

Amanda Vergueiro^{1,2} (IC-CNPq); Luciano Mazzoccoli¹ (Pósdoc-Ministério da Saúde); Claudete Klumb¹ (co-Orientador); Marcela Robaina¹ (Orientador)

¹ Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer -INCA

² Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

RESUMO

O Linfoma de Burkitt (LB), subtipo de linfoma não Hodgkin B (LNH-B) mais frequente na infância, é caracterizado como uma neoplasia hematológica altamente agressiva. A superexpressão do oncogene c-MYC é o principal evento conhecido na patogênese do LB. No entanto, recentemente, foi relatado que c-MYC regula a expressão de vários micro-RNAs (miRNAs). Os miRNAs podem regular a expressão de proteínas que controlam a proliferação, sobrevivência e morte celular, como os miRNAs da família miR-34. A família miR-34 é ativada por p53 e pode induzir a apoptose e/ou inibir a progressão do ciclo celular, levando a inativação de vários proto-oncogenes que atuam na via de TP53 incluindo: c-MYC e CDK6, além de inibir a expressão da proteína anti-apoptótica, BCL-2. Vários estudos têm relatado o papel da família miR-34 em malignidades linfoproliferativas, correlacionando a baixa expressão de miR-34b/c à metilação do DNA. Entretanto, pouco se sabe sobre o papel da família miR-34 no LB. Sendo assim, nossa proposta de estudo é avaliar os efeitos da utilização de agente demetilante de DNA na expressão dos miR-34b/c em linhagens de linfoma B com diferentes perfis de mutação no gene TP53 e seu efeito na resposta a quimioterápicos. Sendo assim, pretendemos contribuir para um melhor entendimento do papel família miR-34 no LB e na elucidação de possíveis alvos terapêuticos, uma vez que a utilização de agentes demetilantes de DNA parece ser uma estratégia promissora para o tratamento do câncer.

OBJETIVOS

- Identificar o status de metilação do miR-34b/c nas linhagens de linfoma de Burkitt: Ramos e Raji que apresentam TP53 mutado e na linhagem P493-6, TP53 selvagem;
- Quantificar os níveis relativos de expressão dos miR-34b/c e das enzimas DNA metil transferases (DNMT1 e DNMT3b) após o tratamento das linhagens com agente demetilante de DNA;
- Avaliar os efeitos da utilização do agente demetilante de DNA na proliferação, no ciclo celular e na indução de morte celular nas linhagens;
- Avaliar os alvos do miR-34b/c envolvidos na regulação da morte celular, Bcl-2 e c-MYC e no ciclo celular, CDK6, mediante o tratamento com o agente demetilante de DNA;
- Avaliar os efeitos na viabilidade e na indução de morte celular da combinação do agente demetilante de DNA com quimioterápicos (Cisplatina e Etoposídeo) utilizados no tratamento do LB nas linhagens celulares.

MATERIAIS E MÉTODOS

- Linhagens celulares LB: Ramos, Raji (TP53 mutante) e P493-6 (TP53 selvagem);
- PCR de Metilação Específica (MSP) para identificação do status de metilação de miR-34b;
- Incubação de linhagens celulares com 5-aza-2-deoxycytidine (Decitabina) (Sigma);
- Quantificação dos níveis de miR-34b e RNAm de p16 por PCR em Tempo Real (RT PCR);
- Análise de expressão proteica por Western Blotting (WB);
- Proliferação, viabilidade e análise de ciclo celular por ensaio de MTT, ensaio de exclusão por azul de tripan e citometria de fluxo;
- Análise estatística pelo Teste Anova e p<0,05 sendo considerado estatisticamente significativo

RESULTADOS



Figura 1: Status de metilação de miR-34b. As amostras amplificadas pelo ensaio PCR-MSP foram submetidas à corrida eletroforética em gel de agarose 2%. Observa-se a amplificação das reações específicas para região metilada (M) em todas as linhagens celulares: Ramos, Raji, BL41, SUDHL4 e P493-6. Nas linhagens Ramos e BL41 nota-se amplificação das reações específicas para região não metilada (U).

