



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANGIE DAYANA BECERRA MONCADA

EFEITO DA LIRAGLUTIDA SOBRE A METILAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE  
*ADAM33* EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA

CURITIBA

2018

ANGIE DAYANA BECERRA MONCADA

EFEITO DA LIRAGLUTIDA SOBRE A METILAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE  
ADAM33 EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná. Área de concentração: Patologia. Linha de pesquisa: Epigenética e Câncer de Mama

Orientadora: Profª Drª Edneia A S R Cavaliere

Co-orientadora: Profª Drª Giseli Klassen

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Moncada, Angie Dayana Becerra

Efeito da liraglutida sobre a metilação do promotor do gene *ADAM33* em linhagens tumorais de mama. / Angie Dayana Becerra Moncada. – Curitiba, 2018.

80 p.: il. ; 30cm.

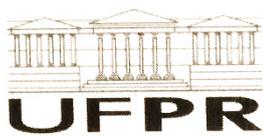
Orientadora: Edneia A. S. R. Cavalieri

Co-orientadora: Giseli Klassen

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Mamas - Cancer. 2. Liraglutida. 3. Genes. I. Título II. Cavalieri, Edneia A. S. R. III. Klassen, Giseli. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 616.07



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,  
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANGIE DAYANA BECERRA MONCADA** intitulada: **EFEITO DA LIRAGLUTIDA SOBRE A METILAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE ADAM33 EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Julho de 2018.

EDNEIA AMANCIO DE SOUZA RAMOS CAVALIERI  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

GRACIELE CRISTIANE MORÉ MANICA BENETTI  
Avaliador Externo (UFPR)

DAYANE ALBERTON  
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico este trabalho ao meu amigo o Espírito Santo  
Ao meus pais por seus conselhos e palavras de alento  
Ao meu amado Esposo por ser meu complemento!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua fidelidade, amor e alegria em todo este processo do desenvolvimento do mestrado, cada experimento, cada dia de convívio tinha impressa a sua companhia.

Agradeço a minha família, porque sempre tinham uma palavra para me dar ânimo! Meus pais, irmãos, sobrinhos, sogros e cunhadas, obrigada por todo o amor. À minha orientadora Dra. Edneia A.S.R. Cavalieri, a palavra que expressa a admiração, respeito e carinho é obrigada! Pela paciência, pela partilha de conhecimento, pelo tempo em me preparar para cada desafio no laboratório, agradeço realmente a disposição que sempre tinha para resolver minhas dúvidas.

À Dra. Giselli Klassen, por abrir as portas do seu laboratório e me permitir aprender um pouco da Epigenética, por seus ensinamentos e orientação.

Aos meus amigos do laboratório Andressa, Lucas, Felipe e Claudinha, obrigada por fazer que cada dia fosse diferente em neste laboratório, porque trabalhar em equipe é saber ser parte de um todo! Em especial agradeço a Andressa, por seu jeito de ensinar, por cada segundo dispensado comigo, por cada sorriso, por cada bom dia e principalmente pelo conhecimento compartilhado até conseguir tê-lo entendido, obrigada pela amizade.

Ao Departamento de Bioquímica da UFPR por dividir conosco os equipamentos.

Ao Valter Baura pelas reações de sequenciamento e pela disponibilidade em ajudar sempre!

À Dona Roseli Prado, por sua simpatia constante no preparo de reagentes.

Ao Laboratório de Nefrologia Experimental, em especial a Regiane por sua colaboração e disposição.

Ao Laboratório de Neurobiologia, onde sempre achei ajuda, dicas e animação, em especial da Silvia.

As colegas do Laboratório LIMQ Michele, Isabel, Sabrina, Rafaela, Camila e Alexandra, sempre que precisei me ajudaram.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela vaga e a bolsa, e pela oportunidade. Aos professores pelas aulas e ensinamentos.

À CAPES, CNPQ e Fundação Araucária pela bolsa de mestrado e suporte financeiro para as pesquisas.

