

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISABELA TIEMY PEREIRA

**ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DOS GENES *MMP2* E *MMP14* EM
LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA E EM TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA
UTILIZANDO A TÉCNICA DE MSP**

**CURITIBA
2013**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISABELA TIEMY PEREIRA

**ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DOS GENES *MMP2* E *MMP14* EM
LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA E EM TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA
UTILIZANDO A TÉCNICA DE MSP**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Giseli Klassen – Departamento de Patologia Básica

Co-orientadora: MSc. Edneia Amancio de Souza Ramos Cavaliere

**CURITIBA
2013**

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e a principal causa de morte entre as mulheres. Alterações na regulação da expressão gênica por eventos epigenéticos são mecanismos comuns neste tipo de câncer. MMP14 e MMP2 são enzimas pertencentes ao grupo das metaloproteases, capazes de degradar o colágeno, um dos principais constituintes da matriz extracelular. Sua função é amplamente descrita por atuar no mecanismo de metástases em diversos tipos de câncer. Dados recentes demonstraram que a linhagem tumoral de mama MCF7 possui o gene *MMP2* regulado por metilação do DNA. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de metilação do promotor dos genes *MMP14* e *MMP2* em um painel de linhagens tumorais para posterior aplicação dos resultados em tumores primários de mama utilizando a técnica de MSP (*methylation specific PCR*). Para isso, amostras de DNA foram isoladas das linhagens tumorais MDA-MB-231, MDA-MB-435, MCF7 e HB4a (linhagem controle normal) e tratadas com bissulfato de sódio. A ilha de CpG contendo 383 pares de bases do promotor do gene *MMP2* das linhagens foi amplificada por PCR, purificada em gel de agarose 1%, ligada ao vetor pGEMT@easy e eletroporado em estirpe de *E. coli* DH10B. Oito clones recombinantes para cada linhagem foram selecionados por α -complementação, confirmados por PCR, purificados e submetidos à técnica de sequenciamento utilizando *Big Dye Terminator* v3.1. Não foi possível a amplificação concomitante das ilhas de CpG do gene *MMP14*, e novos iniciadores devem ser planejados. Os resultados mostraram que a linhagem normal HB4a, que expressa o gene *MMP2*, apresentou 18,1% de metilação global enquanto as linhagens tumorais que não expressam *MMP2*, MCF7 e MDA-MB-231, mostraram 87,7% e 86,2% de metilação global, respectivamente. O perfil de metilação das linhagens tumorais permitiu planejar a localização dos iniciadores para a técnica de MSP capazes de distinguir as amostras metiladas das não metiladas. Entretanto, as reações de PCR utilizando esses iniciadores não ocorreram como esperado. Por isso, em continuidade ao estudo foi realizada a clonagem e o sequenciamento da ilha de CpG do gene *MMP2* a partir de amostras de tumores primários de mama sendo que uma das amostras com expressão positiva da proteína MMP2 apresentou-se altamente metilado (92,8%). Portanto, podemos concluir que a metilação do DNA pode não ser o único mecanismo epigenético de regulação do gene *MMP2*. Os resultados obtidos demonstram que o gene *MMP2* não pode ser avaliado por MSP em amostras de tumores devido a sua heterogeneidade no perfil de metilação, não correspondente à expressão do gene. Resultados como esse ainda não foram descritos na literatura e farão parte de novos estudos para compreensão do envolvimento de MMP2 no câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama. Epigenética. MMP2. Metilação do DNA.

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer and the leading cause of woman death in the world. Alterations on the regulation of gene expression by epigenetic events are common mechanisms in breast cancer. MMP2 and MMP14 are metalloprotease family enzymes which are capable of degrading collagen, a major constituent of the extracellular matrix. This function is widely described by acting on the mechanism of metastasis in many cancers. Recent data have shown that the MCF7 breast tumor line has *MMP2* gene regulated by DNA methylation. The aim of this study was to evaluate the profile of promoter methylation of *MMP2* and *MMP14* genes in tumor cell lines for subsequent application of the results in primary breast tumors using the MSP technique (methylation specific PCR). DNA samples were isolated from tumor cell lines MDA-MB-231, MDA-MB-435, MCF7 and HB4a (normal control) and treated with sodium bisulfite. The *MMP2* gene promoter has 383 bp of CpG island which was amplified from cell lines by PCR, purified on agarose gel 1% and cloned in vector pGEMT Easy ®. Eight recombinant clones for each cell line were selected by α -complementation, confirmed by PCR, purified and subjected to sequencing technique using Big Dye Terminator v3.1. It was not possible the *MMP14* gene amplification and new primers should be designed. The results showed that HB4a (normal control) which expresses *MMP2* gene had 18.1% of global methylation, while MCF7 and MDA-MB-231 that did not express *MMP2* gene showed 87.7% and 86.2% of overall methylation, respectively. The methylation profile of tumor cell lines allowed us to plan the location of primers for MSP technique capable of distinguishing methylated from unmethylated samples. However, the standardization of these primers was not successful, then we continued the study by cloning and sequencing the *MMP2* gene promoter from primary breast tumors samples to confirm the tumor methylation profile. One of the tumor samples with positive expression of the protein MMP2 showed high methylation (92.8%). Therefore, we conclude that DNA methylation may not be the only epigenetic mechanism of *MMP2* gene regulation. The results showed that *MMP2* gene can not be assessed by MSP in tumor samples due to its heterogeneity in methylation profile, not corresponding to the expression of the gene. Results like this have not yet been described in the literature and will be part of further studies to understand the involvement of MMP2 in breast cancer.

Keywords: Breast cancer. Epigenetics. MMP2. DNA methylation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ILHAS DE CpG DO GENE <i>MMP14</i>	21
FIGURA 2 -	SEQUÊNCIA DAS ILHAS DE CpG DO GENE <i>MMP14</i>	21
FIGURA 3 -	PADRONIZAÇÃO DOS INICIADORES PARA A AMPLIFICAÇÃO DAS ILHAS DE CpG DO GENE <i>MMP14</i>	24
FIGURA 4 -	ILHAS DE CPG DO GENE <i>MMP2</i>	24
FIGURA 5 -	ILHA DE CPG DO GENE <i>MMP2</i> AMPLIFICADA POR PCR.....	25
FIGURA 6 -	AMPLIFICAÇÃO DA ILHA DE CpG DO GENE <i>MMP2</i>	26
FIGURA 7 -	PURIFICAÇÃO DA ILHA DE CpG DO GENE <i>MMP2</i>	26
FIGURA 8 -	MINIPREP DOS CLONES POSITIVOS PARA O PCR DE COLÔNIA.....	27
FIGURA 9 -	PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE <i>MMP2</i> NAS LINHAGENS SEQUENCIADAS.....	28
FIGURA 10 -	PADRONIZAÇÃO DOS INICIADORES DE MSP EM LINHAGENS CELULARES.....	30
FIGURA 11 -	TENTATIVA DE PADRONIZAÇÃO DOS INICIADORES DE MSP EM LINHAGENS CELULARES.....	30
FIGURA 12 -	AMPLIFICAÇÃO DA ILHA DE CpG DO GENE <i>MMP2</i> EM TUMORES DE MAMA.....	31
FIGURA 13 -	PURIFICAÇÃO DA ILHA DE CpG DO GENE <i>MMP2</i> EM TUMORES DE MAMA.....	32
FIGURA 14 -	PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE <i>MMP2</i> NOS TUMORES DE MAMA.....	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
1.1	CÂNCER DE MAMA	6
1.2	MECANISMOS MOLECULARES DO CÂNCER	8
1.3	MARCADORES MOLECULARES NO CÂNCER DE MAMA	10
1.4	EPIGENÉTICA	11
1.5	METALOPROTEASES DE MATRIZ – MMPS.....	13
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	LINHAGENS CELULARES	17
3.2	AMOSTRAS DE TUMORES DE MAMA	17
3.3	ELETROFORESE EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA 8% E AGAROSE 1%.....	17
3.4	EXTRAÇÃO DE DNA.....	18
3.5	TRATAMENTO DE DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO	18
3.6	AMPLIFICAÇÃO DAS ILHAS DE CPG DO GENE <i>MMP14</i>	19
3.7	CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA ILHA DE CpG DO GENE <i>MMP2</i>	19
3.8	ANÁLISE DA METILAÇÃO EM TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA POR PCR METILAÇÃO ESPECÍFICA (MSP)	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1	ANÁLISE <i>IN SÍLICO</i> DO GENE <i>MMP14</i>	21
4.2	AMPLIFICAÇÃO DAS ILHAS DE CpG DO GENE <i>MMP14</i>	23
4.4	PERFIL DE METILAÇÃO DA ILHA DE CPG DO GENE <i>MMP2</i> EM LINHAGENS TUMORAIS	26
4.5	ANÁLISE DA METILAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE <i>MMP2</i> EM TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA POR PCR METILAÇÃO ESPECÍFICA (MSP)	29
4.6	PERFIL DE METILAÇÃO DA ILHA DE CpG DO GENE <i>MMP2</i> EM AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA	31
5	CONCLUSÕES.....	35
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
	ANEXOS	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer já é a principal causa de morte nos países desenvolvidos e a segunda causa de morte nos países em desenvolvimento (JEMAL *et al.*, 2011). O crescente aumento no número de casos de câncer nas últimas décadas nos países economicamente desenvolvidos ou em desenvolvimento tem sido atribuído ao crescimento e envelhecimento da população e também por estilos de vida que aumentam as chances da doença, tais como o tabagismo, vida sedentária e hábitos alimentares inadequados, principalmente nos países ocidentais (JEMAL *et al.*, 2011).

O câncer de mama já atingiu o topo da lista entre os mais frequentes no mundo entre as mulheres com aproximadamente 1,3 milhões de casos e 458.400 mortes ocorridas em 2008 (JEMAL *et al.*, 2011). Além disso, é uma das principais causas de morte de mulheres nos países industrializados, principalmente de mulheres com idade entre 30 e 50 anos (ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012). No Brasil, segundo dados do INCA, foram estimados 52.680 novos casos para 2012 com um risco estimado de 50 a 90 casos a cada 100 mil mulheres (INCA 2012).

No câncer de mama não é o tumor primário que causa a morte das pacientes, mas sim, a distribuição de células tumorais à distância, as chamadas metástases (WEIGELT *et al.*, 2005). Os principais alvos de metástase nesse tipo de câncer são os ossos, pulmões, fígado e cérebro. Portanto, estes órgãos, quando acometidos, são responsáveis pela alta taxa de mortalidade (ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012). Ainda não é possível avaliar o risco de metástases, e por causa disso, mais de 80% das pacientes com câncer de mama recebem terapia adjuvante. No entanto, 40% destas apresentam recidiva e morte em decorrência das metástases (WEIGELT *et al.*, 2005).

Fatores ambientais e estilo de vida têm relevante importância no desenvolvimento do câncer de mama, uma vez que a incidência e mortalidade por essa neoplasia apresentam variação em relação à distribuição geográfica e ao status socioeconômico. Populações com maior nível socioeconômico, países do

ocidente e mulheres residentes em áreas urbanas apresentam maiores taxas de incidência e mortalidade (TRICHOPOULOS *et al.*, 2008; INCA, 2012).

