

## Resumos de Teses

### Identificação de genes diferencialmente metilados em nasoangiofibroma juvenil pelo método MS-AP-PCR.

Autora: *Tatiana Mano e Sá Auada.*

Orientadora: *Maria Aparecida Nagai.*

Dissertação de Mestrado. São Paulo: FMUSP, 2006.

O nasoangiofibroma juvenil (JNA) é um tumor benigno altamente vascularizado e localmente invasivo. Afeta a cavidade nasal e nasofaringe principalmente de indivíduos jovens do sexo masculino com idade entre 14 a 25 anos. Soma menos que 0,5% dos tumores de cabeça e pescoço, representando um novo caso entre 150.000 indivíduos. A metilação do DNA é uma modificação epigenética que resulta na base modificada 5-metilcitosina, encontrada principalmente nas ilhas CpG. A metilação está relacionada com o processo de tumorigênese pelos seguintes eventos: hipermetilação das ilhas CpG dos genes supressores de tumor, contribuindo para a perda da função destes genes; hipometilação de proto-oncogênese, causando a hiperexpressão destes; e a deaminação da 5-metilcitosina, que resulta em uma mutação pontual. O objetivo deste estudo é investigar a existência de genes diferencialmente metilados que possam estar relacionados com o desenvolvimento e progressão do JNA.

A técnica escolhida para a realização deste trabalho foi a MS-AP-PCR (análise de metilação pela digestão do DNA por enzimas de restrição e amplificação com oligonucleotídeos arbitrários), que permite a identificação de fragmentos de DNA diferencialmente metilados. Utilizando esta metodologia, foi possível identificar 18 fragmentos de DNA diferencialmente metilados que foram isolados, clonados e seqüenciados. As seqüências obtidas foram utilizadas para realizar a comparação por similaridade às seqüências depositadas nos bancos de dados BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e BLAT ([genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu)).

Quatro seqüências apresentaram similaridade a genes conhecidos: SOD1, MYT1, ABCB1 (MDR/TAP) e CPAMD8. Três seqüências apresentaram similaridade a genes sem RefSeq. Os genes SOD1 e ABCB1 foram selecionados para a realização da validação dos resultados com as amostras de tumor e tecido normal através dos ensaios MSP (PCR sensível à metilação) e PCR em tempo real (qPCR). Não foi possível padronizar as reações de metilação para o gene SOD1. Na análise do padrão de metilação do gene ABCB1 por MSP, observamos evidência de metilação em apenas 4% (2/50) dos casos analisados. Entretanto, a análise de expressão relativa do gene ABCB1 por qPCR mostrou redução da expressão deste gene na maioria das amostras (70%) de JNA analisadas.

Nossos dados sugerem que alteração no padrão de metilação pode estar envolvida no desenvolvimento do JNA. Além disso, nossos dados indicam que a redução na expressão do gene ABCB1 pode estar relacionada ao desenvolvimento destes tumores. Entretanto, novos estudos são necessários para validar os dados obtidos pela análise de metilação diferencial e também para melhor elucidar os mecanismos moleculares que levam a redução na expressão do gene ABCB1 no JNA.

### Exploração funcional do processo de glicosilação aberrante em tumores: mecanismos envolvidos na atividade pró-migratória de galectina-3.

Autora: *Fabiana Henriques Machado de Melo.*

Orientador: *Roger Chammas.*

Tese de Doutorado. São Paulo: FMUSP, 2005.

Ao longo do processo de progressão tumoral observa-se alteração na expressão de glicoconjugados contendo oligossacarídeos *N*-ligados. Uma das formas mais comuns de glicosilação aberrante observada em células transformadas e em tumores humanos é representada por (poli)lactosaminas presentes em oli-

gossacarídeos *N*-ligados. Estes glicanos são ligantes de galectina-3. Com o objetivo de identificar a expressão e distribuição dos ligantes de galectina-3 associados a processos fisiopatológicos, como a transformação maligna, desenvolvemos uma proteína quimérica, a galectina-3 conjugada à fosfatase alcalina (Gal-3/FA). Observamos que a Gal-3/FA possui a mesma especificidade da galectina-3 e que pode ser usada como sonda em ensaios de *overlay* e ensaios de imunistoquímica.

Entre os ligantes de galectina-3 identificamos a  $\beta$ 1 integrina, mediador de processos biológicos dependentes da interação célula-matriz como a migração celular. Linhagens de células de origem mesenquimal derivadas de tumores induzidos com metilcolantreno de animais selvagens (linhagens S11 e S12) e nuli-zigoto (linhagem E12) para o gene da galectina-3 foram estabelecidas. Avaliamos a capacidade migratória dessas células e os resultados mostraram que células que expressam galectina-3 são mais migratórias em superfícies de laminina-1. Este dado sugere que a galectina-3 seja um modulador positivo do processo de migração celular em superfícies de laminina-1. Porém, o mecanismo pelo qual a galectina-3 medeia esse processo não é conhecido. Células que possuem fenótipo mais migratório apresentam um estado intermediário de adesão. Nós observamos que a galectina-3 se encontra nos complexos focais. Na presença de galectina-3 observamos diminuição de FAK fosforilado e recrutamento da fosfatase SHP-2 para os complexos focais. A diminuição de FAK fosforilado no lamelipódio leva ao *turnover* dos complexos focais e ao aumento da migração celular. Analisamos também a via de sinalização e observamos que a galectina-3 não ativa PAK. Contudo, o inibidor de PI3quinase, wortmanina, inibiu o efeito pró-migratório de galectina-3. Esses dados reforçam a noção do papel de galectina-3 na modulação do processo de migração de fibroblastos transformados, funcionando como uma molécula de-adesiva.