linha celular CLS-ACI-1, onde se verificou um aumento muito acentuado do nível de expressão, relativamente à amostra controlo utilizada. Este acentuado aumento da expressão está em concordância com os dados obtidos na caracterização citogenética, onde se verificou que o cromossoma RNO6, onde se encontra localizado o gene *Mycn*, se apresenta altamente rearranjado e em número de cópias aumentado.

Apesar dos dados obtidos na caracterização citogenética fornecerem uma hipótese sólida para explicar o aumento da expressão do oncogene *Mycn*, na linha CLS-ACI-1, esta pode não ser, por si só, suficiente para explicar o aumento altamente acentuado verificado (181 vezes superior ao controlo). Assim sendo é possível que outros mecanismos estejam a contribuir para o aumento da transcrição do *Mycn*. Uma hipótese para explicar os valores de transcrição obtidos surge na análise *in silico* apresentada anteriormente. Nesta análise foram previstos um conjunto de genes nas regiões de "breakpoint" detetadas nos cromossomas rearranjados da linha CLS-ACI-1 e que estão associados ao cancro da mama humano. Estes genes são assim bons candidatos a estarem envolvidos na tumorigénese da linha celular em estudo. Esta análise revelou o possível envolvimento de genes associados à transdução de sinal das vias RAS, MAPK e WNT. Recorde-se que, na introdução, foi referido que o *Mycn* é um efetor da via WNT, estando as vias de sinalização RAS e MAPK associadas à sinalização intracelular de recetores RTK, das quais o *Mycn* também é um efetor. Tendo em conta estes dados e o facto do gene *Kras* se apresentar possivelmente amplificado na linha em estudo, parece plausível que o elevado nível de expressão do *Mycn* esteja associado à amplificação génica e/ou à desregulação das vias responsáveis pelo controlo da expressão do mesmo.

Com base nestes resultados, analisou-se uma das marcas epigenéticas mais conhecidas, a metilação/desmetilação do DNA, utilizando-se para isso, a desmetilação global do genoma da linha celular CLS-ACI-1, através do agente desmetilante 5-aza-2'-deoxycitidina. Assim, a análise da expressão do *Mycn*, foi realizada após a exposição e posterior remoção da 5-azacitidina, nas linhas celulares RNO-normal e CLS-ACI-1. A

5-azacitidina é um agente que causa a desmetilação global do genoma de forma reversível [45]. Este composto é metabolizado e incorporado na cadeia de DNA como análogo da citosina, no entanto quando as DNMTs reconhecem os derivados da 5-azacitidina como substrato para a metilação ficam aprisionadas e, consequentemente, incapazes de exercer a sua função, levando, em última consequência, à desmetilação gradual e global do genoma a cada divisão celular [185]. De referir que a 5-azacitidina é utilizada como agente terapêutico, em terapia epigenética, com o intuito de reverter o silenciamento génico causado pela hipermetilação [58].

A análise assim efetuada revelou que o gene *Mycn* não sofreu alterações significativas de expressão após exposição à 5-azacitidina tanto na linha normal como na tumoral. No entanto, 10 dias após remoção do tratamento com a 5-azacitidina este gene mostra, nas linhas RNO-normal e CLS-ACI-1, um aumento, do nível de expressão que é significativo quer em relação ao nível de expressão das amostras controlo (RNO-normal e CLS-ACI-1 não expostas à 5-azacitidina), quer em relação ao nível de expressão após o tratamento com 5-azacitidina (gráficos 5 e 7). É de notar o facto de ambas as linhas se comportarem de forma semelhante quando foram submetidas à desmetilação global do genoma, o que é um forte indicio de que, na linha CLS-ACI-1, o gene *Mycn* não apresenta, aparentemente, regulação epigenética alterada a nível da metilação do DNA.

Mais ainda a não variação estatisticamente significativa da expressão do *Mycn* durante a exposição, de ambas as linhas, à 5-azacitidina e o aumento da expressão verificado após remoção do agente desmetilante, sugerem que este gene não deverá estar transcripcionalmente suprimido por metilação das citosinas. É, no entanto, possível que o aumento no nível de expressão, verificado numa fase posterior (10 dias após remoção da 5-azacitidina), seja o reflexo de alterações na expressão de genes envolvidos, por sua vez, na regulação da expressão do *Mycn*.

Kobayashi e Nishikawa, em 2012 [186], analisaram em *Mus musculus* a regulação do gene *Mycn*, a nível epigenético, em células estaminais neuronais tendo verificado que este gene é regulado epigeneticamente a nível histónico, mas não ao nível da metilação de ilhas CpG. Estes cientistas verificaram a alteração da marca histónica H3K27me3 (Histona H3 trimetilada no resíduo de lisina 27), associada à repressão, para

H3K4me3 (Histona H3 trimetilada no resíduo de lisina 4) que é uma marca histónica permissiva à transcrição [186]. Estes dados estão de acordo com a hipótese apresentada de que o gene *Mycn* não parece encontrar-se regulado, a nível da metilação do DNA, na linha CLS-ACI-1.

Recorrendo à base de dados UCSC-ENCODE é possível verificar, a nível das marcas epigenéticas do DNA, que o gene *MYCN*, em HSA, apresenta ilhas CpG co-localizadas com as regiões reguladoras (maioritariamente promotores). Estas ilhas CpG encontram-se, regra geral, desmetiladas/hipometiladas, sendo exceção a linha celular Hela-S3 onde esta região surge com níveis de metilação compreendidos entre os 50 e os 100% (anexos 13-16).

Associadas à região reguladora do *MYCN* surgem, também, as marcas histónicas H3K27ac, H3K4me1 (histona H3 monometilada no resíduo de lisina 4), H3K4me3 e H3K9ac que são consideradas como marcas de regiões reguladoras (promotores - H3K4me3 e H3K9ac ou "enhancers" - H3K27ac e H3K4me1) ativas ou potencialmente ativas (anexos 13-16).

Quando analisado na mesma base de dados acima referida, o gene *Mycn*, em MMU, apresenta 3 ilhas CpG, no entanto não estão disponíveis dados acerca do grau de metilação destas ilhas. As marcas histónicas H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac foram, no entanto, também detetadas (anexos 17-20).

A frequente desmetilação das ilhas CpG e a presença das marcas histónicas H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac e H3K9ac associadas a este gene em HSA e MMU, são um indício de que em RNO, o *Mycn*, apresente uma regulação epigenética semelhante. Este perfil de regulação epigenética, a verificar-se para RNO poderá explicar a não ocorrência de variação significativa da expressão durante o tratamento da linha com o agente desmetilante do DNA, uma vez que a desmetilação das ilhas CpG é já frequente neste gene (pelo menos nas espécies referidas). O aumento abrupto da expressão verificado após remoção do agente desmetilante da linha celular poderá então dever-se, como referido acima, à ação de genes reguladores da expressão do *Mycn* que sejam, por sua vez epigeneticamente regulados a nível da metilação de locais CpG, sendo que esta regulação deva conduzir à supressão transcripcional dos mesmos (hipermetilação dos promotores). Curiosamente em 2009, Hernandez-Vargas *et al.*

[187] determinaram que vários genes pertencentes às vias de sinalização WNT e Notch e às vias de transdução do sinal JAK-STAT, RAS-MAPK se encontram metilados, sendo a sua expressão induzida quando as linhas celulares de carcinomas hepáticos, em estudo pela equipa acima referida, foram expostas à 5-azacitidina [187]. Como referido anteriormente, estas vias de sinalização têm o *Mycn* como efetor e uma vez que estas se encontram reguladas a nível da metilação do DNA, fornecem evidências que suportam a hipótese apresentada para explicar o perfil de expressão do *Mycn*, na linha CLS-ACI-1, quando esta linha é exposta à ação da 5-azacitidina.

Parece assim que a linha em estudo neste trabalho, CLS-ACI-1, apresenta um padrão de regulação do gene *Mycn* semelhante ao descrito para a maioria das linhas celulares humanas (normais e tumorais) presentes na base de dados UCSC-ENCODE, o que faz dela um bom modelo celular para o estudo deste gene. No entanto, para uma análise epigenética mais detalhada do *Mycn*, nesta linha tumoral, seria importante analisarem-se também as marcas histónicas referidas, bem como os genes pertencentes às vias de sinalização WNT e Notch e às vias de transdução do sinal JAK-STAT e RAS-MAPK.

V.5.2 - Análise da expressão e possível regulação do oncogene *Erbb2*.

O *ERBB2* é um gene que codifica para um recetor transmembranar que no cancro, por intermédio das vias de sinalização que pode ativar, regula vários processos celulares tais como migração e proliferação celulares, angiogénese, invasão do estroma e resistência à apoptose [126, 127]. Vários mecanismos para a ativação deste oncogene têm vindo a ser descritos, no entanto a amplificação génica é o mais comum [126]. O aumento do nível de expressão da proteína *ERBB2* está correlacionado de forma mais ou menos evidente com o tamanho e classe do tumor, com a disseminação tumoral para os nódulos linfáticos, com uma percentagem elevada de células em fase S, com a ocorrência de aneuploidia e com a redução/inexistência de recetores de hormonas esteroides, o que implica que a ativação deste recetor confere uma vantagem proliferativa às células tumorais. A sobrexpressão do *ERBB2* é utilizada como marcador e está associada a um mau prognóstico, a uma maior agressividade tumoral e ao desenvolvimento de resistência a terapias hormonais [126-128, 131, 137].

A análise efetuada neste trabalho revelou que o gene *Erbb2*, na linha CLS-ACI-1, apresenta uma redução estatisticamente significativa do nível de expressão, comparativamente com a amostra controlo (RNO-normal), com um valor p associado de 0,0017. A expressão deste oncogene é 1,4 vezes menor que a expressão do *Erbb2* apresentada pela linha celular RNO-normal, pelo que não é uma variação biologicamente significativa (gráfico 4b).

Os dados obtidos para o gene *Erbb2* são o oposto dos obtidos por Louzada *et al.* (2012) [45], para a linha celular HH-16.cl.4 de RNO derivada de DMBA, onde, por RT-qPCR, aquela equipa de investigação verificou que o gene *Erbb2* se encontrava significativamente sobrexpresso, com um aumento de expressão verificado de 10,7 vezes, relativamente ao controlo. No mesmo trabalho Louzada *et al*. [45] caracterizaram ainda uma outra linha celular tumoral de RNO (HH-16.cl.2/1) e verificaram, também por RT-qPCR, que o mesmo gene não se encontrava significativamente sobrexpresso nesta [45].

Com a caracterização citogenética da linha CLS-ACI-1 foi possível verificar que o cromossoma RNO10, onde se localiza o gene *Erbb2*, se encontra em trissomia. Com o aumento do número de cópias do gene *Erbb2* verificado, seria de esperar um aumento do nível de expressão, relativamente à amostra controlo. No entanto o que se verificou foi uma diminuição do nível de expressão deste gene, o que pode ser um indício de que o *Erbb2* se encontra transcripcionalmente suprimido por um mecanismo epigenético.

O oncogene *ERBB2*, como descrito na introdução, encontra-se amplamente associado ao cancro da mama humano e dado que a carcinogénese mamária em *Homo sapiens* e em *Rattus norvegicus* apresenta, segundo vários autores, uma grande similaridade mecanística [49-51], seria de esperar, principalmente com o ganho de uma cópia do *Erbb2* na linha CLS-ACI-1, que, nesta linha celular, este oncogene apresentasse um aumento do nível de expressão [47, 48]. Tal não se verificou, o que apesar de inesperado é normal, dado que o cancro é uma doença celular de carácter multifatorial, onde a ativação de várias vias de sinalização podem desencadear o mesmo fenótipo tumoral, ou seja, um grande conjunto de alterações genéticas podem ser combinadas de formas diferentes, desencadeando um fenótipo, que na sua essência é "o mesmo" [176]. É, no entanto, possível que, nesta linha o *Erbb2* esteja a desempenhar um papel ativo devido à ocorrência de mutações no gene, que levem à ativação constitutiva da proteína. Tal apesar de raro já foi descrito em vários tumores [126-128, 130]. À semelhança do ERBB2, outras RTKs têm vindo a ser associadas ao cancro da mama, tal como a família SRC. Esta encontra-se associada à tumorigénese e metastização e, tal como o ERBB2, levam à ativação das vias PI3K e RAS-MAPK, que, como referido anteriormente na análise *in silico*, se encontram possivelmente associadas à tumorigénese na linha CLS-ACI-1 [188]. Tal faz da família SRC um alvo de interesse em futuros estudos, na linha em análise.

À semelhança do realizado para o gene *Mycn*, a expressão do *Erbb2* foi também analisada quando as linhas celulares RNO-normal e CLS-ACI-1 foram expostas a tratamento com 5-azacitidina.

Os resultados obtidos por RT-qPCR mostram, para a linha RNO-normal, que ocorre um aumento de 1,6 vezes, estatisticamente significativo, na expressão do gene *Erbb2* após o tratamento desta linha com 5-azacitidina. Foi também detetada, após

remoção da 5-azacitidina, uma redução estatisticamente significativa na expressão deste gene na linha celular RNO-normal, quer em relação à amostra controlo, quer em relação à amostra recolhida após o período de tratamento com o agente desmetilante (gráfico 6). Estes dados parecem indicar que o gene *Erbb2* se encontra transcripcionalmente suprimido na linha RNO-normal, por metilação do DNA, pois quando o genoma foi desmetilado ocorreu um aumento da transcrição. Após a remoção do agente desmetilante o nível de expressão caiu para valores inferiores aos verificados antes do tratamento da linha RNO-normal com a 5-azacitidina, o que sugere que a linha celular manteve a capacidade de repor o estado de metilação inicial do DNA.

Para a linha CLS-ACI-1, verificou-se que o gene *Erbb2* apresenta um aumento significativo do nível de expressão após o tratamento com 5-azacitidina em comparação com a amostra controlo ($p=0,0106$) verificando-se, no entanto, após remoção (10 dias) do agente desmetilante, novamente um aumento da expressão. Este aumento é significativo quer em relação à amostra controlo ($p=0,0013$), quer em relação ao período de exposição à 5-azacitidina ($p=0,0301$) (gráfico 8).

Pelo aumento da expressão, verificado após o período de exposição à 5-azacitidina, pode-se colocar a hipótese de que o *Erbb2* se encontra regulado negativamente por metilação das citosinas em locais CpG. Seria de esperar que, após remoção do agente desmetilante, as marcas epigenéticas iniciais fossem restauradas, levando à redução da expressão do *Erbb2* para um nível semelhante ao da amostra controlo, tal como é verificado na linha RNO-normal. Tal não se verificou na linha CLS-ACI-1, o que pode ser um indício de que o tempo de recuperação após exposição à 5-azacitidina foi curto de mais para que as marcas epigenéticas fossem restauradas nesta linha ou que a linha celular perdeu a capacidade de renovar/recriar estas marcas epigenéticas após a sua perda, possivelmente devido à desregulação das DNMTs. É de referir que algumas DNA metiltransferases, tal como a DNMT1, apenas exercem a sua função metilante em cadeias de DNA hemimetiladas [189], pelo que se todas as marcas de uma ilha CpG forem eliminadas esta enzima perde o seu substrato, sendo mantido o estado desmetilado e transcripcionalmente ativo. Outra hipótese que permite explicar estes resultados, é a de que o aumento da expressão verificado após a remoção do

agente desmetilante, na linha CLS-ACI-1, se deva à ação de genes responsáveis pela regulação da expressão do *Erbb2*, cuja expressão tenha sido alterada pela 5-azacitidina.

De forma equivalente ao apresentado para o gene *Mycn*, os genes reguladores da expressão do *Erbb2*, de forma a satisfazer a hipótese acima apresentada, têm de se encontrar negativamente regulados a nível epigenético, no que se refere à metilação do DNA. Sabe-se que os genes *Etv4* e *Elf3*, pertencentes à família de fatores transcripcionais ETS e o gene *Tfap2a*, pertencente à família de fatores transcripcionais AP-2, são responsáveis pela ativação transcripcional do gene *Erbb2* [190, 191]. A expressão do gene *ETV4* foi detetada, em tumores da mama humano, em níveis aumentados quando ocorre hipometilação, sendo este gene categorizado como gene induzido por hipometilação [192]. Os genes *TFAP2A* e *ELF3*, em linhas celulares de tumores da mama humano, foram descritos num estado metilado [193, 194], o que os coloca, também, na categoria de genes induzidos por hipometilação. Dado o estado de metilação dos genes *ETV4*, *ELF3* e *TFAP2A* em HSA, os genes homólogos destes em RNO constituem assim genes candidatos para explicar o aumento da expressão, do *Erbb2*, observado na linha CLS-ACI-1, 10 dias após remoção da 5-azacitidina.

Louzada e colaboradores (2012) [45] no trabalho de caracterização de linhas celulares acima referido, realizaram uma análise semelhante à efetuada no presente trabalho, ao nível de expressão do gene *Erbb2*, antes, após a exposição e após remoção da 5-azacitidina na linha celular tumoral de RNO, HH-16cl.4, tendo verificado um decréscimo sucessivo do nível de expressão, relativamente à amostra controlo, após a exposição e após a remoção da 5-azacitidina [45]. Estes autores colocaram a hipótese de que este gene estivesse a ser negativamente regulado por mecanismos epigenéticos que não a metilação das citosinas, sugerindo um possível envolvimento de RNAs não codificantes ou da regulação do "splicing", na supressão da transcrição do *Erbb2* [45].

Estes dados parecem estar em desacordo com o verificado na linha celular CLS-ACI-1, no entanto, no trabalho realizado por Hamm *et al*. (2009) [195] em linhas celulares de condrosarcomas de RNO, foi verificado, tal como na linha CLS-ACI-1, um aumento da expressão do *Erbb2* após desmetilação global do genoma [195]. A hipótese apresentada, de que o *Erbb2* se encontra normalmente, em alguns tecidos, sob controlo epigenético negativo, está também em concordância com os dados obtido por Hattori *et*

al. (2001) [196] e por Kawasaki *et al.* (2004) [82] que mostram que o *Erbb2* se encontra desmetilado e sobrexpresso em tumores e em linhas celulares tumorais [82, 196].

A discussão acima apresentada está, também, de acordo com o descrito na base de dados UCSC-ENCODE (http://genome.ucsc.edu/ENCODE/). Analisando as marcas epigenéticas a nível do DNA, o gene *ERBB2*, em HSA, apresenta uma ilha CpG co-localizada com o promotor génico, esta ilha CpG surge frequentemente desmetilada em linhas celulares tumorais, tendo a sua metilação sido descrita apenas numa das linhas celulares presentes na base de dados UCSC-ENCODE (anexos 21-24). O gene *ERBB2*, apresenta, simultaneamente em HSA, um outro local de metilação associado a zonas de transição e alongamento da transcrição. Este local encontra-se fortemente metilado em todas as linhas celulares, sendo que a metilação a nível exónico ou intrónico se encontra associada com a expressão génica. A metilação no gene (excluindo a região dos promotores) é frequente em genes transcripcionalmente ativos, pois exerce uma função transcripcional essencial, a inibição da iniciação da transcrição intragénica, que caso ocorra pode levar à produção de proteínas anómalas, com função biológica alterada ou mesmo sem qualquer função associada [197].

Ao gene *ERBB2*, surgem associadas, também, as marcas histónicas H3K27Ac (Histona H3 acetilada no resíduo de lisina 27), H3K9ac (Histona H3 acetilada no resíduo de lisina 9) e H3K4m3 (Histona H3 trimetilada no resíduo de lisina 4). Estas modificações histónicas encontram-se frequentemente na proximidade de elementos reguladores ativos, estando no gene *ERBB2*, associadas ao promotor génico e "enhancer" (anexos 21-24). Foi também detetada, no corpo do gene, a marca histónica H3K36me3, que está relacionada com zonas de alongamento transcripcional.

Em MMU, as marcas histónicas associadas ao promotor ativo, encontradas foram a H3K4m3 e H3K27Ac. A marca H3K27me3 (histona H3 trimetilada no resíduo de lisina 27) foi detetada na região do promotor, em linhas celulares hepáticas e hematopoiéticas. Esta marca histónica está associada a regiões cromáticas transcripcionalmente inativas. Nesta espécie foi detetada uma ilha CpG co-localizada com o promotor, no entanto não estão disponíveis dados relativos ao grau de metilação desta ilha CpG (anexos 25-28).

A conservação das marcas epigenéticas verificadas entre HSA e MMU são um bom indício de que, em RNO, o gene *Erbb2* se encontre equivalentemente regulado a nível epigenético, quer isto dizer que, quando transcripcionalmente ativo, este gene apresenta a ilha CpG co-localizada com o promotor num elevado nível de desmetilação e, simultaneamente, apresentará alterações histónicas (H3K27Ac e/ou H3K4m3) que conferem à cromatina um estado permissivo à transcrição.

Deste modo, a linha em estudo neste trabalho, CLS-ACI-1, apresenta um padrão de regulação epigenético do gene *Erbb2* semelhante ao descrito para as linhas celulares humanas presentes na base de dados UCSC-ENCODE, o que faz dela um bom modelo celular para o estudo deste gene. A análise das marcas histónicas acima referidas, bem como dos genes responsáveis pela ativação transcripcional deste gene, seriam uma mais valia na caracterização da linha CLS-ACI-1, pois aumentaria o valor desta linha como modelo para o estudo do *Erbb2*.