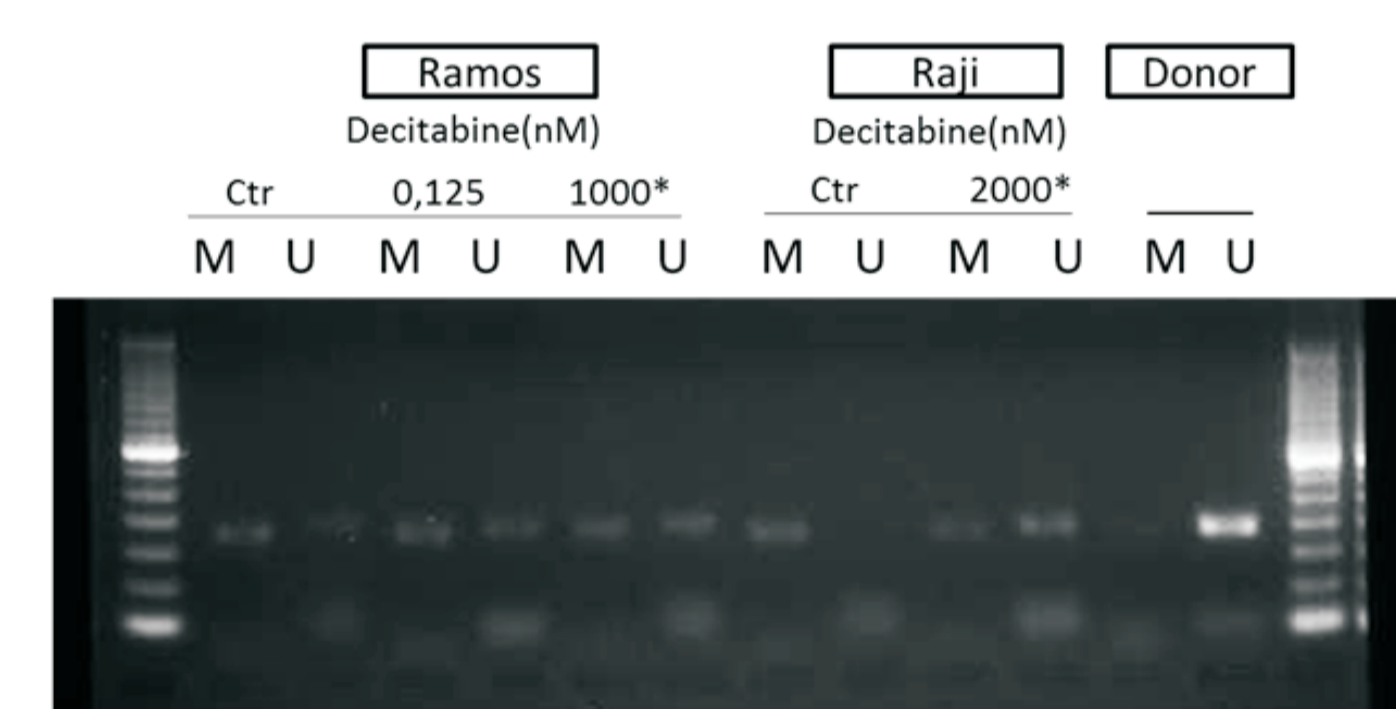


Figura 3: Status de metilação após tratamento com decitabina por MSP. A linhagem celular Ramos foi submetida ao tratamento com 0,125nM e 1µM, enquanto a linhagem celular Raji foi tratada com 2µM de decitabina. A amostra de DNA de plasma de um doador saudável foi o controle positivo da amplificação da reação não metilada. As amostras amplificadas em PCR-MSP foram submetidas à corrida eletroforética em gel de agarose 2%.