As taxas de incidência de câncer de mama também são influenciadas, dentre outros fatores, pelo gênero, idade, história reprodutiva da mulher, predisposição genética, doença benigna prévia, estilo de vida e exposição da mama à radiação (MCPHERSON *et al.*, 2000; TRICHOPOULOS *et al.*, 2008).

A incidência desse tipo de câncer aumenta com a idade, dobrando sua taxa a cada 10 anos até a menopausa, quando essa taxa reduz relativamente (MCPHERSON *et al.*, 2000). Com relação a história reprodutiva da mulher, a menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, idade avançada de primeira gestação e uso de contraceptivos orais estão associados ao aumento do risco ao câncer. Adicionalmente, a predisposição genética pode elevar o risco ao câncer de mama, por exemplo, pelas mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* que são responsáveis por uma proporção considerável dos tumores malignos de mama de caráter familiar (MCPHERSON *et al.*, 2000; TRICHOPOULOS *et al.*, 2008).

Dois teorias tentam explicar a origem dos carcinomas mamários. Em uma delas, o câncer de mama tem sua origem em uma célula única do epitélio glandular mamário que adquire uma ou mais mutações em genes que controlam programas essenciais, como proliferação, morte e diferenciação celular. Por apresentar vantagem seletiva, a célula transformada é selecionada e passa por uma expansão clonal, sendo que cada uma de suas células-filha tem o potencial de adquirir novas alterações moleculares. A progressão da neoplasia continua até a formação de uma massa tumoral com assinatura de expressão gênica específica. Os sucessivos eventos de alteração molecular, seleção e expansão clonal levam a um acúmulo de modificações genéticas e epigenéticas, induzindo a progressão tumoral (AXELROD *et al.*, 2006).

No modelo da célula-tronco de câncer (*cancer stem cell - CSC*), os tumores são organizados em uma hierarquia celular em que as células-tronco são as únicas células com potencial de proliferação ilimitada e com a capacidade de impulsionar o crescimento e progressão tumoral. Segundo esse modelo, os cânceres se originam a partir da transformação maligna de uma célula-tronco adulta. Isto leva a expansão clonal das células progenitoras que sofrem outras alterações genéticas e/ou epigenéticas para se tornarem totalmente transformadas. Dessa forma, os tumores contêm um componente celular que retêm as propriedades fundamentais de células-

tronco que iniciam e conduzem a carcinogênese (CHARAFE-JAUFFRET *et al.*, 2009).

As hiperplasias epiteliais de mama são caracterizadas pela proliferação de células epiteliais para o interior de ductos ou lóbulos mamários e são classificadas com base no padrão citológico e de crescimento arquitetural das células. Os mais incidentes são o do tipo ductal, o qual corresponde a cerca de 80% dos tumores diagnosticados, e os lobulares, com aproximadamente 15% (SCHMITT e GOBBI, 2006; BOMBONATI e SGROI, 2011).

O carcinoma de mama *in situ* constitui um conjunto de lesões da mama caracterizado pela proliferação epitelial maligna restrita aos ductos ou lóbulos mamários e, portanto, totalmente limitadas pela lâmina basal (SCHMITT e GOBBI, 2006). O grupo dos carcinomas invasivos é caracterizado por uma profunda heterogeneidade histomorfológica e clínica (BOMBONATI e SGROI, 2010) e inclui todos os carcinomas mamários que infiltram o estroma, independentemente da coexistência de componente *in situ*. O carcinoma ductal invasivo é o tipo mais frequente de câncer de mama e apresenta comportamento agressivo (SCHMITT e GOBBI, 2006).

1.2 MECANISMOS MOLECULARES DO CÂNCER

O tumor consiste de uma comunidade de células tumorais heterogêneas e de células estromais localizadas na matriz extracelular, nutridas por um sistema vascular (AZNAVOORIAN *et al.*, 1990). A heterogeneidade e complexidade do microambiente tumoral tem grande importância no desenvolvimento, crescimento, formação de metástases e até mesmo na resistência à terapia de muitos tipos de câncer (OHTANI, 1998).

O microambiente tumoral tem um papel crítico como regulador na progressão tumoral por seu contato direto com as células tumorais, atuando como uma fonte importante de fatores de crescimento, motilidade, angiogênicos e entre outros que afetam significativamente a biologia tumoral (BISSELL *et al.*, 2002). O estroma nos tumores é composto por membrana basal, leucócitos, capilares neo formados, fibroblastos e pela matriz extracelular (MEC) localizada em torno das

células tumorais (KASPAR *et al.*, 2006). Além disso, quando comparado com os tecidos normais, o estroma de tumores apresenta infiltrados celulares imunes, aumento de colágeno I e deposição de fibrina (RUDNICK e KUPERWASSER, 2012).

A progressão do câncer é um processo complexo que pode ser dividido em etapas que envolvem diversas modificações, sendo que as principais estão no controle do ciclo celular (PARK e LEE, 2003). Hanahan e Weinberg *et al.*, 2000 sugeriram que seis alterações são fundamentais na progressão de um câncer, são elas: 1. Auto-suficiência de sinais de crescimento; 2. Insensibilidade aos sinais inibitórios de crescimento; 3. Evasão da morte celular programada (apoptose); 4. Potencial replicativo ilimitado; 5. Angiogênese sustentada; 6. Invasão tecidual e metástase. Cada passo é crítico para o desenvolvimento de células hiperplásicas até um tumor avançado que tem a capacidade de formar metástases para locais distantes (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Em algum momento durante o desenvolvimento da maioria dos tipos de câncer humanos, a massa do tumor primário pode gerar algumas células que passam a invadir tecidos adjacentes e depois adquirem a capacidade de migração para locais distantes, aonde podem se estabelecer para formar novas colônias, denominadas metástases (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Do ponto de vista clínico, as metástases são consideradas um dos mais importantes estágios da tumorigênese, uma vez que correspondem a mais de 90% das mortes por câncer (WEIGELT *et al.*, 2005).

O processo metastático envolve as células tumorais, as células inflamatórias e do estroma. Inicialmente há uma transição epitelial-mesenquimal (TEM) com a perda de expressão de E-caderina, uma molécula de adesão, que confere às células tumorais características fibroblásticas e, conseqüentemente, o aumento de sua motilidade (KALLURI e WEINBERG, 2009). Como parte do processo metastático, além do aumento da motilidade das células tumorais, é necessária a destruição da matriz extracelular próxima a essas células, abrindo um caminho para sua passagem (STAMENKOVIC, 2000).

A capacidade que uma massa tumoral adquire para escapar do tumor primário e colonizar um novo ambiente também exige estratégias que envolvem mudanças na junção física das células com seu microambiente e também a ativação de diversas proteases extracelulares (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Durante a progressão do câncer, a matriz extracelular passa por constante remodelamento,

tanto pela degradação de moléculas pré-existentes, quanto pela síntese de novos componentes (KASPAR *et al*, 2006) sendo o crescimento tumoral influenciado também pelo estroma, principalmente pelos fibroblastos, e não apenas pelas células malignas propriamente ditas (KALLURI e ZEISBERG, 2006).

O remodelamento da matriz extracelular é um mecanismo essencial em vários processos fisiológicos e patológicos, como no desenvolvimento e proliferação de tecido em formação, diferenciação de células, bem como invasão e metástase de células neoplásicas. Além disso, a transformação da MEC é um regulador das interações estroma-epiteliais durante a formação de tumores malignos (GROBLEWSKA *et al.*, 2012).

1.3 MARCADORES MOLECULARES NO CÂNCER DE MAMA

O tratamento do câncer de mama sofreu várias mudanças nas últimas décadas devido à descoberta de biomarcadores específicos de diagnóstico e prognóstico que permitem a aplicação de terapias individualizadas para os diferentes subgrupos moleculares. Estes subgrupos mostram diferenças específicas em relação ao comportamento clínico-biológico (WEIGEL e DOWSETT, 2010). Alguns exemplos de genes envolvidos no processo da tumorigênese da mama e que são usados como marcadores moleculares de diagnóstico são os receptores de hormônios esteróides (receptor de estrógeno - RE e receptor de progesterona - RP), o oncogene *ERBB2* e o gene supressor de tumor *TP53* (HARRIS, 1996).

O estrógeno é um hormônio esteroidal que atua como estímulo proliferativo em células normais dos órgãos proliferativos, sendo considerado um estimulante para a iniciação e promoção de tumores nestes órgãos (FABIAN e KIMLER, 2007). O grau de expressão do RE é, sem dúvida, o mais importante marcador molecular no câncer da mama, uma vez que fornece o índice de sensibilidade ao tratamento endócrino e está relacionado a uma variedade de características histológicas nesse tipo de câncer. Tumores de pacientes que apresentam RE positivo, os quais correspondem a cerca de 80% dos casos de câncer de mama, utilizam o hormônio estrógeno como o principal estímulo de crescimento. Por este motivo, o RE é alvo direto das terapias hormonais, sendo a ausência ou presença da sua expressão um

ponto decisivo no tratamento (WEIGEL e DOWSETT, 2010). Sabe-se que boa parte das pacientes que apresentam resistência aos tratamentos adjuvantes se dá, em parte, pela inativação do gene que codifica para RE (*ESR1*) por metilação da sua região promotora. Este dado tem sido descrito para diferentes populações (GAUDET *et al.*, 2009; MIRZA *et al.*, 2009), inclusive em pacientes brasileiras (RAMOS *et al.*, 2010).

O gene do RP (*PGR*) também têm papel fundamental da tumorigênese do câncer de mama promovendo a proliferação celular. Este receptor pode ser expresso tanto em tecidos normais quanto em neoplásicos (LIU *et al.*, 2004). A perda de expressão de RP e RE constitui um potencial mecanismo de resistência à terapia hormonal e, em ambos os casos, a inativação da expressão desses genes por mecanismos epigenéticos tem um importante papel neste contexto (LIU *et al.*, 2004; DUNNWALD *et al.*, 2007).

O gene *ERBB2* é altamente expresso em aproximadamente 20% a 25% dos carcinomas ductais de mama (COUTURIER *et al.*, 2008) e codifica para a proteína denominada HER2, neu ou c-erb, a qual é semelhante ao receptor do fator de crescimento epidérmico. Em geral, mulheres com carcinoma invasivo HER2 positivo possuem uma doença mais agressiva, com pior prognóstico e maior probabilidade de recidiva, com sobrevida global menor quando comparadas com as mulheres HER2 negativas (HENRY e HAYES, 2006; WEIGEL e DOWSETT, 2010). Entretanto, a superexpressão de HER2 em tumores primários de mama beneficia as pacientes com a terapia anti-HER2 (WEIGEL e DOWSETT, 2010), que consiste no anticorpo monoclonal Herceptin® (trastuzumab) que se liga ao HER2, impedindo a sinalização de crescimento (CARTER *et al.*, 1992).

1.4 EPIGENÉTICA

O termo epigenética define as interações entre o genoma e o ambiente que levam a formação do fenótipo (WADDINGTON, 1942). Atualmente a epigenética é empregada para descrever todas as mudanças reversíveis (FEINBERG e TYCKO, 2004) e herdáveis no genoma que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA (MOMPARLER, 2003; NOWSHEEN *et al.*, 2012). As três principais alterações

epigenéticas conhecidas são a metilação do DNA, as modificações pós-traducionais das histonas e os RNAs não codificadores (ncRNAs). Todos atuam de alguma forma na regulação e modificação da expressão gênica (NOWSHEEN *et al.*, 2012).