Capítulo VI - Conclusão e Perspetivas Futuras

Capitulo VI - Conclusão e Perspetivas Futuras

Com este trabalho foi possível caracterizar citogeneticamente, com recurso às técnicas de bandeamento G e por restrição *in situ* e à técnica de "Chromosome Painting", a linha celular tumoral de *Rattus norvegicus*, CLS-ACI-1. Esta linha mostrou ser composta por, pelo menos, 3 subclones, sendo que cada um destes apresenta uma frequente variação do complemento cromossómico, principalmente no que diz respeito aos cromossomas RNO11, RNO12, RNO16, RNO17, RNO18, RNO19 e RNO20. Verificou-se que os cromossomas que se encontram envolvidos num maior número de rearranjos são os cromossomas RNO3 e RNO6, tendo-se ainda detetado um aumento do número de cópias destes cromossomas. Várias equipas de investigação têm reportado a ocorrência de alterações cromossómicas recorrentes nos cromossomas RNO3, RNO6, RNO12, RNO18 e RNO19 em linhas tumorais de RNO. Curiosamente os cromossomas homólogos aos RNO3 e RNO6, em HSA (cromossomas HSA2, HSA14 e HSA20), têm vindo a ser encontrados recorrentemente rearranjados em tumores da mama (HSA20) e neuroblastomas humanos (HSA2 e HSA14).

Tendo em conta os rearranjos cromossómicos detetados, foi possível desenvolver a hipótese de que a linha evoluiu, muito provavelmente, a partir de um clone com o cariótipo:

44,XX,der(3;?)t(3;?)(p10;?),+der(3;?)t(3;?)(p10;?),+4,der(5)t(5;3)(q36;?), rob(6;6)(q10;q10),+rob(6;6)(q10;q10),der(10)t(10;?)(q32;?)

O surgimento deste cariótipo parece ter sido seguido de duplicação do genoma e posterior aquisição das restantes alterações cromossómicas detetadas.

Com recurso à base de dados "Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology" (2012) verificou-se que a linha celular CLS-ACI-1 apresenta várias alterações cromossómicas equivalentes às recorrentemente detetadas no cancro da mama humano. Ao analisar os "breakpoints" cromossómicos detetados na linha CLS-ACI-1 e recorrendo à base de dados acima referida foi possível detetar por análise *in silico* (e através das sintenias entre RNO e HSA) que genes estarão, muito possivelmente, nestas regiões cromossómicas na linha em estudo. Assim os genes

Lats1, Pdcd4, Eif3a, Hspa5, Cd44, Cops2, Plcb2, Spint1, Pcna, Cdc42, Rassf2, Dvl1, Prdm2, Ddx1, Eif2ak2, Sdc1, Esr2, Foxa1, Nin, Numb, Zfp36l1, St6galnac1, Slc9a3r1, Slc16a3, Rassf6, Areg, Cxcl10, Hus1 e *Npy1r*, parecem ser bons candidatos a estarem implicados na iniciação e/ou progressão tumoral da linha em estudo.

Numa fase posterior do trabalho foi analisada a expressão dos genes *Mycn* e *Erbb2*, por "Real-Time Reverse Transcription - quantitative" PCR, na linha celular CLS-ACI-1. Esta análise revelou que o gene *Mycn*, mas não o *Erbb2*, apresenta um nível de expressão (significativo biológica e estatisticamente) superior ao apresentado pela amostra controlo (linha celular RNO-normal). A sobrexpressão do *Mycn* detetada na linha CLS-ACI-1 é 181 vezes superior à verificada na amostra controlo (linha celular de RNO-normal). O *Mycn* tem vindo a ser associado com o controlo de vários processos celulares, tais como ciclo celular, biogénese ribossomal, síntese proteica e função mitocondrial. Este gene é o efetor de vias de sinalização (WNT) e de transdução de sinal (RAS e MAPK). Curiosamente, os nossos dados citogenéticos denotam a possível amplificação dos genes *Mycn* e *Kras* e a análise *in silico* revelou que vários genes implicados nas vias WNT, RAS e MAPK se encontram nas zonas de "breakpoint" dos rearranjos cromossómicos detetados na linha CLS-ACI-1. Estes dados parecem indicar, que o nível de sobrexpressão, verificado na linha em estudo, está associado à amplificação do gene e/ou à desregulação das vias responsáveis pelo controlo da expressão do mesmo.

Na tentativa de compreender a regulação epigenética destes dois genes, procedeu-se à desmetilação global do genoma, usando-se para tal um agente desmetilante, a 5-aza-2'-deoxicitidina. Após tratamento da linha celular CLS-ACI-1 com o agente desmetilante, verificou-se, para o gene *Mycn*, que não ocorreu variação estatisticamente significativa da sua expressão, no entanto 10 dias após a remoção do agente desmetilante, verificou-se um aumento na expressão de cerca de 2 vezes. Uma variação do nível de expressão similar ao verificado na linha CLS-ACI-1 foi detetado na linha controlo RNO-normal, denotando que este gene não parece apresentar alteração ao nível da sua regulação por metilação do DNA, na linha em estudo. Os dados obtidos para o *Mycn* sugerem que este gene não está, provavelmente, transcripcionalmente suprimido por metilação das citosinas, sendo possível que o aumento no nível de expressão,

verificado após remoção do agente desmetilante, seja o reflexo de alterações na regulação de genes envolvidos, por sua vez, na regulação da expressão do *Mycn*. Novamente, as vias de sinalização e de transdução de sinal (WNT, RAS e MAPK) acima referidas permitem explicar a variação na expressão detetada, uma vez que vários dos gene destas vias se encontram metilados e a sua expressão pode ser induzida por desmetilação.

Os dados obtidos na experiência com a 5-azacitidina mostram que o gene *Erbb2* se encontra, a nível epigenético, sob controlo alterado, na linha em estudo. Esta hipótese é suportada pelo diferente perfil de expressão, correspondente aos pontos após exposição e após remoção do agente desmetilante, verificado nas linhas RNO-normal e CLS-ACI-1.

Na linha CLS-ACI-1 o aumento da expressão do *Erbb2*, verificado após o período de exposição à 5-azacitidina, parece indicar que este se encontra regulado negativamente por metilação das citosinas em locais CpG. Seria de esperar que, após remoção do agente desmetilante, as marcas epigenéticas iniciais fossem restauradas, levando à redução da expressão do *Erbb2* para um nível semelhante ao da amostra controlo, como é verificado na linha RNO-normal. Tal não se verificou na linha CLS-ACI-1, o que pode ser um indício de que o tempo de recuperação após exposição à 5-azacitidina foi curto de mais para que as marcas epigenéticas fossem restauradas nesta linha ou que a linha celular perdeu a capacidade de renovar/recriar estas marcas epigenéticas após a sua perda, possivelmente devido à desregulação das DNMTs. Outra hipótese que permite explicar estes resultados, é a de que o aumento da expressão verificado após remoção do agente desmetilante se deva, tal como no gene anteriormente referido, à ação de genes responsáveis pela regulação da expressão do *Erbb2*, cuja expressão tenha sido alterada pela 5-azacitidina.

A caracterização da linha CLS-ACI-1 efetuada neste trabalho demonstra que esta linha tumoral é um bom modelo *in vitro* para o estudo do cancro da mama, pois apresenta alterações cromossómicas estruturais recorrentemente descritas em linhas celulares de RNO e com homologia para algumas das alterações cromossómicas frequentemente detetadas no cancro da mama humano. A análise *in silico*, realizada com o intuito de detetar que genes na proximidade dos "breakpoints" podem estar a

contribuir para a tumorigénese da linha CLS-ACI-1, revelou 29 genes possivelmente afetados e que foram previamente associados ao cancro da mama humano. A análise destes genes, na linha em estudo, seria de interesse, pois permitiria o uso desta linha como modelo para o estudo ou para o desenvolvimento de terapias direcionadas.

Esta linha surge, também, como um bom modelo para o estudo dos genes *Mycn* e *Erbb2* e do seu impacto na oncogénese mamária, assim como para o estudo da regulação epigenética dos mesmos, pois a linha CLS-ACI-1 apresenta marcas epigenéticas similares às frequentemente detetadas em linhas celulares humanas. É de referir que o papel biológico do *Mycn*, nos tumores mamários, se encontra amplamente inexplorado, sendo, em trabalhos futuros, de interesse a análise do impacto da sobrexpressão deste gene no comportamento das células tumorais mamárias.

Seria, também, de interesse, em estudos futuros na linha CLS-ACI-1, determinar que marcas histónicas se encontram associadas aos genes *Mycn* e *Erbb2* de forma a complementar os dados obtidos e, de acordo com as análises *in silico* realizadas, analisar o impacto da via de sinalização WNT e da via de transdução de sinal RAS nesta linha celular, de forma a aumentar o seu valor enquanto modelo celular para o estudo do cancro da mama humano.

Capitulo VII - Bibliografia

Capitulo VII - Bibliografia

[1] - WHO - World Health Organization [http://www.who.int/en/]

[2] - ALERT - Life Sciences Computing [http://www.alert-online.com/pt/medical-guide/estatisticas-do-cancro]

[3] - Siegel R, Naishadham D, Jemal A: Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* 2012, 62(1):10-29.

[4] - Sawan C, Vaissiere T, Murr R, Herceg Z: Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutation research* 2008, 642(1-2):1-13.

[5] - Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, 144(5):646-674.

[6] - Gout S, Huot J: Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society* 2008, 1(1):69-83.

[7] - Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J: Molecular Cell Biology, Fourth edition edn. New York: W. H. Freeman and Company; 2000.

[8] - Pellettieri J, Sanchez Alvarado A: Cell turnover and adult tissue homeostasis: from humans to planarians. *Annual review of genetics* 2007, 41:83-105.

[9] - Elmore S: Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 2007, 35(4):495-516.

[10] - Gonzalez-Sarmiento R, Perez-Losada J: Breast cancer, a stem cell disease. *Current stem cell research & therapy* 2008, 3(1):55-65.

[11] - Morrison BJ, Schmidt CW, Lakhani SR, Reynolds BA, Lopez JA: Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 2008, 10(4):210.

[12] - Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100(1):57-70.

[13] - Berretta R, Moscato P: Cancer biomarker discovery: the entropic hallmark. *PloS one* 2010, 5(8):e12262.

[14] - Frank SA. In: *Dynamics of Cancer: Incidence, Inheritance, and Evolution.* edn. Princeton (NJ); 2007.

[15] - Visvader JE: Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes & development* 2009, 23(22):2563-2577.

[16] - Al-Ejeh F, Smart CE, Morrison BJ, Chenevix-Trench G, Lopez JA, Lakhani SR, Brown MP, Khanna KK: Breast cancer stem cells: treatment resistance and therapeutic opportunities. *Carcinogenesis* 2011, 32(5):650-658.

[17] - Toft DJ, Cryns VL: Minireview: Basal-like breast cancer: from molecular profiles to targeted therapies. *Molecular endocrinology* 2011, 25(2):199-211.

[18] - Sonnenschein C, Soto AM: Theories of carcinogenesis: an emerging perspective. *Seminars in cancer biology* 2008, 18(5):372-377.

[19] - Soto AM, Sonnenschein C: The somatic mutation theory of cancer: growing problems with the paradigm? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2004, 26(10):1097-1107.

[20] - Deininger P: Genetic instability in cancer: caretaker and gatekeeper genes. *The Ochsner journal* 1999, 1(4):206-209.

[21] - Strachan T, Read AP: Human Molecular Genetics, 3rd edition edn. New York: Garland Science; 2004.

[22] - Oliveira AM, Ross JS, Fletcher JA: Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers. *American journal of clinical pathology* 2005, 124 Suppl:S16-28.

[23] - Polyak K: Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of clinical investigation* 2007, 117(11):3155-3163.

[24] - Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS: Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 2008, 75(2):75-84.

[25] - Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S: The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature reviews Genetics* 2006, 7(1):21-33.

[26] - Kakarala M, Wicha MS: Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008, 26(17):2813-2820.

[27] - Lawson JC, Blatch GL, Edkins AL: Cancer stem cells in breast cancer and metastasis. *Breast cancer research and treatment* 2009, 118(2):241-254.

[28] - Martinez-Climent JA, Andreu EJ, Prosper F: Somatic stem cells and the origin of cancer. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 2006, 8(9):647-663.

[29] - Rapp UR, Ceteci F, Schreck R: Oncogene-induced plasticity and cancer stem cells. *Cell cycle* 2008, 7(1):45-51.

[30] - Regenbrecht CR, Lehrach H, Adjaye J: Stemming cancer: functional genomics of cancer stem cells in solid tumors. *Stem cell reviews* 2008, 4(4):319-328.

[31] - Sell S: On the stem cell origin of cancer. *The American journal of pathology* 2010, 176(6):2584-2494.

[32] - Zucchi I, Sanzone S, Astigiano S, Pelucchi P, Scotti M, Valsecchi V, Barbieri O, Bertoli G, Albertini A, Reinbold RA *et al*: The properties of a mammary gland cancer stem cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, 104(25):10476-10481.

[33] - Gilbert CA, Ross AH: Cancer stem cells: cell culture, markers, and targets for new therapies. *Journal of cellular biochemistry* 2009, 108(5):1031-1038.

[34] - Navin NE, Hicks J: Tracing the tumor lineage. *Molecular oncology* 2010, 4(3):267-283.

[35] - Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Molecular Biology of the Cell., 4th edition edn. New York: Garland Science; 2002.

[36] - Marusyk A, Polyak K: Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochimica et biophysica acta* 2010, 1805(1):105-117.

[37] - Little MP: Cancer models, genomic instability and somatic cellular Darwinian evolution. *Biology direct* 2010, 5:19; discussion 19.

[38] - Heim S, Teixeira MR, Dietrich CU, Pandis N: Cytogenetic polyclonality in tumors of the breast. *Cancer genetics and cytogenetics* 1997, 95(1):16-19.

[39] - Shen CY, Yu JC, Lo YL, Kuo CH, Yue CT, Jou YS, Huang CS, Lung JC, Wu CW: Genome-wide search for loss of heterozygosity using laser capture microdissected tissue of breast carcinoma: an implication for mutator phenotype and breast cancer pathogenesis. *Cancer research* 2000, 60(14):3884-3892.

[40] - Bignell GR, Greenman CD, Davies H, Butler AP, Edkins S, Andrews JM, Buck G, Chen L, Beare D, Latimer C *et al*: Signatures of mutation and selection in the cancer genome. *Nature* 2010, 463(7283):893-898.

[41] - Teixeira MR, Pandis N, Bardi G, Andersen JA, Heim S: Karyotypic comparisons of multiple tumorous and macroscopically normal surrounding tissue samples from patients with breast cancer. *Cancer research* 1996, 56(4):855-859.

[42] - Hedges SB: The origin and evolution of model organisms. *Nature reviews Genetics* 2002, 3(11):838-849.

[43] - Hunter P: The paradox of model organisms. The use of model organisms in research will continue despite their shortcomings. *EMBO reports* 2008, 9(8):717-720.

[44] - Heppner GH, Miller FR, Shekhar PM: Nontransgenic models of breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 2000, 2(5):331-334.

[45] - Louzada S, Adega F, Chaves R: Defining the sister rat mammary tumor cell lines HH-16 cl.2/1 and HH-16.cl.4 as an in vitro cell model for Erbb2. *PloS one* 2012, 7(1):e29923.

[46] - Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT *et al*: Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics* 2000, 25(1):25-29.

[47] - Christian AT, Snyderwine EG, Tucker JD: Comparative genomic hybridization analysis of PhIP-induced mammary carcinomas in rats reveals a cytogenetic signature. *Mutation research* 2002, 506-507:113-119.

[48] - Papaconstantinou AD, Shanmugam I, Shan L, Schroeder IS, Qiu C, Yu M, Snyderwine EG: Gene expression profiling in the mammary gland of rats treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2006, 118(1):17-24.

[49] - Stieber D, Piessevaux G, Riviere M, Laes JF, Quan X, Szpirer J, Szpirer C: Isolation of two regions on rat chromosomes 5 and 18 affecting mammary cancer susceptibility. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2007, 120(8):1678-1683.

[50] - Ting AY, Kimler BF, Fabian CJ, Petroff BK: Characterization of a preclinical model of simultaneous breast and ovarian cancer progression. *Carcinogenesis* 2007, 28(1):130-135.

[51] - Burdall SE, Hanby AM, Lansdown MR, Speirs V: Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast cancer research : BCR* 2003, 5(2):89-95.

[52] - Vargo-Gogola T, Rosen JM: Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature reviews Cancer* 2007, 7(9):659-672.

[53] - Lacroix M, Leclercq G: Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast cancer research and treatment* 2004, 83(3):249-289.

[54] - van Staveren WC, Solis DY, Hebrant A, Detours V, Dumont JE, Maenhaut C: Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? *Biochimica et biophysica acta* 2009, 1795(2):92-103.

[55] - Bright RK, Vocke CD, Emmert-Buck MR, Duray PH, Solomon D, Fetsch P, Rhim JS, Linehan WM, Topalian SL: Generation and genetic characterization of immortal human prostate epithelial cell lines derived from primary cancer specimens. *Cancer research* 1997, 57(5):995-1002.

[56] - Currier N, Solomon SE, Demicco EG, Chang DL, Farago M, Ying H, Dominguez I, Sonenshein GE, Cardiff RD, Xiao ZX *et al*: Oncogenic signaling pathways activated in DMBA-induced mouse mammary tumors. *Toxicologic pathology* 2005, 33(6):726-737.

[57] - Fang Y, Elahi A, Denley RC, Rao PH, Brennan MF, Jhanwar SC: Molecular characterization of permanent cell lines from primary, metastatic and recurrent malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) with underlying neurofibromatosis-1. *Anticancer research* 2009, 29(4):1255-1262.

[58] - Ferreira D, Adega F, Chaves R: The Importance of Cancer Cell Lines as in vitro Models in Cancer Methylome Analysis and Anticancer Drugs Testing; 2012.

[59] - Freshney R: Culture of animal cells: A manual of basic technique., 5 th edn: Wiley-Liss; 2005.

[60] - Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F *et al*: A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer cell* 2006, 10(6):515-527.

[61] - Bover L, Barrio M, Slavutsky I, Bravo AI, Quintans C, Bagnati A, Lema B, Schiaffi J, Yomha R, Mordoh J: Description of a new human breast cancer cell line, IIB-BR-G, established from a primary undifferentiated tumor. *Breast cancer research and treatment* 1991, 19(1):47-56.

[62] - Gazdar AF, Girard L, Lockwood WW, Lam WL, Minna JD: Lung cancer cell lines as tools for biomedical discovery and research. *Journal of the National Cancer Institute* 2010, 102(17):1310-1321.

[63] - Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi YL, Girard L, Gandhi J, Kwei KA, Hernandez-Boussard T, Wang P, Gazdar AF *et al*: Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PloS one* 2009, 4(7):e6146.

[64] - Boyd KE, Farnham PJ: Identification of target genes of oncogenic transcription factors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 1999, 222(1):9-28.

[65] - Coleman SC, Stewart ZA, Day TA, Netterville JL, Burkey BB, Pietenpol JA: Analysis of cell-cycle checkpoint pathways in head and neck cancer cell lines: implications for therapeutic strategies. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* 2002, 128(2):167-176.

[66] - Naylor TL, Greshock J, Wang Y, Colligon T, Yu QC, Clemmer V, Zaks TZ, Weber BL: High resolution genomic analysis of sporadic breast cancer using array-based comparative genomic hybridization. *Breast cancer research : BCR* 2005, 7(6):R1186-1198.

[67] - Kwei KA, Kung Y, Salari K, Holcomb IN, Pollack JR: Genomic instability in breast cancer: pathogenesis and clinical implications. *Molecular oncology* 2010, 4(3):255-266.

[68] - Sadikovic B, Al-Romaih K, Squire JA, Zielenska M: Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer. *Current genomics* 2008, 9(6):394-408.

[69] - Aguilera A, Gomez-Gonzalez B: Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nature reviews Genetics* 2008, 9(3):204-217.

[70] - Mettu RK, Wan YW, Habermann JK, Ried T, Guo NL: A 12-gene genomic instability signature predicts clinical outcomes in multiple cancer types. *The International journal of biological markers* 2010, 25(4):219-228.

[71] - Shen Z: Genomic instability and cancer: an introduction. *Journal of molecular cell biology* 2011, 3(1):1-3.

[72] - Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD: Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews Molecular cell biology* 2010, 11(3):220-228.

[73] - Peng JC, Karpen GH: Epigenetic regulation of heterochromatic DNA stability. *Current opinion in genetics & development* 2008, 18(2):204-211.

[74] - Pezer Z, Ugarkovic D: Role of non-coding RNA and heterochromatin in aneuploidy and cancer. *Seminars in cancer biology* 2008, 18(2):123-130.

[75] - Duesberg P, Fabarius A, Hehlmann R: Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells. *IUBMB life* 2004, 56(2):65-81.

[76] - Rasnick D, Duesberg PH: How aneuploidy affects metabolic control and causes cancer. *The Biochemical journal* 1999, 340 (Pt 3):621-630.

[77] - Raptis S, Bapat B: Genetic instability in human tumors. *Exs* 2006(96):303-320.