Ao meu Esposo Andrés por sua ajuda todos os dias, por crer neste sonho de sair do nosso país, sempre fazendo que tudo parecesse fácil, ter você é caminhar pela vida confiante!

À minha Família, sempre é bom ter uma família unida, que vibra com todas as conquistas e vitórias juntos! Meu Pai sempre contando cada domingo que faltava para voltar para casa, minha mãe que me ensinou a não desistir e sempre lutar por meus sonhos, me ensinou que Deus é a resposta a todas minhas dúvidas, obrigada a Mãe mais linda do planeta! Meus irmãos, sobrinhos, cunhadas e sogros, agradeço suas palavras de afeito e carinho.

A meus amigos Geovanni, Pilar e seu filho Luquinhas por ser nossa família durante nossa estadia em nesta cidade, realmente tinham sempre um plano para fazer-nos sorrir.

À nossa igreja MCI Curitiba, que cada domingo nos deu alegria, força e amizade!

## RESUMO

O câncer de mama é a doença mais comum nas mulheres e a segunda principal causa de morte. Os principais fatores de risco incluem a idade, raça, fatores hormonais e ambientais. A incidência aumenta com a idade, sobrepeso, histórico familiar de antecedentes de câncer de mama, status da menstruação e doença benigna da mama. Assim como o câncer de mama, o diabetes é outro problema de saúde e compartilha alguns fatores de risco com o câncer de mama, como por exemplo, a idade e a obesidade. O foco desse estudo foi avaliar como um fármaco utilizado no tratamento do diabetes, o liraglutida, atua no perfil de metilação do gene *ADAM33* no câncer de mama. Para isso, três linhagens tumorais de mama MCF7, MDA-MB-231 e MDA-MB-436 foram cultivadas com o composto desmetilante 5-aza-2'-desoxicitidina e com liraglutida. Em seguida, o DNA foi extraído, tratado com bissulfito de sódio, e submetido ao MSP (PCR de metilação específica) para posterior amplificação da ilha de CpG 1 do gene *ADAM33*. Após a clonagem e sequenciamento, foi possível observar que houve diferença nos perfis de metilação das linhagens tratadas com liraglutida, semelhante ao que fora observado com o 5-Aza, corroborando com os resultados preliminares do MSP. A linhagem MCF7 possui 89,9% de metilação e após tratada com 5-Aza apresentou 71,2%, enquanto tratada com liraglutida 78,9%. A linhagem MDA-MB-231 possui 92,2% de metilação e após tratada com 5-Aza apresentou 54,5% enquanto tratada com liraglutida mostrou 54,7% de metilação. Já a linhagem MDA-MB-436 possuía 89,2% de metilação, e após tratamento com 5-Aza apresentou 84,6%, e após tratamento com liraglutida apresentou 75,3% de metilação global para o gene *ADAM33*. Verificando os possíveis fatores de transcrição que seriam influenciados nas regiões aparentemente reguladas, foi possível observar que os fatores *homeobox* FOXA1, GATA3, NUDR e HNFP, e os FT associados ao tratamento com liraglutida NKX25, FOXA1, DEAF-1, NKX6 e HMGA-1 tem relatados sua importância em câncer de mama e outras doenças contribuindo assim, para uma alteração na expressão de *ADAM33* por estas células tumorais. Esses resultados são os primeiros da literatura a demonstrar que um fármaco utilizado para outra doença provoca alterações epigenéticas, em especial a desmetilação do DNA em um gene relevantemente regulado em câncer de mama, abrindo novas fronteiras na investigação clínica e molecular de como os fármacos possuem influência global, retardando ou promovendo o surgimento de outras co-morbidades.