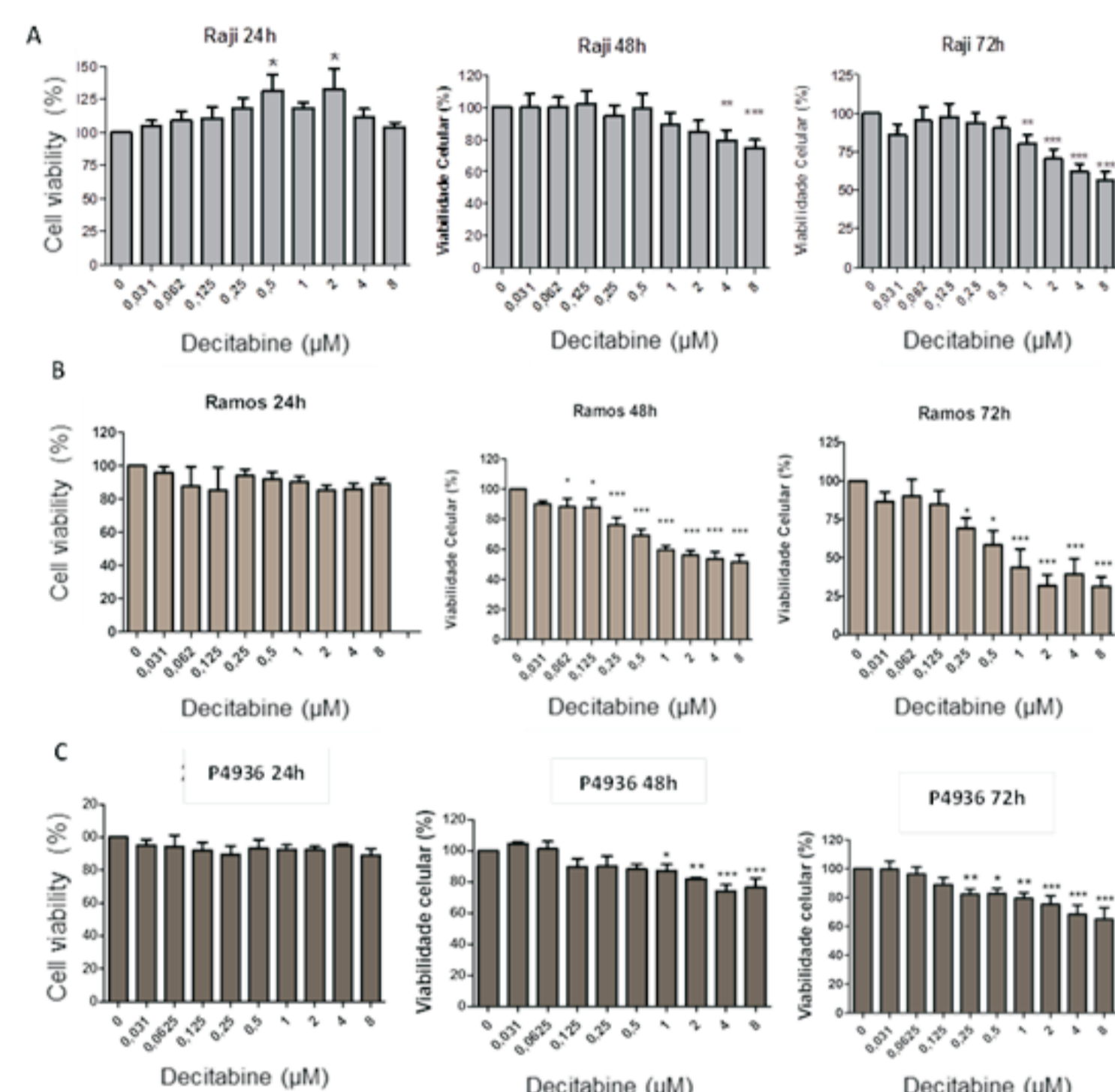


Figura 2: Análise de percentagem de células viáveis mediante uso de decitabina. Através de ensaio de MTT a percentagem de células viáveis (eixo y) de cada linhagem celular foi analisada nos intervalos de 24h, 48h, 72h sob tratamento com diferentes concentrações de decitabina (eixo x). As linhagens celulares analisadas foram Raji (A), Ramos (B) e P493-6 (C). Gráfico representativo da média e erro padrão de 3 experimentos independentes.