[78] - Pathiraja TN, Stearns V, Oesterreich S: Epigenetic regulation in estrogen receptor positive breast cancer--role in treatment response. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2010, 15(1):35-47.

[79] - Pitot HC, Grosso LE, Goldsworthy T: Genetics and epigenetics of neoplasia: facts and theories. *Carcinogenesis; a comprehensive survey* 1985, 10:65-79.
[80] - Rothhammer T, Bosserhoff AK: Epigenetic events in malignant melanoma. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 2007, 20(2):92-111.
[81] - Lo PK, Sukumar S: Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics* 2008, 9(12):1879-1902.
[82] - Kawasaki H, Taira K: Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature* 2004, 431(7005):211-217.
[83] - Ehrlich M: DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 2002, 21(35):5400-5413.
[84] - Ehrlich M: DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* 2009, 1(2):239-259.
[85] - Shann YJ, Cheng C, Chiao CH, Chen DT, Li PH, Hsu MT: Genome-wide mapping and characterization of hypomethylated sites in human tissues and breast cancer cell lines. *Genome research* 2008, 18(5):791-801.
[86] - Veeck J, Esteller M: Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2010, 15(1):5-17.
[87] - Lippman Z, Martienssen R: The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 2004, 431(7006):364-370.
[88] - Abdel-Rahman WM: Genomic instability and carcinogenesis: an update. *Current genomics* 2008, 9(8):535-541.
[89] - Holland AJ, Cleveland DW: Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* 2009, 10(7):478-487.
[90] - Ricke RM, van Ree JH, van Deursen JM: Whole chromosome instability and cancer: a complex relationship. *Trends in genetics : TIG* 2008, 24(9):457-466.
[91] - Klein A, Zang KD, Steudel WI, Urbschat S: Different mechanisms of mitotic instability in cancer cell lines. *International journal of oncology* 2006, 29(6):1389-1396.
[92] - Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW: On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature reviews Cancer* 2005, 5(10):773-785.
[93] - Weaver BA, Cleveland DW: Does aneuploidy cause cancer? *Current opinion in cell biology* 2006, 18(6):658-667.
[94] - Storchova Z, Pellman D: From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nature reviews Molecular cell biology* 2004, 5(1):45-54.
[95] - Boveri T: Ueber mehrpolige Mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns. URL for English translation: http://8e.devbio.com/

article.php?ch=4&id=24. 1902.
[96] - Boveri T: Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. (The origin of malignant tumors.). 1914.
[97] - Weaver BA, Cleveland DW: The aneuploidy paradox in cell growth and tumorigenesis. *Cancer cell* 2008, 14(6):431-433.
[98] - Weaver BA, Cleveland DW: Aneuploidy: instigator and inhibitor of tumorigenesis. *Cancer research* 2007, 67(21):10103-10105.
[99] - Pfau SJ, Amon A: Chromosomal instability and aneuploidy in cancer: from yeast to man. *EMBO reports* 2012, 13(6):515-527.
[100] - Berger R, Bernard OA: Jumping translocations. *Genes, chromosomes & cancer* 2007, 46(8):717-723.
[101] - Raphael BJ, Volik S, Yu P, Wu C, Huang G, Linardopoulou EV, Trask BJ, Waldman F, Costello J, Pienta KJ *et al*: A sequence-based survey of the complex structural organization of tumor genomes. *Genome biology* 2008, 9(3):R59.

[102] - Unger K, Wienberg J, Riches A, Hieber L, Walch A, Brown A, O'Brien PC, Briscoe C, Gray L, Rodriguez E *et al*: Novel gene rearrangements in transformed breast cells identified by high-resolution breakpoint analysis of chromosomal aberrations. *Endocrine-related cancer* 2010, 17(1):87-98.

[103] - Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA *et al*: Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 2011, 144(1):27-40.

[104] - Howarth KD, Blood KA, Ng BL, Beavis JC, Chua Y, Cooke SL, Raby S, Ichimura K, Collins VP, Carter NP *et al*: Array painting reveals a high frequency of balanced translocations in breast cancer cell lines that break in cancer-relevant genes. *Oncogene* 2008, 27(23):3345-3359.

[105] - Nambiar M, Kari V, Raghavan SC: Chromosomal translocations in cancer. *Biochimica et biophysica acta* 2008, 1786(2):139-152.

[106] - Inaki K, Hillmer AM, Ukil L, Yao F, Woo XY, Vardy LA, Zawack KF, Lee CW, Ariyaratne PN, Chan YS *et al*: Transcriptional consequences of genomic structural aberrations in breast cancer. *Genome research* 2011, 21(5):676-687.

[107] - Laird PW, Jaenisch R: The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annual review of genetics* 1996, 30:441-464.

[108] - Alekseenko A, Wojas-Pelc A, Lis GJ, Furgal-Borzych A, Surowka G, Litwin JA: Cyclin D1 and D3 expression in melanocytic skin lesions. *Archives of dermatological research* 2010, 302(7):545-550.

[109] - Loddo M, Kingsbury SR, Rashid M, Proctor I, Holt C, Young J, El-Sheikh S, Falzon M, Eward KL, Prevost T *et al*: Cell-cycle-phase progression analysis identifies unique phenotypes of major prognostic and predictive significance in breast cancer. *British journal of cancer* 2009, 100(6):959-970.

[110] - Malumbres M, Barbacid M: Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews Cancer* 2009, 9(3):153-166.

[111] - Kaye FJ: The retinoblastoma-like protein family: still in the shadow of the RB gene? *Journal of the National Cancer Institute* 1998, 90(19):1418-1419.

[112] - Alt FW, Kellems RE, Bertino JR, Schimke RT: Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells. *The Journal of biological chemistry* 1978, 253(5):1357-1370.

[113] - Albertson DG: Gene amplification in cancer. *Trends in genetics : TIG* 2006, 22(8):447-455.

[114] - Debatisse M, Malfoy B: Gene amplification mechanisms. *Advances in experimental medicine and biology* 2005, 570:343-361.

[115] - Joos S, Scherthan H, Speicher MR, Schlegel J, Cremer T, Lichter P: Detection of amplified DNA sequences by reverse chromosome painting using genomic tumor DNA as probe. *Human genetics* 1993, 90(6):584-589.

[116] - Shimizu N: Extrachromosomal double minutes and chromosomal homogeneously staining regions as probes for chromosome research. *Cytogenetic and genome research* 2009, 124(3-4):312-326.

[117] - Shimizu N, Shingaki K, Kaneko-Sasaguri Y, Hashizume T, Kanda T: When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. *Experimental cell research* 2005, 302(2):233-243.

[118] - Coquelle A, Pipiras E, Toledo F, Buttin G, Debatisse M: Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell* 1997, 89(2):215-225.

[119] - Bailey SM, Murnane JP: Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucleic acids research* 2006, 34(8):2408-2417.

[120] - Slijepcevic P: Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* 1998, 107(2):136-140.

[121] - Murnane JP: Telomeres and chromosome instability. *DNA repair* 2006, 5(9-10):1082-1092.

[122] - Mc CB: Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 1951, 16:13-47.

[123] - Lo AW, Sabatier L, Fouladi B, Pottier G, Ricoul M, Murnane JP: DNA amplification by breakage/fusion/bridge cycles initiated by spontaneous telomere loss in a human cancer cell line. *Neoplasia* 2002, 4(6):531-538.

[124] - Coquelle A, Toledo F, Stern S, Bieth A, Debatisse M: A new role for hypoxia in tumor progression: induction of fragile site triggering genomic rearrangements and formation of complex DMs and HSRs. *Molecular cell* 1998, 2(2):259-265.

[125] - Hynes NE, Lane HA: ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature reviews Cancer* 2005, 5(5):341-354.

[126] - Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE: The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO journal* 2000, 19(13):3159-3167.

[127] - Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS: Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006, 366(1):2-16.

[128] - Yarden Y, Sliwkowski MX: Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews Molecular cell biology* 2001, 2(2):127-137.

[129] - Zhou X, Agazie YM: The signaling and transformation potency of the overexpressed HER2 protein is dependent on the normally-expressed EGFR. *Cellular signalling* 2012, 24(1):140-150.

[130] - Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y: Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2004, 58(3):903-913.

[131] - Holbro T, Hynes NE: ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2004, 44:195-217.

[132] - Roskoski R, Jr.: The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochemical and biophysical research communications* 2004, 319(1):1-11.

[133] - Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H: A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular systems biology* 2005, 1:2005 0010.

[134] - Neve RM, Sutterluty H, Pullen N, Lane HA, Daly JM, Krek W, Hynes NE: Effects of oncogenic ErbB2 on G1 cell cycle regulators in breast tumour cells. *Oncogene* 2000, 19(13):1647-1656.

[135] - Rodriguez-Berriguete G, Fraile B, Martinez-Onsurbe P, Olmedilla G, Paniagua R, Royuela M: MAP Kinases and Prostate Cancer. *Journal of signal transduction* 2012, 2012:169170.

[136] - Citri A, Yarden Y: EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature reviews Molecular cell biology* 2006, 7(7):505-516.

[137] - Revillion F, Bonneterre J, Peyrat JP: ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *European journal of cancer* 1998, 34(6):791-808.

[138] - Burris HA, 3rd, Rugo HS, Vukelja SJ, Vogel CL, Borson RA, Limentani S, Tan-Chiu E, Krop IE, Michaelson RA, Girish S *et al*: Phase II study of the antibody drug conjugate trastuzumab-DM1 for the treatment of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive breast cancer after prior HER2-directed therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011, 29(4):398-405.

[139] - Knoepfler PS, Zhang XY, Cheng PF, Gafken PR, McMahon SB, Eisenman RN: Myc influences global chromatin structure. *The EMBO journal* 2006, 25(12):2723-2734.

[140] - Varlakhanova NV, Knoepfler PS: Acting locally and globally: Myc's ever-expanding roles on chromatin. *Cancer research* 2009, 69(19):7487-7490.

[141] - Knoepfler PS: Myc goes global: new tricks for an old oncogene. *Cancer research* 2007, 67(11):5061-5063.

[142] - Wasylishen AR, Penn LZ: Myc: the beauty and the beast. *Genes & cancer* 2010, 1(6):532-541.

[143] - Hynes NE, Stoelzle T: Key signalling nodes in mammary gland development and cancer: Myc. *Breast cancer research : BCR* 2009, 11(5):210.

[144] - Eilers M, Eisenman RN: Myc's broad reach. *Genes & development* 2008, 22(20):2755-2766.

[145] - Gustafson WC, Weiss WA: Myc proteins as therapeutic targets. *Oncogene* 2010, 29(9):1249-1259.

[146] - Bown N: Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects. *Journal of clinical pathology* 2001, 54(12):897-910.

[147] - Torres J, Regan PL, Edo R, Leonhardt P, Jeng EI, Rappaport EF, Ikegaki N, Tang XX: Biological effects of induced MYCN hyper-expression in MYCN-amplified neuroblastomas. *International journal of oncology* 2010, 37(4):983-991.

[148] - Bieche I, Lerebours F, Tozlu S, Espie M, Marty M, Lidereau R: Molecular profiling of inflammatory breast cancer: identification of a poor-prognosis gene expression signature. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004, 10(20):6789-6795.

[149] - Prins J, De Vries EG, Mulder NH: The myc family of oncogenes and their presence and importance in small-cell lung carcinoma and other tumour types. *Anticancer research* 1993, 13(5A):1373-1385.

[150] - Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L: Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Experimental cell research* 1968, 49(1):219-222.

[151] - Caspersson T, Castleman KR, Lomakka G, Modest EJ, Moller A, Nathan R, Wall RJ, Zech L: Automatic karyotyping of quinacrine mustard stained human chromosomes. *Experimental cell research* 1971, 67(1):233-235.

[152] - ISCN: ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. In: *ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.* edn. Edited by Shaffer LG, SlovaK ML, Campbell LJ. Switzerland: Krager, S.; 2009.

[153] - Teixeira AP: Organização da fracção repetitiva nos genomas de Cricetus cricetus, Peromyscus eremicus (Família Cricetidae) e Praomys tullbergi (Família Muridae). Considerações sobre a evolução do cromossoma X. Vila Real, Portugal: UTAD - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro; 2007.

[154] - Morais AM: Padrões de Bandeamento por Restrição *In Situ* e "Bar-Codes" para Cromossomas Humanos. Vila Real, Portugal: UTAD - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro; 2004.

[155] - Sumner AT, Evans HJ, Buckland RA: New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature: New biology* 1971, 232(27):31-32.

[156] - Bickmore W: Karyotype Analysis and Chromosome Banding. *Nature Publishing Group* 2001.

[157] - Santos S: Organização e Evolução do genoma dos Carnivora: Felis catus – Fracção repetitiva e arquitectura Cromossómica. Braga, Portugal: UM - Universidade do Minho; 2006.

[158] - Gould DC, Callan HG, Thomas CA, Jr.: The actions of restriction endonucleases on lampbrush chromosomes. *Journal of cell science* 1976, 21(2):303-313.
[159] - Jones K: Molecular Structure of Human chromosomes (Repetitive DNA and primate evolution). New York: Yunis JJ ed. Academic Press; 1977.
[160] - Gosalvez J, Buno I, Lopez-Fernandez C, Fernandez JL, Goyanes VJ: Image analysis of murine chromatin fiber structure after in situ digestion with restriction endonucleases. *Analytical and quantitative cytology and histology / the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology* 1997, 19(3):207-214.
[161] - Chaves R: Organização e Evolução do Genoma na Familia Bovidae: Inferências por Citogenética Molecular. Vila Real, Portugal: UTAD - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro; 2002.
[162] - Borges AL: Modelos celulares e genéticos em tumores mamários de gata. Vila Real, Portugal: UTAD - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro; 2009.
[163] - Verma R, Babu A: Human chromosomes – Principles and Tecniques, 2ª edição edn. New York.: McGraw-Hills Book Company,; 1995.
[164] - Schwarzacher T, Heslop – Harrison JS: Pratical “in situ” Hybridization. Oxford: BIOS; 2000.
[165] - Meles SM: "Comparative Chromosome Painting" entre os Genomas das Espécies Muridae (Rodentia) Praomys tullbergi, Mus musculus e Rattus norvegicus: Arquitetura Cromossómica. Vila Real, Portugal: UTAD - Universidade de Trás-os Montes e Alto Douro; 2008.
[166] - Carter NP: Cytogenetic analysis by chromosome painting. *Cytometry* 1994, 18(1):2-10.
[167] - Hamta A, Adamovic T, Samuelson E, Helou K, Behboudi A, Levan G: Chromosome ideograms of the laboratory rat (Rattus norvegicus) based on high-resolution banding, and anchoring of the cytogenetic map to the DNA sequence by FISH in sample chromosomes. *Cytogenetic and genome research* 2006, 115(2):158-168.
[168] - BIO-RAD: Real-Time PCR - Applications Guide. *Bio-Rad Laboratories, Inc* 2006.
[169] - Biosystems A: Applied Biosystems StepOne and StepOnePlus: Real Time PCR Systems - Getting Started Guide. *Applied Biosystems* 2007.
[170] - Biosystems A: Apllied Biosystems StepOne and StepOnePlus Real-Time PCR Systems. Relative Standard Curve and Comparative Ct Experiments; 2010.
[171] - Murray D, Doran P, MacMathuna P, Moss AC: In silico gene expression analysis--an overview. *Molecular cancer* 2007, 6:50.
[172] - [http://www.cell-lines-service.de/content/e174/e158/e2031/e1144/index_eng.html]
[173] - Shimizu N: Molecular mechanisms of the origin of micronuclei from extrachromosomal elements. *Mutagenesis* 2011, 26(1):119-123.
[174] - Adamovic T, Trosso F, Roshani L, Andersson L, Petersen G, Rajaei S, Helou K, Levan G: Oncogene amplification in the proximal part of chromosome 6 in rat endometrial adenocarcinoma as revealed by combined BAC/PAC FISH, chromosome painting, zoo-FISH, and allelotyping. *Genes, chromosomes & cancer* 2005, 44(2):139-153.
[175] - Popescu NC, Greiner JW: Recurrent alterations of the short arm of chromosome 3 define a tumor suppressor region in rat mammary tumor cells. *Carcinogenesis* 1999, 20(10):2033-2036.
[176] - Walentinsson A, Sjoling A, Helou K, Klinga-Levan K, Levan G: Genomewide assessment of genetic alterations in DMBA-induced rat sarcomas: cytogenetic, CGH, and allelotype analyses reveal recurrent DNA copy number changes in rat chromosomes 1, 2, 4, and 7. *Genes, chromosomes & cancer* 2000, 28(2):184-195.
[177] - Dano L, Guilly MN, Dutrillaux B, Chevillard S: Clonal evolution of a radon-induced rat lung tumor. *Cancer genetics and cytogenetics* 2001, 125(1):52-58.
[178] - [http://www.cancerindex.org/]

[179] - Hamta A, Talebbeigy F: Recurrent Regional Allelic Imbalance in Chromosome 15 in Rat Endometrial Adenocarcinomas. *Yakhteh Medical Journal* 2010, 12(1):59-72.

[180] - Hodgson JG, Chin K, Collins C, Gray JW: Genome amplification of chromosome 20 in breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 2003, 78(3):337-345.

[181] - Tabach Y, Kogan-Sakin I, Buganim Y, Solomon H, Goldfinger N, Hovland R, Ke XS, Oyan AM, Kalland KH, Rotter V *et al*: Amplification of the 20q chromosomal arm occurs early in tumorigenic transformation and may initiate cancer. *PloS one* 2011, 6(1):e14632.

[182] - Murphy WJ, Larkin DM, Everts-van der Wind A, Bourque G, Tesler G, Auvil L, Beever JE, Chowdhary BP, Galibert F, Gatzke L *et al*: Dynamics of mammalian chromosome evolution inferred from multispecies comparative maps. *Science* 2005, 309(5734):613-617.

[183] - Bailey JA, Baertsch R, Kent WJ, Haussler D, Eichler EE: Hotspots of mammalian chromosomal evolution. *Genome biology* 2004, 5(4):R23.

[184] - [http://biogps.org/#goto=welcome]

[185] - Stresemann C, Lyko F: Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2008, 123(1):8-13.

[186] - Kobayashi K, Jakt LM, Nishikawa SI: Epigenetic regulation of the neuroblastoma genes, Arid3b and Mycn. *Oncogene* 2012.

[187] - Hernandez-Vargas H, Lambert MP, Le Calvez-Kelm F, Gouysse G, McKay-Chopin S, Tavtigian SV, Scoazec JY, Herceg Z: Hepatocellular carcinoma displays distinct DNA methylation signatures with potential as clinical predictors. *PloS one* 2010, 5(3):e9749.

[188] - Andrechek ER, Muller WJ: Tyrosine kinase signalling in breast cancer: tyrosine kinase-mediated signal transduction in transgenic mouse models of human breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 2000, 2(3):211-216.

[189] - Jaenisch R, Bird A: Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics* 2003, 33 Suppl:245-254.

[190] - Scott GK, Chang CH, Erny KM, Xu F, Fredericks WJ, Rauscher FJ, 3rd, Thor AD, Benz CC: Ets regulation of the erbB2 promoter. *Oncogene* 2000, 19(55):6490-6502.

[191] - Berlato C, Chan KV, Price AM, Canosa M, Scibetta AG, Hurst HC: Alternative TFAP2A isoforms have distinct activities in breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 2011, 13(2):R23.

[192] - Bieche I, Tozlu S, Girault I, Onody P, Driouch K, Vidaud M, Lidereau R: Expression of PEA3/E1AF/ETV4, an Ets-related transcription factor, in breast tumors: positive links to MMP2, NRG1 and CGB expression. *Carcinogenesis* 2004, 25(3):405-411.

[193] - Dunwell T, Hesson L, Rauch TA, Wang L, Clark RE, Dallol A, Gentle D, Catchpoole D, Maher ER, Pfeifer GP *et al*: A genome-wide screen identifies frequently methylated genes in haematological and epithelial cancers. *Molecular cancer* 2010, 9:44.

[194] - Rodenhiser DI, Andrews J, Kennette W, Sadikovic B, Mendlowitz A, Tuck AB, Chambers AF: Epigenetic mapping and functional analysis in a breast cancer metastasis model using whole-genome promoter tiling microarrays. *Breast cancer research : BCR* 2008, 10(4):R62.

[195] - Hamm CA, Xie H, Costa FF, Vanin EF, Seftor EA, Sredni ST, Bischof J, Wang D, Bonaldo MF, Hendrix MJ *et al*: Global demethylation of rat chondrosarcoma cells after treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine results in increased tumorigenicity. *PloS one* 2009, 4(12):e8340.

