

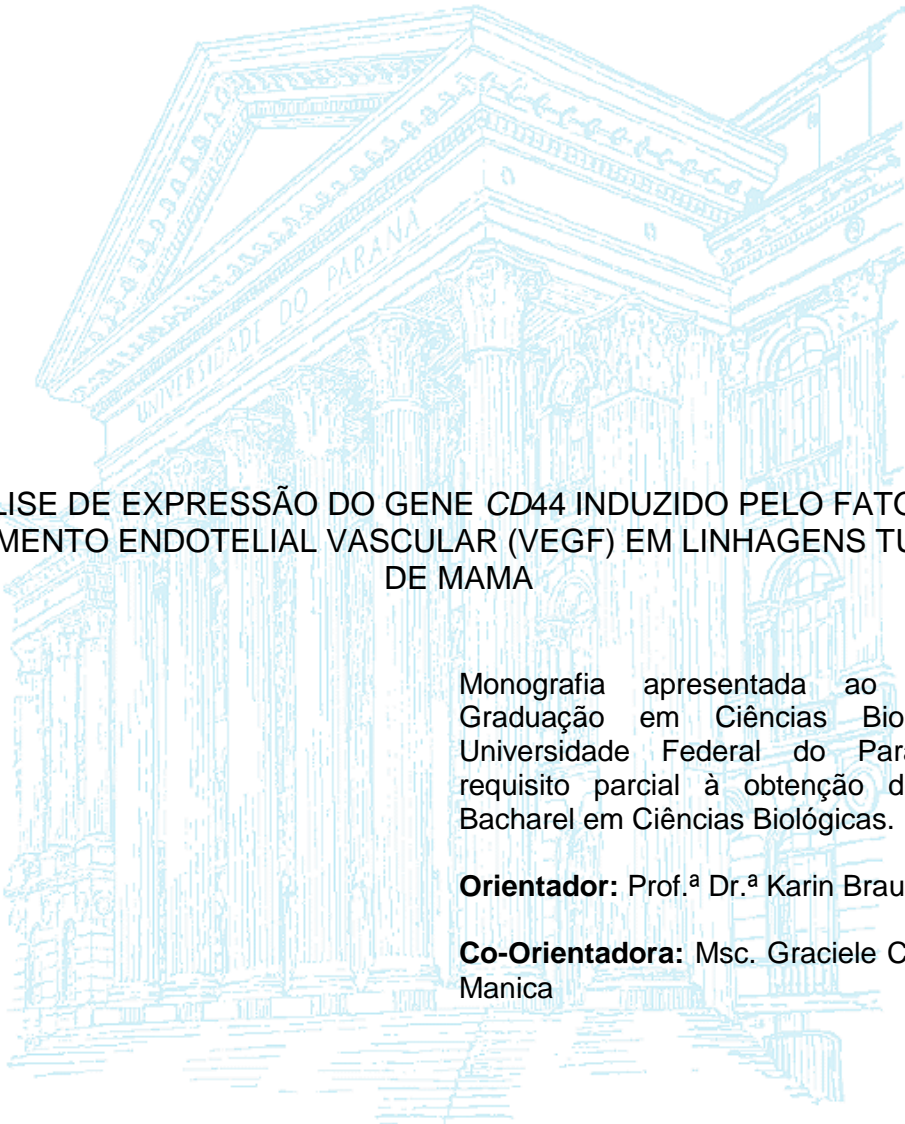
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA BUSATO TOLEDO

ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE *CD44* INDUZIDO PELO FATOR DE
CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) EM LINHAGENS TUMORAIS
DE MAMA

CURITIBA
2014

MARIANA BUSATO TOLEDO



ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE *CD44* INDUZIDO PELO FATOR DE
CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) EM LINHAGENS TUMORAIS
DE MAMA

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.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Karin Braun Prado

Co-Orientadora: Msc. Graciele Cristina More Manica

CURITIBA
2014

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo. A metástase é a principal causa de morte entre os pacientes diagnosticados com essa neoplasia. O microambiente tumoral é composto por células tumorais heterogêneas e por células estromais localizadas na matriz extracelular, nutridas por um sistema vascular. O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é um dos mediadores relacionados com a angiogênese, que é o processo de formação de vasos sanguíneos importantes para a transição epitelial-mesenquimal (TEM). Alterações entre as células e entre as interações celulares com os elementos de matriz estão relacionadas com a invasão tumoral. O receptor glicoproteico CD44 é o principal receptor do ácido hialurônico, do colágeno e fibronectina, presentes na matriz. A presença de CD44 na superfície das células caracteriza as células iniciadoras tumorais (*Cancer stem cells*). O objetivo desse trabalho foi avaliar a interferência do VEGF na expressão do gene *CD44* e de sua proteína na superfície celular das linhagens tumorais de mama BT-474, MCF-7, SKBR-3 e ZR-75-1. As células foram tratadas com 10 ng e 50 ng de VEGF por um período de 24 horas em meio de cultura livre de soro. O anticorpo anti-CD44 marcado com PE e seu isotipo foram utilizados nos ensaios de citometria de fluxo. Na linhagem tumoral MCF-7 foi observado um aumento significativo em relação ao controle sem VEGF ($p = 10^{-6}$) na marcação da superfície celular pela molécula CD44 após o tratamento com 10 ng de VEGF. A proporção de células CD44 positivas nessa linhagem, quando submetidas ao tratamento com 50 ng de VEGF (15,97%), foi inferior àquela observada no tratamento com 10 ng (55,33%) ($p = 10^{-6}$). As linhagens tumorais, BT-474 e SKBR-3 consideradas pela literatura negativas para CD44, não sofreram interferência na marcação de CD44 após o tratamento com VEGF. Por outro lado, a linhagem ZR-75-1 apresentou marcação positiva para CD44, independente do efeito do VEGF, porém sem significância estatística. A análise da expressão gênica de *CD44* nos experimentos foi realizada por RT-qPCR, empregando-se como referência o gene *HPRT1*. Os resultados de expressão do gene *CD44* nas linhagens tumorais frente aos tratamentos com VEGF não apresentaram diferenças significativas, sendo apresentada uma correlação ($p < 0,05$) entre estes dados e os resultados de marcação da citometria de fluxo. Pode-se concluir que VEGF interfere na expressão do receptor CD44 na superfície das células da linhagem tumoral MCF-7. Na demais linhagens não houve alteração significativa na expressão de CD44, quando estas foram tratadas com VEGF.

Palavras-chave: Câncer de mama; CD44; VEGF.

ABSTRACT

Breast cancer is the second most common type of cancer in the world. Metastasis is the leading cause of death among patients diagnosed with this cancer. The tumor microenvironment is composed of heterogeneous tumor cells and stromal cells located in the extracellular matrix, nourished by a vascular system. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the mediators related to angiogenesis, which is the process of formation of blood vessels that are important for epithelial-mesenchymal transition (EMT). Changes between cells and between cellular interactions with the matrix elements are related to tumor invasion. The glycoprotein CD44 is the main receptor for hyaluronic acid, collagen and fibronectin, present in the array. The presence of CD44 on the surface of cells characterizes the cancer stem cells. The objective of this work was to evaluate the interference of VEGF on expression of *CD44* gene and its protein in the cellular surface of the breast cancer cell lines BT-474, MCF-7, SKBR-3 and ZR-75-1. The cells were treated with 10 ng and 50 ng of VEGF for a period of 24 hours in serum-free culture medium. The anti-CD44 antibody, marked with PE, and its isotype were used for flow cytometry. In MCF-7 cell line was observed a significant increase as compared to the control without VEGF ($p = 10^{-6}$) in the label of the cell surface by CD44 molecule after treatment with 10 ng of VEGF. The proportion of positive cells for CD44 in this lineage when subjected to treatment with 50ng of VEGF (15.97%) was lower than that observed in the treatment with 10 ng (55.33%) ($p = 10^{-6}$). The cell lines BT-474 and SKBR-3, considered CD44 negative by the literature, not suffered interference in label of CD44 after treatment with VEGF. On the other hand, the cell line ZR-75-1 presented positive marking for CD44, independent of the effect of VEGF, but without statistical significance. Analysis of gene expression of *CD44* in experiments was performed by qRT-PCR, using as a reference the *HPRT1* gene. Despite the lack of statistical significance of the found in the results of expression of *CD44* gene in cell lines through VEGF treatments, there was a correlation ($p < 0.05$) between expression of *CD44* gene with the labeling results of flow cytometry. It can be concluded that VEGF interferes on CD44 expression on the surface of the MCF-7 cell line. In other lineages there was no significant change in the expression of CD44, when these were treated with VEGF.