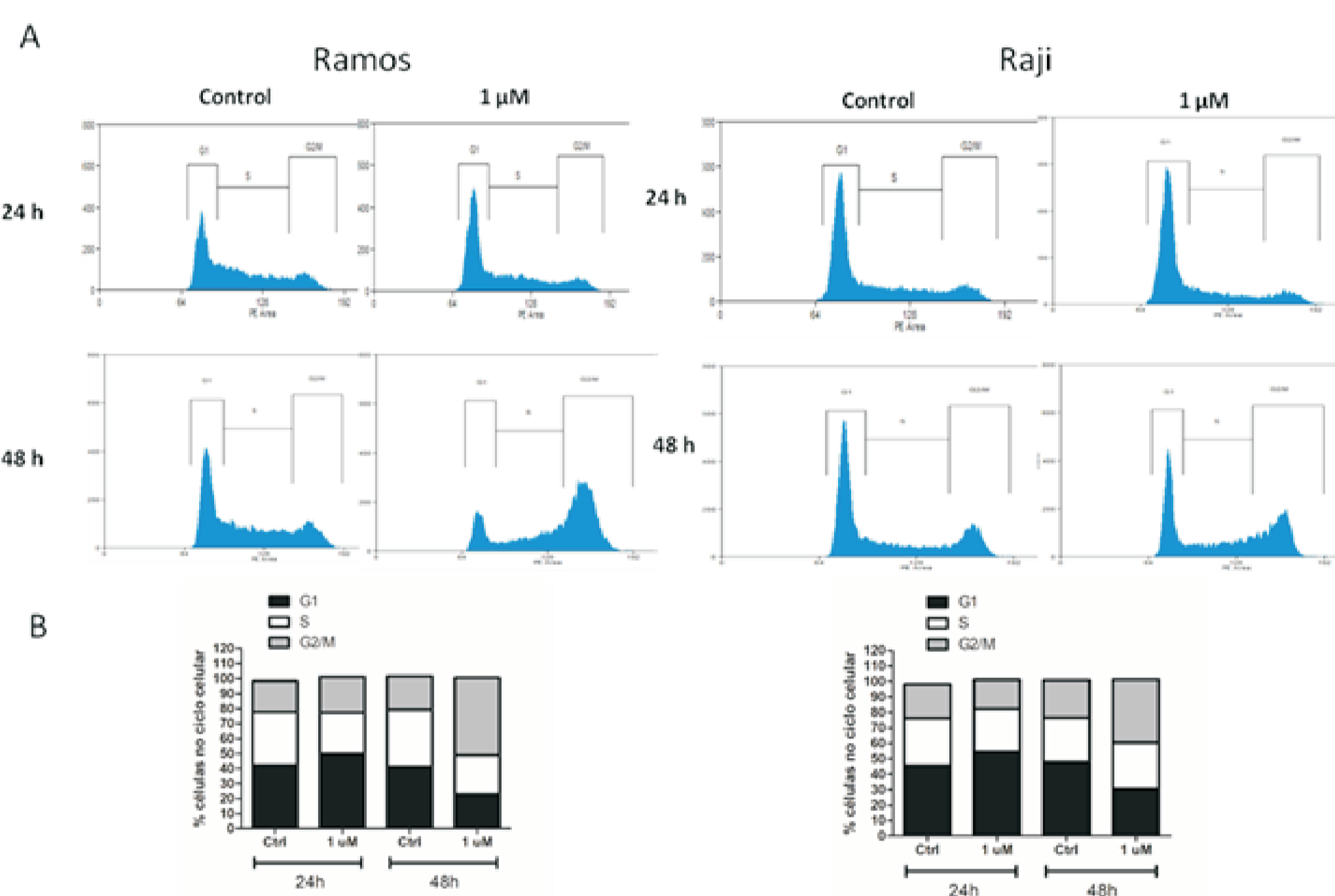


Figura 7: Análise de ciclo celular das linhagens celulares Ramos e Raji após tratamento com decitabina. Os intervalos de tempo de incubação com decitabina foram 24h e 48h. As análises foram feitas em 10.000 eventos. (A) Ciclo-celular representativo de um experimento. (B) Percentagem da média de 3 experimentos independentes.