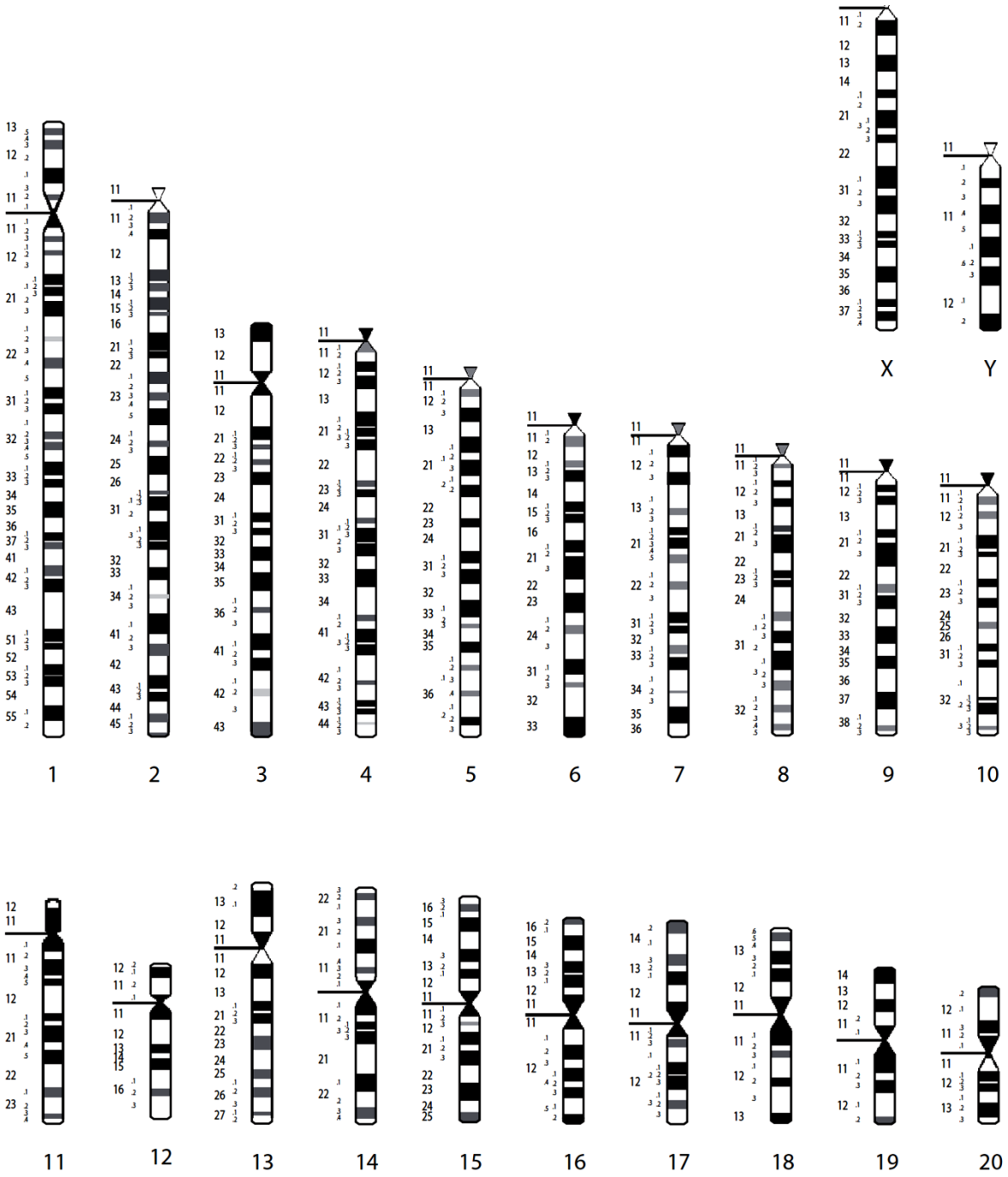
[196] - Hattori M, Sakamoto H, Satoh K, Yamamoto T: DNA demethylase is expressed in ovarian cancers and the expression correlates with demethylation of CpG sites in the promoter region of c-erbB-2 and survivin genes. *Cancer letters* 2001, 169(2):155-164.

[197] - Jjingo D, Conley AB, Yi SV, Lunyak VV, Jordan IK: On the presence and role of human gene-body DNA methylation. *Oncotarget* 2012, 3(4):462-474.

Anexos

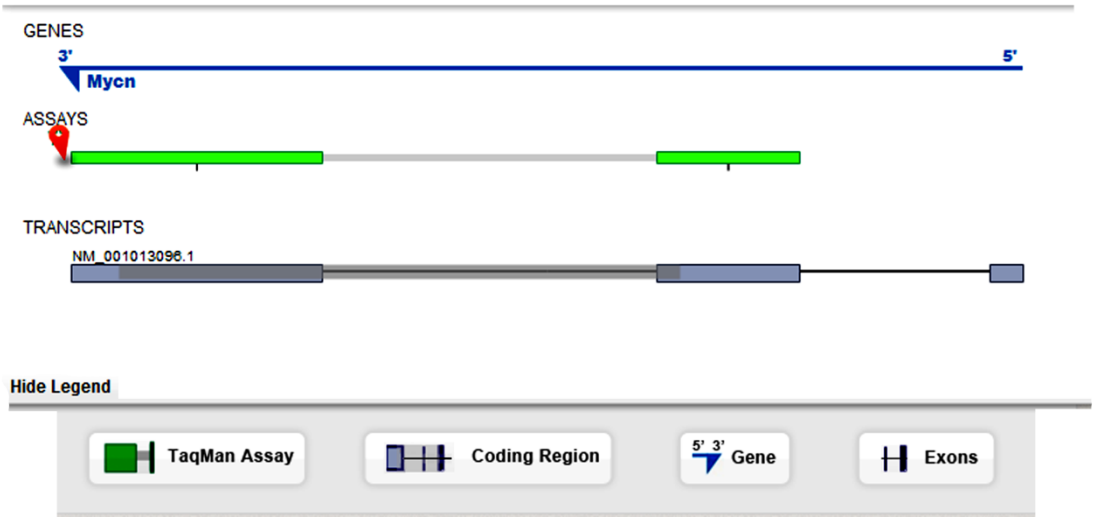
Anexos

Anexo 1 - Ideograma de *Rattus norvegicus* desenvolvido por Levan (1974) e completado por Hamta *et al* (2006). Retirado de Hamta *et al*, 2006.



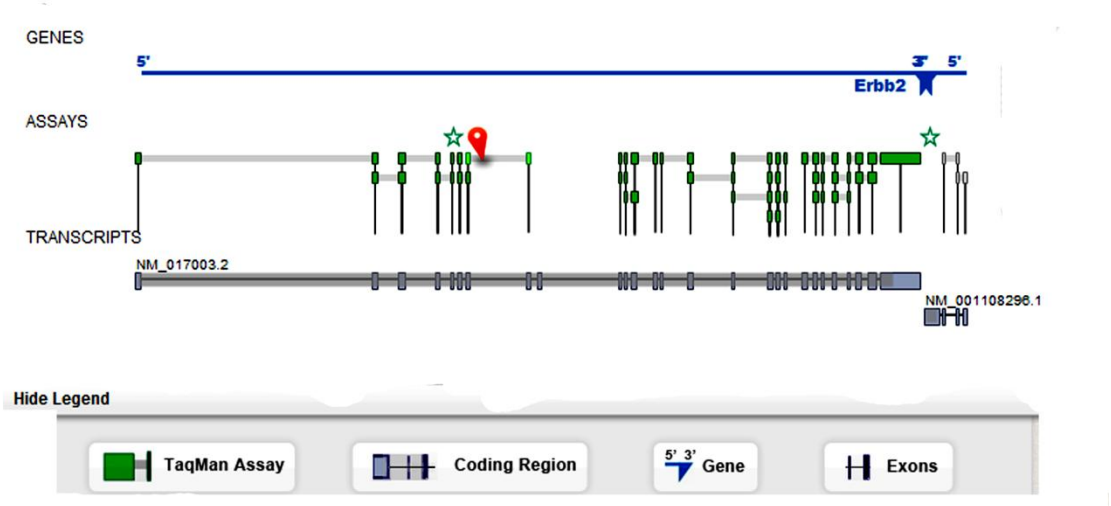
Anexo 2 - "TaqMan Gene Expression Assay" ("Applied Biosystem") para o gene *Mycn* (NP:001013096.1). Na imagem pode ser consultado o tamanho do amplicão esperado e a localização da região a amplificar.

Interrogated Sequence		Translated Protein	Exon Boundary	Assay Location	Amplicon Length
RefSeq	NM_001013096.1	NP_001013114.1	2 - 3	1075	95



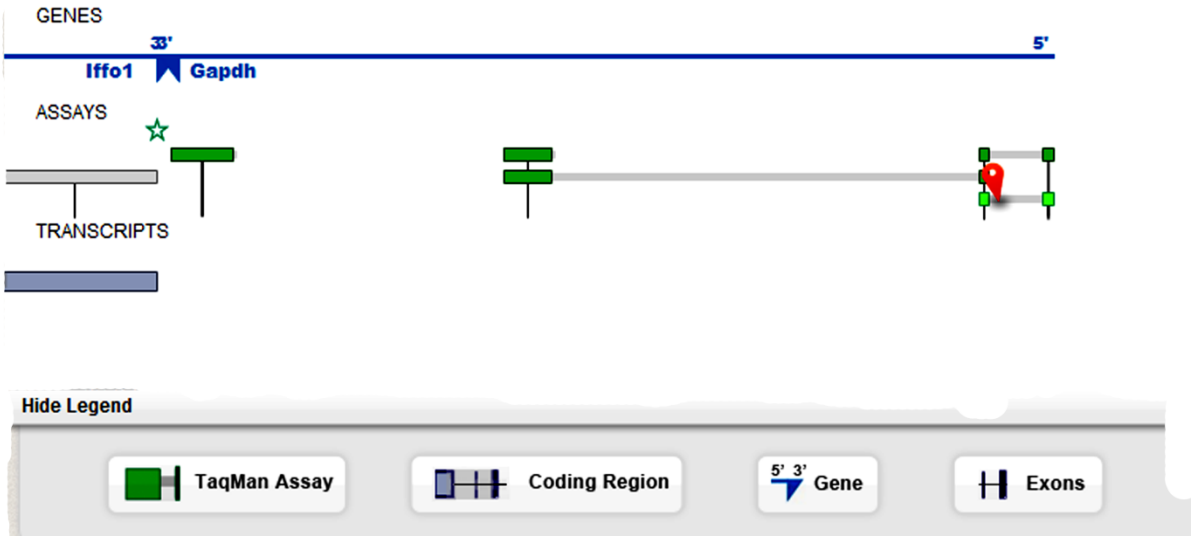
Anexo 3 - "TaqMan Gene Expression Assay" ("Applied Biosystem") para o gene *Erbb2* (NM_017003.2). Na imagem pode ser consultado o tamanho do amplicão esperado e a localização da região a amplificar.

Interrogated Sequence		Translated Protein	Exon Boundary	Assay Location	Amplicon Length
RefSeq	NM_017003.2	NP_058699.2	7 - 8	1019	74
GenBank mRNA	AY116182.1	-	7 - 8	1019	74
	BC061863.1	-	7 - 8	1091	74
	X03362.1	-	7 - 8	930	74

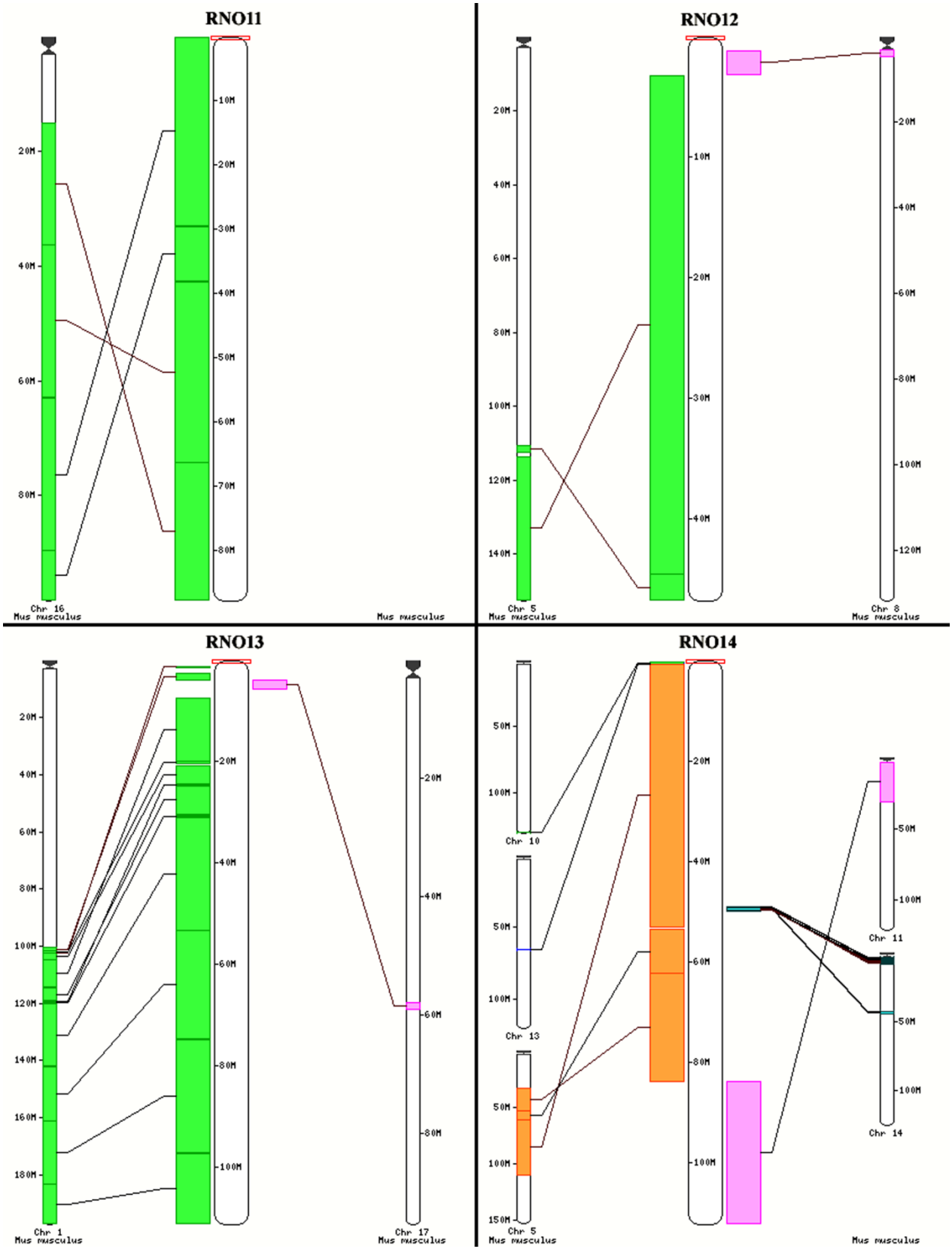


Anexo 4 - "TaqMan Gene Expression Assay" ("Applied Biosystem") para o gene *Gapdh2* (NM_017008.3). Na imagem pode ser consultado o tamanho do amplicão esperado e a localização da região a amplificar.

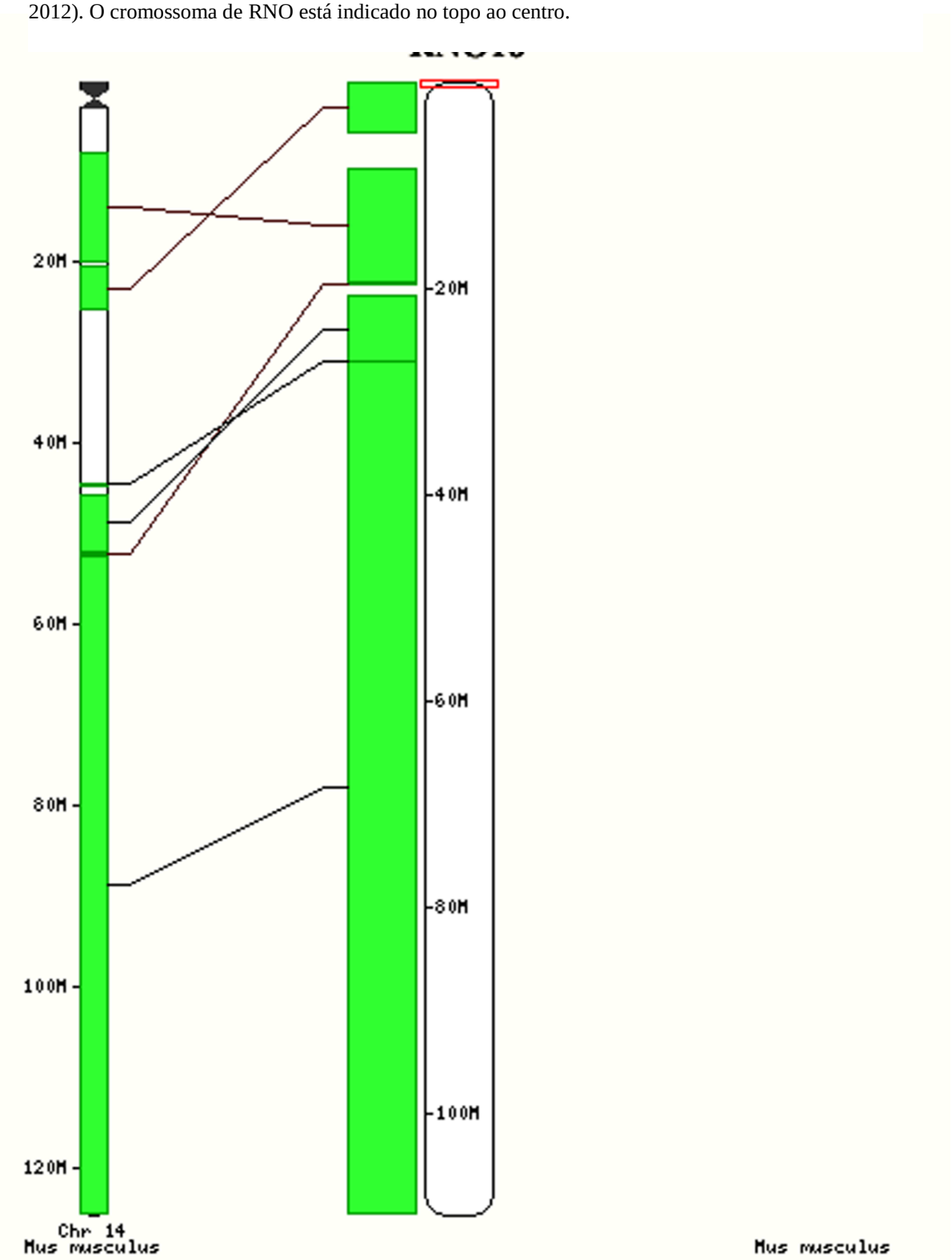
RefSeq	NM_017008.3	NP_058704.1	1 - 1	55	60
GenBank mRNA	BC059110.1	-	1 - 1	55	60
	X02231.1	-	1 - 2	50	60



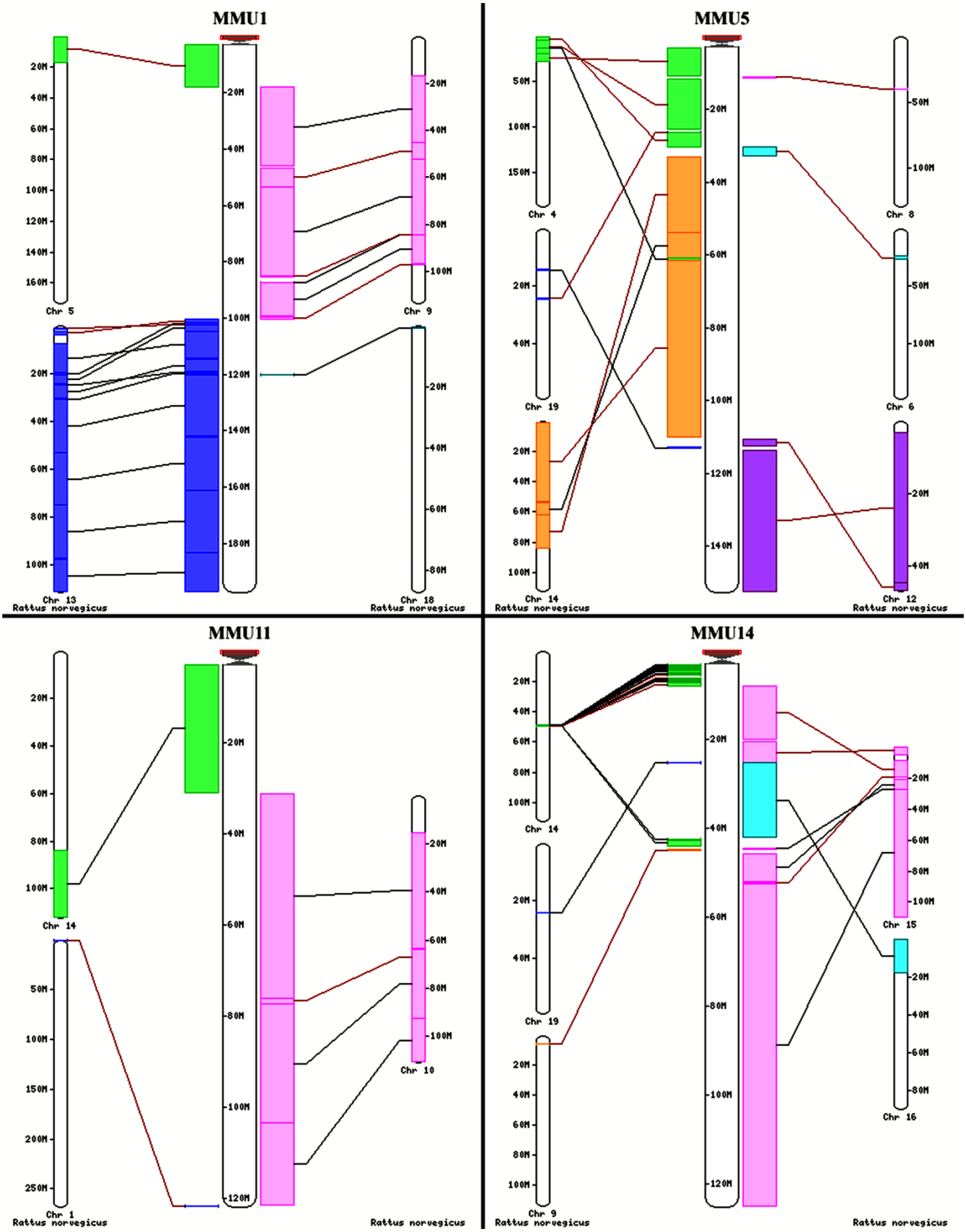
Anexo 5 - Mapa sinténico entre RNO e MMU. Retirado da base de dados Ensembl ("release" 69, 2012). Os cromossomas de RNO estão indicados no topo ao centro.



