

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) trata-se do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em células epiteliais do cólon, que se transformam em adenocarcinomas. Mudanças epigenéticas desempenham um papel importante no processo de diferenciação celular, permitindo que as células mantenham características diversificadas estáveis, apesar de conterem o mesmo conteúdo genético. Muitos estudos foram feitos para a compreensão da epigenética do câncer, particularmente em matéria de metilação do DNA. Apesar de se saber relativamente pouco sobre os padrões de modificações específicas de histonas no CCR, modificações seletivas de histonas têm sido mostradas atuando em conjunto com a metilação do DNA, ambos resultando na modificação da conformação da cromatina, que, por consequência, influencia na expressão de genes que medeiam a patogênese do CCR. Entretanto, ainda não foram identificados biomarcadores epigenéticos para serem utilizados no CCR como fator de diagnóstico, progressão, tendência de invasão tecidual e metástase, prognóstico e/ou resposta a agentes quimioterápicos. Dessa forma, o aumento da compreensão da regulação da expressão gênica no contexto epigenético do CCR pode levar ao desenvolvimento de marcadores epigenéticos para o diagnóstico, assim como de medicamentos para terapia epigenética de CCR.

OBJETIVO

O trabalho tem como objetivo estudar as modificações que ocorrem no remodelamento da cromatina na progressão do CCR, através da avaliação das diferenças no grau de empacotamento da cromatina no genoma de tecido normal e tumoral de três indivíduos diagnosticados com CCR nos estágios 2, 3 e 4 utilizando-se a técnica de Mnase-seq. Além disso, o estudo visa identificar vias metabólicas e de sinalização relacionadas com as regiões da cromatina diferencialmente empacotadas, assim como prever os motivos das regiões enriquecidas.

METODOLOGIA – DADOS DE MNASE-SEQ

A fim de se estudar a estrutura da cromatina no genoma de CCR, nós baixamos do banco de dados público SRA, seis amostras pareadas (do SRR2810481 à SRR2810486, normal e tumoral), do estudo SRP065259. Estes dados foram gerados usando a técnica de Mnase-seq (figura1), seguida de enriquecimento dos sítios de início de transcrição (TSS). Esta abordagem permite o mapeamento das posições dos nucleossomos que se encontram nas regiões TSS. Após o uso da nuclease micrococcal (Mnase), que digere preferencialmente o DNA ligante, é feito o sequenciamento *paired-end* dos fragmentos de DNA não digeridos, originários das regiões TSS.