Key-words: Breast cancer; CD44; VEGF

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ÉXONS DO GENE <i>CD44</i>	11
FIGURA 2 – IDENTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO DE MCF-7 ESTUDADA POR CITOMETRIA DE FLUXO	23
FIGURA 3 – CITOMETRIA MCF-7 SEM VEGF.	24
FIGURA 4 – CITOMETRIA MCF-7 COM 10 NG VEGF.	25
FIGURA 5 – CITOMETRIA MCF-7 COM 50 NG VEGF.....	25
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DOS VALORES DE $2^{-\Delta\Delta CT}$ OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS DE RT-qPCR PARA CADA LINHAGEM.	27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	8
2.1	CÂNCER DE MAMA.....	8
2.2	FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)	9
2.3	CD44 E SUA ESTRUTURA PROTEICA.....	11
2.4	CD44 NO CÂNCER	12
3	OBJETIVOS	15
3.1	OBJETIVO GERAL	15
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4	MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1	LINHAGENS CELULARES OU MATERIAL BIOLÓGICO.....	16
4.2	CULTIVO CELULAR	16
4.3	TRATAMENTO COM VEGF	17
4.4	EXTRAÇÃO DE DNA E RNA.....	18
4.5	SINTESE DE CDNA	18
4.6	RT-PCR E RT-qPCR.....	19
4.7	ELETROFORESE EM GEL POLIACRILAMIDA	20
4.8	CITOMETRIA DE FLUXO.....	20
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
5.1	TRATAMENTO COM VEGF E CITOMETRIA DE FLUXO	22
5.2	TRATAMENTO COM VEGF E ANÁLISE POR RT-qPCR.....	26
6	CONCLUSÕES	28
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
	ANEXOS	34

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome designado ao grupo de mais de 100 doenças que tem como principal característica o desenvolvimento de células que perderam sua capacidade de crescimento normal e, assim, sofreram multiplicação e proliferação desordenada, com potencial invasivo (INCA, 2014).

A metástase é uma das principais características dos tumores malignos, causando mais de 90% das mortes nos pacientes com câncer. É um processo complexo com muitos passos, os quais envolvem a propagação das células cancerosas do seu sítio primário e o estabelecimento destas em órgãos distantes (VALASTYAN & WEINBERG, 2011). Durante a progressão tumoral as células adquirem um conjunto de propriedades metastáticas, devido a uma série de alterações genéticas. Como resultado, as células tumorais se desprendem do sítio primário, penetram no tecido conectivo da membrana basal e invadem estruturas adjacentes, incluindo os linfonodos e os vasos sanguíneos. Subsequentemente, estas células são transportadas para sítios de crescimento secundários, caracterizando a metástase. A perda da coesividade entre as células e o ganho dessas novas funções é importante na cascata metastática (HART; GOODE; WILSON, 1989).

No câncer de mama, as metástases são as principais causas de óbito. Compreender os mecanismos que desencadeiam esse processo é essencial para o entendimento da progressão do câncer. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) tem papel fundamental no processo de angiogênese, essencial para o crescimento e migração tumoral. A molécula CD44 é um marcador de células iniciadoras tumorais, além de auxiliar na ativação de metaloproteases que degradam a matriz extracelular, processo importante na migração tumoral.

Neste trabalho pretendem-se verificar a influência de VEGF na expressão de CD44 em linhagens tumorais de mama que expressam pouco ou que não expressam esse receptor e, assim, analisar parte da relação entre essas duas moléculas. Sabendo-se que CD44 e VEGF são moléculas pró-metastáticas, este estudo poderá contribuir na compreensão dos mecanismos moleculares importantes relacionados ao desenvolvimento e metástase do câncer de mama.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é segundo tipo mais comum de câncer que acomete a população mundial. Em 2012, de acordo com o banco de dados da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), GLOBOCAN, 1,7 milhões de novos casos dessa neoplasia foram diagnosticados em mulheres ao redor do mundo (IARC, 2013). Estimam-se para o ano de 2014 e 2015 a ocorrência de 57.120 novos casos de câncer de mama no Brasil, com um risco estimado de 56 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2014).

O câncer de mama é derivado das células epiteliais que revestem a unidade ducto terminal do lóbulo mamário, sendo por isso denominado carcinoma, (SAINSBURY; ANDERSON & MORGAN, 2000), e apresenta uma grande heterogeneidade molecular e clínica, o qual dificulta a escolha do tratamento (GAGE; WATTENDORF & HENRY, 2012). É classificado como não invasivo ou *in situ*, quando as células tumorais não ultrapassam a camada basal dos ductos e dos lóbulos, correspondendo de 15 a 30% dos tumores malignos de mama (KHATIB & MODJTABAI, 2006); e do tipo invasivo (VIEIRA *et al.*, 2008), quando há a disseminação das células tumorais pela membrana basal dos ductos e lóbulos alcançando os tecidos normais adjacentes, correspondendo cerca de 70% a 85% dos casos de câncer de mama (KHATIB & MODJTABAI, 2006).

Os carcinomas mamários possuem uma etiologia variada, resultante da interação de fatores genéticos, epigenéticos, ambientais, sociais, características e hábitos individuais que tem efeitos cumulativos (PARKIN & FERNÁNDEZ, 2005). Seu desenvolvimento é resultado de alterações celulares decorrentes de mutações genéticas, importantes para a manutenção da homeostase celular. Dois tipos de genes estão relacionados a estas alterações, podendo estar mutados, sendo responsáveis pelo controle da divisão e diferenciação celular: os oncogenes e os genes supressores de tumor (OSBORNE *et al.*, 2004).

Os proto-oncogenes agem na regulação do ciclo celular e quando mutados são denominados de oncogenes, podendo ativar e promover a divisão celular. Os

produtos dos proto-oncogenes desempenham papel importante na regulação de atividades celulares (OSBORNE *et al.*, 2004). Um oncogene importante, e mais conhecido, para a progressão do câncer de mama é o *ERBB2* (HER2), um receptor transmembrana com atividade tirosina quinase, que fosforila outras proteínas que regulam a expressão de genes envolvidos em processos de crescimento e divisão celular, e atua como transdutores de sinais até o núcleo (HOWE & BROWN, 2011).

Os genes supressores de tumor inibem ou reprimem a proliferação celular através do controle do ciclo celular ou promovendo a apoptose. Quando mutados estes genes podem aumentar a probabilidade de formação do tumor. Em alguns casos, esses genes, ao invés de mutados, podem estar epigeneticamente regulados, como a metilação da região promotora, levando ao silenciamento deste gene (OSBORNE *et al.*, 2004). Alguns dos genes supressores de tumor mais conhecidos envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama são: *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *SYK*, *NES1* (BUCHHOLZ & WAZER, 2002).

Os principais alvos metastáticos no câncer de mama são os ossos, pulmões, fígado e cérebro e quando acometidos, estes órgãos são os 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).

2.2 FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)

O microambiente tumoral é composto por células tumorais heterogêneas e por células estromais localizadas na matriz extracelular, nutridas por um sistema vascular (AZNAVOORIAN *et al.*, 1990). Inicialmente ocorre uma transição epitelial-mesenquimal (TEM) com a perda de expressão da molécula de adesão E-caderina (CDH1), conferindo às células tumorais características fibroblásticas e, conseqüentemente, o aumento de sua motilidade (KALLURI e WEINBERG, 2009). A ativação e a hiperproliferação das células estromais e a presença de macrófagos associados ao tumor facilitam a TEM das células tumorais (TLSTY *et al.*, 2006).

É necessária, além do aumento da motilidade das células tumorais, a degradação da matriz extracelular próxima a essas células, facilitando sua migração para outros locais (STAMENKOVIC, 2000). A transição epitelial-mesenquimal é importante para que as células tumorais adquiram características migratórias, sendo importante que ocorra a formação de vasos sanguíneos, processo denominado de angiogênese, para as células tumorais migrarem. Mediadores pró-inflamatórios promovem a ativação das vias de sinalização favoráveis à angiogênese e invasão, controladas principalmente, pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (WANG *et al.*, 2014), também conhecido como fator de permeabilidade vascular (BENZAZZI *et al.*, 2014).

VEGF compreende uma família de cinco fatores de crescimento: VEGFA, considerado o protótipo dos demais, VEGFB, VEGFC, VEGFD e o fator de crescimento da placenta (PLGF) (KOCH *et al.*, 2011). A maioria dos membros dos ligantes e receptores da família VEGF, principalmente o VEGFA são regulados pelo fator induzível pela hipóxia (HIF) que está associado a condições de hipóxia presentes em ambientes de necrose (GERMAIN *et al.*, 2010). Duas formas de VEGF são normalmente produzidas pelas células endoteliais e pelas células tumorais de mama: VEGF₁₂₁ e VEGF₁₆₅ (FOLKMAN, 1995; FERRARA, 2002). Além disso, VEGF também age como um fator anti-apoptótico, diretamente relacionado com a sobrevivência celular, por induzir a proteína Bcl-2 em células endoteliais e células de câncer de mama (PIDGEON *et al.*, 2001).

A angiogênese é essencial para o desenvolvimento, progressão e metástase dos tumores malignos (FOLKMAN, 1995; FERRARA, 2002). Na ausência da angiogênese, os tumores não conseguem crescer mais que 1-2 mm² (BERGES & BENJAMIN, 2003). Com o crescimento do tumor ocorre a hipóxia, que estimula a produção de fatores angiogênicos como o VEGF e FGF (*fibroblast growth factor*). Estas moléculas se ligam às células endoteliais estimulando a proliferação e produção de proteases que digerem a membrana basal e a matriz extracelular que as cercam. As células endoteliais então começam a migrar em feixes paralelos, na direção de VEGF (químico-atraente) para formar o novo vaso (TONINI; ROSSI & CLAUDIO, 2003). A sinalização de VEGF e seu receptor, VEGFR, é uma via de sinalização fisiológica, e também patológica, que promove a angiogênese endotelial e a mitogênese de células não endoteliais. Tem sido proposta a existência de uma “troca angiogênica” observada durante a transição de um microambiente com

predomínio de fatores anti-angiogênicos e de células cancerosas dormentes para um ambiente com fatores pró-angiogênicos e de crescimento tumoral rápido (PAÉZ *et al.*, 2012).