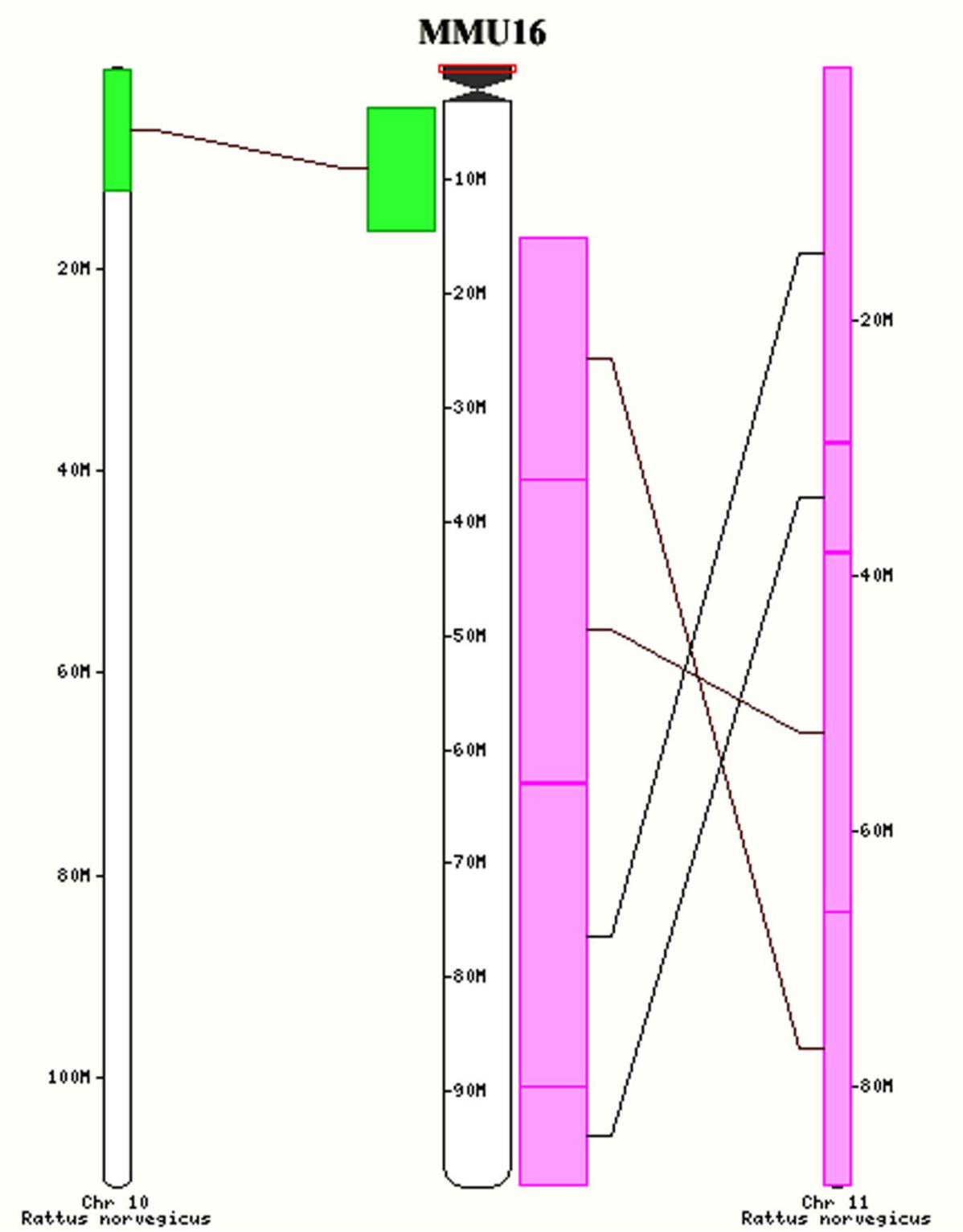
Anexo 6 - Mapa sinténico entre RNO e MMU. Retirado da base de dados Ensembl ("release" 69, 2012). O cromossoma de RNO está indicado no topo ao centro.



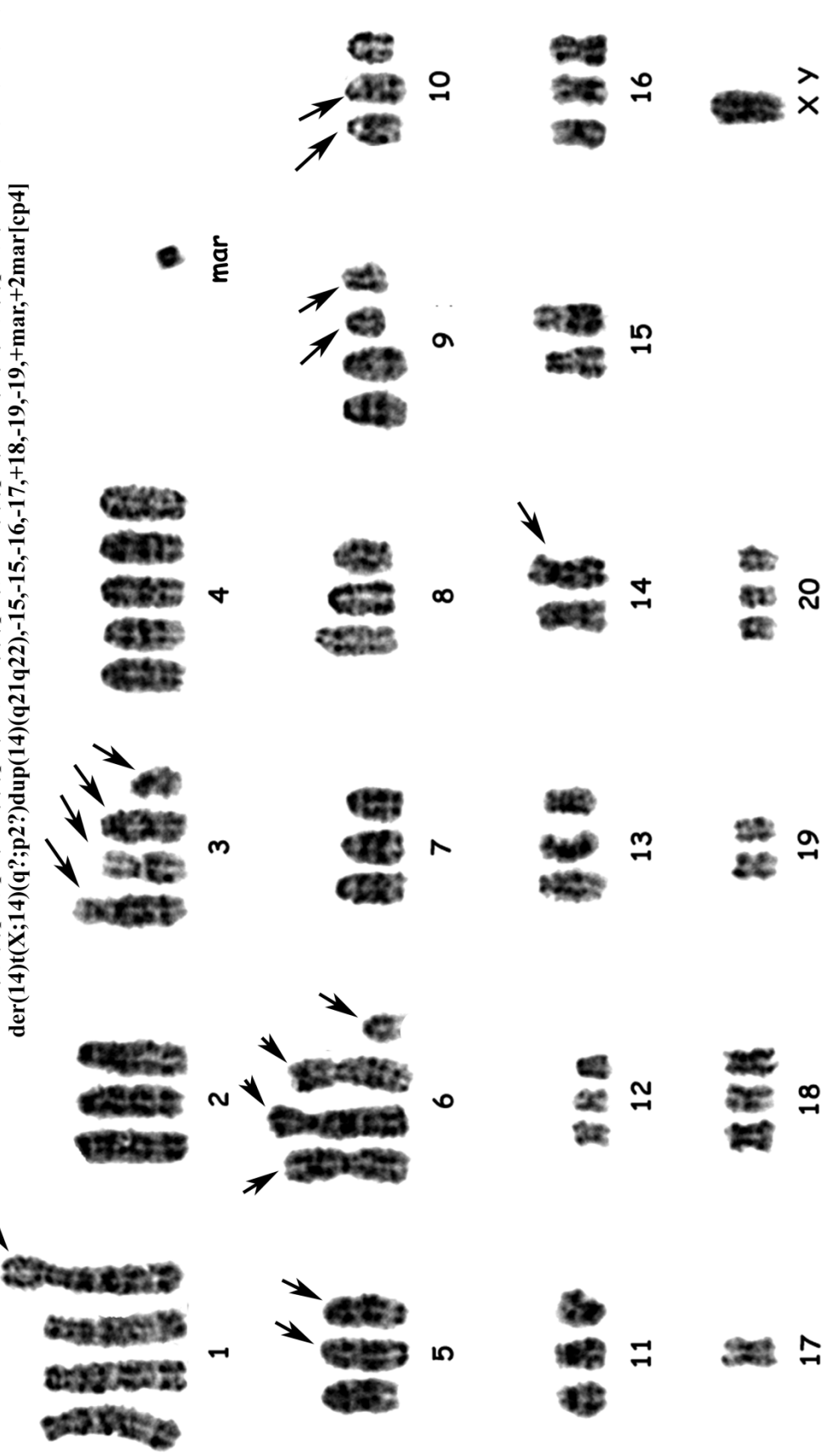
Anexo 7 - Mapa sinténico entre MMU e RNO. Retirado da base de dados Ensembl ("release" 69, 2012). Os cromossomas de MMU estão indicados no topo ao centro.



Anexo 8 - Mapa sinténico entre MMU e RNO. Retirado da base de dados Ensembl ("release" 69, 2012). O cromossoma de MMU está indicado no topo ao centro.

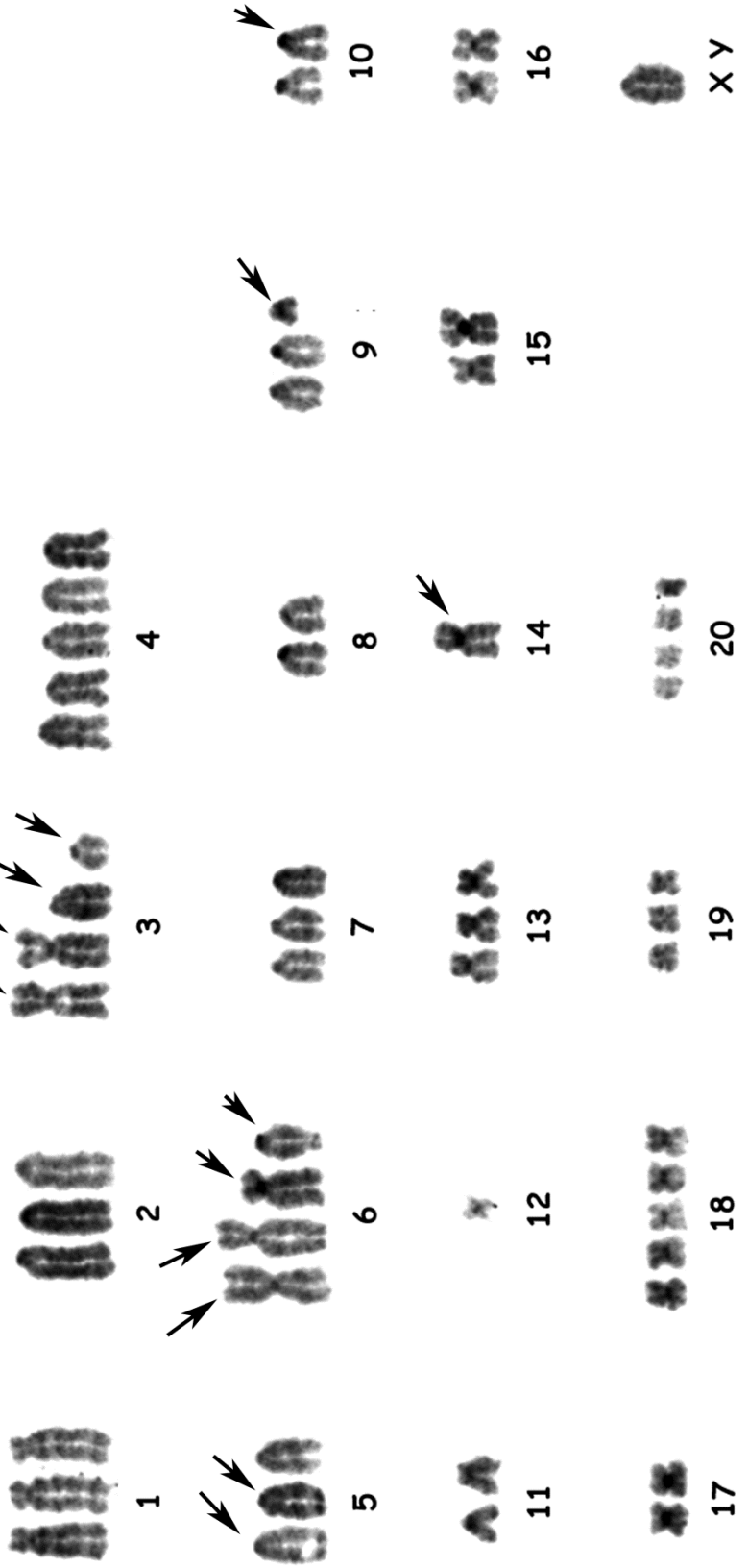


Anexo 9 - Cariótipo representativo do subclone A, da linha CLS-ACI-1. Cromossomas sujeitos a bandeamento-GTG. Os cromossomas rearranjados encontram-se assinalados pelas setas pretas.

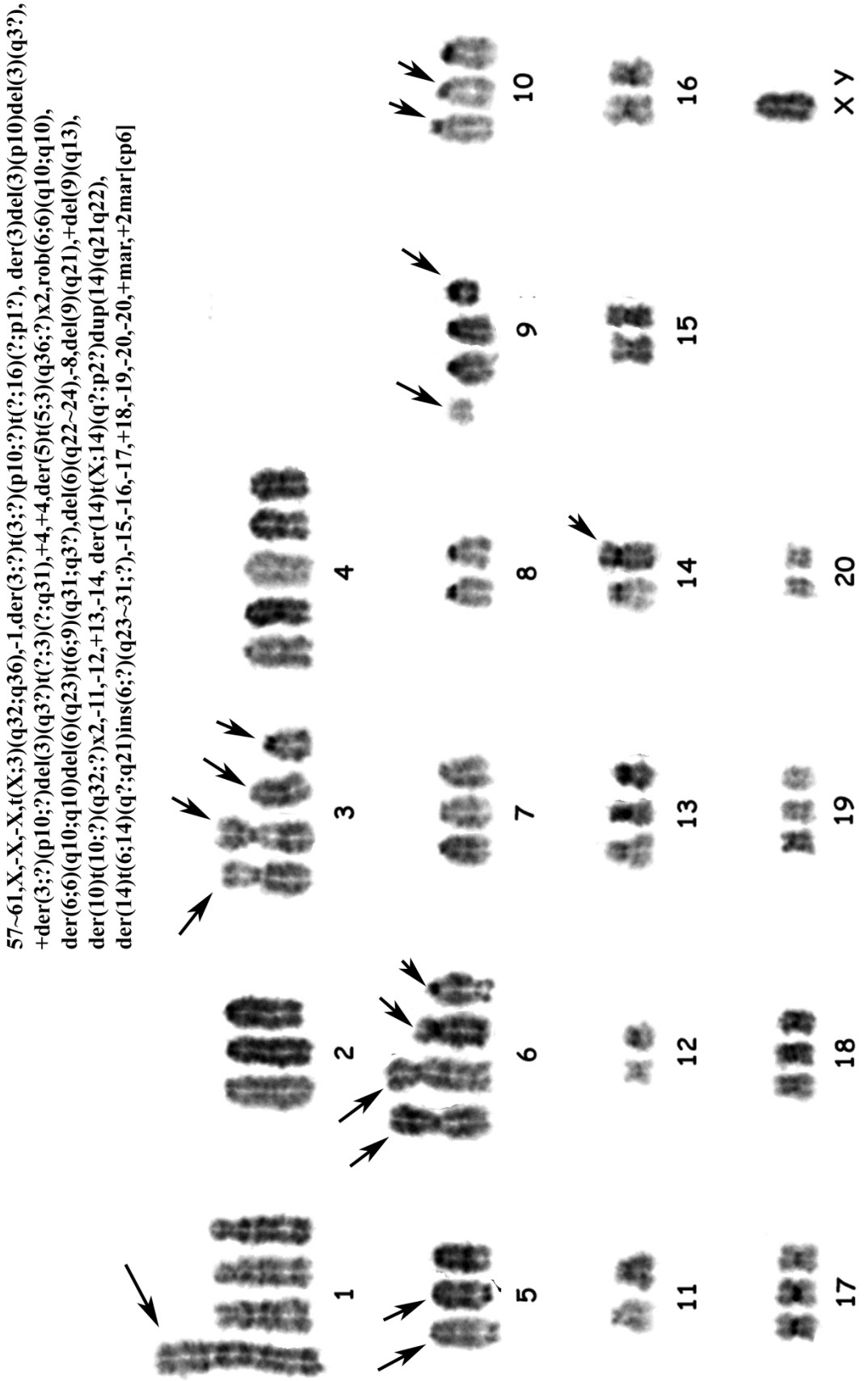


Anexo 10 - Cariótipo representativo do subclone B, da linha CLS-ACI-1. Cromossomas sujeitos a bandeamento por restrição *in situ* com a enzima PstI. Os cromossomas rearranjados encontram-se assinalados pelas setas pretas.

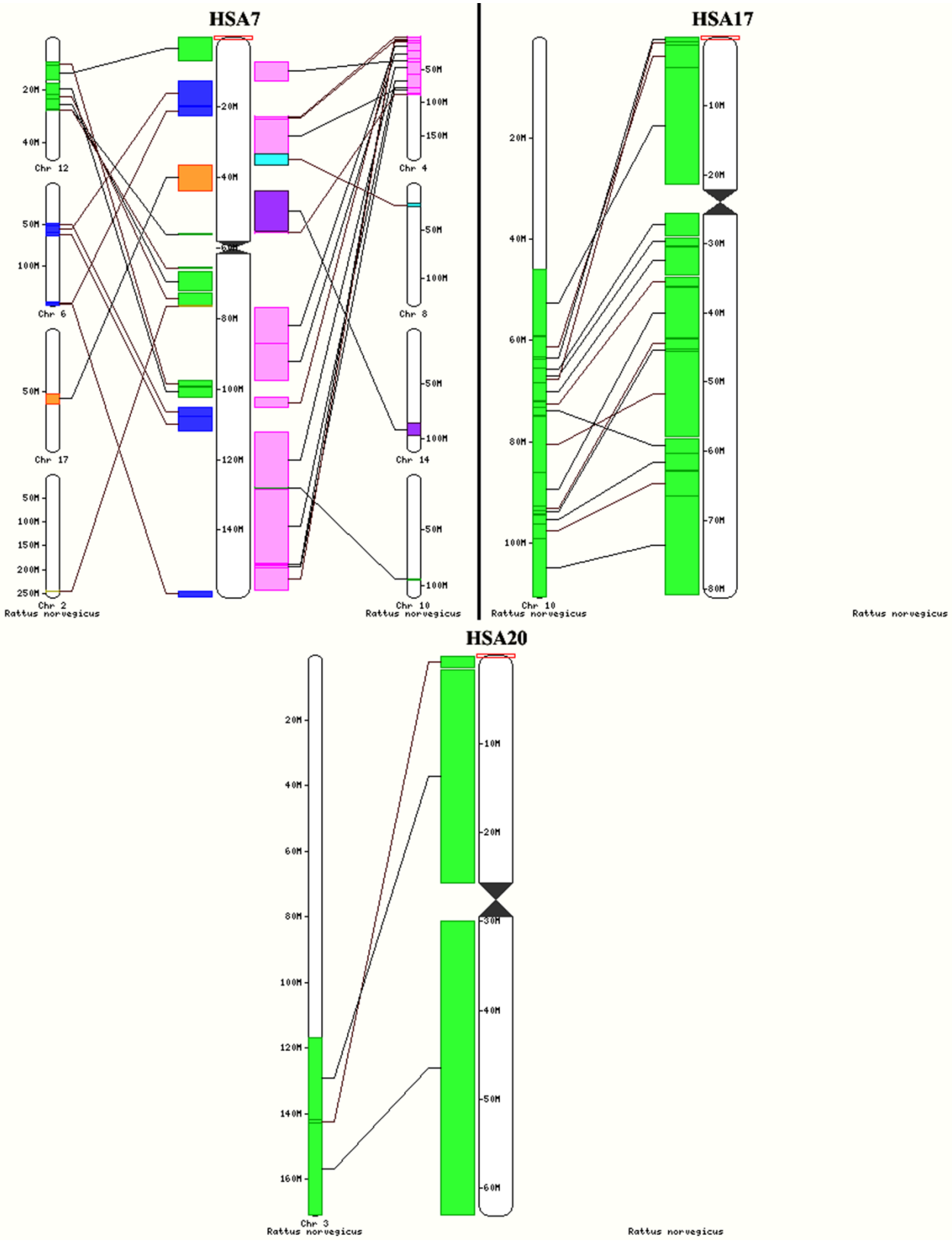
58~62,X,-X,-X,t(X;3)(q32;q36),der(1)t(1;3)(p13;q35)t(1;6)(q55;?), der(3;?)t(3;?)(p10;?)t(?;16)(?;p1?), der(3)del(3)(p10)del(3)(q3?),+der(3;?)(p10;?)del(3)(q3?)t(?;3)(?;q31),+4,+4,der(5)t(5;3)(q36;?)x2,rob(6;6)(q10;q10 der(6;6)(q10;q10)del(6)(q23)t(6;9)(q31;q3?), del(6)(q22~24),+der(6;6)(q10;q10)del(6)(q1?),-8,-8,del(9)(q21), +del(9)(q13),der(10)t(10;?)(q32;?)x2,-11,-11,-12,-12,-14,-14,der(14)t(X;14)(q?;p2?)dup(14)(q21q22), -15, -15,-16,+mar[cp4]