A metilação do DNA é o processo epigenético mais bem conhecido e estudado, e devido a sua importância para esse trabalho é o tema que será detalhado a seguir.

Uma das modificações epigenéticas melhor descrita em eucariontes é a metilação do DNA, que é uma modificação química covalente resultante da metilação do carbono 5 de citosinas adjacentes às guaninas, os chamados dinucleotídeos CpG (BIRD, 2002). A metilação ocorre quando um grupo metil oriundo da 5-adenosilmetionina (SAM – doador universal de metil) é adicionado à posição 5 do anel pirimídico da citosina (C), gerando a 5-metilcitosina (m^5C), processo este catalisado pelas enzimas DNA Metiltransferases (DNMTs) (AUCLAIR e WEBER, 2012).

Padrões de metilação do DNA são estabelecidos no início da gênese do embrião e são delicadamente monitorados durante o desenvolvimento (NOWSHEEN *et al.*, 2012). Nas células normais, a metilação ocorre predominantemente em regiões repetitivas do genoma, como as regiões satélites, os elementos de transposons e retrovírus. A metilação do DNA é o mecanismo mais comum e estável de inativação epigenética de um gene (NOWSHEEN *et al.*, 2012), fundamental no silenciamento da expressão gênica e na manutenção da estabilidade da estrutura cromossômica, tendo em vista a existência da grande quantidade de DNA repetitivo presente no genoma humano (REIK, 2007).

A metilação do DNA ocorre quase exclusivamente no contexto de dinucleotídeos CpG, que são pouco frequentes no genoma, exceto em sequências curtas de DNA denominadas 'Ilhas de CpG' que possuem alta densidade desses dinucleotídeos (AUCLAIR e WEBER, 2012). Quando uma região apresenta um tamanho maior do que 0,5 kb de DNA e contem mais do que 55% de nucleotídeos C + G é denominada como ilha de CpG (GARDINER-GARDEN, 1987). As ilhas de CpG encontram-se geralmente posicionadas nas regiões 5' dos genes, ou seja, associadas às suas regiões promotoras e reguladoras (ANTEQUERA, 2003; AUCLAIR e WEBER, 2012). A maioria das ilhas de CpG encontra-se não metilada em todos os estágios do desenvolvimento de todos os tipos de tecido (ANTEQUERA, 2003). Nos casos em que ocorre metilação da ilha de CpG, há a

repressão da transcrição deste gene, que pode ocorrer através da inibição da ligação dos fatores de transcrição ou por mudança na estrutura da cromatina (BIRD, 2002; NOWSHEEN *et al.*, 2012).

Os perfis de metilação do DNA são perturbados em muitas doenças, em particular todos os tipos de câncer, que mostram tanto uma ampla hipometilação do genoma como uma hipermetilação incomum de genes supressores de tumores ou de RNA não-codificantes (AUCLAIR e WEBER, 2012). Em tecidos tumorais, genes supressores de tumor são muitas vezes inativados epigeneticamente por metilação, quando comparados com o tecido normal (NOWSHEEN *et al.*, 2012). A metilação de ilhas de CpG desempenha um importante papel na regulação transcricional, a qual geralmente é alterada em processos patológicos (DAWSON e KOUZARIDES, 2012).

Mais recentemente as ilhas de CpG também têm sido descritas como elementos importantes na regulação de *MMP2*, bem como de outras MMPs. A hipometilação já foi descrita como ativadora de *MMP2* em câncer de próstata (SHUKEIR e PAKNESHAN *et al.*, 2006) e as modificações no perfil de metilação do DNA do gene *MMP2* já foram descritas em linhagem de câncer de mama (CHERNOV *et al.*, 2009). A avaliação de aspectos epigenéticos em tumores de mama poderá ajudar a elucidar a biologia e heterogeneidade dessa doença (NOWSHEEN *et al.*, 2012).

1.5 METALOPROTEASES DE MATRIZ – MMPS

A migração de células tumorais está associada à degradação da matriz extracelular. Este processo é um acontecimento crítico e essencial durante a invasão de tecidos e metástases, permitindo que as células tumorais invadam os tecidos adjacentes. Proteases produzidas pelo tumor e pelas células do estroma são as responsáveis pela degradação da MEC e sua expressão é normalmente associada a um prognóstico ruim (ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012). Entre elas destacam-se as metaloproteases de matriz (MMPs) que são endopeptidases zinco-dependentes que atuam na clivagem de diversos substratos constituintes da MEC (STAMENKOVIC, 2000).

A atividade das MMPs é regulada fisiologicamente de maneira intrínseca para evitar perturbações na arquitetura tecidual. Nos diversos tipos de câncer, esta atividade torna-se desregulada, inclusive no câncer de mama (ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012). Estudos demonstram que essas enzimas são altamente expressas nos estágios iniciais de invasão tumoral e estão envolvidas nas etapas iniciais da carcinogênese mamária (STAMENKOVIC, 2000; ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012).

MT1-MMP, também conhecida como MMP-14, é uma enzima proteolítica que parece ser importante para a degradação das proteínas da matriz extracelular e ativação de MMPs, tais como pró-MMP-2, pró-MMP-13 e pró-MMP-8 (HOTARY, *et al.*, 2003; SABEH *et al.*, 2004; BARBOLINA e STACK, 2008). Suas funções têm sido descritas na invasão celular, migração, angiogênese e progressão tumoral em diversos tipos de câncer (SEIKI, 2003; JIANG *et al.*, 2006; MYLONA *et al.*, 2007). A proteína MMP-14 é a primeira MMP descrita como ancorada à superfície celular e está diretamente envolvida na locomoção celular e degradação da matriz através da ativação de MMPs solúveis. A MMP-14 interage com a proteína MMP-2, ativando-a e promovendo a invasão de células no estroma, sendo intrinsecamente relacionadas com a tumorigênese e a formação de metástases (EGEBLAD e WERB, 2002). Altos níveis de expressão de MMP-14 foram encontrados em diversos tipos de câncer, inclusive em tumores mamários agressivos, estando associados a uma menor sobrevida das pacientes (JIANG *et al.*, 2006).

A enzima MMP-2 é uma metaloprotease descrita como um dos principais orquestradores da remodelagem da MEC, atuando na degradação final das fibras de colágeno libertando as células tumorais a partir da rede circundante (ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012). MMP-2 é uma colagenase tipo IV, ou gelatinase, secretada na forma de zimogênio (proMMP-2), que requer clivagem pós-traducional extracelular para ganhar atividade biológica (MOHAMMAD *et al.*, 2012; ROBERTS *et al.*, 2002). Também conhecida como gelatinase A, é a mais amplamente distribuída das MMPs e é expressa constitutivamente pela maioria das células, incluindo células endoteliais e epiteliais (FODA e ZUCKER, 2001).

Tumores malignos com altos níveis de expressão dessa enzima possuem elevado risco de metástases e diminuição do tempo de sobrevida (QUARANTA *et al.*, 2007; TALVENSAARI-MATTILA *et al.*, 2003). Partyka e colaboradores (2012) demonstraram uma expressão elevada dessa enzima em tecidos de pacientes com câncer gástrico metastático, confirmando sua participação nos processos

neoplásicos e invasivos (PARTYKA *et al.*, 2012). Por estas razões, a MMP-2 tem sido associada a um pior prognóstico em câncer de mama, destacando-se o potencial dessa molécula como marcador clínico, um biomarcador de desenvolvimento de metástases (SHAH *et al.*, 2009; SULLU *et al.*, 2011; ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012).

Poucos marcadores moleculares estão disponíveis para prever o risco de metástases em pacientes com câncer de mama (ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012). Novos marcadores de prognóstico poderiam auxiliar a identificar as pacientes que estão em maior risco de desenvolvimento de metástases, o que pode permitir aos oncologistas a adaptação de estratégias de tratamentos (WEIGELT *et al.*, 2005). Nesse sentido, o campo da epigenética e o desenvolvimento de marcadores moleculares epigenéticos tem ganhado relevante atenção uma vez que podem contribuir para o diagnóstico e prognóstico do câncer, uma vez que possuem alta sensibilidade e especificidade (NOWSHEEN *et al.*, 2012).

Nesse contexto, existem fortes evidências do envolvimento da regulação da expressão dos genes *MMP14* e *MMP2* por mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA. Diante disso, esse trabalho pretendeu aprimorar o estudo do perfil de metilação do promotor desses genes, tanto em linhagens tumorais de mama, como também em tumores primários de mama.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil de metilação do promotor do gene *MMP14* em linhagens tumorais de mama e aprimorar o estudo do perfil de metilação do promotor do gene *MMP2* em linhagens tumorais de mama e em tumores primários de mama utilizando a técnica de MSP (*methylation specific PCR*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar e sequenciar as ilhas de CpG do gene *MMP14* de linhagens tumorais de mama após tratamento de DNA com o reagente bissulfito de sódio e correlacionar com o perfil de expressão nessas linhagens.
- Clonar e sequenciar a ilha de CpG do gene *MMP2* de linhagens tumorais de mama após tratamento de DNA com o reagente bissulfito de sódio e correlacionar com o perfil de expressão nessas linhagens.
- Avaliar o silenciamento epigenético do gene *MMP2* em tumores primários de mama utilizando a técnica de MSP (*methylation specific PCR*) e correlacionar com o perfil de expressão da proteína MMP-2 por imunohistoquímica

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS CELULARES

As linhagens tumorais de mama utilizadas neste projeto foram a MCF7, MDA-MB-231 e MDA-MB 435. A linhagem HB4a (células de epitélio mamário imortalizadas por SV40) foi utilizada como controle normal. Os cultivos das linhagens foram realizados em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com soro fetal bovino 10% (Gibco) seguindo o protocolo sugerido pela empresa ATCC.

3.2 AMOSTRAS DE TUMORES DE MAMA

Foram utilizadas três amostras de DNA de tumores primários de mama gentilmente cedidas pela Dra. Enilze M. F. Ribeiro e pelo Dr. Iglénir J. Cavalli, responsáveis pelo Banco de Tumores do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Todas as amostras catalogadas neste Banco de Tumores são provenientes do Hospital de Clínicas da UFPR (HC-UFPR) e do Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG), cujo responsável é o Dr. Rubens Silveira de Lima. As amostras foram obtidas mediante consentimento informado dos pacientes e aprovação do Comitê de Ética, Processo nº 25000.007020/2003-93; registro no CONEP: 7220 e parecer nº 251/2003 de 20/02/2003 do HNSG, Curitiba-PR.

3.3 ELETROFORESE EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA 8% E AGAROSE 1%

Os produtos das reações de PCR e de MSP foram avaliados em géis de poliacrilamida (visto que é um método mais sensível). Os géis de poliacrilamida 8% são preparados utilizando-se uma solução de acrilamida e bis-acrilamida na

proporção 29:1, TEMED a 0,1% (Life Technologies) como doador de elétrons da reação e persulfato de amônio (APS) a 0,1% como catalisador da reação. A revelação dos resultados foi feita pela impregnação com nitrato de prata segundo o método de Sanguinetti *et al.* (SANGUINETTI *et al.*, 1994). Demais produtos foram aplicados em eletroforese de gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,2 µg/ml.

