

# PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE CDKN2A ( $p14^{ARF}$ / $p16^{INK4a}$ ) DE MULHERES FRENTISTAS DE POSTO DE GASOLINA

Bravo, M.<sup>1</sup>, Delmonico, L.<sup>1</sup>, Silvestre, R.T.<sup>1</sup>, Santiago, F.<sup>1</sup>, Ornellas, M.H.<sup>1</sup>, Alves, G.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Marcadores Circulantes, FCM, UERJ

<sup>2</sup> Coordenação de Pesquisa, INCA

## INTRODUÇÃO

A mistura BTX (benzeno, tolueno e xileno), presente na gasolina, tem potencial carcinogênico e induz à hipermetilação do DNA. Os frentistas de postos de gasolina estão expostos a essa mistura por 8 horas diárias ou mais, o que os torna vulneráveis a esta alteração epigenética. A metilação consiste na modificação do DNA no qual é adicionado o radical metil ( $CH_3$ ) nas citosinas. A maioria destas modificações acontecem nas ilhas CpG que levam a redução de expressão gênica, ou silenciamento dos genes. Padrões alterados de metilação do DNA são comuns em muitas doenças humanas, incluindo câncer, e há evidências de que a perda da regulação epigenética pode ser o evento transformante preliminar. Ambas as proteínas p16 e p14 agem como supressoras tumorais, atuando na regulação do ciclo celular.

## OBJETIVO

Detectar a hipermetilação nos promotores dos genes supressores tumorais  $p14^{ARF}$  /  $p16^{INK4a}$  em DNA de sangue de mulheres frentistas de posto de gasolina do município do Rio de Janeiro, e avaliar o perfil epidemiológico dessas frentistas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Cerca de 100 ng de DNA genômico de sangue foi usado para amplificação da região promotora dos genes  $p14^{ARF}$  /  $p16^{INK4a}$ . A reação em cadeia da polimerase metilação-específica (MSP - *Methylation Specific Polymerase*) foi realizada pelo EPITECT Kit, cat. 59104, (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com os protocolos do fabricante. Como controle positivo de metilação foi utilizado DNA da linhagem celular DLD-1. A detecção da hipermetilação dos promotores foi revelada por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante 10% corado com nitrato de prata. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do HUPE, CAAE 34310014.9.0000.5259.

## REFERÊNCIAS

Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 3:9821-6, 1996

Apoio Financeiro  
FAPERJ (APQ1 E-26/010.002022/2015) e Programa de Oncobiologia

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise epidemiológica do presente estudo, constatou-se que a idade média das 42 frentistas analisadas foi de 32,3 anos, e a média da menarca das mesmas, de 12,6 anos. O tempo de exposição aos compostos de gasolina foi cerca de 2,5 anos, e a porcentagem de etilistas e tabagistas foi de 47,6% e 19%, respectivamente. Das 42 amostras de sangue periférico, 19% (8/42) foram positivas para metilação no promotor de  $p14^{ARF}$ , e 64% (27/42) foram positivas para o promotor de  $p16^{INK4a}$ , sendo que 7% (3/42) apresentarem hipermetilação concomitante. Além disso, 24% (10/42) dos casos avaliados apresentaram hipometilação concomitante nas duas regiões promotoras avaliadas. Até o momento, 12 controles mulheres foram avaliadas para a região promotora de  $p16^{INK4a}$  e nenhum apresentou hipermetilação no promotor. A região promotora de  $p16^{INK4a}$  foi encontrada mais hipermetilada (mais de 3X) do que a região promotora de  $p14^{ARF}$ . A hipermetilação concomitante foi encontrada em uma minoria da coorte estudada.

Tabela 1: Perfil de metilação dos genes  $p14^{ARF}$  /  $p16^{INK4a}$

Promotor	Hipermetilação
$p16^{INK4a}$	74% (31/42)
$p14^{ARF}$	19% (8/42)
$p14^{ARF}$ e $p16^{INK4a}$	7% (7/42)

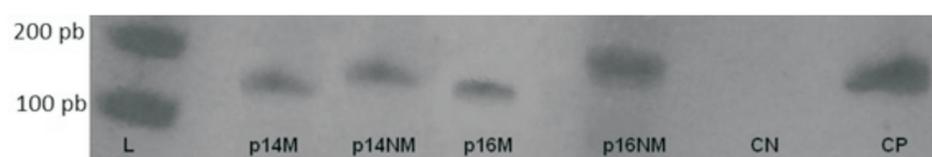


Figura 1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante 10% corado com nitrato de prata, demonstrando as regiões promotoras para metilação de  $p14^{ARF}$  e  $p16^{INK4a}$ . L – marcador de peso molecular; p14M – hipermetilação para a região de  $p14^{ARF}$ ; p14NM – caso não metilado para  $p14^{ARF}$ ; p16M – hipermetilação para a região de  $p16^{INK4a}$ ; p16NM – caso não metilado para  $p16^{INK4a}$ ; CN – controle negativo (H<sub>2</sub>O); CP – linhagem de células DLD-1 positivas para metilação

## CONCLUSÃO

Das frentistas analisadas, 19% (8/42) e 64% (27/42) estavam metiladas para as regiões promotoras de  $p14^{ARF}$  e  $p16^{INK4a}$ , respectivamente. Estes dados podem estar envolvidos com a exposição ao composto BTX, presente na gasolina. As análises dos controles estão em fase de conclusão, e assim, será feita uma análise estatística comparativa.