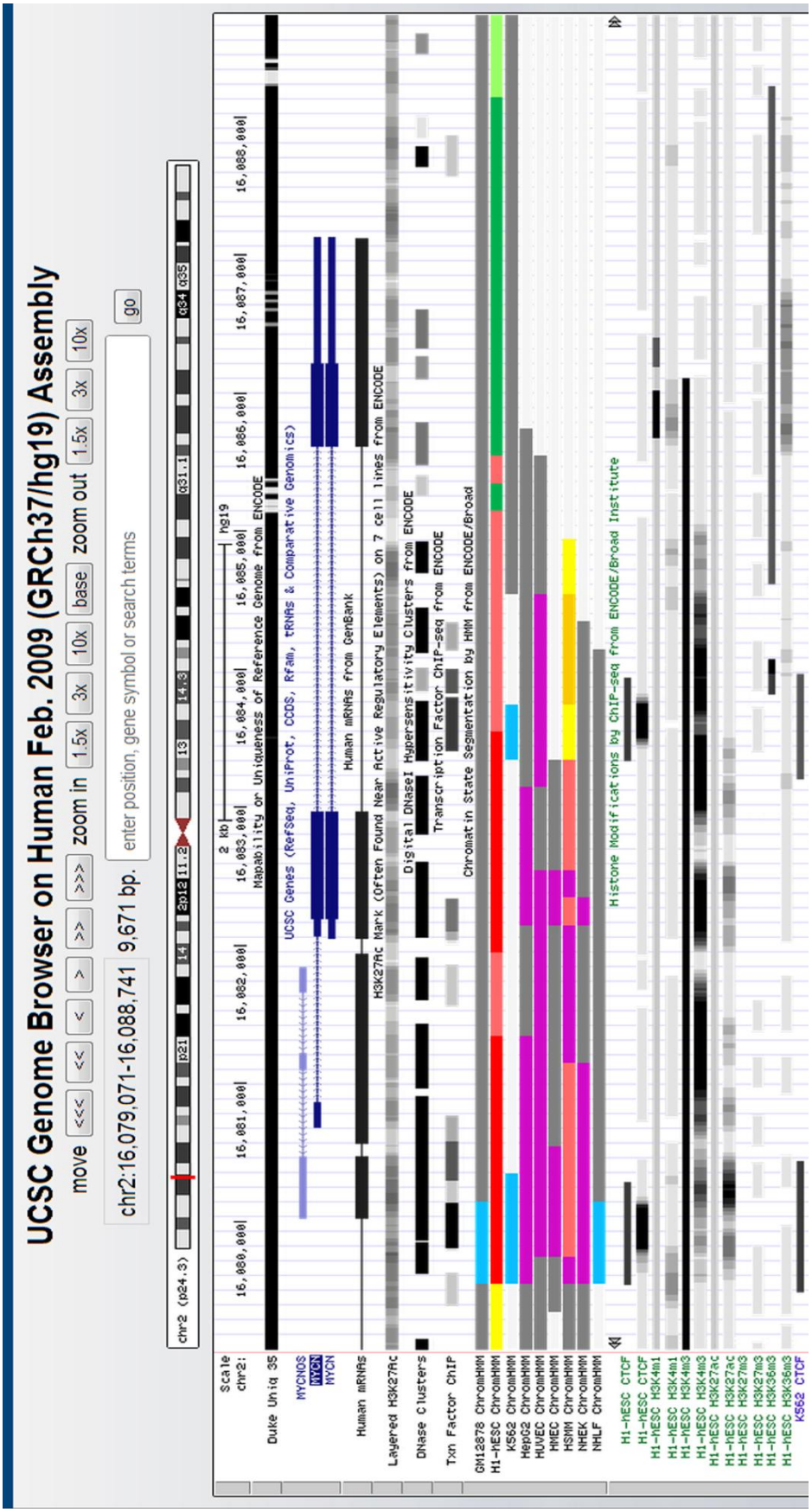
Anexo 11 - Cariótipo representativo do subclone C, da linha CLS-ACI-1. Cromossomas sujeitos a bandeamento por restrição *in situ* com a enzima PstI. Os cromossomas rearranjados encontram-se assinalados pelas setas pretas.



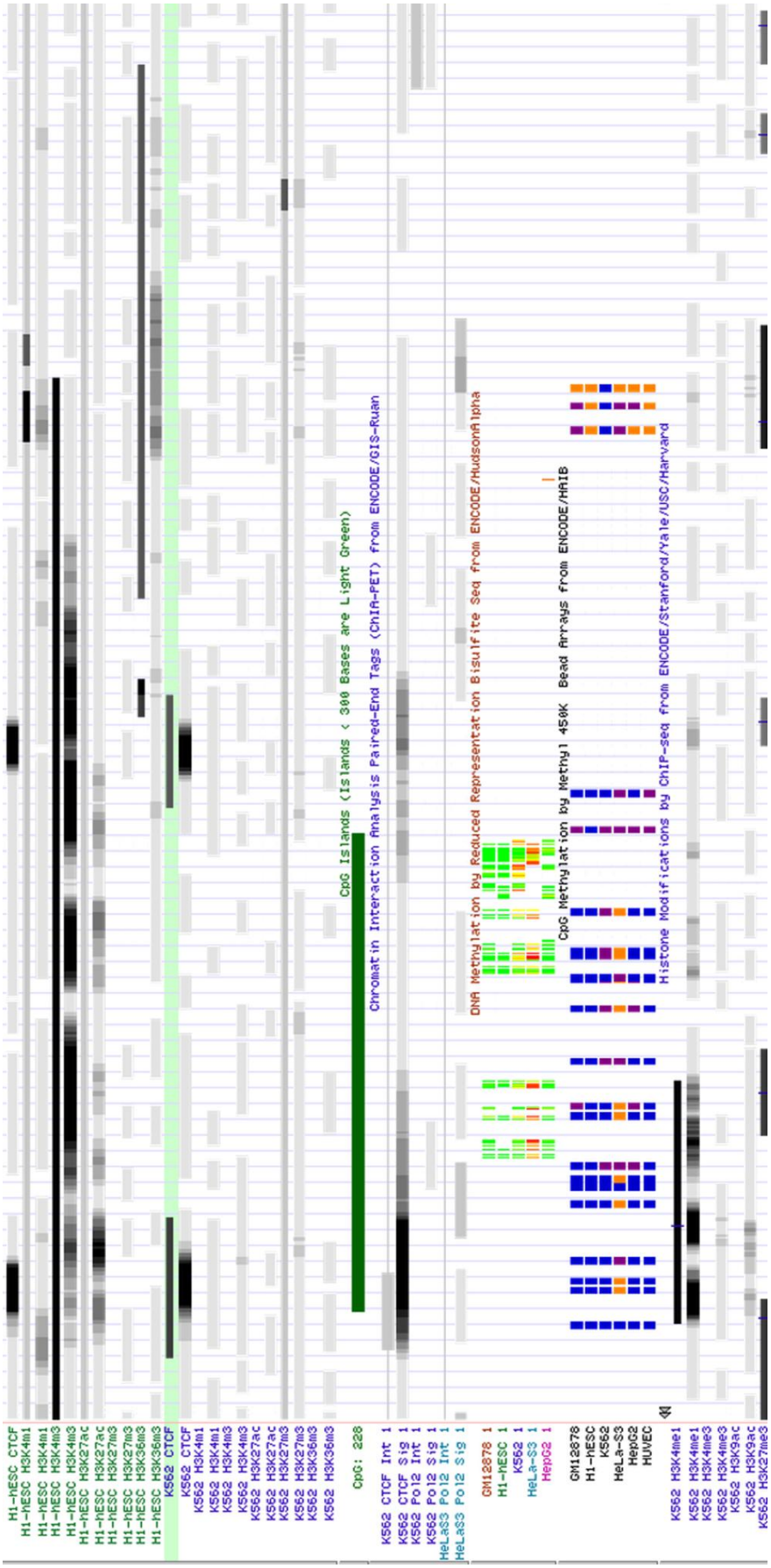
Anexo 12 - Mapa sinténico entre HSA e RNO. Retirado da base de dados Ensembl ("release" 69, 2012). Os cromossomas de HSA estão indicados no topo ao centro.



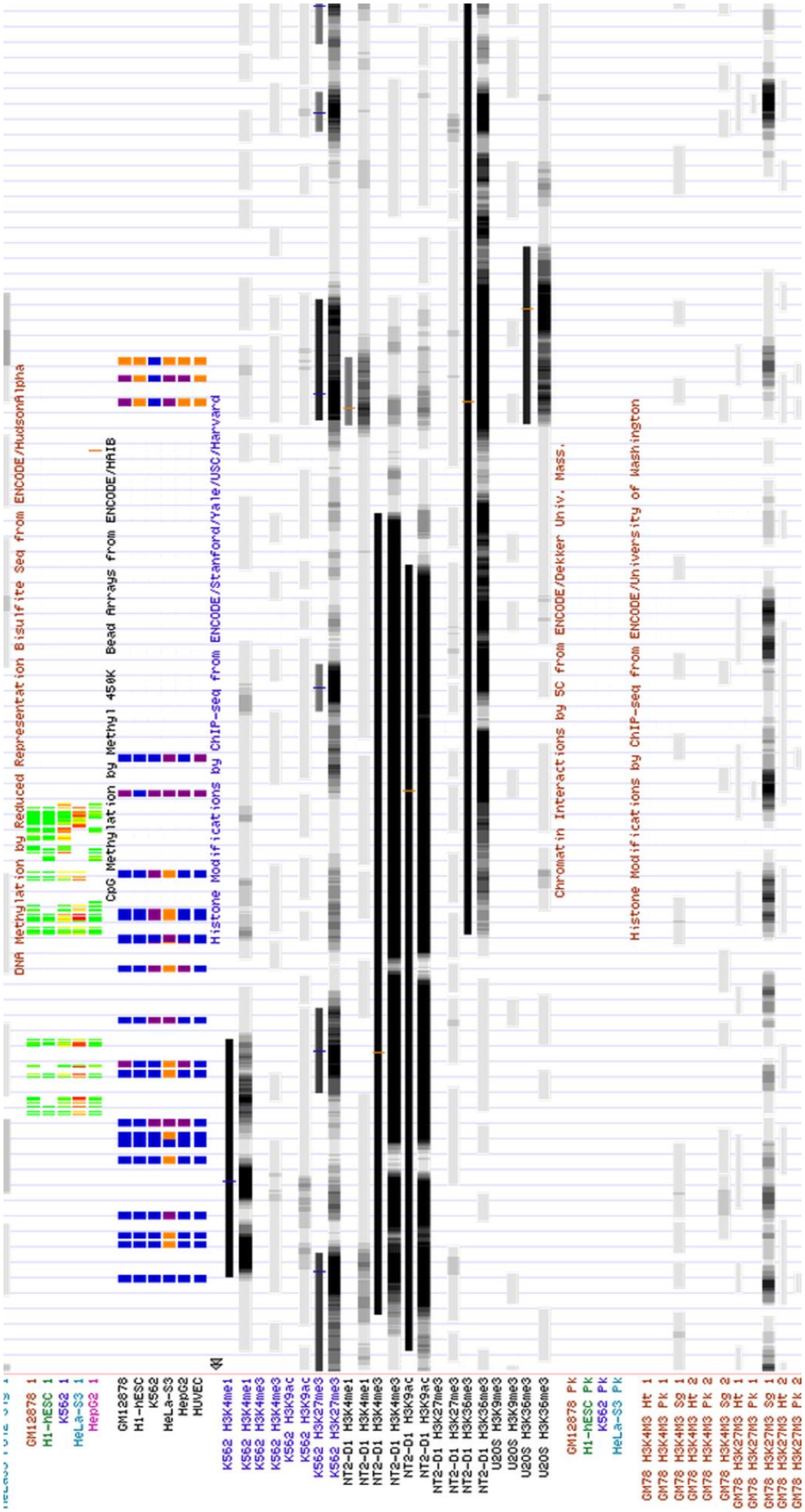
Anexo 13 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *MYCN* em HSA (parte 1). Retirado de UCSC-ENCODE (2012).



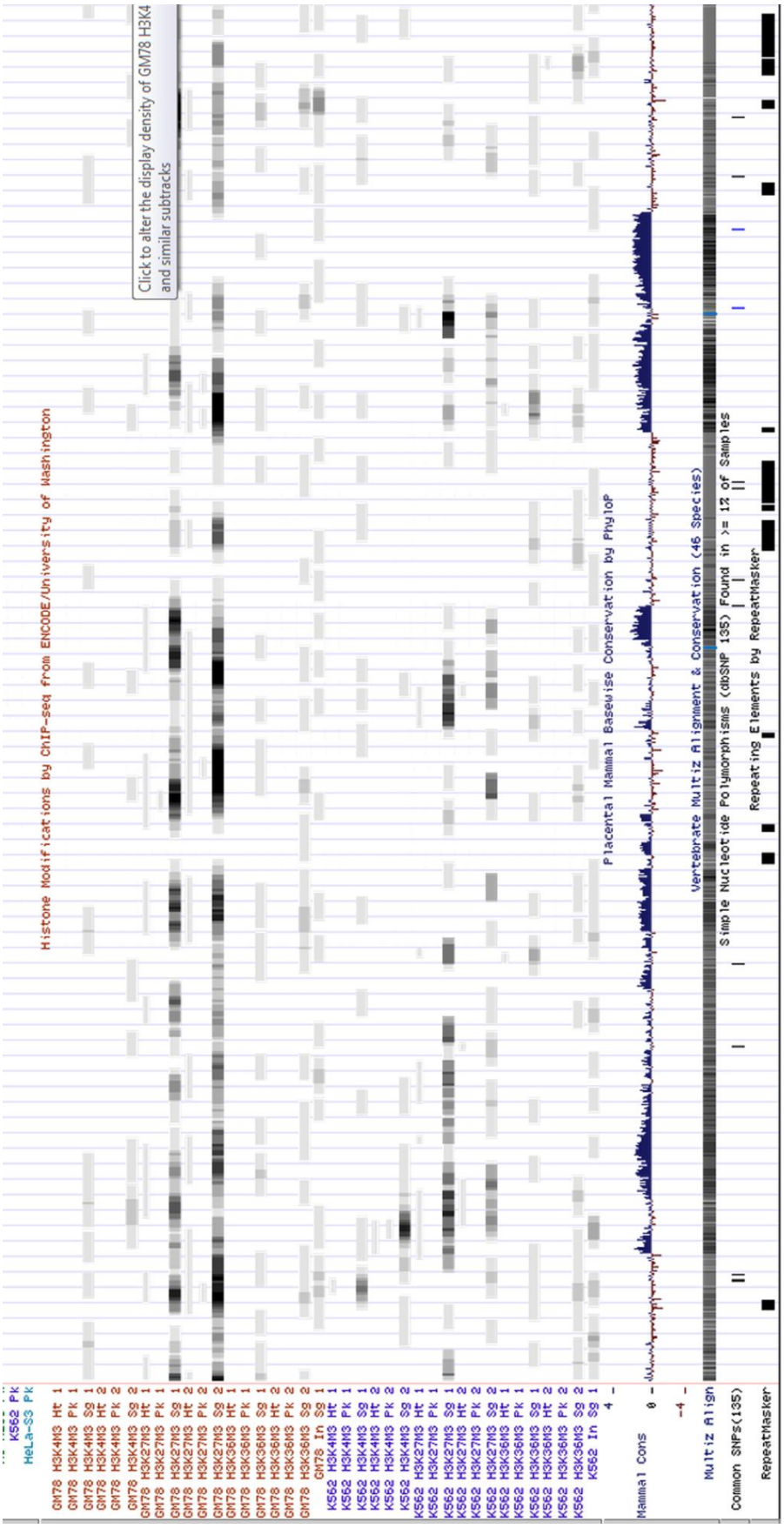
Anexo 14 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *MYCN* em HSA (parte 2). Retirado de UCSC-ENCODE (2012).



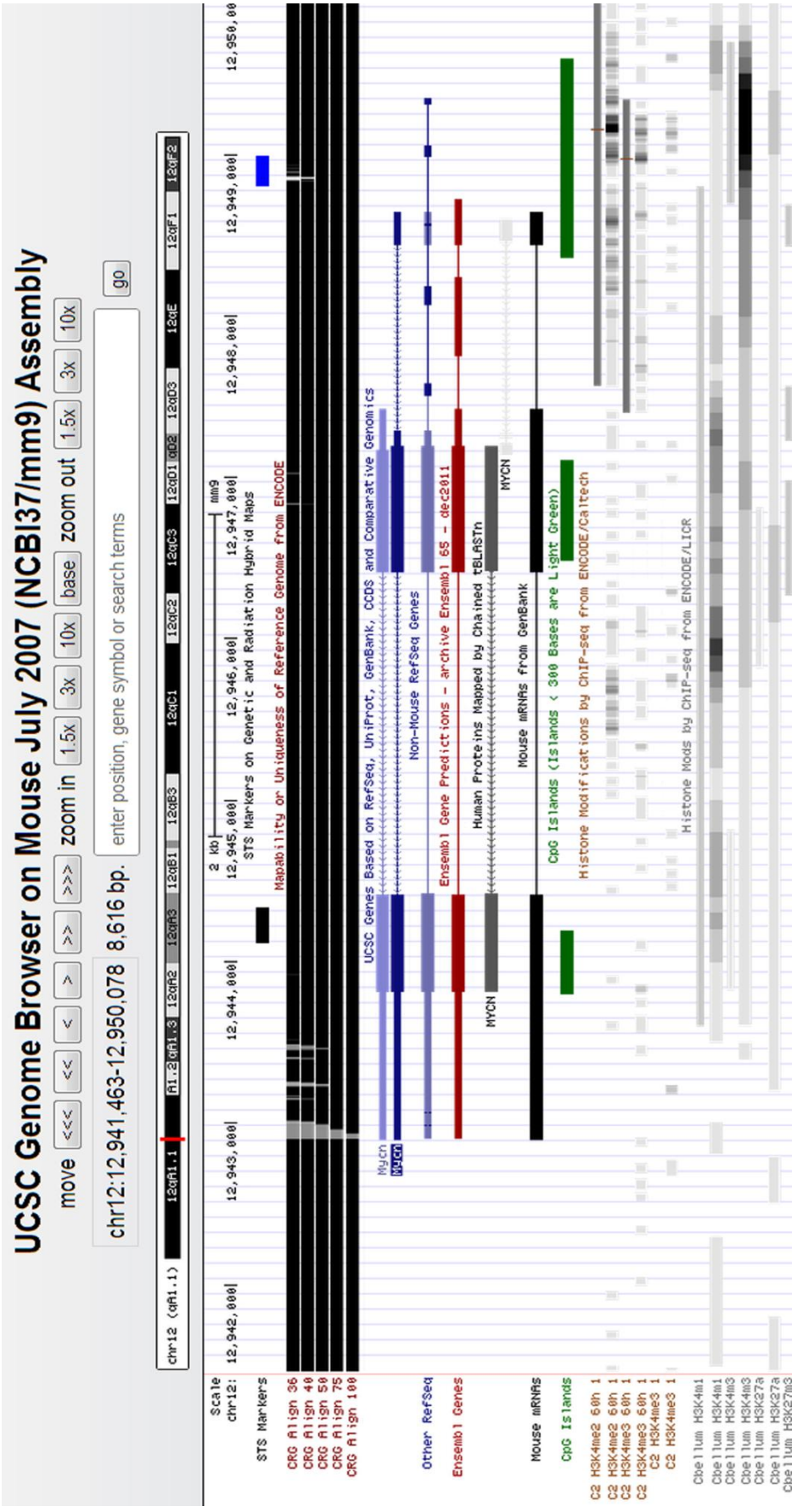
Anexo 15 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *MYCN* em HSA (parte 3). Retirado de UCSC-ENCODE (2012).