2.3 CD44 E SUA ESTRUTURA PROTEICA

CD44, também conhecida como molécula de adesão celular, antígeno Hermes e PGP-1, é uma glicoproteína transmembrana do tipo I amplamente expressas pelas células, sendo codificado por um único e conservado gene com aproximadamente 50 kilobases (kb). O gene *CD44*, localizado no cromossomo 11p13 em humanos (GUNTHERT *et al.*, 1995), contém 20 éxons, dos quais 10 são variantes (FIGURA 01) e estão sujeitos à regulação pós-transcricional, como *splicing* alternativo e modificação protéica, gerando diferentes isoformas com pesos moleculares variando de 80 a 200 kDa. A variante 1 não é expressa em humanos por possuir um *stop códon* (SCREATON *et al.*, 1992; NAOR; SIONOV & ISH-SHALOM, 1997).

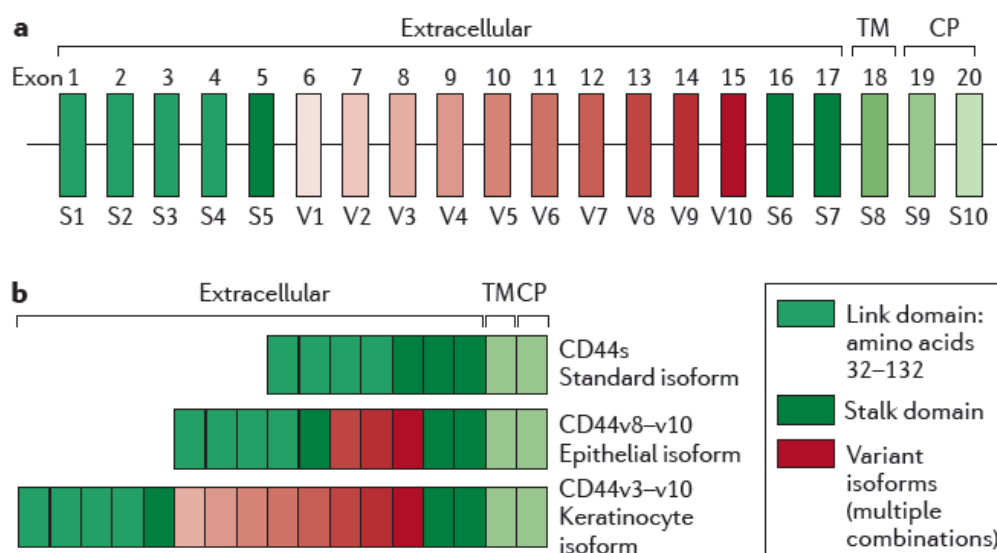


FIGURA 1 – ÉXONS DO GENE *CD44*. a) éxons de *CD44*: éxons da região constante (barras verdes), usados em todos os RNAm de *CD44* e proteínas, b) éxons variantes de *CD44* (barras vermelhas), usados em proteínas variantes de *CD44* e são selecionados por *splicing* alternativo. Fonte: ZÖLLER, 2011.

Splicing específico em tecidos resulta na formação da forma padrão de CD44 (CD44s), a qual não contém nenhum dos éxons variantes, sendo a forma mais expressa em células normais. CD44s está presente em todas as isoformas e consiste em um domínio extracelular, que possui uma sequência sinal N-terminal (éxon 1) e um sítio de ligação para a ligação ao ácido hialurônico (éxons 2 e 3), uma região proximal à membrana plasmática (éxons 4, 5, 16 e 17), um domínio transmembrana (éxon 18) e um domínio citoplasmático (éxons 19 e 20) (THORNE; LEGG & ISACKE, 2004). As isoformas variantes de CD44, nomeadas pelos éxons que possuem, são expressas somente em poucos tecidos epiteliais, principalmente durante a proliferação celular, durante o desenvolvimento embrionário e em muitos tipos de câncer (NAOR; SIONOV & ISH-SHALOM, 1997).

O domínio N-terminal pode interagir com muitas moléculas, incluindo, além do ácido hialurônico (principal componente da matriz extracelular), outras moléculas pertencentes à família dos glicosaminoglicanos, laminina, fibronectina e colágeno (NAOR; SIONOV & ISH-SHALOM, 1997). Além disso, o domínio extracelular pode possuir sulfato e/ou sulfato de heparan, possibilitando a ligação de fatores de crescimento, como o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2) (BENNETT *et al.*, 1995).

O receptor CD44 tem participação em diversas atividades celulares, processos fisiológicos e patológicos, incluindo: interação célula-célula, célula-matriz extracelular, migração celular, apresentação de fatores de crescimento, citocinas, transmissão de sinal de superfície celular para o seu interior, apoptose, sobrevivência, proliferação celular, desenvolvimento, inflamação, cicatrização, hematopoese, resposta imune e progressão tumoral (ZÖLLER, 2011).

2.4 CD44 NO CÂNCER

O receptor CD44 tem um papel essencial em muitas atividades tumorais e sua expressão em tecidos tumorais é associada com o aumento da propagação metastática em diferentes tipos de câncer (NAOR *et al.*, 2008). Dependendo do órgão afetado, o padrão das isoformas do gene *CD44* expressas e a ocorrência de metástases são diretamente ou inversamente relacionados. Por exemplo, as

isoformas de CD44 são superexpressas em muitos tipos de células tumorais, como no câncer gástrico, pancreático, pulmonar e renal (HEIDER *et al.*, 1993; LIM *et al.*, 2008; PENNO *et al.*, 1994; RALL & RUSTGI, 1995). CD44s tem sido associado na progressão tumoral (CANNISTRA *et al.*, 1993), e em outros tipos tumorais, como o neuroblastoma, a ausência de CD44 indica um pior prognóstico (SHTIVELMAN & BISHOP, 1991).

CD44 age por meio de vários mecanismos na regulação do carcinoma de mama, como quando bloqueado com anticorpo, a inibição de CD44s com o ligante ácido hialurônico resulta em um aumento da invasão celular tumoral (LOPEZ *et al.*, 2005). Em câncer de próstata Lou *et al.* (1999) demonstraram que o promotor do CD44 é regulado epigeneticamente, sendo a baixa expressão deste gene decorrente da hipermetilação da região promotora e associada com a progressão do câncer de próstata para um estágio metastático.

Algumas isoformas de CD44 são superexpressas em tumores de mama, as quais podem estar relacionadas com o potencial metastático (PENG *et al.*, 2007). Além disso, o fenótipo das células tumorais de mama indica que CD44 pode distinguir as células iniciadora tumorais (*cancer stem cells* - CSCs) das não tumorigênicas, e regular aspectos importante da metástase, incluindo a transformação, crescimento, invasão, motilidade celular e resistência a quimioterápicos (AL-HAJJ *et al.*, 2003). As CSCs são definidas como pequenas populações de células dentro do ambiente tumoral que possuem propriedades de células-tronco. Elas podem se auto-renovarem, diferenciarem em linhagens e reconstituírem o fenótipo heterogêneo do tumor parental que foram derivadas (ZÖLLER, 2011).

As CSCs possuem a motilidade como característica compartilhada com as células-tronco normais, resultante da expressão de CD44⁺/CD24⁻, facilitando na adesão e migração pelos vasos sanguíneos. A aderência nos vasos sanguíneos é considerada fator inicial para a migração nos tecidos. Mine e colaboradores (2003) demonstraram que a alta expressão *in vitro* de CD44 em células tumorais de mama aprimora a aderência destas no endotélio.

A transição epitelial-mesenquimal (TEM), processo pelo qual as células mudam seu fenótipo epitelial para um fenótipo fibroblástico, é importante para a cicatrização, mas também para o processo de metástase das células tumorais. Um fator importante relacionado com TEM das CSCs é a expressão de CD44 que

promove a invasão pela matrigel (KLARMANN *et al.*, 2009). Uchino e colaboradores (2010) realizaram experimentos em matrigel com a linhagem tumoral MCF-7 e selecionaram populações que invadiram essa matrigel. Após obterem células significativamente mais invasivas que a população parental foi verificada o perfil genético dessas populações. Constatou-se que houve relevante aumento da expressão de CD44 e diminuição de expressão de CD24. Além disso, o tratamento com anticorpo contra CD44 diminuiu a invasão e migração em matrigel.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a expressão gênica e a detecção de CD44 após a adição do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) exógeno, em linhagens tumorais de mama BT-474, MCF-7, SKBR-3 e ZR-75-1.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar por meio do método de qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) a expressão de CD44 nas linhagens tumorais de mama MCF-7, SKBR-3, BT-474 e ZR-75-1 na presença e na ausência de VEGF;
- Verificar e quantificar a presença do receptor CD44 nas linhagens com e sem a adição de VEGF por citometria de fluxo;
- Verificar, por meio das diferentes metodologias abordadas a existência de uma correlação entre a expressão da proteína CD44 na superfície celular e os níveis de RNA do gene *CD44*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS CELULARES OU MATERIAL BIOLÓGICO

As linhagens tumorais de mama utilizadas neste projeto foram: MCF-7, ZR-75-1, BT-474 e SKBR-3. Essas linhagens são parte da coleção de Lombardi Comprehensive Cancer Center, Washington D.C. e foram cedidas pela colaboração estabelecida com a Dr.^a Luciane Regina Cavalli e Cláudia Aparecida Rainho da Unesp, Botucatu-São Paulo. As quatro linhagens estudadas representam o tipo celular luminal, que caracteriza tumores com menor número de aberrações no genoma quando comparados com aqueles do tipo celular basal. Além disso, o tipo luminal apresenta células mais diferenciadas do que aquelas presentes no tipo basal, caracterizando-o como um tumor de menor agressividade (NEVE *et al.*, 2006).