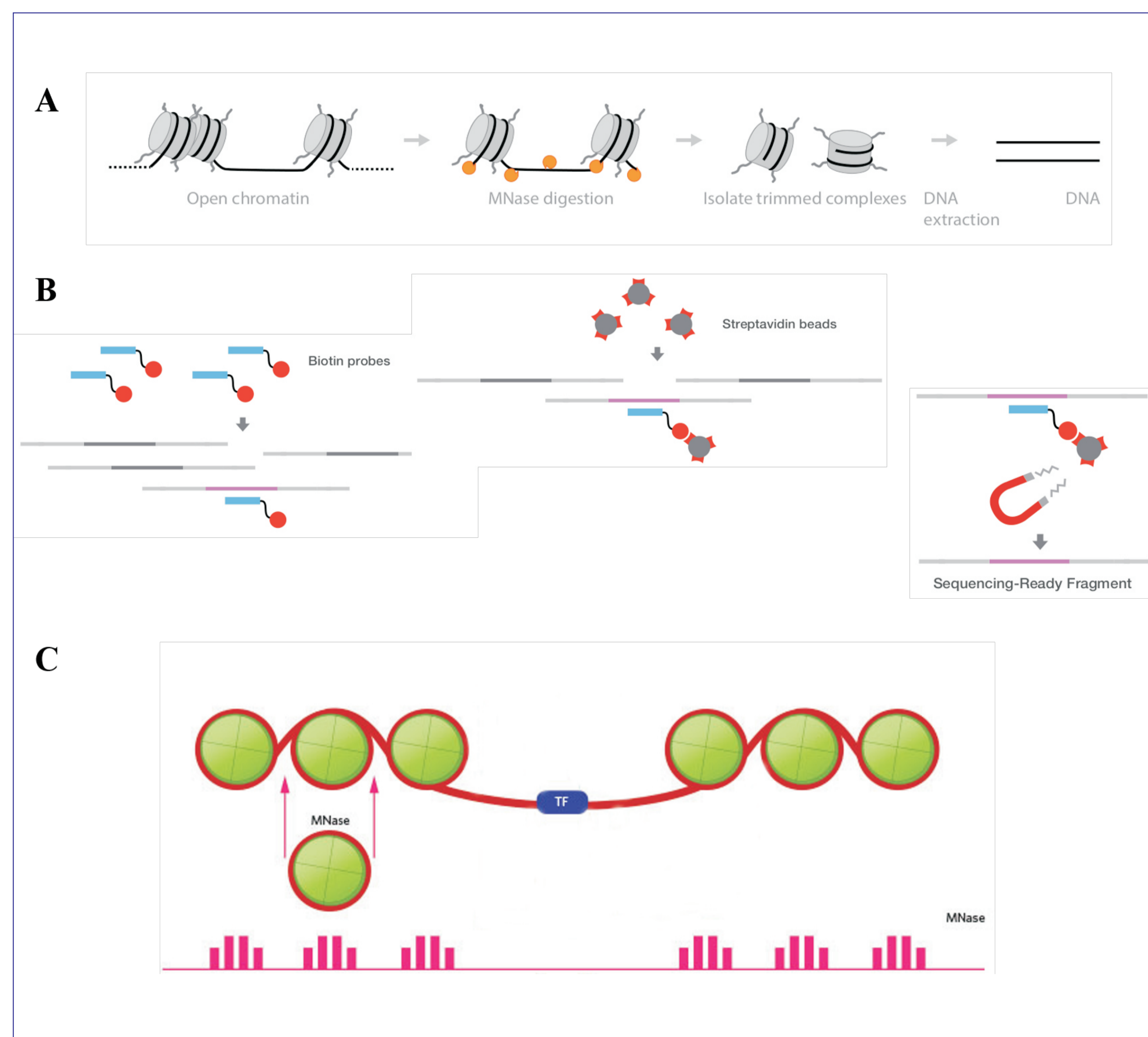
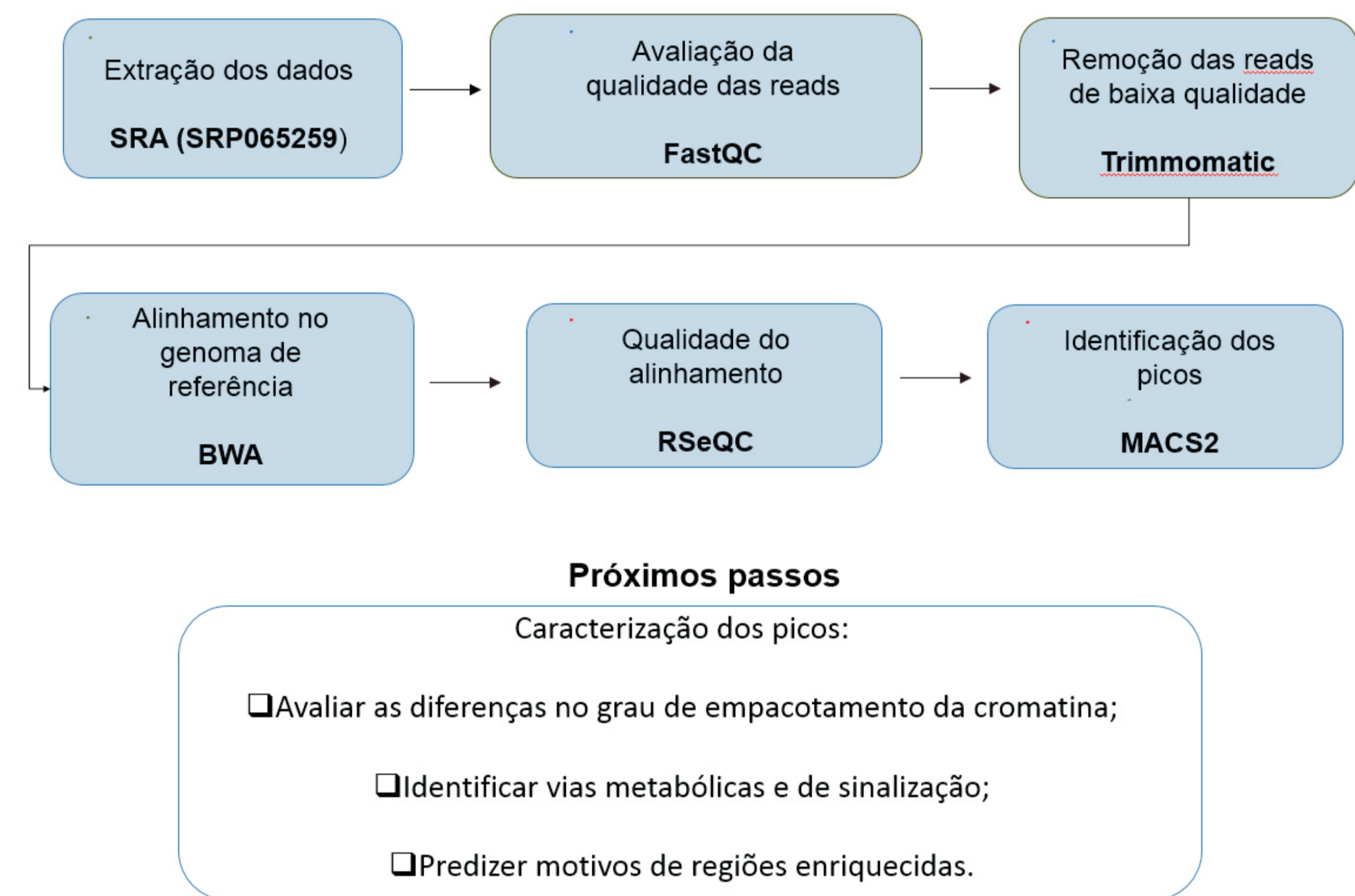