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA genômico das linhagens foi realizada utilizando o protocolo *All prep* DNA/RNA (Qiagen) que proporciona a extração simultânea destas moléculas de modo qualitativo e satisfatório. A extração de DNA plasmidial foi feita utilizando o kit QiaPrep Spin miniprep (Qiagen). As amostras de DNA obtidas foram quantificadas em espectrofotômetro *Nanodrop* e submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo.

3.5 TRATAMENTO DE DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO

O tratamento com bissulfito de sódio dos DNAs das linhagens e tumores foi realizado através do protocolo *Epitect* (Qiagen). A eficiência dessa técnica foi verificada através de uma reação de *nested-PCR* (duas reações com diferentes condições de estringência) para a sequência satélite SATR-1 (ANEXO I). A escolha desta região foi em virtude da mesma ser hipometilada em amostras tumorais de câncer de mama (COSTA *et al.*, 2006).

3.6 AMPLIFICAÇÃO DAS ILHAS DE CPG DO GENE *MMP14*

O DNA das linhagens celulares utilizadas para o estudo da região promotora de *MMP14* foi isolado e tratado com bissulfito de sódio como descrito anteriormente. As tentativas de amplificação das ilhas de CpG foram realizadas utilizando-se os pares de iniciadores para o gene *MMP14* descritos no Anexo II. Foram feitas duas reações de PCR utilizando o mesmo par de iniciadores com condições de estringência diferentes, onde as condições de amplificação foram variadas (ANEXO II).

3.7 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA ILHA DE CpG DO GENE *MMP2*

As linhagens celulares HB4a, MDA-MB-231 e MCF7 foram utilizadas para o estudo da região promotora de *MMP2* em virtude de seus padrões de expressão. Para isso, o DNA das linhagens foi isolado e tratado com bissulfito de sódio como descrito anteriormente. A amplificação da ilha de CpG foi realizada utilizando-se o par de iniciadores descritos no Anexo III, e os produtos amplificados foram purificados de gel de agarose 1% utilizando o protocolo *Quick Gel Extration Kit Protocols* (Qiagen). Em seguida, o fragmento foi ligado ao vetor *pGEMT®easy* (Promega), e este foi eletroporado em estirpe de *E. coli* DH10B. Os clones recombinantes (positivos) foram selecionados por α -complementação. De cada linhagem avaliada, foram selecionados pelo menos oito clones positivos para permitir uma abordagem suficiente de alelos na preparação. Estes clones foram confirmados por PCR de colônia e submetidos à extração de DNA plasmidial utilizando o kit *QiaPrep Spin miniprep* (Qiagen). Cerca de 400 ng de cada preparação foram sequenciados utilizando-se o kit *BigDye terminator v3.1* e sequenciados no equipamento ABI 3110.

Para a amplificação da ilha de CpG do gene *MMP2* nos tumores primários de mama, o iniciador reverso foi substituído (ANEXO III), em virtude de termos

constatado melhor amplificação do fragmento desejado. Os procedimentos de clonagem e sequenciamento foram os mesmos descritos anteriormente.

3.8 ANÁLISE DA METILAÇÃO EM TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA POR PCR METILAÇÃO ESPECÍFICA (MSP)

As regiões diferencialmente metiladas nas linhagens tumorais foram escolhidas para o desenho de iniciadores. Para isto, devem ser consideradas duas condições (1) o padrão de expressão do gene – definido por RT-PCR (resultados não descritos); e (2) os resultados de sequenciamento.

Na técnica de MSP consideramos as modificações da sequência a ser analisada após o tratamento do DNA com o bissulfito de sódio. Deste modo, os iniciadores são desenhados sobre CGs determinados como diferencialmente metilados, levando-se em consideração o padrão de expressão da linhagem e a conversão de cada nucleotídeo pelo bissulfito de sódio dado pelo sequenciamento. Assim, duas reações de PCR são realizadas para uma mesma amostra, sendo uma para a condição metilada e outra para a condição não metilada, cada uma com seu par específico de iniciador (HERMAN *et al.*, 1996).

Foram testados dois pares de iniciadores para cada condição - metilada e não metilada - que estão descritos no Anexo IV. Em todas as reações foram utilizados os DNAs das linhagens HB4a (controle positivo para reação U e negativo para reação M) e MCF7 (controle negativo para reação U e positivo para reação M) como controles internos da reação de PCR.

Todas as reações foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo solução tampão 1 X, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 8 pmoles de cada iniciador (universal e reverso), 1U de *Taq* Platinum (Invitrogen) e entre 0,5 a 1,0 µL de DNA tratado com bissulfito de sódio. As condições de amplificação utilizadas na tentativa de padronização das reações tiveram as temperaturas e tempos de anelamento variados, bem como o número de ciclos (ANEXO IV).

fragmento como desejado. Então, um novo iniciador universal foi planejado e iniciou-se a tentativa de padronização, porém sem sucesso novamente. A Figura 3 mostra uma das tentativas de amplificação, exemplificando a tentativa de padronização. Diante disso, será necessário o desenho de novos iniciadores para dar continuidade ao estudo do perfil de metilação do promotor do gene *MMP14*.

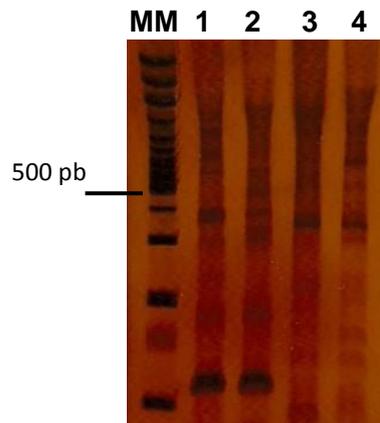


FIGURA 3 - PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DAS ILHAS DE CPG DO GENE *MMP14*. MM: marcador de massa; (1) HB4a ; (2) MCF-7 ; (3) MDA-MB-435; (4) MDA-MB-231. Fragmento esperado de 1011 pb.

4.3 ANÁLISE *IN SÍLICO* DO GENE *MMP2*

A região compreendendo 3306 pares de bases, que engloba desde a região promotora até o início do primeiro exon, foi avaliada para o gene *MMP2* utilizando o programa *Methprimer*. Sua região promotora apresenta quatro ilhas de CpG, que podem ser visualizadas na Figura 4 abaixo.

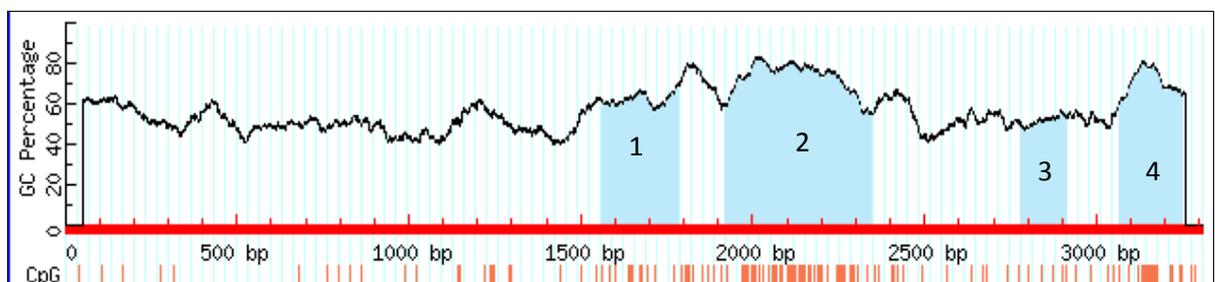


FIGURA 4 - ILHAS DE CPG DO GENE *MMP2*. Gráfico representativo das ilhas de CpG presentes na região promotora dentro da região avaliada (2 kb a montante e 2 kb jusante da região 5' TSS do gene *MMP2*).

Fonte: Adaptado de *Methprimer*.

4.4 PERFIL DE METILAÇÃO DA ILHA DE CPG DO GENE *MMP2* EM LINHAGENS TUMORAIS

Para avaliar o perfil de metilação do gene *MMP2* as linhagens foram cultivadas, o DNA cromossomal extraído, tratado com bissulfito de sódio e submetido ao controle da região satélite SATR-1.

Os iniciadores para a amplificação da ilha de CpG do gene *MMP2* utilizados nesse trabalho foram planejados e padronizados através de duas reações de PCR utilizando o mesmo par de iniciadores com condições de estringência diferentes (ANEXO III). Através desta metodologia foi possível a obtenção de uma boa quantidade de produto amplificado sendo possível a continuidade para a próxima etapa de purificação (Figura 6).

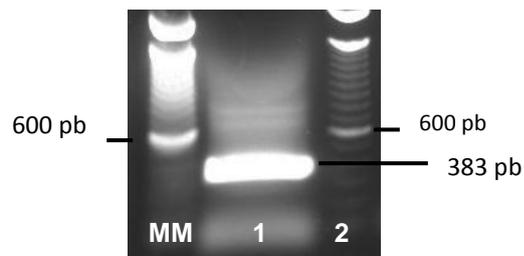


FIGURA 6 - AMPLIFICAÇÃO DA ILHA DE CpG DO GENE *MMP2*. MM: marcador de massa 100 pb, (1) HB4a (2) MM 100 pb. Fragmento de 383 pb pré-purificação.

Através da Figura 6 acima é possível observar que a ilha foi eficientemente amplificada estando apta a fase seguinte de purificação. A purificação foi realizada a partir da extração do gel de agarose. Na Figura 7 abaixo, é possível observar que a técnica foi realizada adequadamente, obtendo produto suficiente para a ligação no vetor de sequenciamento.

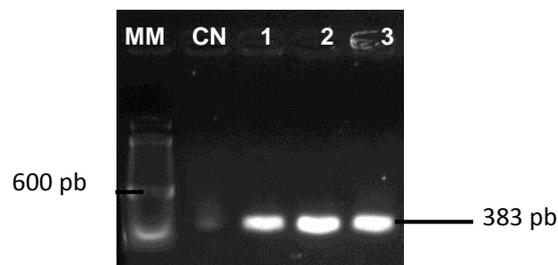


FIGURA 7 - PURIFICAÇÃO DE DNA CONTENDO A ILHA DE CPG DO GENE *MMP2*. MM: marcador de massa; CN: controle negativo, (1) HB4a; (2) MDA-MB-231, (3) MCF-7. Fragmento de 383 pb após a purificação.

Os produtos purificados foram ligados ao vetor *pGEMT@easy* (Promega). Este vetor proporciona a ligação através da complementação com suas timinas terminais, uma vez que a *Taq* Polimerase insere adeninas na reação do PCR, além da sua resistência ao antibiótico ampicilina, sendo possível uma pré-seleção dos clones.

Após a ligação ao vetor, o produto foi eletroporado em estirpe *E. coli* DH10B e os clones recombinantes foram selecionados por α -complementação. Nesta técnica é possível a seleção dos clones que receberam o inserto após a eletroporação, sendo diferenciadas em colônias brancas das colônias azuis - que não receberam o inserto. Isso se dá pela transcrição de uma porção da enzima β -galactosidase do plasmídeo, que complementa a porção presente na bactéria, e essa enzima ativa é capaz de degradar o substrato X-gal presente no meio, gerando um composto azul. Quando o inserto está presente, a transcrição não acontece e as colônias permanecem brancas.