4.2 CULTIVO CELULAR

Os cultivos das linhagens celulares foram realizados em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementados com 2 mM de L-glutamina, com uma solução de antibióticos contendo 1% de penicilina (10 000 U) e estreptomicina (10 mg/ml) (Sigma), com 25 mM da solução tampão HEPES (Gibco) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma).

O início do cultivo é feito com as amostras retiradas do nitrogênio líquido contendo em solução estoque aproximadamente 10^6 células. O descongelamento foi realizado em banho-maria a 37°C e quando havia no tubo criogênico um pequeno bloco de gelo, constituído pela solução de congelamento e células, imediatamente foi realizada a transferência da solução para um tubo de 15 ml contendo 10 ml de meio RPMI. Os tubos foram centrifugados a 500 x g por 6 minutos para remoção do DMSO (dimetilsulfóxido) e, após a formação do pellet, descartou-se o sobrenadante para então ressuspender as células em 1 ml de meio RPMI suplementado. Uma alíquota de 10 µl dessa solução foi usada para verificar, em câmara de Neubauer, o número e a viabilidade das células, por meio do azul de *Trypan*. Após a contagem, a suspensão de células foi transferida para as garrafas pequenas (25 cm²) de cultivo celular, contendo previamente 3 ml de meio de cultura suplementado. Os frascos foram incubados em estufa com tensão de CO₂ a 5% e a 37°C. O meio de cultura foi

regularmente substituído em dias alternados até a confluência de aproximadamente 80-90% das células para realizar a expansão das linhagens para as garrafas médias (75 cm²). Para o processo de expansão, as células foram tratadas com 1 ml de 0,25% tripsina-EDTA (Sigma) e incubadas na estufa novamente por 3-5 minutos para desprender as células aderidas ao frasco. Posteriormente, as células foram transferidas para tubos de 15 ml e centrifugadas a 500 x g por 6 minutos, para remoção do meio tripsinizado. O pellet de células foi então ressuspensão com meio de cultivo novo, transferidas para a garrafa nova e incubada na estufa de CO₂.

A etapa de congelamento das células seguiu o seguinte protocolo: 90% RPMI (suplementado com 2 mM de L-glutamina, 1% de antibióticos, 25 mM de HEPES, 50% SFB) e 10% DMSO.

4.3 TRATAMENTO COM VEGF

As concentrações para o tratamento com VEGF foram baseadas no estudo de Liang e colaboradores (2006) que utilizaram VEGF para analisar a atividade proliferativa em linhagens tumorais de mama, como a MCF-7, BT-474 e a ZR-75-1.

Para cada linhagem estudada foi realizado o tratamento com VEGF₁₆₅ (Gibco) exógeno, diluído em 0,1% de BSA (soro albumina bovina), em placas de seis poços (Cellstar®), que compreendiam a seguinte distribuição dos experimentos: triplicatas de controle (sem a adição de VEGF), triplicatas com 10 ng de concentração de VEGF e triplicatas com 50 ng de VEGF. Em cada poço foram adicionadas 2 ml de RPMI (com todos os suplementos) contendo 4×10^5 células. Após um período de 24h de incubação, em estufa de CO₂, necessários para a adesão das células nos poços, as mesmas foram lavadas quatro vezes com 2 ml de tampão fosfato PBS 1X para retirar o soro contido nas células e realizar o tratamento com VEGF. Em seguida, foram adicionados 2 ml de RPMI suplementado, porém com a adição de 0,1% de SFB, juntamente com o VEGF nas concentrações pré-estabelecidas. As placas foram mantidas em estufa de 37°C contendo 5% de CO₂ por um período de 24 horas. Após esse período as células das triplicatas de cada condição do experimento foram lavadas com 2 ml de PBS 1X para remoção do VEGF, tripsinizadas com 400 µl de uma solução contendo 0,25% tripsina-EDTA (Sigma) para desagregar as células, neutralizadas com 1 ml de RPMI e transferidas

para tubos de 15mL e centrifugadas a 500 x g por 6 minutos. O pellet formado após a centrifugação foi ressuspenso em 1 ml de PBS 1X e após contabilização das células em câmara de Neubauer, as mesmas foram divididas para a realização da extração simultânea de DNA e RNA e para citometria de fluxo dos experimentos.

4.4 EXTRAÇÃO DE DNA E RNA

A extração de DNA e RNA foi realizada com o kit All prep DNA/RNA mini kit (Qiagen), de acordo com o manual do fabricante. Este kit proporciona a extração simultânea das moléculas dos dois ácidos nucleicos de modo satisfatório e qualitativo. As amostras foram eluidas em volumes variados conforme a quantidade de células inicialmente obtidas nos cultivos dos tratamentos prévios.

4.5 SINTESE DE cDNA

A quantificação do RNA total extraído das linhagens celulares foi realizada no espectrofotômetro Nanodrop. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi empregada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas.

Aproximadamente 1 µg da amostra de RNA total foram transcritos reversamente à primeira fita de cDNA utilizando o kit High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). Os procedimentos para a obtenção do cDNA foram: diluição, quando necessário, da amostra de RNA total em água dietil-pirocarbonato (DEPC), a qual inibe RNases, em volume final de 10 µl; a este volume foram acrescentados 10 µl da seguinte solução: 2 µl de oligonucleotídeos randômicos (10 X), 0,8 µl do mix de dNTPs (100 mM), 2 µl de tampão da enzima (10 X) e 1 µl da enzima Multiscribe™ transcriptase reversa e 4,2 µl de água DEPC. As soluções foram então submetidas a ciclos de temperaturas: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C. Após o término dos ciclos o cDNA foi armazenado a -20°C até o uso.

4.6 RT-PCR E RT-qPCR

As análises de expressão do RNAm foram realizadas através das metodologias de RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*) e de RT-qPCR (real time - *quantitative Polymerase Chain Reaction*). O método qualitativo (RT-PCR) serviu de padronização e otimização da reação de PCR do gene *CD44*, cujos oligonucleotídeos–iniciadores, preconizados por MAHALINGAIAH & SINGH (2014), apresentam as seguintes sequências:

CD44F (forward): 5' CCC AGA TGG AGA AAG CTC TG 3'

CD44R (reverse): 5' GTT GTT TGC TGC ACA GAT GG 3'

O fragmento amplificado do gene *CD44* contém 113 pares de base. O gene constitutivo *HPRT1* (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase-1) (FIGUEIRA *et al.*, 2009), foi usado como gene de referência, e apresenta um produto de 104pb obtido após amplificação com os seguintes iniciadores:

HPRT (forward): 5' GAA CGT CTT GCT CGA GAT GTG A 3'

HPRT (reverse): 5' TCC AGC AGG TCA GCA AAG AAT 3'

As condições de RT-PCR para os genes *CD44* e *HPRT1* estão descritos no ANEXO I.

A análise qualitativa da expressão do gene *CD44* (RT-qPCR) foi realizada empregando-se o equipamento (Viia-7- Applied Biosystems, Life Technologies). O produto do gene *CD44* foi monitorado com o sistema *SYBR Green* através da sua incorporação ao DNA de dupla fita formado durante a amplificação do gene. Conforme a progressão da PCR, mais amplicons são criados resultando um aumento na intensidade de fluorescência proporcional à quantidade de produto gerado pela PCR.

As reações (RT-qPCR) ocorreram nas seguintes concentrações: 20 pmol de cada oligo-iniciador, 5 µl de master mix *SYBR Green*® (Applied Biosystems), 15 ng de cDNA e q.s.p 10 µl de água ultrapura.

O nível de expressão dos genes foi obtido pela quantificação relativa dos níveis de expressão determinado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de acordo com as fórmulas abaixo (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001):

$$\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene de referência}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct \text{ amostra calibradora}$$

No qual, ΔCt calibradora = (Ct do gene alvo, no caso *CD44* da amostra controle, – Ct do gene de referência, *HPRT* da amostra controle). E $\Delta\Delta\text{Ct}$ = (Ct do gene alvo, no caso *CD44* das amostras tratadas com 10 ng ou 50 ng de VEGF, – Ct do gene de referência, *HPRT1* das amostras com 10 ng ou 50 ng, respectivamente) – ΔCt calibradora. O número de vezes que ocorre a mudança da expressão é calculado como $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. No gráfico logarítmico, a expressão do controle é dada como uma linha basal, representada por 1, e a expressão relativa de cada variante para cada amostra tratada é demonstrada, comparada com o controle. Valores superiores a 1 indicam superexpressão e valores inferiores a 1, indicam subexpressão.

4.7 ELETROFORESE EM GEL POLIACRILAMIDA

A otimização da RT-PCR usando os oligonucleotídeos-iniciadores para os genes *CD44* e *HPRT1* foi realizada em aparelho termociclador (Eppendorf Mastercycler® ep), seguida da eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, constituído por acrilamida e bis-acrilamida na proporção 29:1, TEMED a 0,1% e persulfato de amônio (APS) a 0,1%. (ANEXO II). A revelação dos resultados foi feita pela impregnação com nitrato de prata (SANGUINETTI *et al.*, 1994).

4.8 CITOMETRIA DE FLUXO

Os experimentos de citometria de fluxo foram desenvolvidos no aparelho FACSVerse da BD Biosciences.