Figura 1. Técnica de Mnase-seq; (A) Preparo da biblioteca através da fragmentação do DNA genômico utilizando a enzima Mnase (adaptado de ref 1); (B) Enriquecimento dos fragmentos contendo sítios de início de transcrição utilizando sondas associadas a biotina e beads magnéticas (adaptado de ref 3). (C) Representação das regiões sequenciadas (adaptado de ref 2).

METODOLOGIA – BIOINFORMÁTICA

A qualidade das leituras foram analisadas utilizando a ferramenta FastQC e as *reads* de baixa qualidade foram removidas utilizando o algoritmo Trimmomatic. Após a filtragem, as *reads* foram alinhadas ao genoma humano de referência (Versão GRCh37) com o programa BWA. O pacote RseQC (disponível no repositório Bioconductor para linguagem R) foi utilizado para avaliar a qualidade do alinhamento e somente as *reads* com alinhamentos únicos foram aceitas nas análises posteriores. A posição dos nucleossomos foi determinada usando a ferramenta MACS2.



RESULTADOS

Utilizando a ferramenta MACS2, foram obtidos os seguintes números de picos para as seis amostras: 51804 (SRR2810481); 53275 (SRR2810482); 52550 (SRR2810483); 58018 (SRR2810484); 55919 (SRR2810485) e 57404 (SRR2810486).