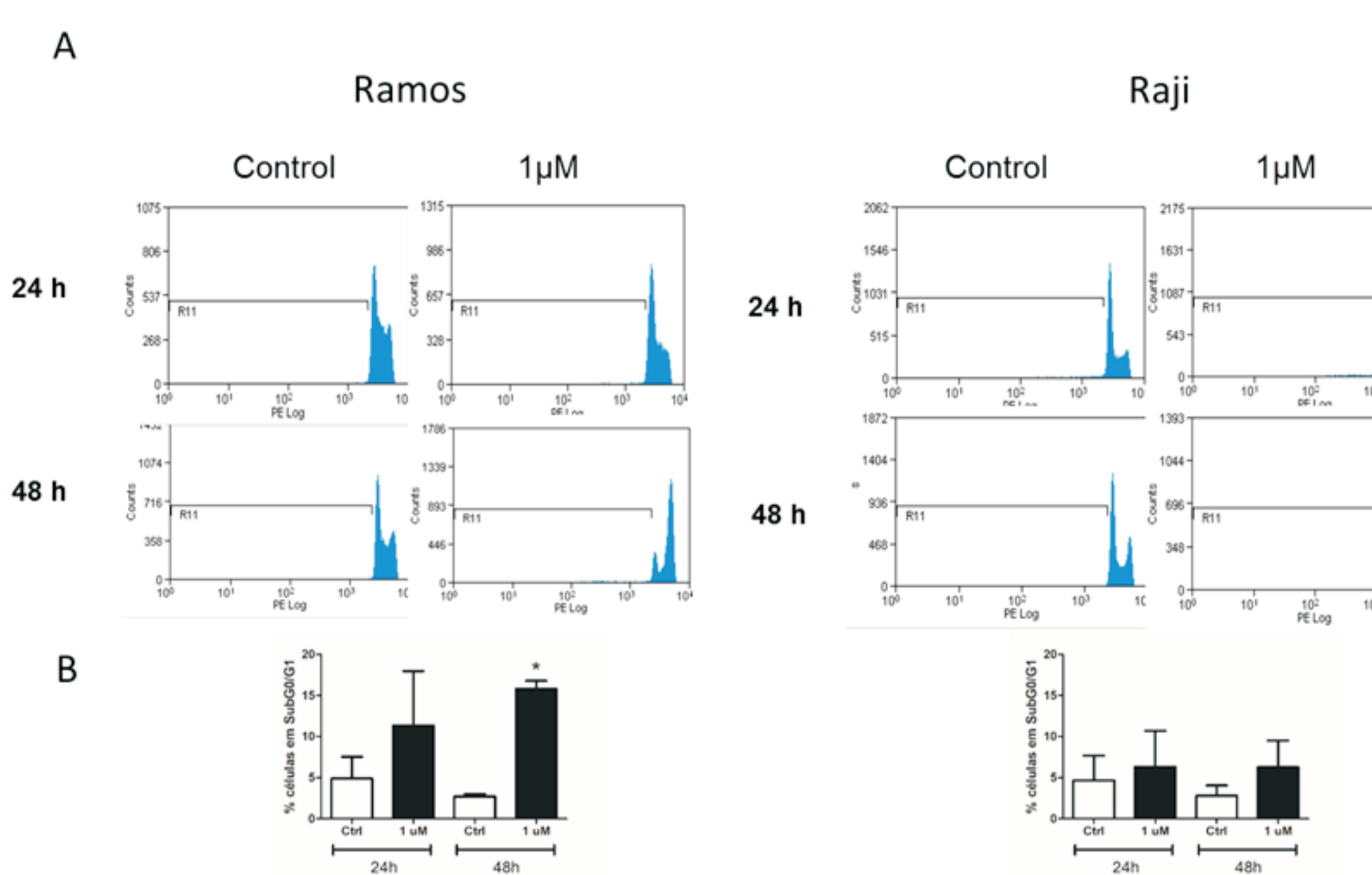


Figura 8: Análise de fragmentação de DNA nas linhagens Ramos e Raji tratadas com 1µM de Decitabina por 24h e 48h. É observado um aumento de fragmentação de DNA nas células tratadas em comparação com as células controles em ambas as linhagens celulares. (A) Análise de fragmentação de DNA representativa de um experimento. (B) Percentagem da média de 3 experimentos independentes.

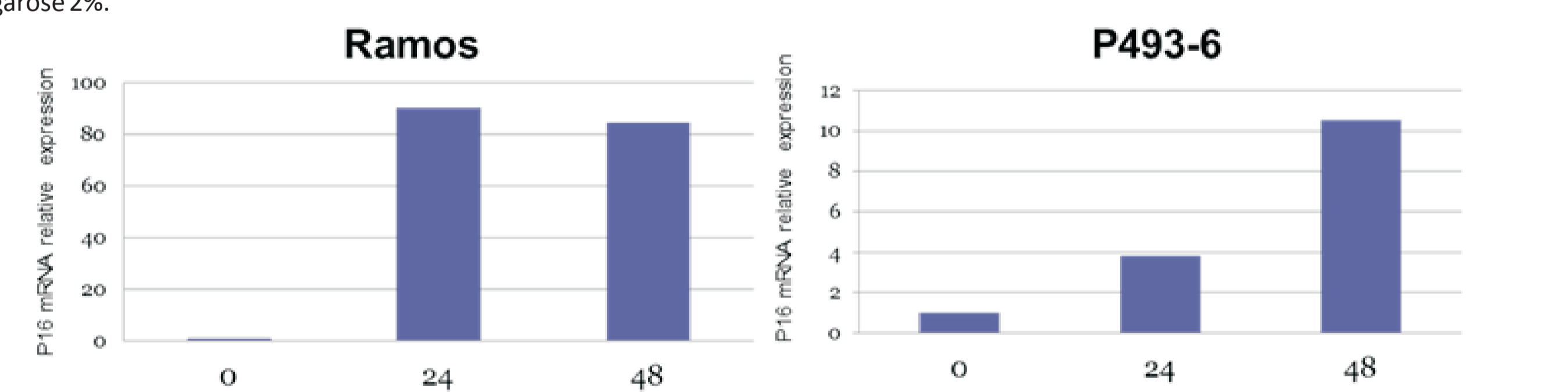


Figura 4: Análise quantitativa de expressão de RNAm do gene p16. Análise realizada nas linhagens celulares Ramos e P493-6 através de ensaio de PCR em Tempo Real em que se observa gráfico cujo eixo y apresenta o valor de expressão de RNAm e o eixo x apresenta o tempo em que as linhagens foram submetidas ao tratamento com decitabina. Gene TBP foi utilizado como controle endógeno.