Em seguida os clones foram transferidos para uma nova placa e submetidos ao PCR de colônia para a confirmação do inserto. Os clones que se mostraram positivos foram crescidos em meio líquido por aproximadamente 16h e submetidos ao protocolo de extração de DNA plasmidial (miniprep) que pode ser visualizado na Figura 8 abaixo.

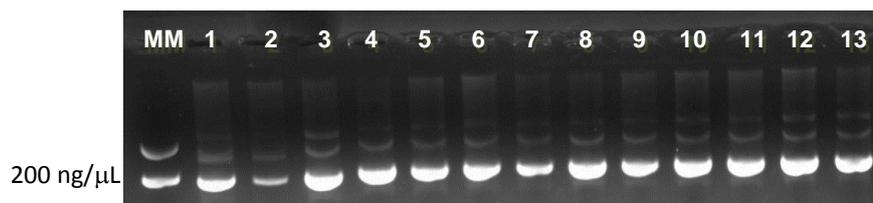


FIGURA 8 – ISOLAMENTO DE DNA DE CLONES CONTENDO A ILHA DE CpG do DO GENE *MMP2*. MM corresponde ao marcador de 200 ng/μL, 1 – 13. DNA plasmidial dos clones selecionados.

Em seguida, o DNA plasmidial foi submetido à técnica de sequenciamento e os resultados podem ser visualizados nas figuras abaixo.

Segundo os dados de sequenciamento obtidos para o gene *MMP2* foi possível observar que a linhagem normal HB4a apresentou um percentil de metilação de 18,1%. De acordo com estudos anteriores realizados pelo nosso grupo, sabemos que a linhagem HB4a expressa *MMP2*. As linhagens tumorais MCF7 e

MDA-MB-231, que não expressam *MMP2*, mostraram 87,7% e 86,2 % de metilação global respectivamente. Na Figura 9 abaixo constam os dados da metilação de cada clone selecionado de cada linhagem.

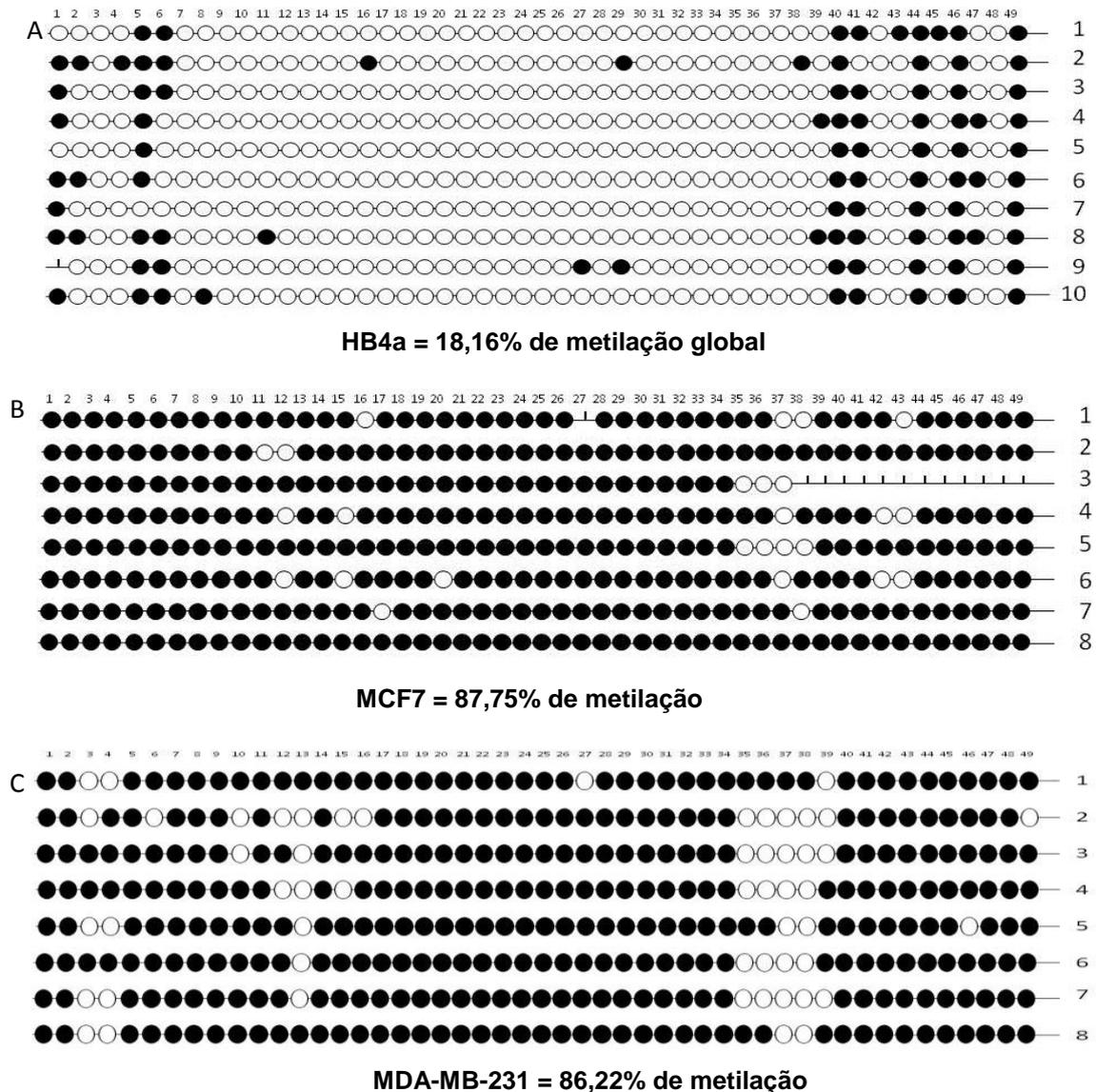


FIGURA 9. PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE *MMP2* EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA. A) metilação individual e global da linhagem HB4a; B) metilação individual e global da linhagem MCF7; C) metilação individual e global da linhagem MDA-MB-231. Cada dinucleotídeo está representado por um círculo, sendo que os círculos em preto representam os CGs metilados e os círculos brancos, os não metilados. Os traços correspondem à CGs indeterminados quanto ao seu perfil de metilação. A numeração acima dos círculos corresponde à numeração dos CGs, e à direita aos clones sequenciados.

O sequenciamento das linhagens HB4a, MCF7 e MDA-MB-231 corroboram os nossos resultados anteriores de expressão do gene *MMP2*. Ou seja, a linhagem normal HB4a expressa *MMP2* e, portanto, possui baixo nível de metilação no

promotor do gene. Por outro lado, as linhagens tumorais MCF7 e MDA-MB-231, que não expressam *MMP2*, possuem um alto grau de metilação global.

4.5 ANÁLISE DA METILAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE *MMP2* EM TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA POR PCR METILAÇÃO ESPECÍFICA (MSP)

A partir dos resultados do perfil de metilação do gene *MMP2* nas linhagens HB4a e MCF7, regiões diferencialmente metiladas nessas linhagens tumorais foram escolhidas para o desenho dos iniciadores, descritos na Tabela 2. Com o intuito de distinguir as amostras tumorais metiladas das não metiladas, utilizou-se a técnica de MSP (*methylation specific PCR*). Para isso, os iniciadores são desenhados em sítios de dinucleotídeos CG, levando-se em consideração a modificação dos nucleotídeos pelo bissulfato de sódio e o perfil de expressão da linhagem. Sendo assim, são necessários dois pares de iniciadores para a aplicação da técnica, um para a condição metilada e outro para a condição não metilada.

O primeiro par de iniciadores para a condição metilada (M) foi desenhado sobre os CGs 11 e 12 (universal) e 35, 36 e 37 (reverso). Enquanto para a condição não metilada (U), sobre os CGs 13, 14 e 15 (universal) e 35, 36 e 37 (reverso). Iniciou-se, então, a padronização da reação de MSP nas linhagens celulares HB4a e MCF7, em ambas as condições, metilado (M) e não metilado (U). Como a linhagem HB4a expressava *MMP2*, esperava-se visualizar banda apenas para reação U e a linhagem tumoral MCF7 que não expressava, esperava-se banda apenas para reação M. As condições de amplificação foram variadas, tanto em temperatura e tempo de anelamento, quanto na quantidade de ciclos (ANEXO IV), porém, não foi possível a padronização como esperávamos.

Na Figura 8, está exemplificada uma das tentativas de padronização, onde não conseguimos amplificar os produtos de modo satisfatório correspondentes para cada condição.

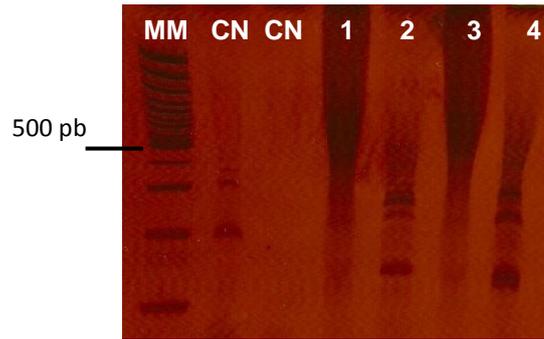


FIGURA 10. PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR MSP EM LINHAGENS TUMORAIS. MM: marcador de massa; CN: controle negativo, (1) HB4a reação U; (2) HB4a reação M; (3) MCF-7 reação U; (4) MCF-7 reação M. Fragmentos esperados de 201 pb (M) e 170 pb (U).

Diante dos resultados negativos decidiu-se pelo desenho de novos iniciadores, alterando-se a região de anelamento. Esses novos pares de iniciadores foram desenhados sobre os CGs 13 e 14 (universal) e 31 e 32 (reverso) para ambas as condições. Novamente, houve a tentativa da padronização dos iniciadores nas linhagens celulares, porém, da mesma maneira que o primeiro par testado, não foi possível esta padronização impossibilitando a continuidade da técnica. Na Figura 11 está exemplificada uma das tentativas de padronização onde não conseguimos amplificar os fragmentos correspondentes para cada condição.

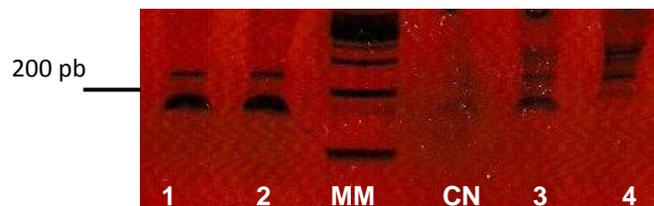


FIGURA 11. PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR MSP EM LINHAGENS TUMORAIS. MM: marcador de massa; CN: controle negativo, (1) HB4a reação M; (2) MCF-7 reação M; (3) HB4a reação U; (4) MCF-7 reação U. Fragmentos esperados de 133 pb (M) e 132 pb (U).