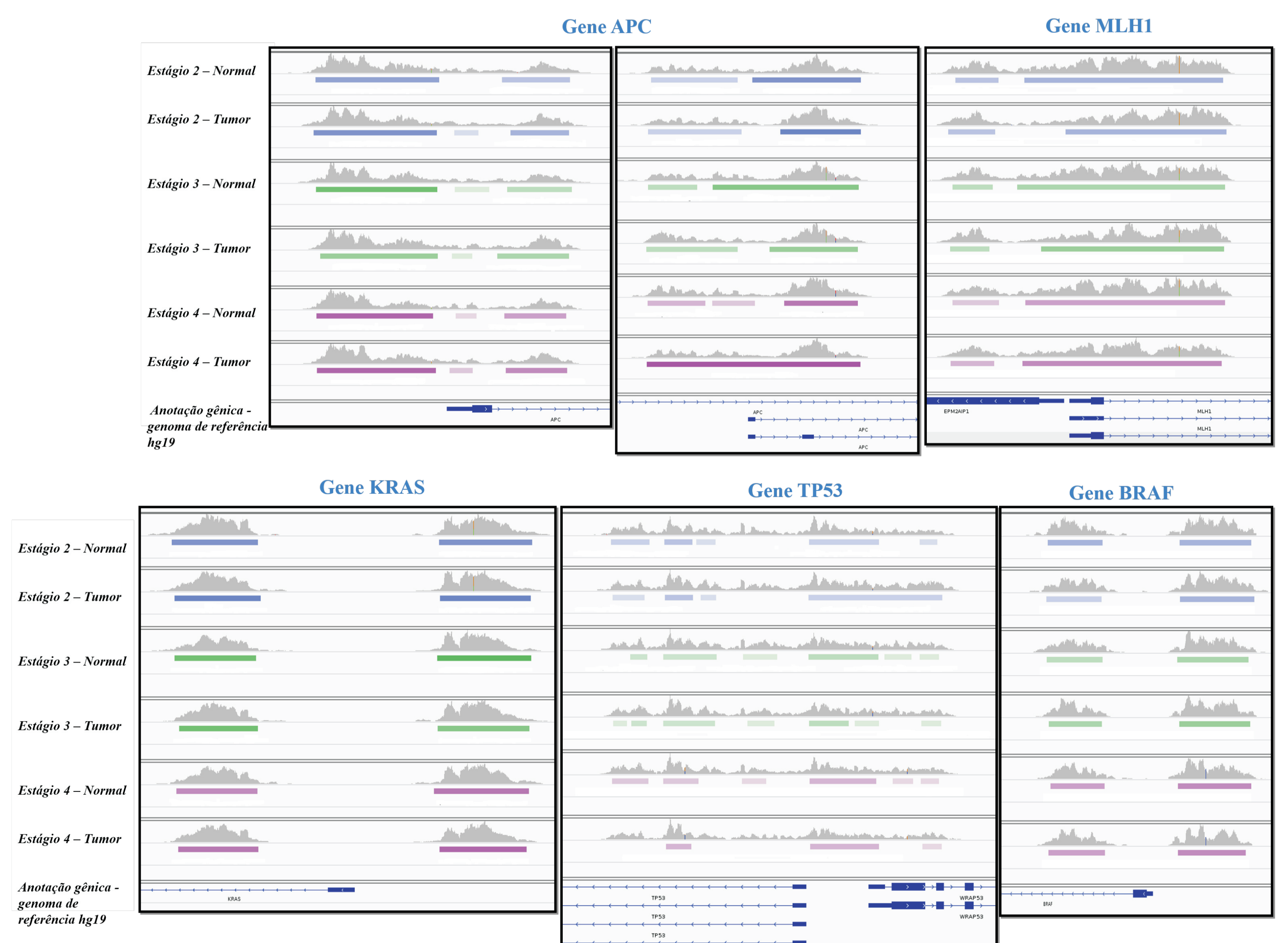


Figura 2. Posição dos nucleossomos em genes relacionados ao desenvolvimento do CCR gerados a partir do alinhamento das reads e identificação dos picos nas amostras de tecido normal e tumor em três estágios de desenvolvimento do tumor colorretal. Imagem gerada com o programa IGV referente as amostras SRR2810481 a SRR2810486.

REFERÊNCIAS

- Drullner BR, Vera D, Johnson R, Ruan X, Apone LM, Dimalanta ET, Stewart FJ, Boardman L, Dennis JH. Comprehensive nucleosome mapping of the human genome in cancer progression. *Oncotarget*. 2015 doi: 10.18632/oncotarget.6811.
- Illumina. Disponível em: <http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/research_reviews/sequencing-methods-review.pdf>. Acessado em 06/09/2016.
- The Scientist. Disponível em: <<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/44772/title/Revealing-in-the-Revealed/>>. Acessado em 06/09/2016.
- Illumina. Nextera Exome Enrichment Kit. Illumina, Inc., 2012. 770-2012-028.

Apoio financeiro: Ministério da Saúde