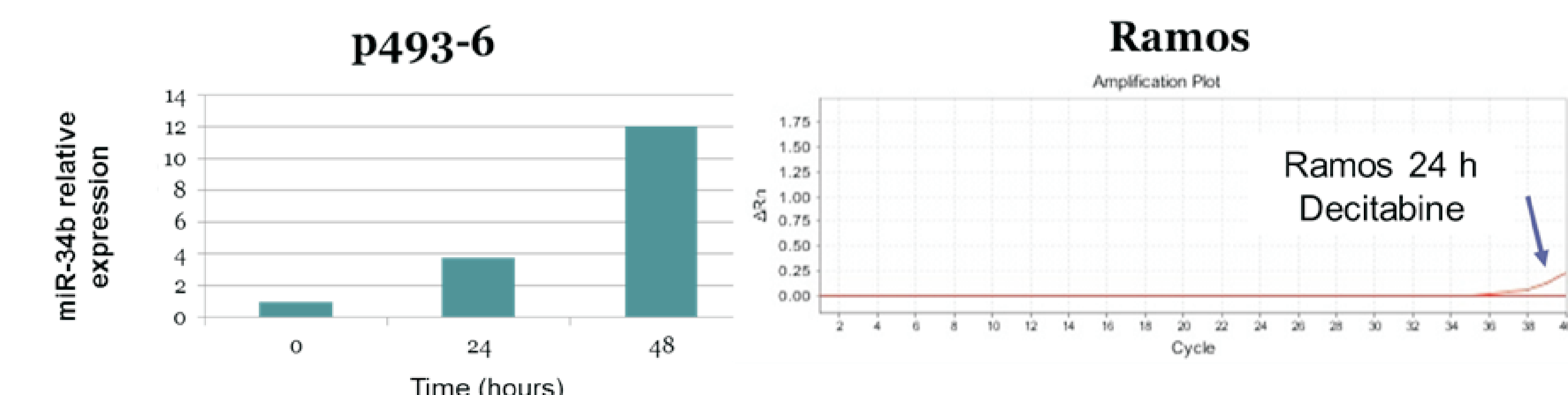


Figura 5: Análise de expressão de miR-34b nas linhagens celulares P493-6 e Ramos. Após realização de PCR em Tempo Real, obteve-se amplificação de miR-34b nas linhagens Ramos e P493-6. A análise quantitativa da expressão relativa de miR-34b na linhagem P493-6 foi feita nos intervalos de tempo de 24h e 48h em que o gráfico apresenta em seu eixo y o valor de expressão do gene e o eixo x apresenta o intervalo de tempo em que as células foram submetidas a 1µM de decitabina.

