

Estudo da expressão de genes modulados pelo tratamento com agentes desmetilantes e imunossupressores.

Caroline L. Stoppa^{1*}, Janaína I. Torres¹, Susana N. Diniz²

1. Estudantes de IC da Universidade Anhanguera de São Paulo – UNIAN *clscls09@gmail.com

2. Pesquisadora do Depto.de Biotecnologia e Inovação em Saúde, UNIAN, São Paulo/SP

Palavras Chave: *expressão gênica, azacitidina, tacrolimus*

Introdução

Dentre os mecanismos participantes do chamado “epigenoma”, estão a metilação de DNA, a modificação de histonas e os RNAs regulatórios não codificantes, que têm um papel importante na regulação da expressão gênica. Diversos estudos têm demonstrado que os mecanismos epigenéticos, incluindo a metilação do DNA, são dinâmicos e podem ser alterados durante a vida por múltiplos fatores dentre os quais alguns que podem estar associados à ação e a resposta a fármacos. Estas diferenças inter-individuais no epigenoma podem alterar a ação e a resposta à drogas. Além disso, as drogas podem alterar o programa epigenômico podendo causar efeitos farmacocinéticos e farmacodinâmicos não previstos. O impacto que as drogas possuem na expressão gênica tem sido estudado por *microarray* de expressão gênica. Com o advento dessa tecnologia, novas oportunidades se abriram para estudos epigenéticos, o que tem sido até hoje estudado principalmente no câncer. No entanto, esses métodos podem ser potencialmente desenvolvidos e aplicados para mapear mudanças no epigenoma relacionadas à resposta a drogas. Sabendo-se que indivíduos possuem respostas diferentes aos imunossupressores e que alterações epigenéticas podem estar relacionadas com a regulação dessas respostas, a proposta a proposta deste trabalho é realizar uma análise global *in silico* de genes e redes genicas significativamente alterados pelo tratamento *in vitro* com drogas desmetilante e imunossupressora, utilizando bancos de dados públicos de bioinformática, com o objetivo de identificar mecanismos de ação em comum e o possível efeito epigenético do imunossupressor. A identificação dos efeitos epigenômicos das drogas, e da participação de diferenças epigenéticas na variação da resposta intra e inter-individual a elas deve aumentar nosso conhecimento de seu mecanismo de ação, permitindo uma melhor particularização dos tratamentos com drogas imunossupressoras.

Resultados e Discussão

A busca de genes alterados, pelo tratamento com AZA e FK, no banco de dados *connectivity map* (CMAP), identificou uma lista de genes de três tratamentos distintos com azacitidina (AZA 688, 672 e 690) e três tratamentos com tacrolimus (FK) (FK 39, 22a e 8). Nesta busca, foram encontrados todos os genes regulados positivamente (Up) e negativamente (Dn) em cada tratamento, com a dose de 16uM (AZA) e 1uM (FK), em diferentes tipos celulares (PC3 e MCF7). Os resultados demonstraram 16 genes Up regulados e 343 genes Dn regulados que foram comuns aos três tratamentos com AZA. Foram encontrados 19 genes Up regulados e 16 genes Dn regulados que eram comuns a todos os tratamentos com FK506 (Figura 1). Após a obtenção e cruzamento das listas de genes alterados pelos tratamentos com AZA e FK506, foi identificado um único gene (gene X) em comum entre AZA Dn e Fk Up. Este gene é um membro de uma grande

família de proteínas associadas com a função de desmetilação de lisinas presentes na cauda N-terminal das histonas. Neste estudo foi mostrado o gene X é negativamente modulado pela desmetilação do DNA e ativado pelo tratamento imunossupressor, sendo assim um potencial candidato para validação, *in vitro*, após tratamento com os agentes desmetilante e imunossupressor.

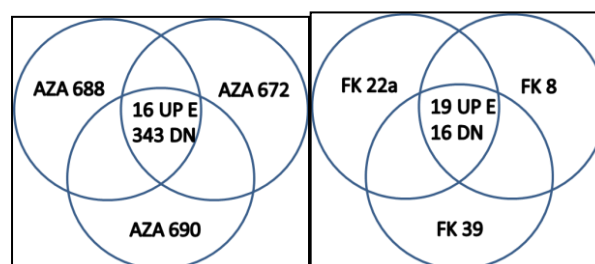


Figura 1. - Número de genes em comum alterados positivamente (UP) e negativamente (DN) pelos tratamentos (n=3) com agente desmetilante azacitidina (AZA) e imunossupressor (FK), obtido no banco de dados CMAP (www.broadinstitute.org/cmap).

Posteriormente, células MCF-7, tumor de câncer de mama humana, correspondente a dois tratamentos de cada droga avaliados no cMAP, foram cultivadas em meio RPMI completo (contendo soro fetal bovino e antibiótico), mantidas a 37° C na estufa de CO₂, e tratadas com azacitidina (AZA) e tacrolimus (FK). A viabilidade foi avaliada após o período de 24 horas de tratamento das células pelo método azul de tripan, e os resultados mostraram que não houve ação citotóxica das drogas nas células, o percentual de morte observado foi de 1-2%. Desta forma, RNA total foi extraído com Trizol, de acordo com o fabricante e submetido à reação de transcrição reversa para obtenção do cDNA. Reações de PCR em tempo real estão sendo realizadas com primers específicos para o gene selecionado e validação da alteração do padrão de expressão conforme encontrado no estudo *in silico*.

Conclusões

Os resultados desse estudo demonstraram que o tratamento de células humanas com os agentes desmetilante azacitidina, e imunossupressor tacrolimus, alteraram a expressão de genes envolvidos com a função de desmetilação de lisinas presentes na cauda N-terminal das histonas. A identificação e validação da expressão alterada desse gene *in vitro* permitirá uma melhor compreensão do mecanismo de ação de imunossupressores no epigenoma.

Agradecimentos

FAPESP

Jones, P.A. and Takai, D. (2001). The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293, 1068-1070 2.

Szyf M (2004). Toward a discipline of Pharmacoepigenomics. *Curr. Pharmacol.* 2, 357-377