As células cultivadas em RPMI foram lavadas com tampão fosfato PBS 1X e coletadas após a tripsinização. Após duas lavagens com PBS 1X, as células foram ressuspensas nesse tampão (5×10^4 células/100 μl) e incubadas no escuro, por 30 minutos, com 2 μl de anti CD44 (anticorpo monoclonal conjugado com fluorocromo PE- BD Pharmigen- catálogo número 550989) ou com 5 μl do seu respectivo isotipo (BD Pharmigen catálogo número 555749). Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e ressuspensas em 500 μl de tampão para análise no citômetro.

As linhagens tumorais estudadas foram analisadas, primeiramente, sem marcação com anticorpo fluorescente para delinear as voltagens de granulosidade (SSC) e tamanho (FSC) ideais para a padronização das populações celulares autofluorescentes e não marcadas de cada linhagem. A análise do efeito do VEGF sobre a expressão de CD44 nas diferentes linhagens tumorais foi realizada com a aquisição de 10.000 eventos/experimento. A porcentagem dos eventos positivos e negativos para CD44 e a mediana da intensidade de fluorescência foram obtidos através do software de análise FACsuite do próprio equipamento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As linhagens tumorais BT-474, MCF-7, SKBR-3 e ZR-75-1 foram selecionadas com base na literatura que relata que as mesmas apresentam baixa expressão de CD44 (MCF-7) ou nenhuma (SKBR-3, BT-474 e ZR-75-1) (SHERIDAN *et al.*, 2006; OLSSON *et al.*, 2011).

A forma padrão da molécula CD44, considerada um marcador de células iniciadoras tumorais, foi analisada nos experimentos de expressão de RNA e de marcação celular por citometria de fluxo antes e após o tratamento com VEGF.

5.1 TRATAMENTO COM VEGF E CITOMETRIA DE FLUXO

As diferentes concentrações de VEGF (10 ng e 50 ng) foram testadas nas quatro linhagens tumorais de mama e os dados foram confrontados com as mesmas células não tratadas com VEGF. Os experimentos foram realizados com 0,1% de soro, condição essa denominada de ausência de soro, pois o soro apresenta uma quantidade inespecífica de uma variedade de fatores de crescimento que podem influenciar nos experimentos. Liang e colaboradores (2006) relataram que nos experimentos de cultivo celular a proliferação induzida por VEGF era inibida pela presença de soro, e que a mesma ocorria, na ausência do soro, em 71% das linhagens tratadas.

Entre as linhagens estudadas, ZR-75-1 foi a que apresentou menor número de células aderidas à placa quando analisadas na microscopia ótica. As demais linhagens apresentaram adesão celular com uma boa confluência das células e a linhagem MCF-7 apresentou inclusive um aumento do número de células ao longo dos tratamentos, notada a partir das contagens das células em câmara de Neubauer.

Para determinar se VEGF modula a expressão da molécula CD44 nas linhagens tumorais de mama foi determinada, por citometria de fluxo, a proporção de CD44+/CD44- na superfície das células tumorais. O controle de isotipo do anticorpo anti-CD44 marcado com PE foi utilizado em todas as linhagens estudadas, como mostrado para a linhagem MCF-7 (FIGURA 2A - 2B).

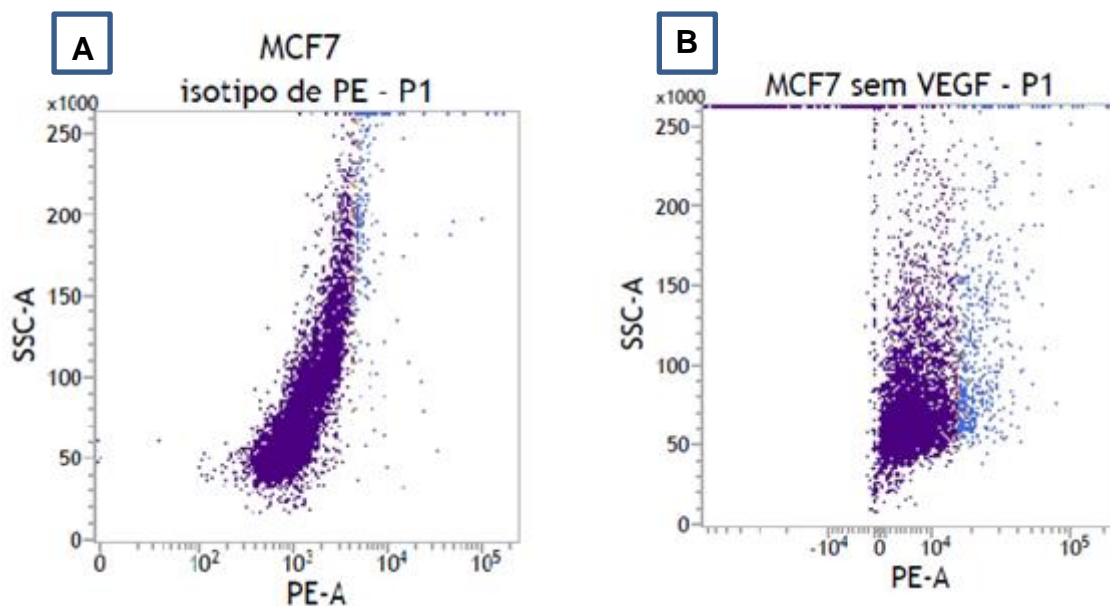


FIGURA 2 – IDENTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO DE MCF-7 ESTUDADA POR CITOMETRIA DE FLUXO. A - Isotipo de IgG de camundongo marcado com PE; B - controle com anticorpo anti-CD44.

Entre as linhagens avaliadas por citometria, foi possível verificar que as células da linhagem tumoral BT-474 não apresentavam CD44 em sua superfície antes do tratamento com VEGF, conforme o esperado pela literatura (SHERIDAN *et al.*, 2006). A ausência dessa expressão foi mantida também após o experimento com VEGF (TABELA 1).

Conforme o critério de Dominici, que define a positividade de um marcador nas células mesenquimais multipotentes, a marcação das células $\leq 2\%$ indica reatividade negativa para um respectivo marcador (DOMINICI *et al.*, 2006). Seguindo esse critério, verificou-se que a linhagem SKBR-3 é negativa para o marcador CD44, mesmo após os tratamentos com VEGF (TABELA 1).

Diferentemente dos dados da literatura, foi verificado que 5% das células da linhagem ZR-75-1 expressam em sua superfície a molécula CD44. Essa expressão decaiu após o tratamento com VEGF, apesar dos valores não apresentarem diferenças estatísticas significativas (TABELA 1).

	CONTROLE	10 ng VEGF	50 ng VEGF
BT-474			
CD44+	0,05	0,03	0,04
CD44-	99,95	99,97	99,96
MCF-7			
CD44+	8,45	55,33	15,97
CD44-	91,55	44,67	84,03
SKBR-3			
CD44+	1,65	1,17	1,33
CD44-	98,35	98,83	98,67
ZR-75-1			
CD44+	4,98	4,52	3,43
CD44-	95,02	95,48	96,57

TABELA 1 – PORCENTAGEM DOS EVENTOS CD44+ E CD44 - OBTIDOS NO TRATAMENTO COM VEGF. (RESULTADOS EM NEGRITO INDICAM QUE A COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS APRESENTOU SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA ATRAVÉS DO TESTE DE QUI-QUADRADO $p = 10^{-6}$).

Nas células da linhagem tumoral MCF-7 foi verificada que após o tratamento com VEGF ocorria um aumento na expressão de CD44 (FIGURAS 3, 4 e 5) As diferenças entre as amostras controle sem tratamento e aquelas tratadas com 10 ng de VEGF foram estatisticamente significativas ($p = 10^{-6}$). Essa diferença estatisticamente significativa manteve-se quando foram comparados os tratamentos de 10 ng e 50 ng de VEGF ($p = 10^{-6}$). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre o controle sem tratamento e as amostras tratadas com 50 ng de VEGF ($p = 0,123$) (TABELA 1).

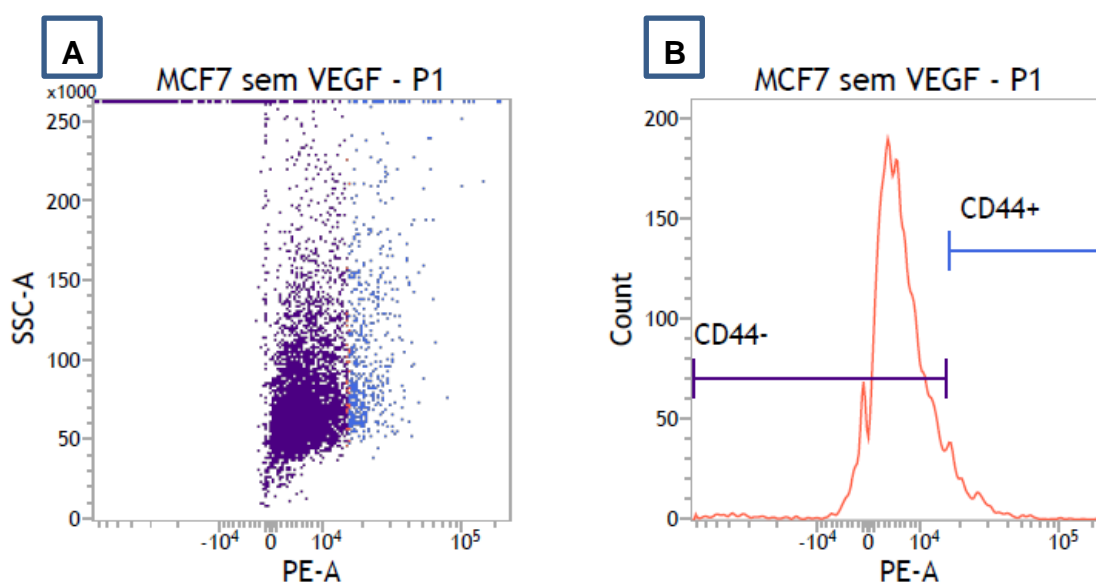


FIGURA 3 – CITOMETRIA MCF-7 SEM VEGF. A – População de células marcadas positivamente para CD44+ em cor mais clara; B – histograma representando a intensidade da fluorescência da marcação.