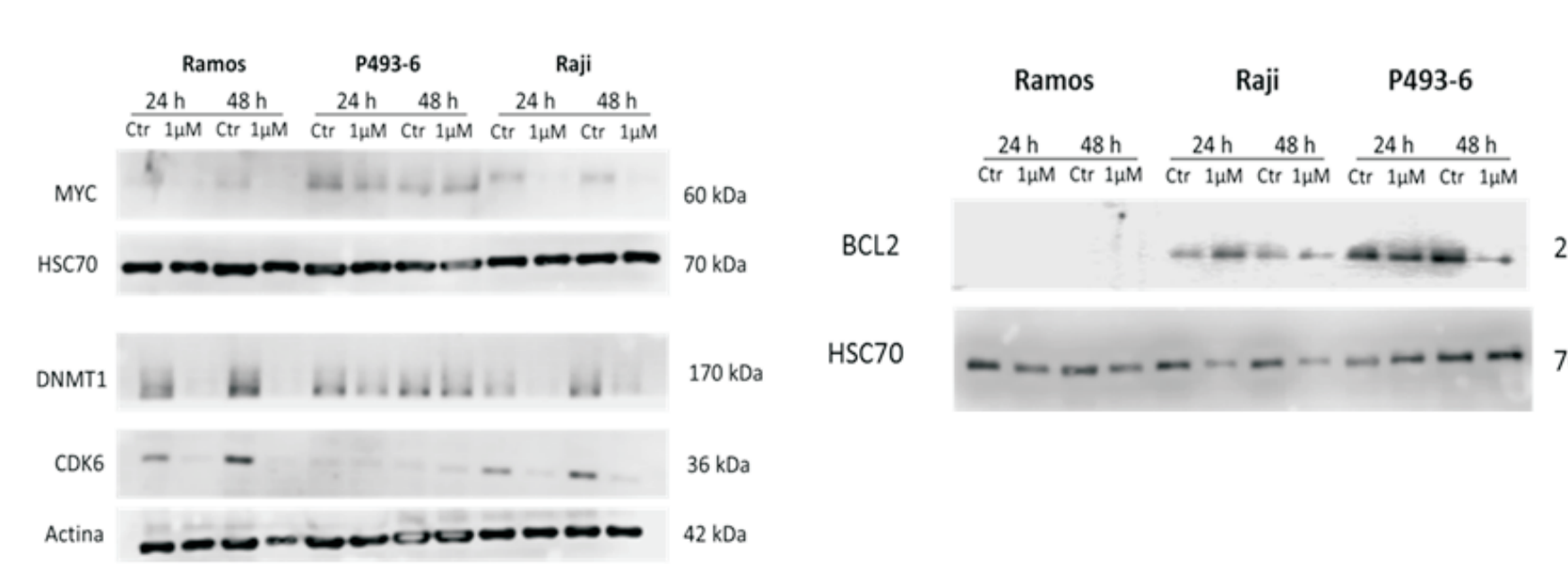


Figura 6: Análise de expressão proteica dos alvos de miR-34b. Observa-se redução dos níveis proteicos dos alvos de miR-34b (MYC e CDK6) e de DNMT1 nas amostras tratadas com 1µM de decitabina em comparação às amostras controles das linhagens celulares Ramos e Raji. Não houve alteração dos níveis proteicos de MYC, CDK6 e DNMT1 nas amostras da linhagem celular P4936. Os níveis proteicos de BCL2 apresentam-se diminuídos somente nas amostras tratadas de P4936 após 48h de tratamento com decitabina. Não detectou-se na linhagem Ramos expressão proteica de BCL2. HSC70 e Actina foram utilizados como constitutivos.

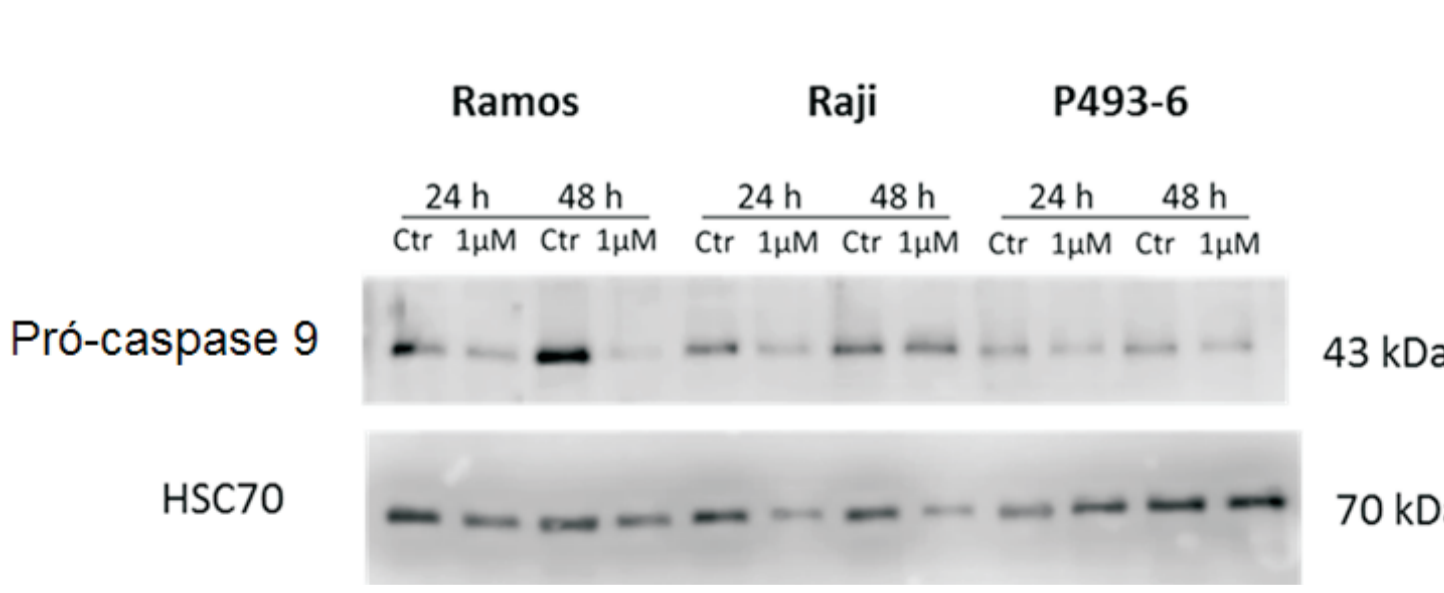


Figura 9: Análise de expressão de pró-caspase 9. A redução dos níveis de pró-caspase 9 é observado nas células tratadas da linhagem Ramos em 24h e 48h. Na linhagem Raji não observa-se redução de expressão de pró-caspase 9 e na linhagem P493-6 uma redução discreta de expressão de pró-caspase 9 é observada em ambos os intervalos de tempo. HSC70 foi utilizado como constitutivo.