A técnica de MSP pode avaliar rapidamente o estado de metilação de regiões ricas em CGs em grande número de amostras necessitando de quantidades pequenas de DNA (KU *et al.*, 2011). Outra técnica que pode fornecer uma análise mais direta que a de MSP é o sequenciamento. No entanto, o MSP pode fornecer informação semelhante e tem as vantagens de ser mais simples e rápido, necessitando apenas de uma reação de PCR e análise em eletroforese (HERMAN *et al.*, 1996). Portanto, utilizando essa técnica seria possível avaliar o perfil de metilação de um grande número de amostras de tumores primários de mama.

Porém, diante dos nossos resultados, resolvemos dar continuidade clonando e sequenciando algumas amostras de tumores primários de mama para avaliarmos se o perfil de metilação desses tumores correspondia ao observado nas linhagens e compará-los com a expressão da enzima MMP-2 no tecido tumoral.

4.6 PERFIL DE METILAÇÃO DA ILHA DE CpG DO GENE *MMP2* EM AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA

Para a análise do perfil de metilação dos tumores, o DNA das amostras foi tratado com bissulfito de sódio como descrito em material e métodos. Como controle interno, o DNA tratado foi submetido a um PCR para a amplificação da região satélite SATR-1, que demonstrou a eficiência do tratamento. As três amostras tumorais foram escolhidas devido às características anatomopatológicas dos tumores, confrontando com os dados de imunohistoquímica já disponíveis em nosso laboratório. A região de interesse foi amplificada e pode ser visualizado na Figura 12 abaixo.

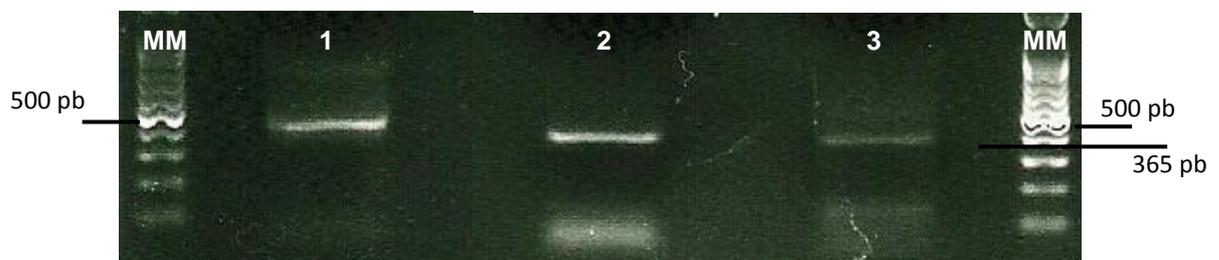


FIGURA 12. AMPLIFICAÇÃO DA ILHA DE CpG DO GENE *MMP2* EM TUMORES DE MAMA. MM: marcador de massa; (1) tumor 412; (2) tumor 505; (3) tumor 619. Fragmento de 365 pb pré-purificação.

Na Figura 12, é possível observar que as ilhas de CpG dos tumores foram eficientemente amplificadas, estando aptas à fase seguinte de purificação. A purificação foi realizada a partir da extração do gel de agarose e pode ser visualizada na Figura 13.

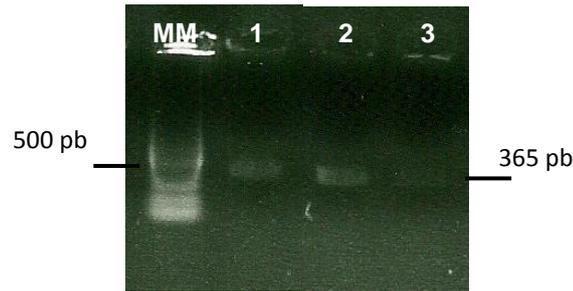
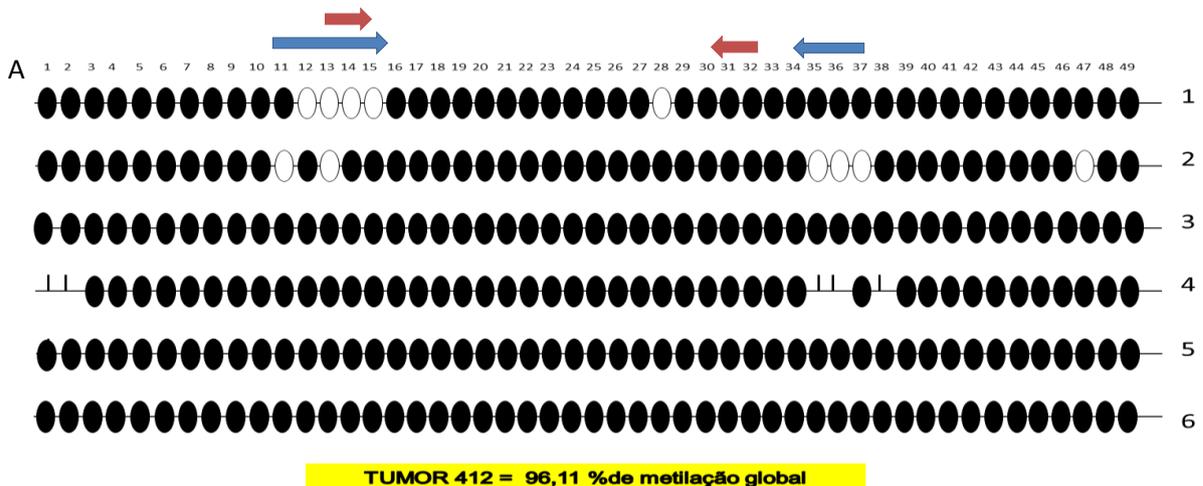


FIGURA 13. PURIFICAÇÃO DA ILHA DE CpG DO GENE *MMP2* EM TUMORES DE MAMA. MM: marcador de massa; (1) tumor 412; (2) tumor 505; (3) tumor 619. Fragmento de 365 pb pós purificação.

Amostras tumorais apresentam certa peculiaridade quanto à amplificação e purificação. Nem sempre é possível se obter uma quantidade ideal de produto como o esperado para as linhagens celulares, outro fator determinante da dificuldade em se realizar tal metodologia aos tumores. Embora os fragmentos obtidos apresentem pouca quantidade, os mesmos foram submetidos à ligação ao vetor como tentativa de clonagem, utilizando uma proporção superior ao volume final descrito no protocolo. Estes clones então foram eletroporados, selecionados e purificados para posterior sequenciamento que pode ser visualizado na Figura 14 abaixo.



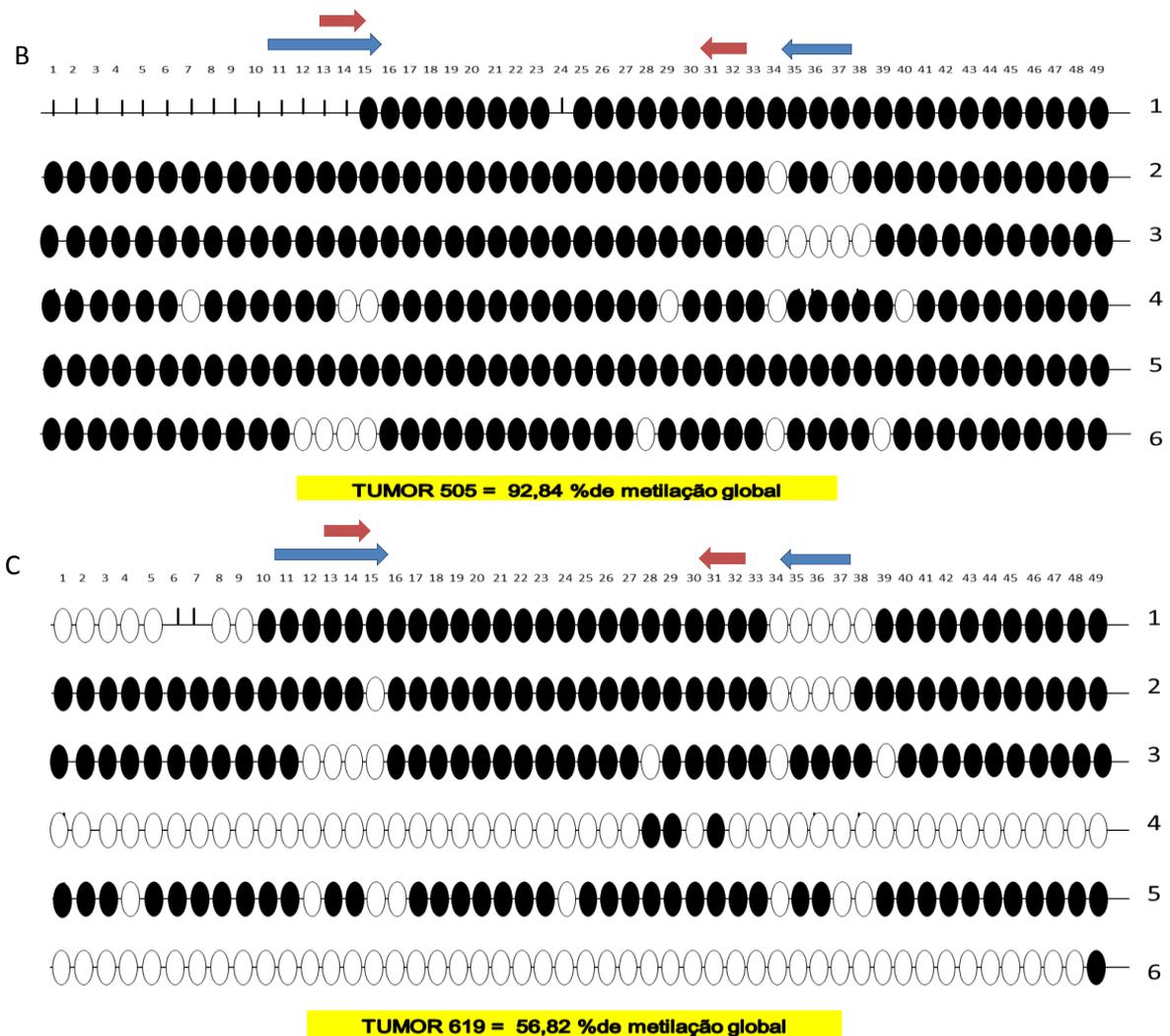


FIGURA 14. PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE *MMP2* EM TUMORES DE MAMA. A) metilação individual e global do tumor 412; B) metilação individual e global do tumor 505; C) metilação individual e global do tumor 619. Cada dinucleotídeo está representado por um círculo, sendo os círculos pretos representando os CGs metilados e os círculos brancos, os não metilados. Os traços correspondem à CGs indeterminados quanto ao seu perfil de metilação. A numeração acima dos círculos corresponde à numeração dos CGs, e à direita aos clones sequenciados. As setas localizam os iniciadores utilizados na primeira (azuis) e na segunda (vermelhas) tentativas de padronização.