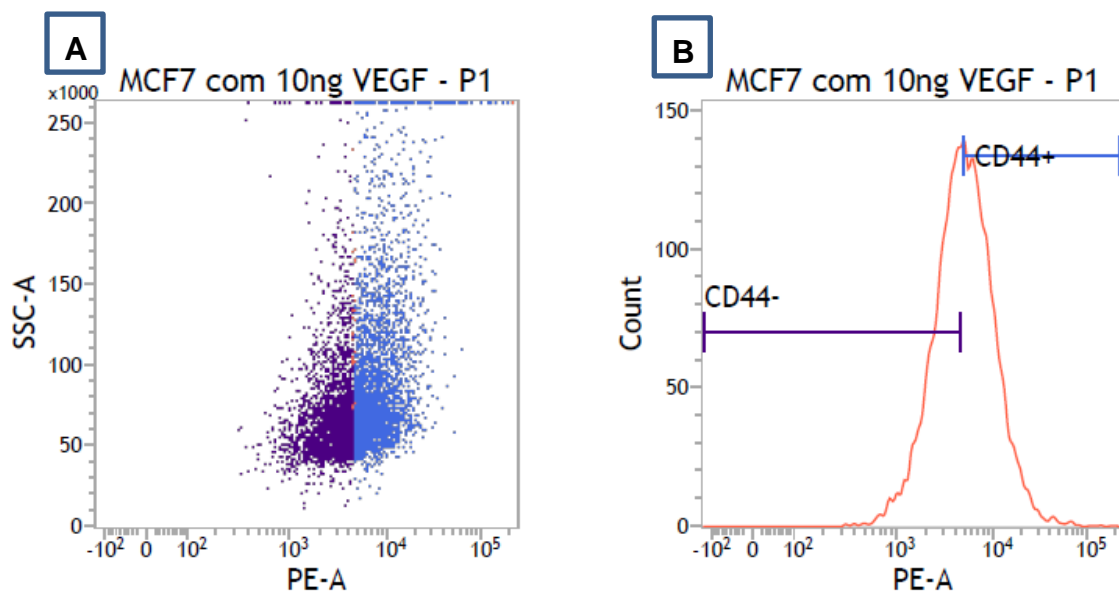


FIGURA 4 – CITOMETRIA MCF-7 COM 10 NG VEGF. A – População de células marcadas positivamente para CD44+ em cor mais clara; B – histograma representando a intensidade da fluorescência da marcação.

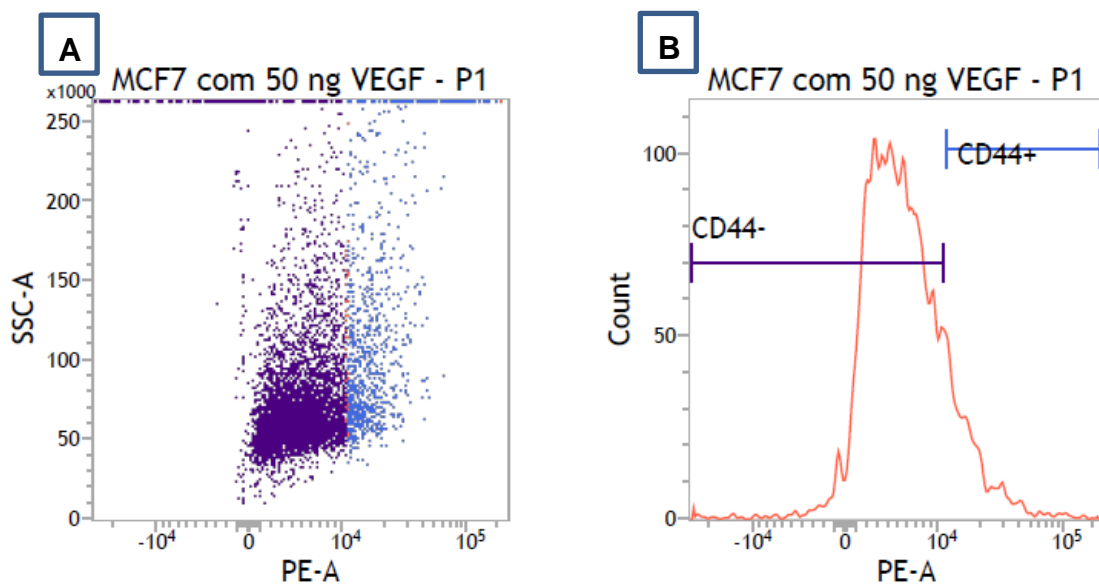


FIGURA 5 – CITOMETRIA MCF-7 COM 50 NG VEGF. A – População de células marcadas positivamente para CD44+ em cor mais clara; B – histograma representando a intensidade da fluorescência da marcação.

A proporção de células da linhagem MCF-7 positivas para CD44 (55,33%) diminui quando foi adicionado 50 ng de VEGF adicionada ao meio de cultivo (15,97%) (TABELA 2). Pode-se supor que há uma relação inversa entre a

quantidade de VEGF adicionada e a quantidade de CD44 expressa na superfície das células dessa linhagem.

MCF-7	% Eventos	Mediana de PE-A
CONTROLE CD44-	91,55	5.643
CONTROLE CD44+	8,45	21.952
10 ng VEGF CD44-	44,67	3.210
10 ng VEGF CD44+	55,33	8.445
50 ng VEGF CD44-	84,03	4.716
50 ng VEGF CD44+	15,97	16.650

TABELA 2 – INTENSIDADE DA FLUORESCÊNCIA DE PE E A PORCENTAGEM DE EVENTOS ADQUIRIDOS.

5.2 TRATAMENTO COM VEGF E ANÁLISE POR RT-QPCR

As amostras de cDNA das linhagens submetidas aos experimentos foram analisadas de modo quantitativo pela técnica de RT-qPCR. A utilização dessa técnica foi para verificar se os níveis de expressão relativa do RNAm do gene CD44 se alteram após o tratamento com VEGF. Os dados obtidos dos níveis de expressão dos genes HPRT e CD44 foram utilizados com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). O teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado e os resultados não apresentaram uma variação significativa ($p \leq 0,05$) de expressão de CD44, em nível de RNAm, nas linhagens testadas em relação as mesmas sem o tratamento com VEGF (FIGURA 6). Apesar dos resultados obtidos de expressão do RNA do gene *CD44* não apresentarem significância estatística foi possível correlacioná-los com aqueles obtidos por citometria de fluxo. Comparando-se a FIGURA 6 com os dados da tabela 3 foi possível verificar que a porcentagem de eventos CD44+ obtidos no tratamento com 10 ng de VEGF para a linhagem MCF-7 correlaciona-se com os maiores valores de expressão obtidos pela técnica de RT-qPCR para essa linhagem. Além disso, as tendências observadas na expressão do gene *CD44* avaliadas pelo ensaio de RT-qPCR para as linhagens tumorais

analisadas apresentaram uma correlação significativa ao nível de 0,05 com os resultados obtidos na citometria de fluxo (correlação de Kendall's tau = 0,733).

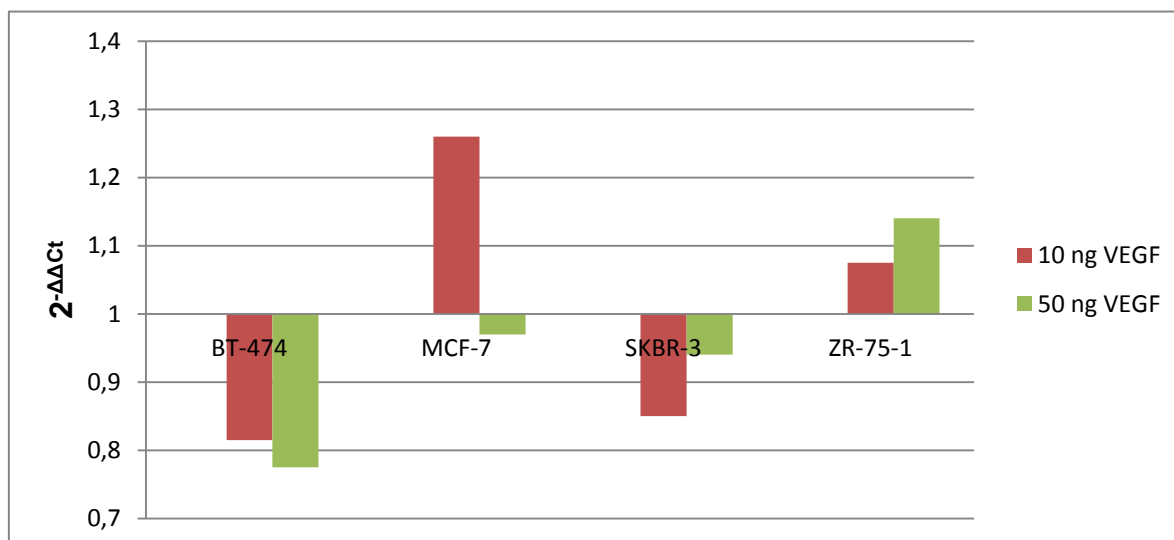


FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DOS VALORES DE $2^{-\Delta\Delta Ct}$ OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS DE RT-QPCR PARA CADA LINHAGEM.