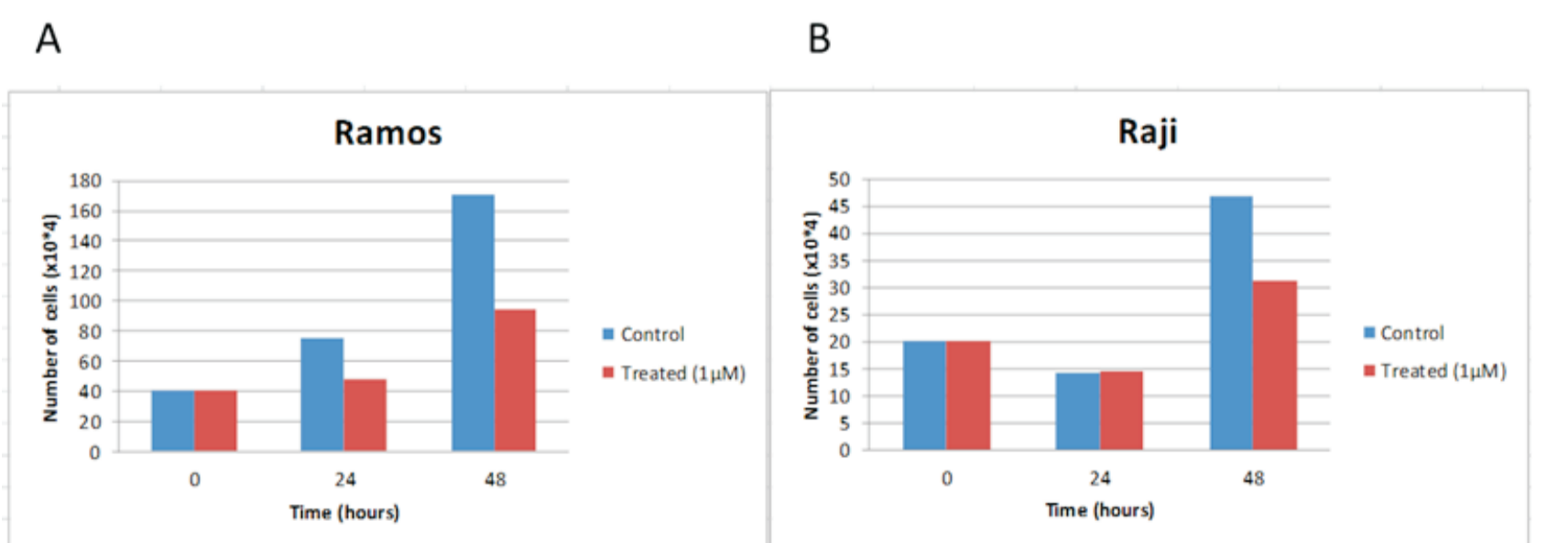


Figura 10: Número de células viáveis após tratamento com decitabina. Número de células viáveis foi determinado pelo ensaio de exclusão por azul de tripan. O eixo y representa o número de células e o eixo x representa o tempo de incubação das linhagens celulares Ramos (A) e Raji (B) com decitabina.

CONCLUSÃO PARCIAL

Pode-se concluir que a região promotora de miR-34b é regulada por metilação sendo um mecanismo reversível através do uso do agente demetilante em linhagens celulares de Linfoma de Burkitt. O agente demetilante restaurou a expressão de miR-34b, diminuindo a expressão de seus alvos. Nossos resultados podem contribuir para um melhor entendimento do papel de miR-34 na patogênese de LB e possui potencial implicação terapêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cannell IG, Kong YW, Johnston SJ et al. p38 MAPK/MK2-mediated induction of miR-34c following DNA damage prevents Myc-dependent DNA replication. Proc Natl Acad Sci USA; 107: 5375-5380. 2010.
 Chang T.C., et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. Nature Genetics, 40. Number 1, 2008. Cole KA, Attiyeh EF, Mosse YP et al. A functional screen identifies miR-34a as a candidate neuroblastoma tumor suppressor gene. Mol Cancer Res. May(5):735-42. 2008.
 Klapproth K & Wirth T. Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. Review British Journal of Haematology, 149. 494-497. 2010.
 Klumb, C.E. Biology and Pathogenesis of B Non-Hodgkin Lymphoma in childhood: a Review. Revista Brasileira de Cancerologia, 47(3):291-01, 2001.
 Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. Proc Natl Acad Sci USA, 105:13556-61. 2008.
 Zhang B., et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Review Developmental Biology 302, 1-12 2007.

Projeto Gráfico: Setor de Edição e Informação Técnico-Científica / INCA

Apoio Financeiro: CNPq; FAPERJ; Ministério da Saúde/INCA