De cada tumor primário avaliado, apenas seis clones foram obtidos. Este número, embora seja inferior aos oito clones recomendados, nos mostram um perfil que podemos considerar dentro dos padrões de confiabilidade. No trabalho desenvolvido em nosso laboratório (Ramos, *et al.*, 2012 – manuscrito em submissão) 44 amostras de tumores foram avaliados quanto ao padrão de expressão tecidual em cortes histológicos utilizando a técnica de imunohistoquímica. Os resultados mostraram que os tumores 412 (A) e 619 (C) não revelaram a presença da proteína MMP-2 na marcação com o anticorpo, enquanto o tumor

identificado como 505 (B) era positivo para a presença de MMP-2. Considerando nossos dados de sequenciamento destas amostras, esperávamos que os tumores que possuem MMP-2 apresentassem uma baixa taxa de metilação global enquanto tumores que não possuem MMP-2 citosólico apresentassem uma alta taxa de metilação global. Contudo, aliando os resultados obtidos no sequenciamento, foi possível observar que as amostras 412 e 619 com expressão negativa para MMP-2 mostraram uma metilação global de 96,1% e 56,8%, respectivamente. Enquanto a amostra 505, que tem expressão positiva para a proteína, apresentou 92,8% de metilação (Figura 14). Ou seja, os resultados do sequenciamento dos tumores não corroboram com os dados de expressão da proteína MMP2.

Segundo a literatura, nos casos em que ocorre alta taxa de metilação da ilha de CpG de determinado gene, há a repressão da sua transcrição, ou seja, a hipermetilação do DNA indica que genes estão desligados (NOWSHEEN *et al.*, 2012). Contudo observamos que a metilação de quase 93% da amostra 505 não corresponde com seu padrão de expressão positiva da MMP-2 obtida na imunohistoquímica. Ainda se faz necessário a análise de mais amostras de tumores porque talvez a nossa amostragem não seja representativa entre a relação que existe entre a metilação desse gene e sua expressão, entretanto podemos sugerir que pode existir uma provável regulação por outros fatores epigenéticos na expressão do gene *MMP2*.

Embora nossos resultados ainda demandem de uma análise mais detalhada, foi visualizado através da co-localização dos iniciadores de MSP na sequência que a dificuldade de padronização era devido à ausência de uma região adequada para o desenho destes iniciadores (ver setas na Figura 14). A posição ao qual eles se encontram denotam o porquê de termos sempre obtidos mais fragmentos do que o esperado para esta técnica tão específica, e que somente saberíamos esta dificuldade partindo de um sequenciamento de uma amostra de tumor. Através destes resultados também podemos observar que o desenho de iniciadores ideais para a técnica de MSP não será possível, uma vez que não há regiões diferencialmente metiladas entre amostras que expressam e não expressam o gene *MMP2*, considerando, neste caso, os dados de imunohistoquímica.

5 CONCLUSÕES

Com este trabalho concluiu-se que os iniciadores planejados para o estudo do perfil de metilação do promotor do gene *MMP14* não estavam funcionando adequadamente impossibilitando a continuidade de sua análise. Novos iniciadores devem ser planejados para que a região de interesse seja amplificada adequadamente e possibilite o desenvolvimento do estudo desse promotor.

Também foi possível concluir que, com relação ao gene *MMP2*, a linhagem normal de mama HB4a possui um perfil de metilação global de aproximadamente 19%, condizente com seu padrão de expressão positiva. Da mesma forma, os perfis de metilação das linhagens tumorais MCF7 e MDA-MB-231, superiores a 80%, correspondem ao padrão gênico de expressão negativa, corroborando os dados da literatura que demonstram que o gene *MMP2* é regulado por mecanismos epigenéticos de metilação do DNA.

Através do sequenciamento do gene *MMP2*, iniciadores para a técnica de MSP foram desenhados, no entanto, sua padronização não foi obtida embora exaustivas tentativas fossem realizadas. Dado este que só foi possível ser considerado a partir do sequenciamento da região promotora de *MMP2* em amostras de tumores primários, que demonstrou que esses iniciadores não estavam localizados em regiões adequadas. Com o sequenciamento das amostras tumorais, também foi possível observar que a relação entre metilação e expressão gênica do gene *MMP2* não está presente nos tumores. Este resultado aparentemente negativo poderá no futuro mostrar que, apesar deste gene ter sua regulação mediada pela metilação do DNA, este não é o único fator, e que demais estudos envolvendo a regulação de sua transcrição são necessários para a conclusão de sua participação na tumorigênese em câncer de mama metastático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTEQUERA, F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. **Cell Mol Life Sci**, v.60, n.8, p.1647-58, 2003.
- ARTACHO-CORDÓN, F.; RÍOS-ARRABAL, S.; LARA, P. C. *et al.* Matrix metalloproteinases: Potential therapy to prevent the development of second malignancies after breast radiotherapy. **Surgical oncology**, p. 1-9., 2012.
- AUCLAIR, G.; WEBER, M. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. **Biochimie**, p. 1-10., 2012.
- AXELROD, R.; AXELROD, D. E.; PIENTA, K. J. Evolution of cooperation among tumor cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 103, n. 36, p. 13474-13479, 2006.
- AZNAVOORIAN, S., M. L. STRACKE, *et al.* Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells. **J Cell Biol**, v.110, n.4, p.1427-38, 1990.
- BARBOLINA, M. V.; STACK, M. S. Membrane type 1-matrix metalloproteinase: substrate diversity in pericellular proteolysis. **Semin Cell Dev Biol**, v.19, n.1, Feb, p.24-33. 2008.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & development**, v. 16, n. 1, p. 6-21., 2002.
- BISSELL, M.J.; RADISKY, D.C.; RIZKI, A.; WEAVER, V.M.; PETERSEN, O.W. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. **Differentiation; research in biological diversity**, n. 70, p. 537-546, 2002.
- BOMBONATI, A.; SGROI, D. C. The molecular pathology of breast cancer progression. **The Journal of pathology**, v. 223, n. 2, p. 307–17, 2011.
- CARTER, P.; PRESTA, L., *et al.* Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.89, n.10, May 15, p.4285-9. 1992.
- CHARAFE-JAUFFRET, E.; GINESTIER, C.; BIRNBAUM, D. Breast cancer stem cells: tools and models to rely on. **BMC cancer**, v. 9, p. 202, 2009.
- CHERNOV, A. V.; SOUNNI, N. E., *et al.* Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP2/TIMP-2 axis in cancer cells. **J Biol Chem**, v.284, n.19, p.12727-34, 2009.
- COSTA, F.F.; PAIXAO, V.A.; CAVALHER, F.P.; RIBEIRO, K.B.; CUNHA, I.W.; RINCK, J.A.; O'HARE, M.; MACKAY, A.; SOARES, F.A.; BRENTANI, R.R. SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer. **Cancer Genet Cytogenet**, v.165, n.2, p.135-143, 2006.
- COUTURIER, J.; VINCENT-SALOMON, A., *et al.* Diagnosis of HER2 gene amplification in breast carcinoma. **Pathol Biol (Paris)**, v.56, n.6, Sep, p.375-9. 2008.
- DAWSON, M. A.; KOUZARIDES, T. Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. **Cell**, v. 150, n. 1, p. 12-27, 2012.
- DUNNWALD, L. K.; ROSSING, M. A., *et al.* Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. **Breast Cancer Res**, v.9, n.1, p.R6. 2007.
- EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, v.2, n.3, Mar, p.161-74. 2002.
- FABIAN, C. J.; KIMLER, B. F. Use of biomarkers for breast cancer risk assessment and prevention. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.106, n.1-5, Aug-Sep, p.31-9. 2007.
- FEINBERG, A. P. e TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nat Rev Cancer**, v.4, n.2, p.143-53, 2004.

- FODA, H. D.; ZUCKER, S. Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. **Drug discovery today**, v. 6, n. 9, p. 478-482., 2001.
- GARDINER-GARDEN, M. e FROMMER, M. CpG islands in vertebrate genomes. **J Mol Biol**, v.196, n.2, p.261-82, 1987.
- GAUDET, M. M.; CAMPAN, M., *et al.* DNA hypermethylation of ESR1 and PGR in breast cancer: pathologic and epidemiologic associations. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.18, n.11, Nov, p.3036-43. 2009.
- GROBLEWSKA, M.; SIEWKO, M.; MROCZKO, B.; SZMITKOWSKI, M. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer. **Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society**, v. 50, n. 1, p. 12-9., 2012.
- HANAHAN, D. e R. A. WEINBERG. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n.1, p.57-70, 2000.
- HARRIS, C. C. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic an abridged historical perspective. **Carcinogenesis**, v.17, n.6, Jun, p.1187-98. 1996.
- HENRY, N. L.; HAYES, D. F. Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring, and treatment of primary and metastatic breast cancer. **Oncologist**, v.11, n.6, Jun, p.541-52. 2006.
- HERMAN, J. G.; GRAFF, J. R.; MYÖHÄNEN, S.; NELKIN, B. D.; BAYLIN, S. B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 18, p. 9821-6., 1996.
- HOTARY, K. B.; ALLEN, E. D., *et al.* Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. **Cell**, v.114, n.1, Jul 11, p.33-45. 2003.
- INCA. Estimativas 2012: Incidência de câncer no brasil. **Instituto Nacional do Câncer**. M. D. S. D. B. D. E. <http://www.inca.gov.br>. Rio de Janeiro 2011.
- JEMAL, A.; BRAY, F.; FERLAY, J. Global Cancer Statistics. **CA Cancer Journal**, v. 61, n. 2, p. 69-90., 2011.
- JIANG, W. G.; DAVIES, G.; MARTIN, T. A; *et al.* Expression of membrane type-1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP in human breast cancer and its impact on invasiveness of breast cancer cells. **International journal of molecular medicine**, v. 17, n. 4, p. 583–90, 2006.
- KALLURI, R. e WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest**, v.119, n.6, p.1420-8, 2009.
- KALLURI, R. e ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer**, v.6, n.5, p.392-401, 2006.
- KASPAR, M., L. ZARDI, *et al.* Fibronectin as target for tumor therapy. **Int J Cancer**, v.118, n.6, p.1331-9, 2006.
- KU, J.-LOK; JEON, Y.-KYUNG; PARK, J.-GAHB. Methylation-Specific PCR. **Epigenetics Protocols**, v. 791, p. 23-32., 2011.
- LIU, Z. J.; ZHANG,X. B., *et al.* Progesterone receptor gene inactivation and CpG island hypermethylation in human leukemia cancer cells. **FEBS Lett**, v.567, n.2-3, Jun 4, p.327-32. 2004.
- MCPHERSON, K.; STEEL, C. M.; DIXON, J. M. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. **B. M. J.**, v. 321, n. 7261, p. 624-628, 2000.