As quatro linhagens avaliadas nesse estudo representam o tipo celular luminal, considerado o tipo mais comum de câncer de mama (SHERIDAN *et al.*, 2006). As linhagens BT-474 e SKBR-3 apresentam ainda a marcação ErbB2 positiva, o que pode caracterizá-las como mais agressiva que aquelas que não expressam essa molécula em sua superfície. O marcador de células iniciadoras tumorais, CD44, pode ser encontrado nas diferentes isoformas no câncer de mama e sua expressão é importante para a sobrevivência e invasão das células tumorais. As linhagens tumorais de mama BT-474 e SKBR-3 apresentaram, no presente estudo, expressão negativa de CD44 frente ao VEGF. Isoformas de CD44 poderiam estar associadas a essas linhagens tumorais mais agressivas, uma vez que a expressão de outras variantes de CD44 está diretamente relacionada com a progressão do tumor e uma pior taxa de sobrevida livre de doença (KRISHNAMACHARY *et al.*, 2012). De acordo com Tremmel e colaboradores (2009), a isoforma CD44v6 contém um sítio de ligação para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), porém essa isoforma não foi analisada no presente trabalho, somente a isoforma padrão. Estudos futuros poderiam determinar se as variantes de CD44 sofrem interferência em sua expressão quando submetidas aos efeitos de VEGF.

6 CONCLUSÕES

A linhagem MCF-7 apresentou um aumento estatisticamente significativo ($p = 10^{-6}$) na quantidade de moléculas CD44 presentes na superfície das células após o tratamento por 24 horas com 10 ng de VEGF.

O aumento do número de moléculas CD44 presentes na superfície das células tumorais MCF-7 é inversamente proporcional à quantidade de VEGF, pois a expressão da molécula CD44 foi maior quando adicionado 10 ng de VEGF do que quando adicionado 50 ng de VEGF.

Após o tratamento de 24 horas com 10 ng e 50 ng de VEGF não foram observadas diferenças significativas de expressão do gene *CD44* nas linhagens tumorais de mama MCF-7, SKBR-3, BT-474 e ZR-75-1.

Há uma correlação significativa entre os resultados obtidos através da metodologia de RT-qPCR e aqueles obtidos por citometria de fluxo para marcação de CD44 sob efeito de VEGF nas linhagens tumorais de mama do tipo luminal analisadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-HAJJ, M.; WICHA, M. S.; BENITO-HERNANDEZ, A., MORRISON, S. J.; CLARKE, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, n. 7, p. 3983-3988, 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.
- 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.
- BENAZZI, C; AL-DISSI, A.; CHAU, C.H.; FIGG, W.D.; SARLI, G.; de OLIVEIRA, J.T.; GÄRTNER, F. Angiogenesis in spontaneous tumors and implications for comparative tumor biology. **The scientific World Journal**, v. 2014, 2014.
- BENNETT, K. L. *et al.* CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. **The Journal of cell biology**, v. 128, n. 4, p. 687-698, 1995.
- BERGERS, G.; BENJAMIN, L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 401–410, 2003.
- BUCHHOLZ, T., A.; WAZER, D., E. Molecular biology and genetics of breast cancer development: a clinical perspective. In: **Seminars in radiation oncology**. WB Saunders, p. 285-295, 2002.
- CANNISTRA, S. A.; KANSAS, G. S.; NILOFF, J.; DeFRANZO, B.; KIM, Y.; OTTENSMEIER, C. Binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro is partly mediated by CD44H. **Cancer Research**, v. 53, n. 16, p. 3830-3838, 1993.
- DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F. C., KRAUSE, D. S., ... & HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.
- FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. **Seminars in Oncology**, v. 29, p. 10–14, 2002.
- FIGUEIRA, R. C.; GOMES, L. R.; NETO, J. S.; SILVA, F. C.; SILVA, I. D.; SOGAYAR, M. C. Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential. **BMC cancer**, v. 9, n. 1, p. 20, 2009.
- FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nature Medicine**, v. 1, p. 27–31, 1995.

GAGE, M.; WATTENDORF, D.; HENRY, L.R. Translational advances regarding hereditary breast cancer syndromes. **J Surg Oncol**, v. 105, n. 5, p. 444-451, 2012.

GERMAIN, S.; MONNOT, C.; MULLER, L.; EICHMANN, A. Hypoxia driven angiogenesis: role of tip cells and extracellular matrix scaffolding. **Current Opinion in Hematology**, v. 17, p. 245-251, 2010.

GÜNTHERT, U.; HOFMANN, M.; RUDY, W.; REBER, S.; ZÖLLER, M.; HAUßMANN, I.; MATZKU, S.; WENZEL, A.; PONTA, H.; HERRLICH, P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. **Cell**, v. 65, n. 1, p. 13-24, 1991.

GUNTHERT, U.; STAUDER, R.; MAYER, B.; TERPE, H.; FINKE, L.; FRIEDRICH, K. Are CD44 variant isoforms involved in human tumor progression? **Cancer Surv.**, v. 24, p. 19-42, 1995.

HART, I. R.; GOODE, N. T.; WILSON, R. E. Molecular aspects of the metastatic cascade. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 989, n. 1, p. 65-84, 1989.

HEIDER, K. H.; DÄMMRICH, J.; SKROCH-ANGEL, P.; MÜLLER-HERMELINK, H. K.; VOLLMERS, H. P.; HERRLICH, P.; PONTA, H. Differential expression of CD44 splice variants in intestinal-and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. **Cancer research**, v. 53, n. 18, p. 4197-4203, 1993.

HONETH, G.; BENDAHL, P. O.; RINGNÉR, M.; SAAL, L. H.; GRUVBERGER-SAAL, S. K.; LOVGREN, K.; ... & HEGARDT, C. The CD44+/CD24-phenotype is enriched in basal-like breast tumors. **Breast Cancer Res**, v. 10, n. 3, p. R53, 2008.

HOWE, L. R.; BROWN, P. H. Targeting the HER/EGFR/ErbB family to prevent breast cancer. **Cancer prevention research**, v. 4, n. 8, p. 1149-1157, 2011.

IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER). Latest World Cancer Statistics Global Cancer Burden Rises to 14.1 Million New Cases in 2012: Marked Increase in Breast Cancers must be Addressed. **World Health Organization**, n. 223, p. 1-3, 2013

INCA. Estimativas 2014: Incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional do Câncer**. M. D. S. D. B. D. E. <http://www.inca.gov.br>. Rio de Janeiro 2014.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest**, v. 119, n. 6, p. 1420-8, 2009.

KHATIB & MODJTABAI. Guidelines for the early detection and screening of breast cancer. **World Health Organization**, Regional Office for the Eastern Mediterranean, 2006.

KLARMANN, G. J., HURT, E. M., MATHEWS, L. A., ZHANG, X., DUHAGON, M. A., MISTREE, T., ... & FARRAR, W. L. Invasive prostate cancer cells are tumor initiating

cells that have a stem cell-like genomic signature. **Clinical & experimental metastasis**, v. 26, n. 5, p. 433-446, 2009.

KOCH, S.; TUGUES, S.; LI, X.; GUALANDI, L.; CLAESSEON-WELSH, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. **Biochemical Journal**, v. 437, p. 169-183, 2011.

KRISHNAMACHARY, B., PENET, M. F., NIMMAGADDA, S., MIRONCHIK, Y., RAMAN, V., SOLAIYAPPAN, M., ... & BHUJWALLA, Z. M. Hypoxia regulates CD44 and its variant isoforms through HIF-1 α in triple negative breast cancer. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e44078, 2012.

LIANG, Yayun; BREKKEN, Rolf A.; HYDER, Salman M. Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti-hormones. **Endocrine-related cancer**, v. 13, n. 3, p. 905-919, 2006.

LIM, S. D.; YOUNG, A. N.; PANER, G. P.; AMIN, M. B. Prognostic role of CD44 cell adhesion molecule expression in primary and metastatic renal cell carcinoma: a clinicopathologic study of 125 cases. **Virchows Archiv**, v. 452, n. 1, p. 49-55, 2008.

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T., D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(- Delta Delta CT) method. **Method**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOPEZ, J. L.; CAMENISCH, T. D.; STEVENS, M. V.; SANDS, B. J.; McDONALD, J.; SCHROEDER, J. A. CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. **Cancer Res.**, v. 65, p. 6755-6763, 2005.

LOU, W.; *et al.* Methylation of the CD44 metastasis suppressor gene in human prostate cancer. **Cancer research**, v. 59, n. 10, p. 2329-2331, 1999.

MAHALINGAIAH, P. K. S.; SINGH, K. P. Chronic Oxidative Stress Increases Growth and Tumorigenic Potential of MCF-7 Breast Cancer Cells. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e87371, 2014.

MINE, S., FUJISAKI, T., KAWAHARA, C., TABATA, T., IIDA, T., YASUDA, M., ... & TANAKA, Y. Hepatocyte growth factor enhances adhesion of breast cancer cells to endothelial cells in vitro through up-regulation of CD44. **Experimental cell research**, v. 288, n. 1, p. 189-197, 2003.

NAOR, D.; SIONOV, R. V.; ISH-SHALOM, D. CD44: structure, function and association with the malignant process. **Adv Cancer Res.**, v. 71, p. 241-319, 1997.