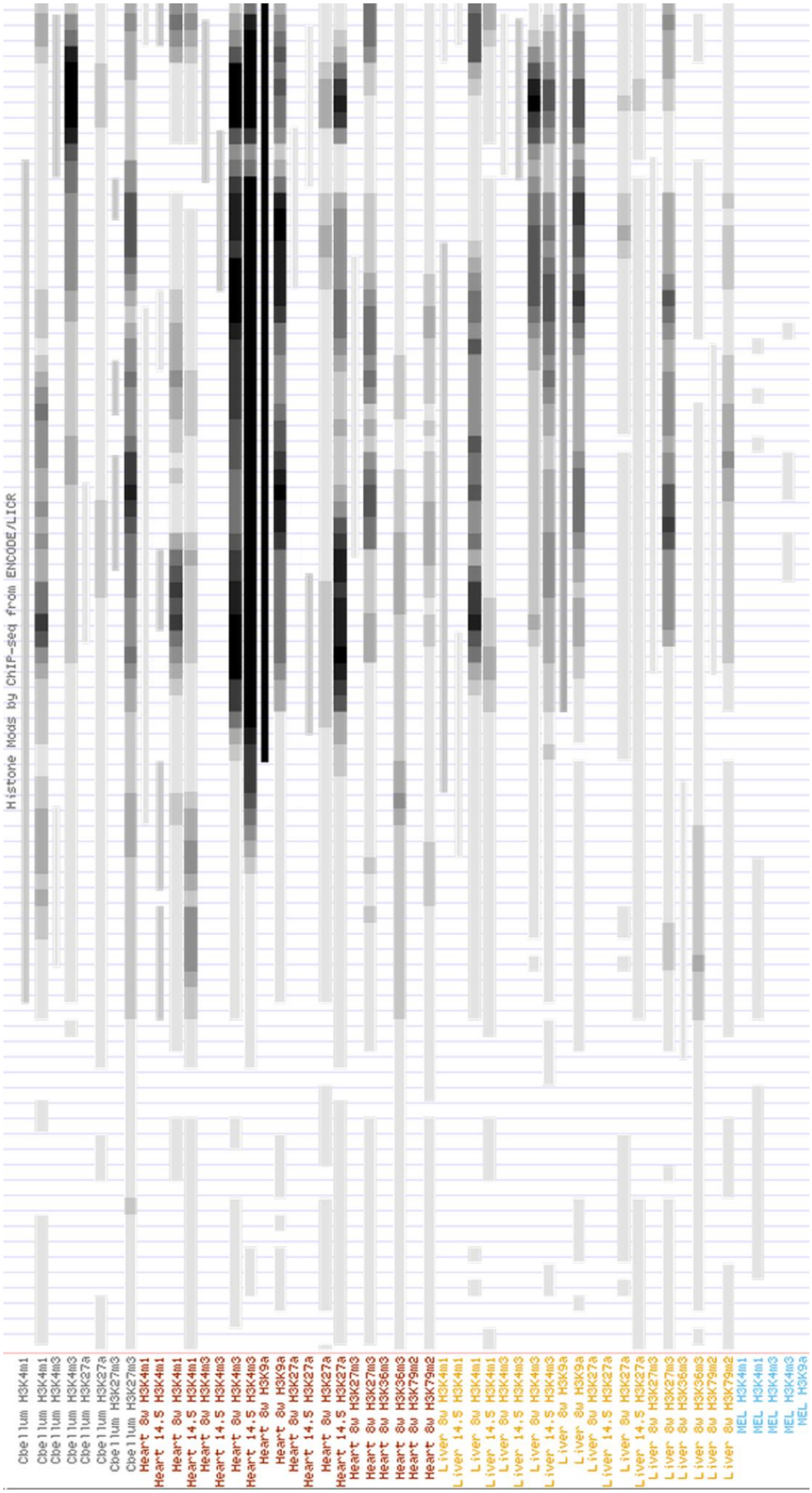
Anexo 16 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *MYCN* em HSA (parte 4). Retirado de UCSC-ENCODE (2012).



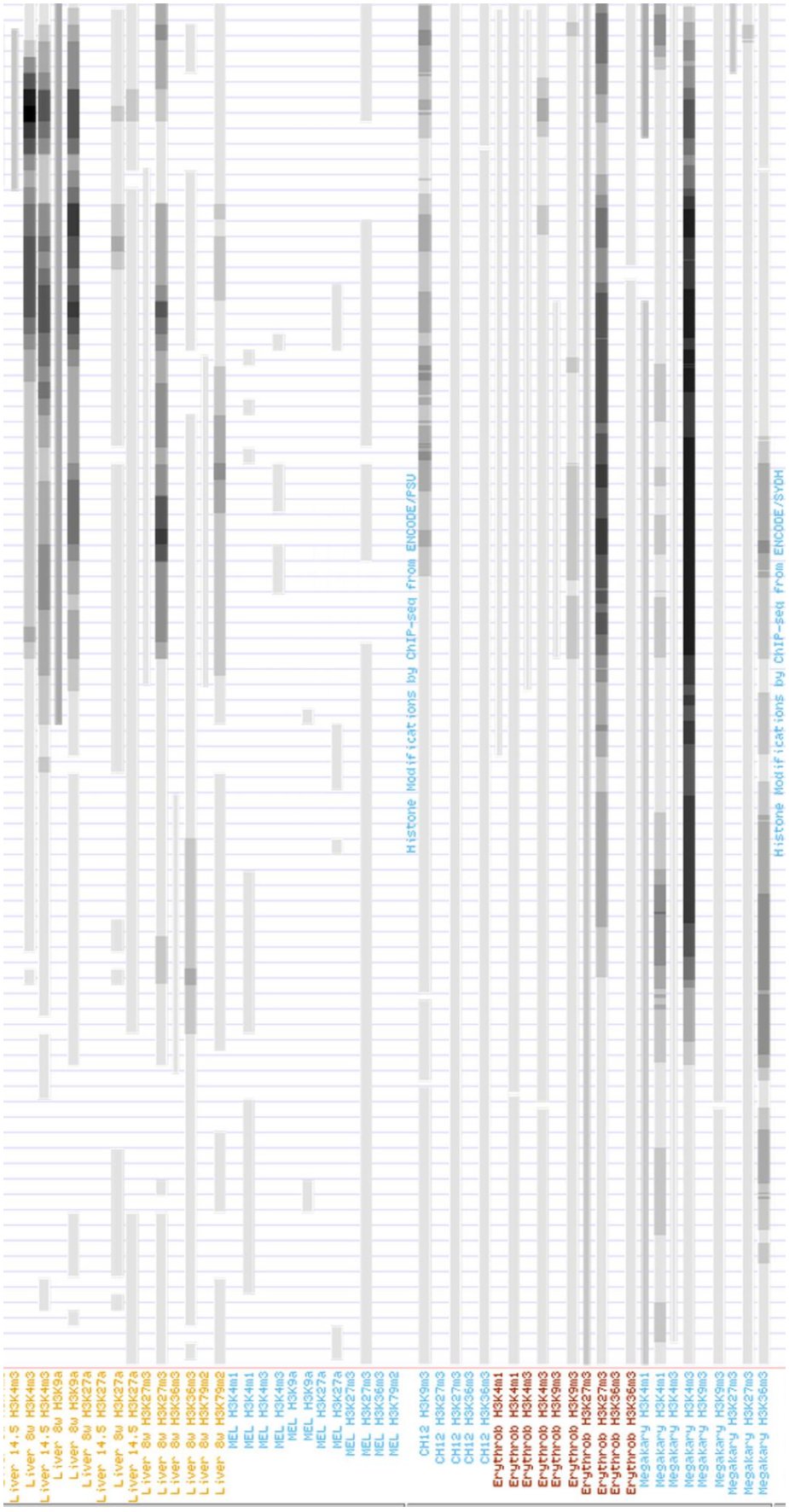
Anexo 17 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *Mycn* em MMU (parte 1). Retirado de UCSC-ENCODE (2012).



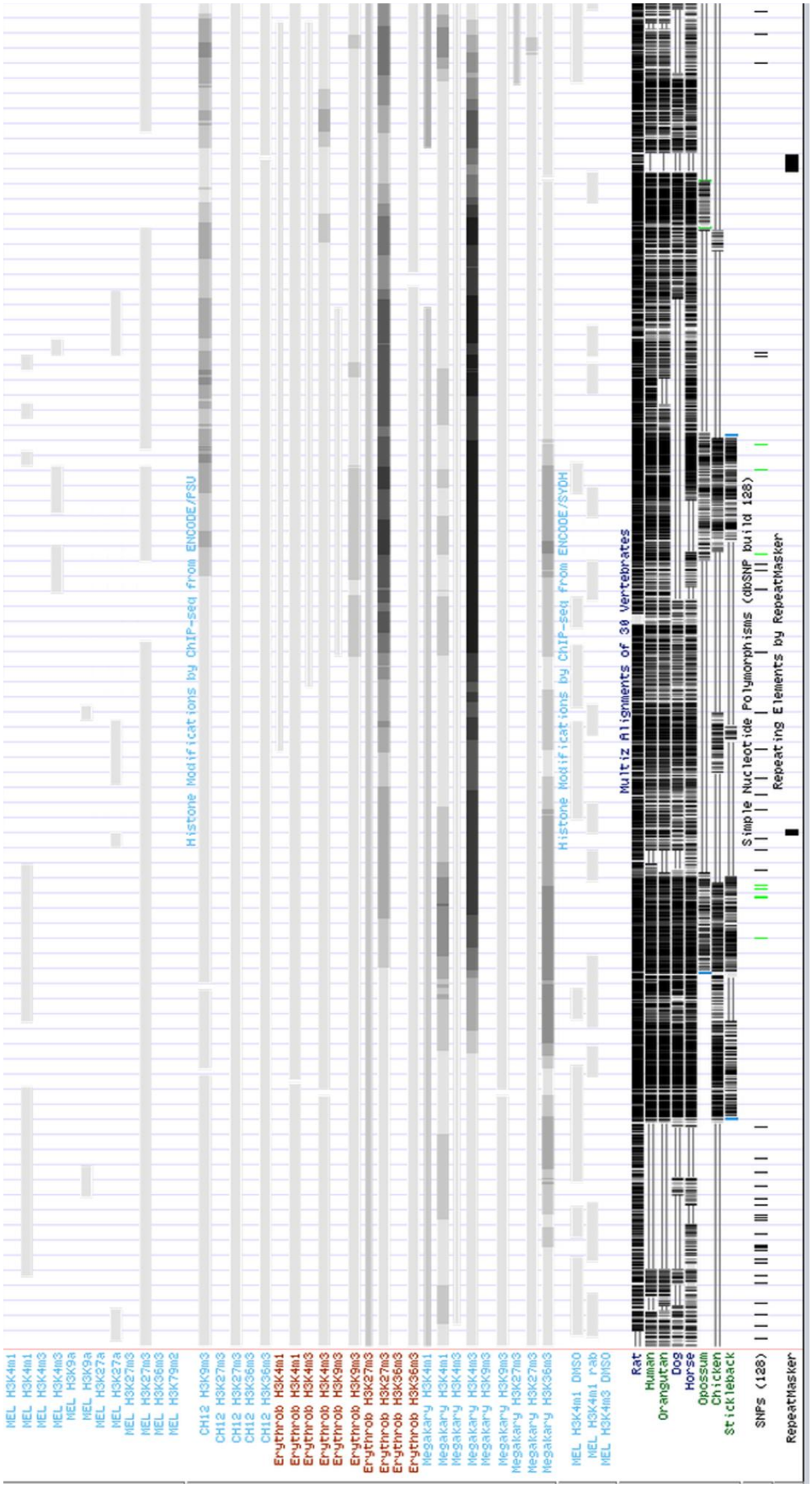
Anexo 18 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *Mycn* em MMU (parte 2). Retirado de UCSC-ENCODE (2012).



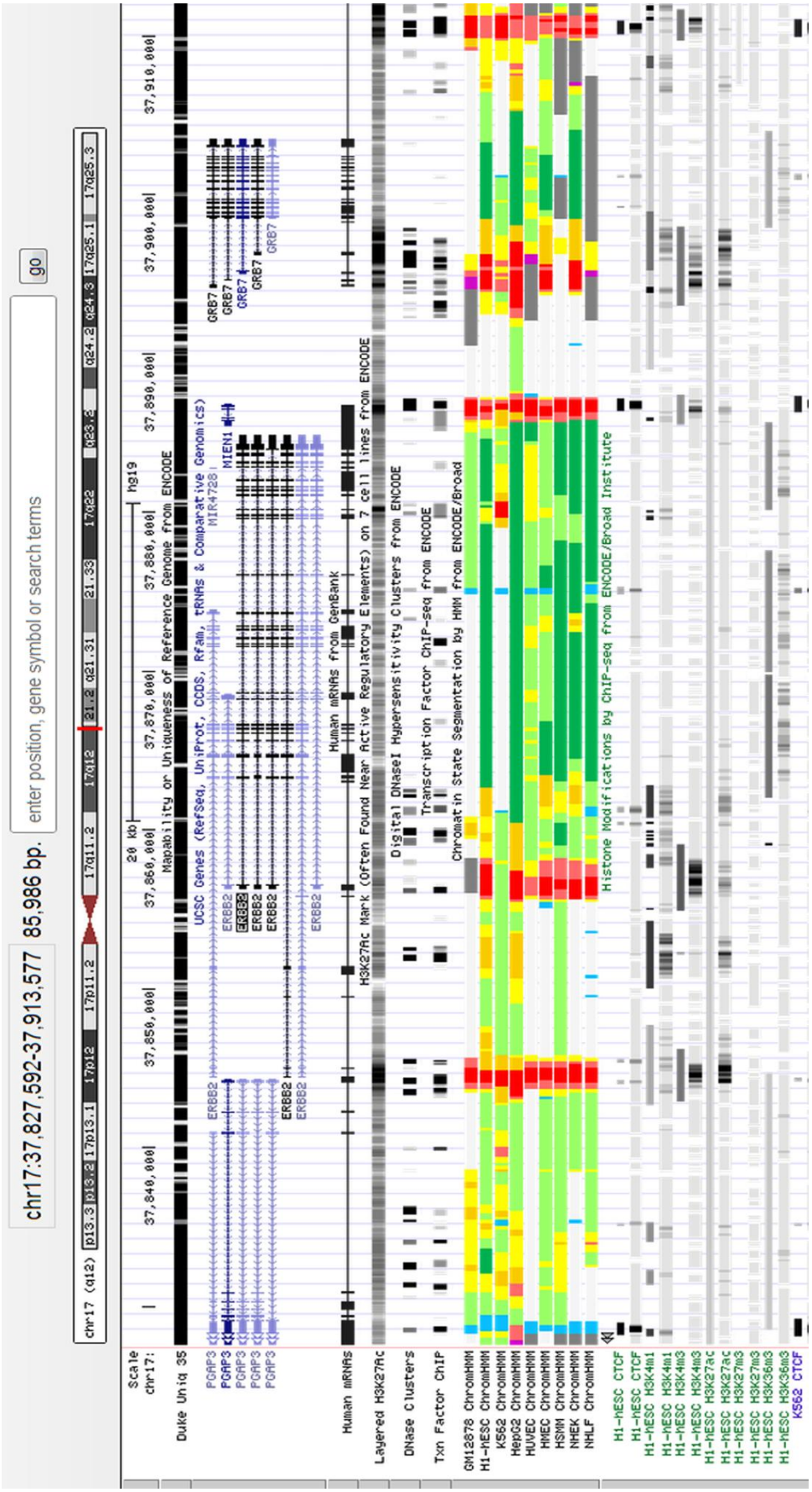
Anexo 19- Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *Mycn* em MMU (parte 3). Retirado de UCSC-ENCODE (2012).



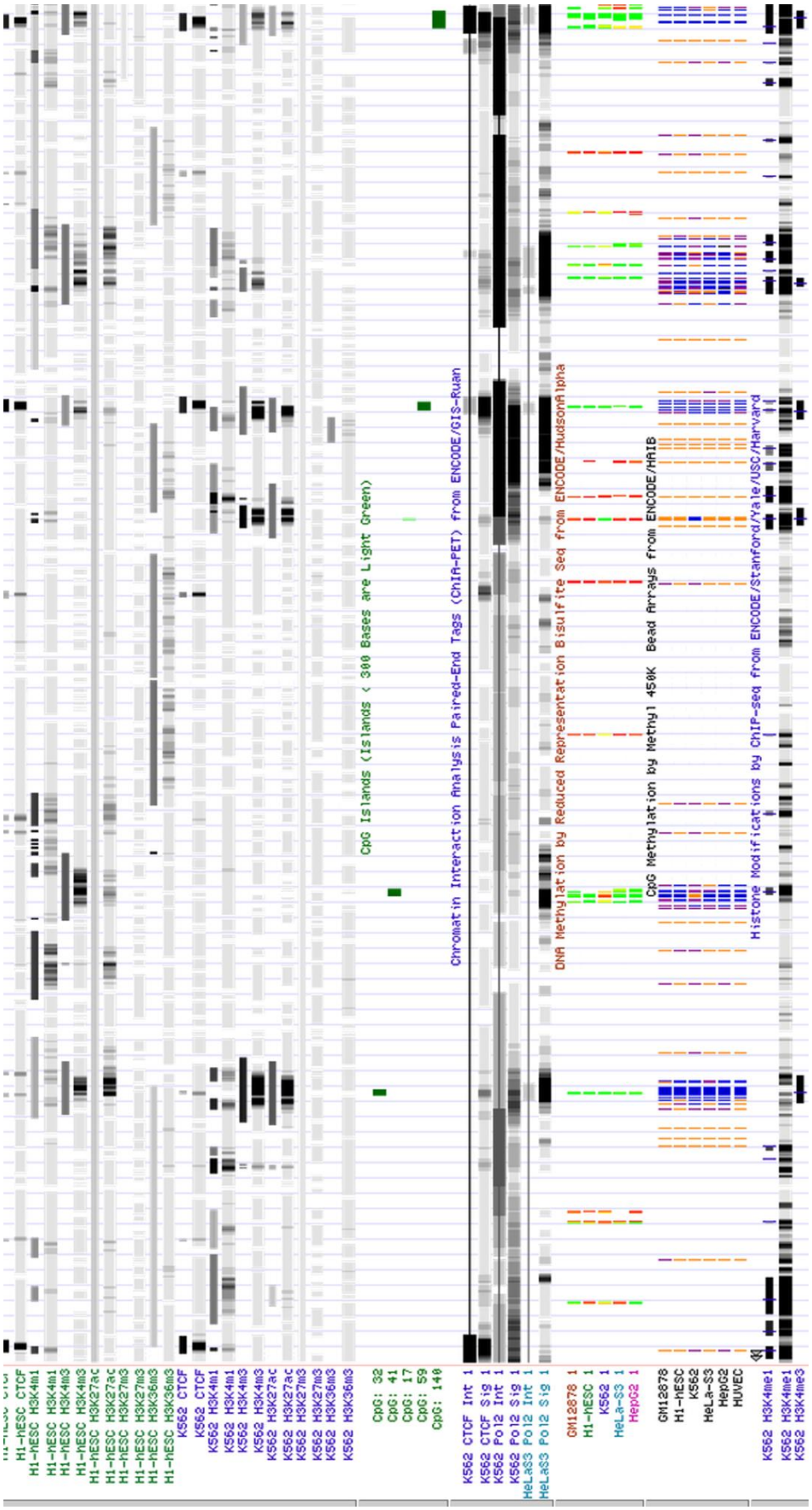
Anexo 20 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *Mycn* em MMU (parte 4). Retirado de UCSC-ENCODE (2012).



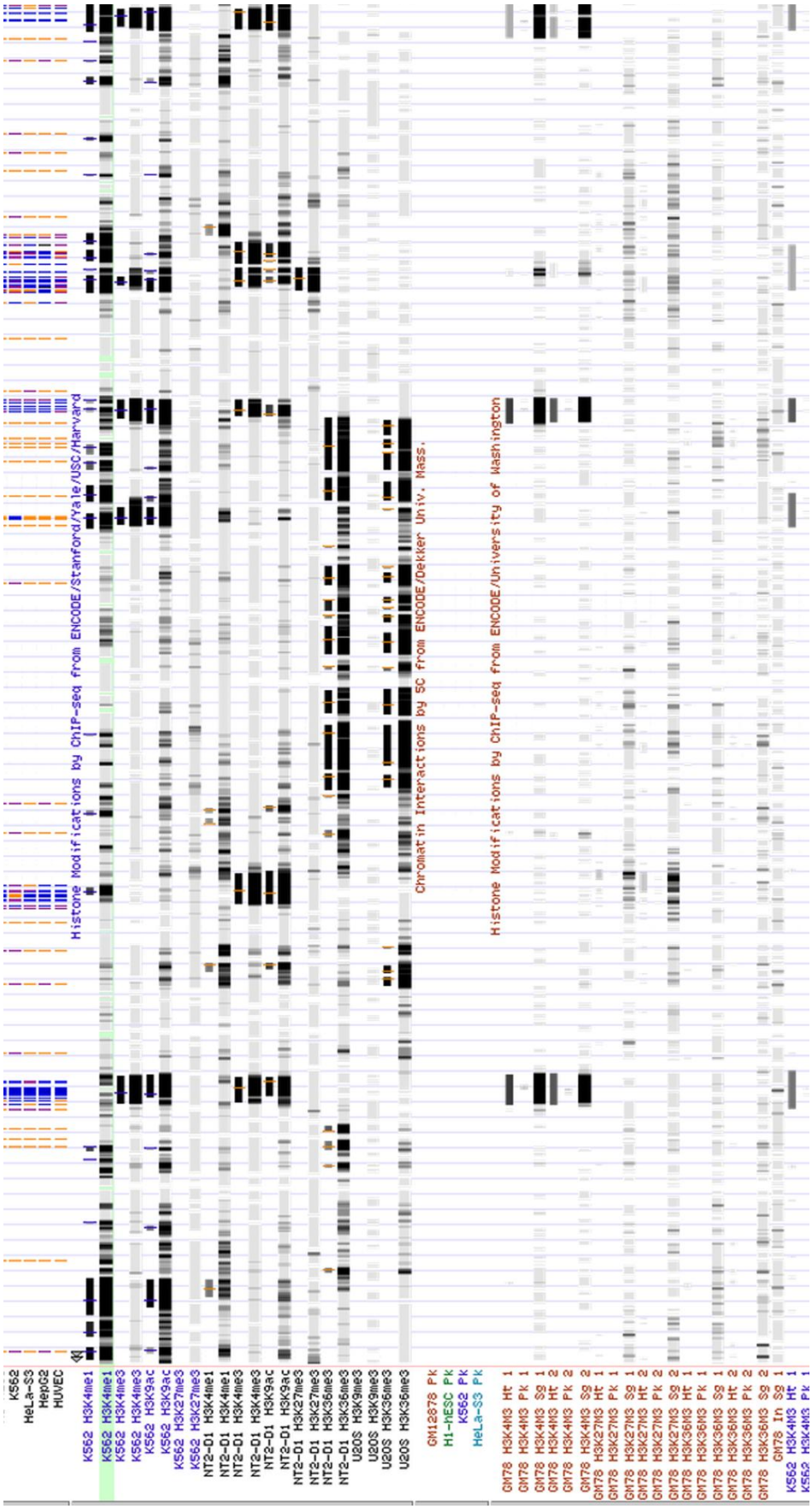
Anexo 21 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *ERBB2* em HSA (parte 1). Retirado de UCSC-ENCODE (2012).