- MIRZA, S.; SHARMA, G. *et al.* Clinical significance of Stratifin, ERalpha and PR promoter methylation in tumor and serum DNA in Indian breast cancer patients. **Clin Biochem**, v.43, n.4-5, Mar, p.380-6. 2009.
- MOHAMMAD, M. A; ZEENELDIN, A. A; ABD ELMAGEED, Z. Y. *et al.* Clinical relevance of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinases (MMP-2 and MT1-MMP) in human breast cancer tissue. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 366, n. 1-2, p. 269-75., 2012.
- MOMPARLER, R. L. Cancer epigenetics. **Oncogene**, v.22, n.42, p.6479-83, 2003.
- MYLONA, E.; NOMIKOS, A; MAGKOU, C. *et al.* The clinicopathological and prognostic significance of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-9 according to their localization in invasive breast carcinoma. **Histopathology**, v. 50, n. 3, p. 338-47, 2007.
- NOWSHEEN, S.; AZIZ, K.; TRAN, P. T. *et al.* Epigenetic inactivation of DNA repair in breast cancer. **Cancer letters**, p. 1-10., 2012.
- OHTANI, H. Stromal reaction in cancer tissue: pathophysiologic significance of the expression of matrix-degrading enzymes in relation to matrix turnover and immune/inflammatory reactions. **Pathol Int**, v.48, n.1, p.1-9, 1998.
- PARK, M. T. e LEE, S. J. Cell cycle and cancer. **J Biochem Mol Biol**, v.36, n.1, p.60-5, 2003.
- PARTYKA, R. GONCIARZ, M.; JALOWIECKI, P.; KOKOCINSKA, D.; BYRCZEK, T. VEGF and metalloproteinase 2 (MMP2) expression in gastric cancer tissue. **Med Sci Monit**, v. 18, n. 4, p. 130-134, 2012.
- QUARANTA, M.; DANIELE, A.; COVIELLO, M.; VENNERI, M.T.; ABBATE, I.; CARINGELLA, M.E. MMP-2, MMP-9, VEGF and CA 15.3 in breast cancer. **Anticancer research**, v. 27, p. 3593-3600, 2007.
- RAMOS, E. A.; CAMARGO, A. A., *et al.* Simultaneous CXCL12 and ESR1 CpG island hypermethylation correlates with poor prognosis in sporadic breast cancer. **BMC Cancer**, v.10, p.23. 2010.
- REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v.447, n.7143, p.425-32, 2007.
- ROBERTS, L.M.; VISSER, J.A.; INGRAHAM, H. A. Involvement of a matrix metalloproteinase in MIS-induced cell death during urogenital development. **Development**, n. 129, p. 1487-1496, 2002.
- RUDNICK, J. A; KUPERWASSER, C. Stromal biomarkers in breast cancer development and progression. **Clinical & experimental metastasis**, v. 2., 2012.
- SABEH, F.; OTA, I., *et al.* Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. **J Cell Biol**, v.167, n.4, Nov 22, p.769-81. 2004.
- SANGUINETTI, C. J; DIAS NETO, E. *et al.* Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v.17, n.5, p.914-2, 1994.
- SCHMITT, F.; GOBBI, H. Mama. In: BRASILEIRO-FILHO, G. *et al.* (Ed.). **Bogliolo: patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 613-643.
- SEIKI, M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. **Cancer Lett**, v.194, n.1, May 8, p.1-11. 2003.
- SHAH, F.D.; SHUKLA, S.N.; SHAH, P.M.; SHUKLA, H.K.; PATEL, P.S. Clinical significance of matrix metalloproteinase 2 and 9 in breast cancer. **Indian journal of cancer**, v.46, p. 194-202, 2009.

SHUKEIR, N., P. PAKNESHAN, *et al.* Alteration of the methylation status of tumor-promoting genes decreases prostate cancer cell invasiveness and tumorigenesis in vitro and in vivo. **Cancer Res**, v.66, n.18, p.9202-10, 2006.

STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Semin Cancer Biol**, v.10, n.6, p.415-33, 2000.

SULLU, Y.; DEMIRAG, G.G.; YILDIRIM, A.; KARAGOZ, F.; KANDEMIR, B. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast. **Pathology, research and practice**, v. 207, p. 747-753, 2011.

TALVENSAARI-MATTILA, A.; PAAKKO, P.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. **British journal of cancer**, v. 89, p.1270-1275, 2003.

TRICHOPOULOS, D.; ADAMI, H.-O.; EKBOM, A.; HSIEH, C.-C.; LAGIOU, P. Early life events and conditions and breast cancer risk: from epidemiology to etiology. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 122, n. 3, p. 481–5, 2008.

WADDINGTON, C. The Epigenotype. **Endeavour**, v.1, p.18-20, 1942.

WEIGEL, M. T.; DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. **Endocrine-related cancer**, v. 17, n. 4, p. R245–62, 2010.

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; VEER, L. J. VAN 'T. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature reviews/Cancer**, v. 5, n. 8, p. 591-602, 2005.

ANEXOS

ANEXO I

- PARES DE INICIADORES E CONDIÇÕES DAS REAÇÕES UTILIZADOS NA REAÇÃO NESTED-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DE SATR-1.

Par de iniciadores	Condições
	Reação 1
	95 °C – 5'
	94 °C – 3'
HIPO2 Universal-1	48 °C – 3'
5' GTT ATA TTA TTT TTT GTT TTT TTG 3'	72 °C – 2'
	94 °C – 3'
	50 °C – 3'
	72 °C – 2'
HIPO2 Reverso-1	
5' ACA TTT CCT TAT AAT ATT ATT CC 3'	94 °C – 1'
	52 °C – 1'
	72 °C – 1'
	72 °C – 5'
	Reação 2
	95 °C – 5'
	94 °C – 1'
HIPO2 Universal-2	50 °C – 3'
5' TAT AGT GGT GGT GTA TAT TTG 3'	72 °C – 2'
	94 °C – 3'
	52 °C – 3'
	72 °C – 2'
HIPO2 Reverso-2	94 °C – 45"
5' CAC CTA ACC TAT AAT ATT TCT TC 3'	54 °C – 40"
	72 °C – 2'
	72 °C – 5'

ANEXO II

- PARES DE INICIADORES E CONDIÇÕES DAS REAÇÕES UTILIZADOS NA PADRONIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DAS ILHAS DE CpG DO GENE *MMP14*

Par de iniciadores	Tamanho do fragmento	Condições testadas	
		Reação 1	Reação 2
PF14_NESTED		95 °C – 5'	95 °C – 5'
5' TGA GGA ATA ATT		94 °C – 45"	94 °C – 45"
TTT TTT AAT TTT AAG T		47 ± 5 °C – 45"	48 ± 5 °C – 45"
3'		72 °C – 2'	72 °C – 2'
	1011 pb	94 °C – 45"	94 °C – 45"
		49 ± 5 °C – 45"	50 ± 5 °C – 45"
		72 °C – 2'	72 °C – 2'
		5x	5x
RP14_NESTED		94 °C – 30"	94 °C – 30"
5' ATT AAC AAC AAA		51 ± 5 °C – 45"	52 ± 5 °C – 45"
AAA AAC CTA AAA AC 3'		72 °C – 2'	72 °C – 2'
		72 °C – 5'	72 °C – 5'
		35x	35x
		Reação 1	Reação 2
MMP14_FN		95 °C – 5'	95 °C – 5'
5' TGT TTT TTG TTT TTT		94 °C – 45"	94 °C – 45"
TTG TTT A 3'		44 ± 3 °C – 45"	45 ± 3 °C – 45"
		72 °C – 2'	72 °C – 2'
	823 pb	94 °C – 45"	94 °C – 45"
		46 ± 3 °C – 45"	47 ± 3 °C – 45"
		72 °C – 2'	72 °C – 2'
		5x	5x
RP14_NESTED		94 °C – 30"	94 °C – 30"
5' ATT AAC AAC AAA		48 ± 3 °C – 45"	49 ± 3 °C – 45"
AAA AAC CTA AAA AC 3'		72 °C – 2'	72 °C – 2'
		72 °C – 5'	72 °C – 5'
		35x	35x

ANEXO III

PARES DE INICIADORES E CONDIÇÕES DAS REAÇÕES UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DAS ILHAS DE CpG DO GENE *MMP2*

Par de iniciadores	Tamanho do fragmento	Condições	
Amostras linhagens celulares			
N2F_MMP2 5' AAG GGA TTG TTA GGA TTT G 3'	383 pb	Reação 1	Reação 2
		95 °C – 5'	95 °C – 5'
		94 °C – 45"	94 °C – 45"
		52 °C – 45"	54 °C – 45"
		72 °C – 2'	72 °C – 2'
		94 °C – 45"	94 °C – 45"
		54 °C – 45"	56 °C – 45"
		72 °C – 2'	72 °C – 2'
		94 °C – 30"	94 °C – 30"
		56 °C – 45"	58 °C – 45"
72 °C – 2'	72 °C – 2'		
72 °C – 5'	72 °C – 5'		
Amostras tumorais			
N2F_MMP2 5' AAG GGA TTG TTA GGA TTT G 3'	365 pb	Reação 1	Reação 2
		95 °C – 5'	95 °C – 5'
		94 °C – 45"	94 °C – 45"
		52 °C – 45"	54 °C – 45"
		72 °C – 2'	72 °C – 2'
		94 °C – 45"	94 °C – 45"
		54 °C – 45"	56 °C – 45"
		72 °C – 2'	72 °C – 2'
		94 °C – 30"	94 °C – 30"
		56 °C – 45"	58 °C – 45"
72 °C – 2'	72 °C – 2'		
72 °C – 5'	72 °C – 5'		
MMP2R1Ch 5' ACT CTT TAT CCR TTT TAA AAA C 3' (Chernov <i>et al.</i> , 2009)		94 °C – 30"	94 °C – 30"
		56 °C – 45"	58 °C – 45"
		72 °C – 2'	72 °C – 2'
		72 °C – 5'	72 °C – 5'

ANEXO IV

- INICIADORES UTILIZADOS NA TÉCNICA DE MSP

Iniciadores	Sequência 5'-3'	CpGs	Tamanho do fragmento
FM-MMP2 (1)	TTATGAGTCGTTGAGTCGGGT	11, 12	201 pb
RM-MMP2 (1)	TCAAAAAACCCGTAACGCG	35, 36 e 37	
FU-MMP2 (1)	TATTGAGTTAGTGGATTTTTGGA	13, 14 e 15	170 pb
RU-MMP2 (1)	CTCAAAAAACCCATAAACACAC	35, 36 e 37	
FM-MMP2 (2)	AGGTTATCGAGTTAGCGG	13 e 14	133 pb
RM-MMP2 (2)	CATCGTAACGCTCCCTAA	31 e 32	
FU-MMP2 (2)	AGGTTATTGAGTTAGTGG	13 e 14	132 pb
RU-MMP2 (2)	ATCATAAACTCCCTAAC	31 e 32	

Nota: Considera-se o M junto ao nome dos iniciadores como Metilado e U como não metilado (*Unmethylated*). F corresponde ao iniciador universal e R ao reverso. Dois pares de iniciadores foram testados para cada condição.

- CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZADAS PARA A PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE MSP.

Iniciadores	Condições	
FM-MMP2/RM-MMP2 (1)	95 °C – 5'	} 35 ± 3 x
	94 °C – 40"	
	52 ± 3 °C – 26 ± 4"	
	72 °C – 2'	
	72 °C – 5'	
FU-MMP2/RU-MMP2 (1)	95 °C – 5'	} 35 ± 3 x
	94 °C – 40"	
	51 ± 3 °C – 27 ± 2"	
	72 °C – 2'	
	72 °C – 5'	
FM-MMP2/RM-MMP2 (2)	95 °C – 5'	} 33 ± 2 x
	94 °C – 40"	
	54 ± 3 °C – 23 ± 7"	
	72 °C – 2'	
	72 °C – 5'	
FU-MMP2/RU-MMP2 (2)	95 °C – 5'	} 34 ± 1 x
	94 °C – 40"	
	46 ± 1 °C – 28 ± 3"	
	72 °C – 2'	
	72 °C – 5'	