NAOR, D.; WALLACH-DAYAN, S. B.; ZAHALKA, M. A.; SIONOV, R. V. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, p. 260-267, 2008.

NEVE, R. M., CHIN, K., FRIDLAND, J., YEH, J., BAEHNER, F. L., FEVR, T., ... & GRAY, J. W. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. **Cancer cell**, v. 10, n. 6, p. 515-527, 2006

OLSSON, E.; HONETH, G.; BENDAHL, P. O.; SAAL, L. H.; GRUVBERGER-SAAL, S., RINGNER, M.; ... & HEGARDT, C. CD44 isoforms are heterogeneously expressed in breast cancer and correlate with tumor subtypes and cancer stem cell markers. **BMC cancer**, v. 11, n. 1, p. 418, 2011.

OSBORNE, C.; WILSON, P.; TRIPATHY, D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. **Oncologist**, v. 9, n. 4, p. 361-77, 2004.

PÁEZ, D.; LABONTE, M.J.; BOHANES, P.; ZHANG, W.; BENHAIM, L.; NING, Y.; WAKATSUKI, T.; LOUPAKIS, F.; LENZ, H.J. Cancer dormancy: a model of early dissemination and late cancer recurrence. **Clin Cancer Res.**, v. 18, p. 645-653, 2012.

PARKIN, D. M.; FERNÁNDEZ, L., M., G. Use of statistics to assess the global burden of breast cancer. **The breast journal**, v. 12, n. s1, p. S70-S80, 2006.

PENG, S. T.; SU, C. H.; KUO, C. C.; SHAW, C. F.; WANG, H. S. CD44 crosslinking-mediated matrix metalloproteinase-9 relocation in breast tumor cells leads to enhanced metastasis. **Int J Oncol.**, v. 31, n. 5, p. 1119-1126, 2007.

PENNO, M. B.; AUGUST, J. T.; BAYLIN, S. B.; MABRY, M.; LINNOILA, R. I.; LEE, V. S.; ... & ROSADA, C. Expression of CD44 in human lung tumors. **Cancer research**, v. 54, n. 5, p. 1381-1387, 1994.

PIDGEON, G. P., BARR, M. P.; HARMEY, J. H.; FOLEY, D. A.; BOUCHIER-HAYES, D. J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates BCL-2 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells. **British journal of cancer**, v. 85, n. 2, p. 273, 2001.

RALL, C.J.N.; RUSTGI, A. K. CD44 isoform expression in primary and metastatic pancreatic adenocarcinoma. **Cancer research**, v. 55, n. 9, p. 1831-1835, 1995.

SAINSBURY, J. R. C.; ANDERSON, T. J.; MORGAN, D. A. L. ABC of breast diseases: breast cancer. **BMJ: British Medical Journal**, v. 321, n. 7263, p. 745, 2000.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A. J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v. 17, n. 5, p. 914-921, 1994.

SCREATON, G. R.; BELL, M. V.; JACKSON, D. G.; CORNELIS, F. B.; GERTH, U.; BELL, J. I. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 24, p. 12160-12164, 1992.

SHERIDAN, C., KISHIMOTO, H., FUCHS, R. K., MEHROTRA, S., BHAT-NAKSHATRI, P., TURNER, C. H., ... & NAKSHATRI, H. CD44+/CD24-BREAST CANCER CELLS EXHIBIT ENHANCED INVASIVE PROPERTIES: AN EARLY STEP

NECESSARY FOR METASTASIS. **BREAST CANCER RES**, V. 8, N. 5, P. R59, 2006.

SHTIVELMAN, E. M. M. A.; BISHOP, J. M. Expression of CD44 is repressed in neuroblastoma cells. **Molecular and cellular biology**, v. 11, n. 11, p. 5446-5453, 1991.

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

THORNE, R. F.; LEGG, J. W.; ISACKE, C. M. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. **Journal of cell science**, v. 117, n. 3, p. 373-380, 2004.

TLSTY T., D.; COUSSENS L., M. Tumor stroma and regulation of cancer development. **Annu Rev Patho**, v. 1, p. 119-150, 2006.

TONINI, T.; ROSSI, F. & CLAUDIO, P. P. Molecular basis of angiogenesis and cancer. **Oncogene**, v. 22, n. 42, p. 6549-6556, 2003.

TREMMELE, M.; MATZKE, A.; ALBRECHT, I., LAIB, A. M., OLAKU, V., BALLMER-HOFER, K., ... & ORIAN-ROUSSEAU, V. A CD44v6 peptide reveals a role of CD44 in VEGFR-2 signaling and angiogenesis. **Blood**, v. 114, n. 25, p. 5236-5244, 2009.

UCHINO, M.; KOJIMA, H.; WADA, K.; IMADA, M.; ONODA, F.; SATOFUKA, H.; UTSUGI, T.; MURAKAMI, Y. Nuclear β -catenin and CD44 upregulation characterize invasive cell populations in non-aggressive MCF-7 breast cancer cells. **BMC cancer**, v. 10, n. 1, p. 414, 2010.

VALASTYAN, S. & WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, v. 147, p. 275-292, 2011.

VIEIRA, D., S., C.; DUFLOTH, R., M.; SCHMITT, F., C., L.; ZEFERINO, L. C.; Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 30, n. 1, p. 42-7, 2008.

WANG, P.C.; WENG, C.C.; HOU, Y.S.; JIAN S.F.; FANG, K.T.; HOU, M.F.; CHENG, K.H. Activation of VCAM-1 and its associated molecule CD44 leads to increased malignant potential of breast cancer cells. **Int J.Mol Sci.**, v. 15, p. 3560-3579, 2014.

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.

ZÖLLER, M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 4, p. 254-267, 2011.

ANEXOS

ANEXO I

- REAGENTES E CONDIÇÕES UTILIZADOS NA RT-PCR DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA *CD44*.

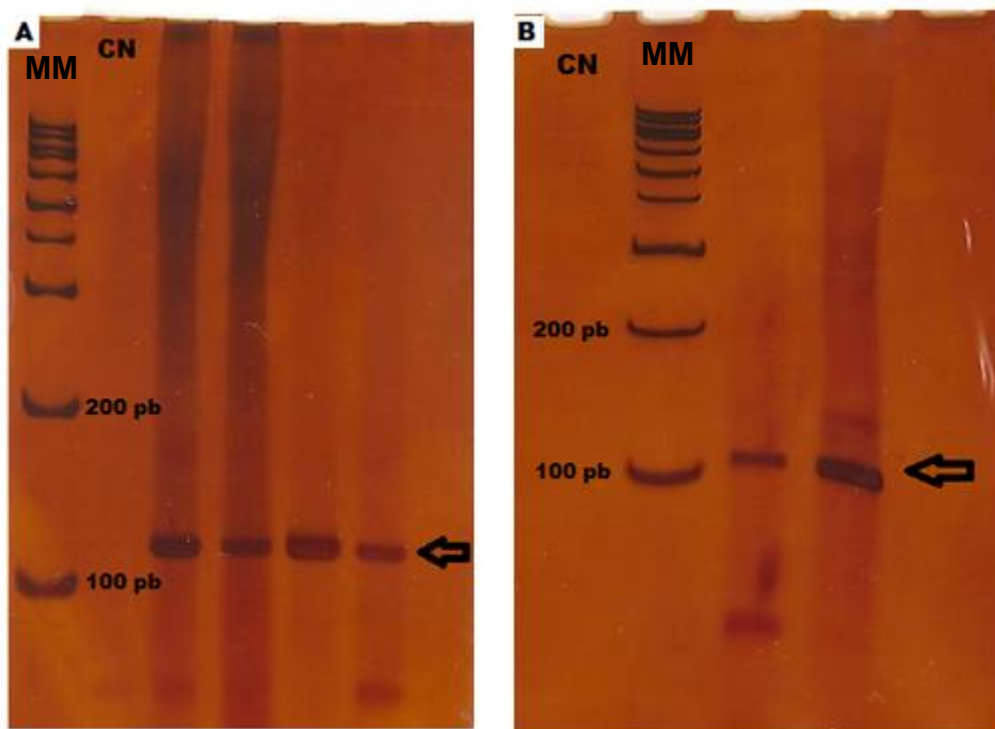
REAGENTES		CONDIÇÕES
Tampão 10x	1 X	
MgCl ₂	1,5 mM	95°C – 5' – 1 X
dNTP	0,2 mM	94°C – 30''
Primer 5'	0,5 µM	47°C – 45''
Primer 3'	0,5 µM	72°C – 45''
<i>Taq</i> polimerase	1 U	72°C – 5' – 1 X
Amostra	100 ng	
Água mili-Q	q.s.p 10 µl	

- REAGENTES E CONDIÇÕES UTILIZADOS NA RT-PCR DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA *HPRT1*.

REAGENTES		CONDIÇÕES
Tampão 10x	1 X	
MgCl ₂	1,5 mM	95°C – 5' – 1 X
dNTP	0,2 mM	94°C – 30''
Primer 5'	0,5 µM	60°C – 45''
Primer 3'	0,5 µM	72°C – 45''
<i>Taq</i> polimerase	1 U	72°C – 5' – 1 X
Amostra	100 ng	
Água mili-Q	q.s.p 10 µl	

ANEXO II

- GEL DE POLIACRIMIDA 8% DA PADRONIZAÇÃO DOS INICIADORES *CD44* (GEL A) E *HPRT1* (GEL B).



AS SETAS INDICAM OS PRODUTOS AMPLIFICADOS; **MM**: MARCADOR MOLECULAR; **CN**: CONTROLE NEGATIVO.