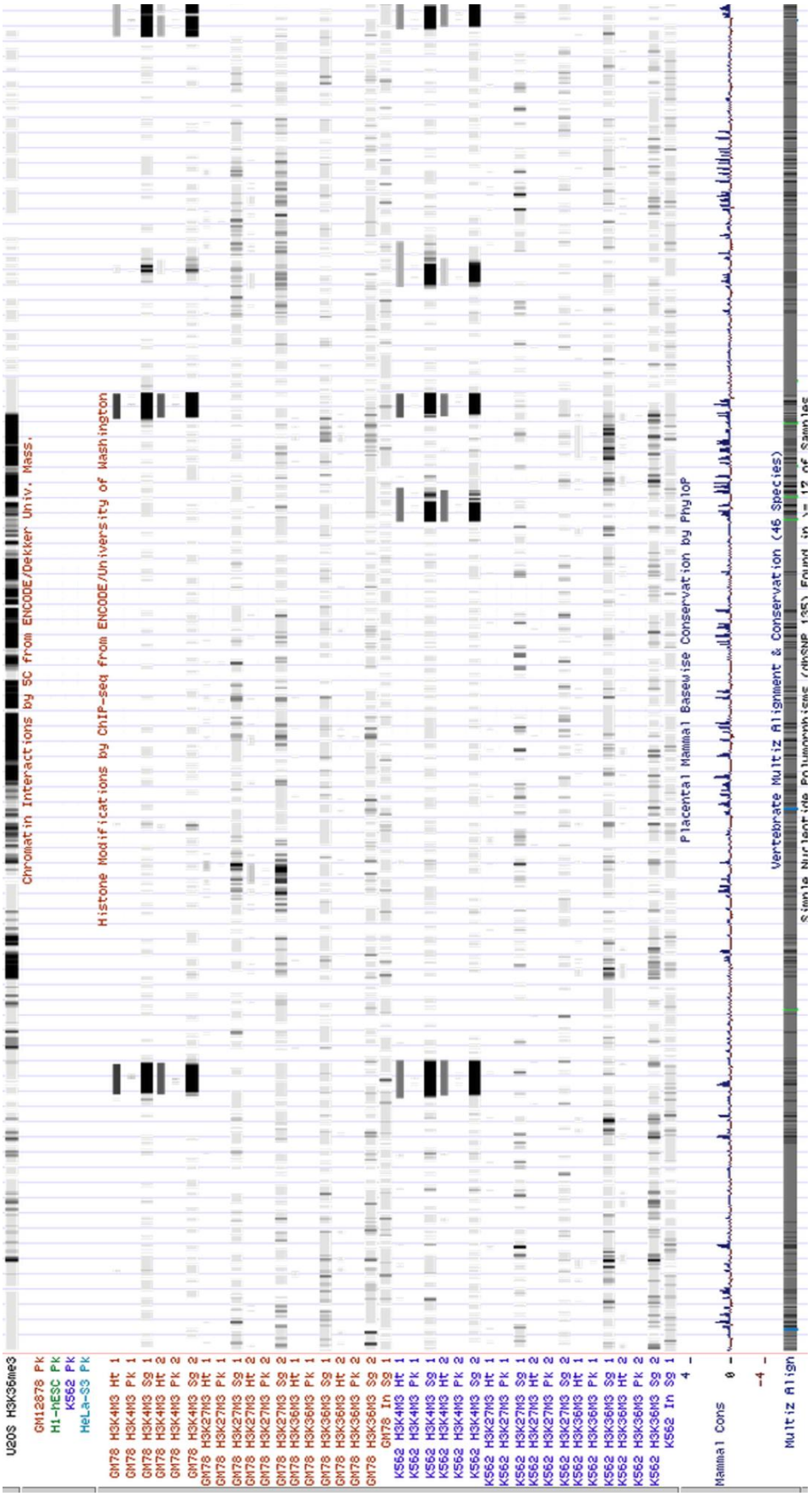
Anexo 22 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *ERBB2* em HSA (parte 2). Retirado de UCSC-ENCODE (2012).



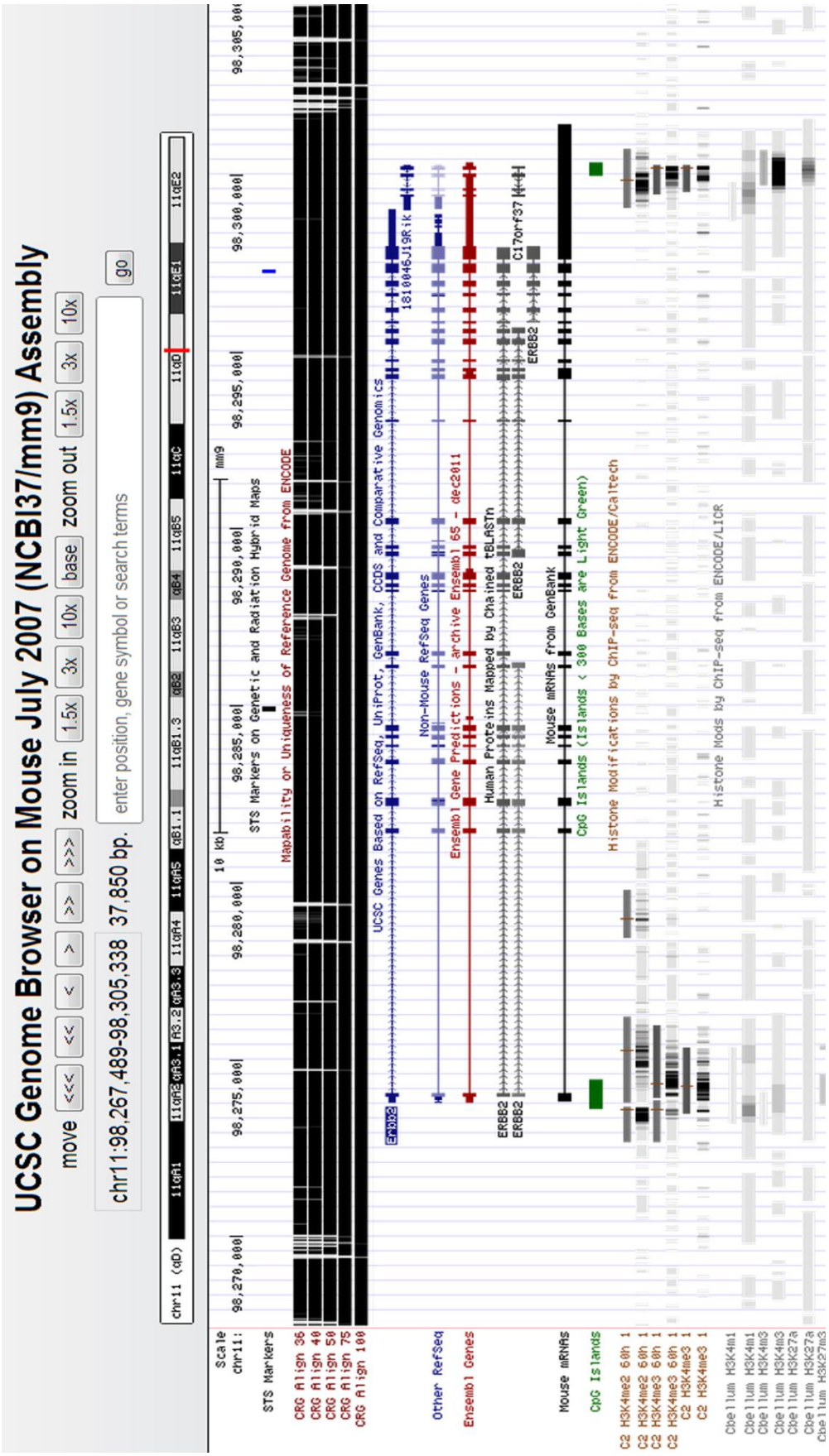
Anexo 23- Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *ERBB2* em HSA (parte 3). Retirado de UCSC-ENCODE (2012).



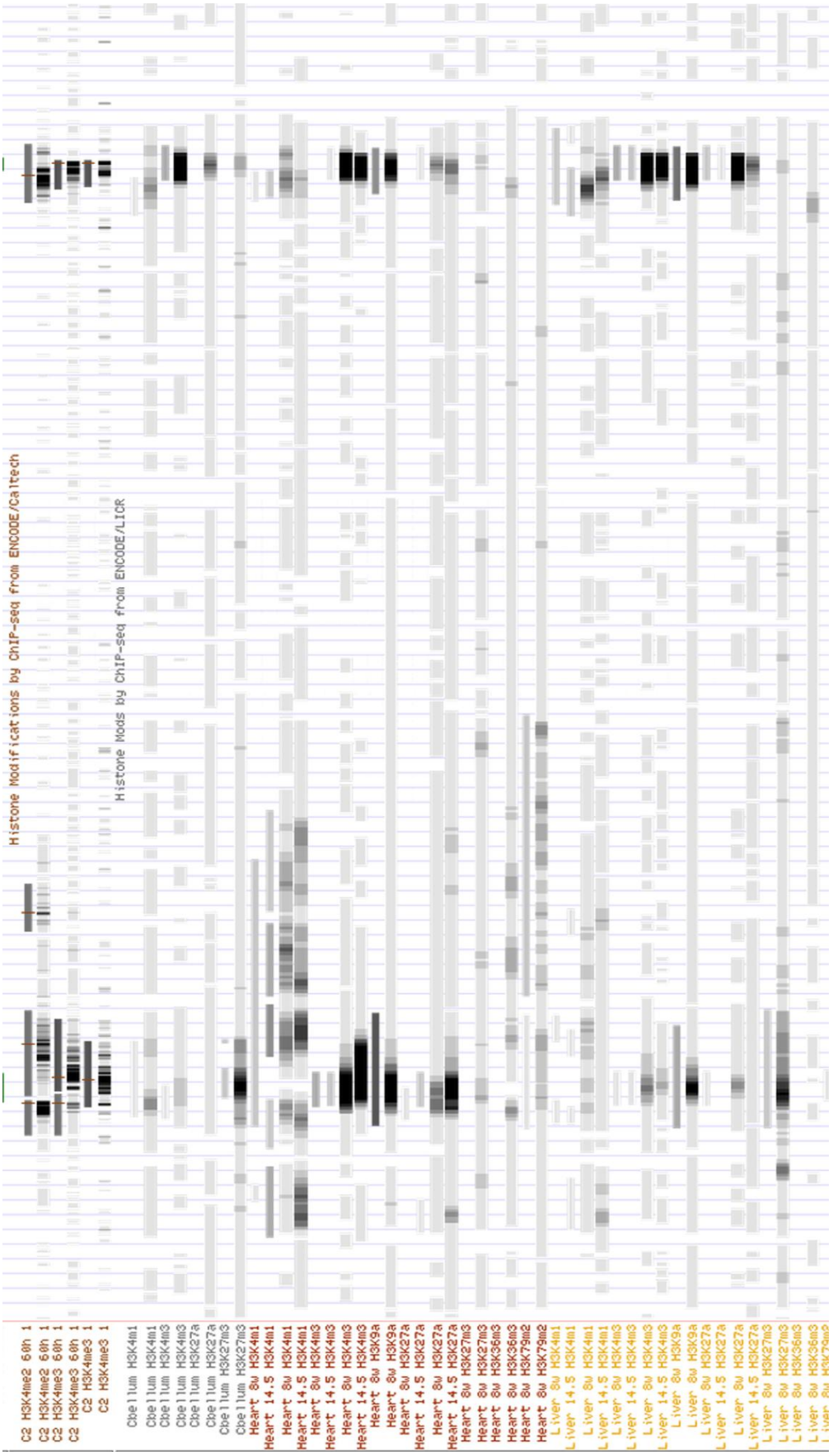
Anexo 24 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *ERBB2* em HSA (parte 4). Retirado de UCSC-ENCODE (2012).



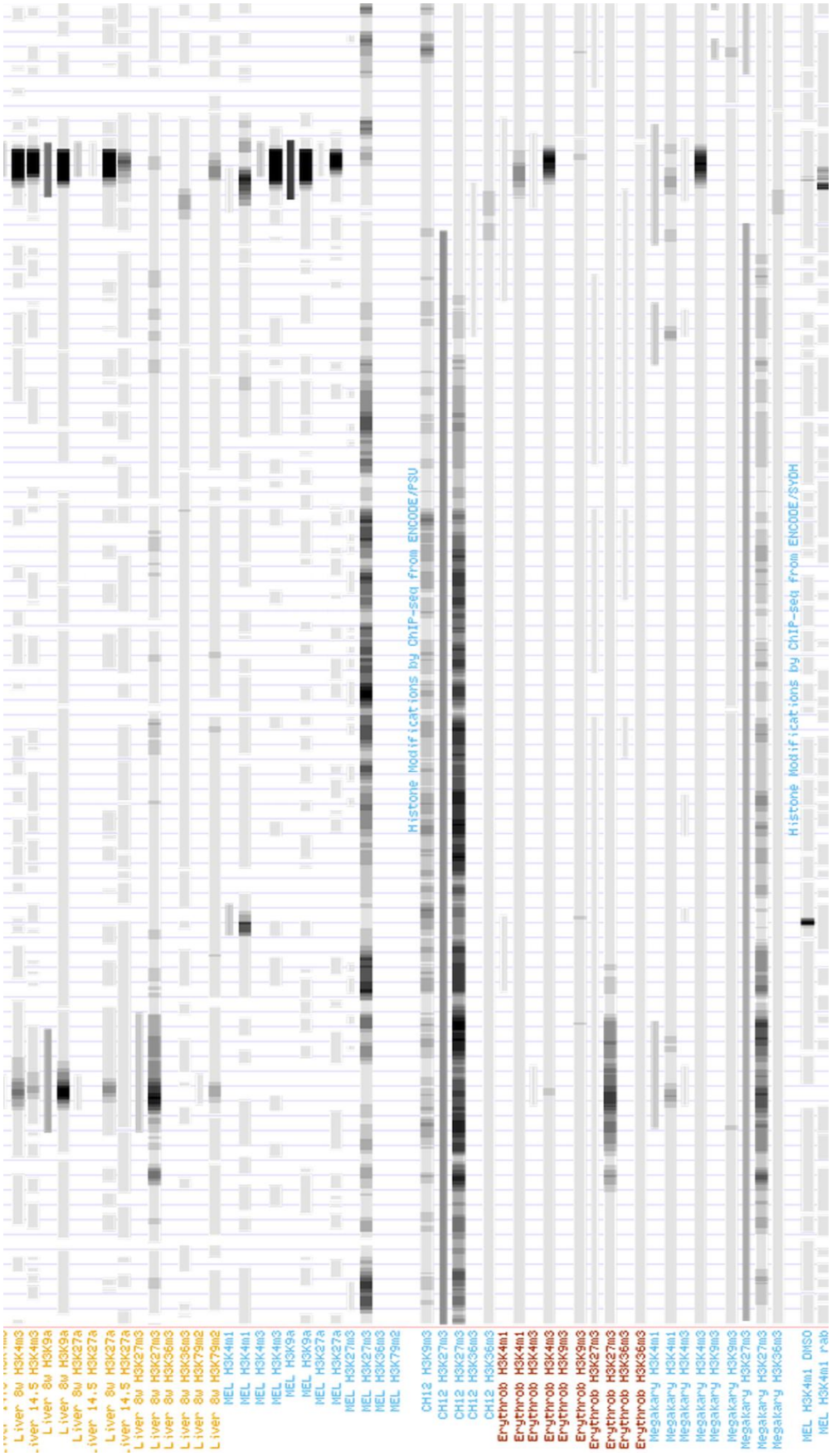
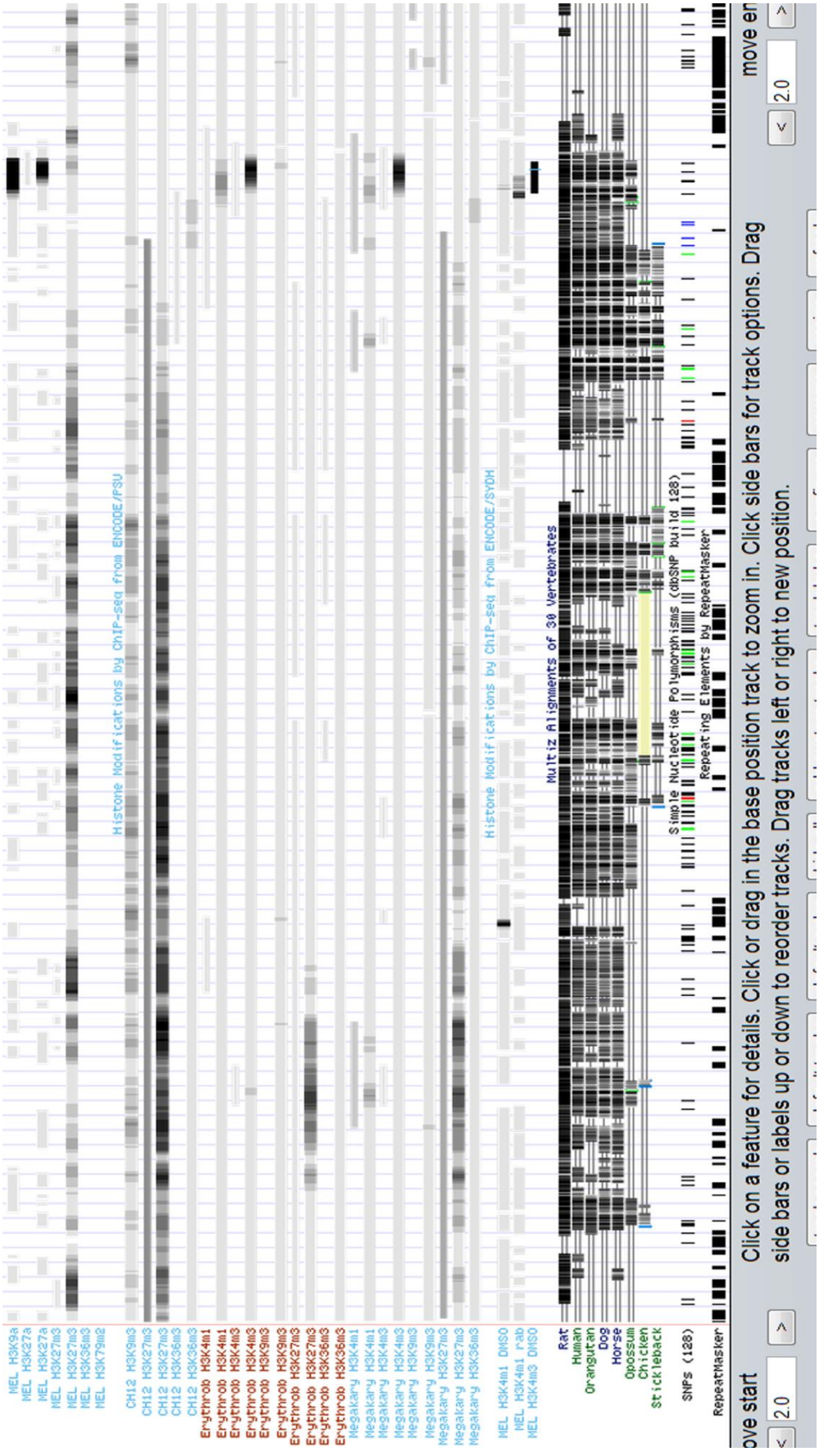
Anexo 25 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *Erbb2* em MMU (parte 1). Retirado de UCSC-ENCODE (2012).



Anexo 26 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *Erbb2* em MMU (parte 2). Retirado de UCSC-ENCODE (2012).



Anexo 27 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *Erbb2* em MMU (parte 3). Retirado de UCSC-ENCODE (2012).



Anexo 28 - Análise *in silico* das marcas epigenéticas associadas ao gene *Erbb2* em MMU (parte 4). Retirado de UCSC-ENCODE (2012).