**Palavras-chave:** Câncer de mama; *ADAM33*; Liraglutida.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most common disease in women and the second leading cause of death. The main risk factors include age, race, hormonal and environmental factors. The incidence increases with age, overweight, breast cancer family's history, menstruation status and benign breast disease. Like breast cancer, diabetes is another health problem and shares some risk factors for breast cancer, such as age and obesity. The focus of this study was to evaluate how a drug used in the treatment of diabetes, liraglutide, acts on the methylation profile of the ADAM33 gene in breast cancer. For this, three breast tumor lines MCF7, MDA-MB-231 and MDA-MB-436 were cultured with the demethylating compound 5-aza-2'-deoxycytidine and with liraglutide. After that, the DNA was extracted, treated with sodium bisulfite, and submitted to MSP (specific methylation PCR) for further amplification of the CpG 1 island of the ADAM33 gene. After cloning and sequencing, it was possible to observe that there was a difference in the methylation profiles of liraglutide-treated lines, similar to that observed with 5-Aza, corroborating with the preliminary results of MSP. The MCF7 strain had 89.9% methylation, and after 5-Aza treatment presented 71.2%, while treated with liraglutide 78.9%. The MDA-MB-231 lineage had 92.2% methylation and after 5-Aza treatment showed 54.5% while treated with liraglutide showed 54.7% methylation. The MDA-MB-436 line had 89.2% methylation, and after 5-Aza treatment presented 84.6%, and after treatment with liraglutide presented 75.3% of global methylation of ADAM33 gene. It was possible to observe that the homeobox FOXA1, GATA3, NUDR and HNFP factors and the FT associated with treatment with liraglutide NKX25, FOXA1, DEAF-1, NKX6 and HMGA-1 has reported its importance in breast cancer and other diseases thus contributing to a change in the expression of ADAM33 by these tumor cells. These results are the first in the literature to demonstrate that a drug used for another disease causes epigenetic changes, especially DNA demethylation in a gene that is relevantly regulated in breast cancer, opening new frontiers in clinical and molecular investigation of how drugs have a global influence, delaying or promoting the emergence of other comorbidities in parallel.

**Key words:** Breast cancer; ADAM33; Liraglutide.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	DISSEMINAÇÃO METASTÁTICA.....	20
FIGURA 2	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA PROTEÍNA DA FAMÍLIA ADAM.....	22
FIGURA 3	DIFERENTES MECANISMOS DE DEPENDÊNCIA DE ESTROGÊNIO PARA CÂNCER DE MAMA RELACIONADOS A HORMÔNIOS EM MULHERES PRÉ E PÓS-MENOPAUSA.....	26
FIGURA 4	ESTRATÉGIAS EMPREGADAS PARA DESENVOLVER AGONISTAS DO RECEPTOR DE GLP-1 COM MEIA-VIDA <i>IN VIVO</i> PROLONGADA.....	30
FIGURA 5	ESTRUTURA QUÍMICA DA LIRAGLUTIDA.....	31
FIGURA 6	METILAÇÃO DA CITOSINA.....	34
FIGURA 7	ESQUEMA DE UM FRAGMENTO DE 2000 PARES DE BASES ANTES DA REGIÃO PROMOTORA E 1000 PARES DE BASES DA REGIÃO CODIFICANTE DO GENE ADAM33.....	44
FIGURA 8	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SOFTWARE GENOMATIX (MATINSPECTOR®).....	48
FIGURA 9	PCR-MSP DO GENE ADAM33 NAS LINHAGENS MCF7, MDA-MB-231 E MDA-MB-436.....	49
FIGURA 10	PADRONIZAÇÃO DA PCR-NESTED PARA A LINHAGEM MDA-MB-231 CONTROLE E TRATADA COM 5-AZA.....	50
FIGURA 11	PCR PRÉ-PURIFICAÇÃO.....	51
FIGURA 12	ELETROFORESE DO PRODUTO DE PCR NESTED, DEPOIS DA PURIFICAÇÃO A PARTIR DA LINHAGEM MDA-MB-231 TRATADA COM 5-AZA.....	54
FIGURA 13	PCR DE COLÔNIA DOS CLONES SELECIONADOS.....	55
FIGURA 14	MINIPREP DA LINHAGEM MDA-MB-231 TRATADOS COM 5-AZA.....	55
FIGURA 15	PORCENTAGEM DE METILAÇÃO LINHAGEM MCF7.....	56

FIGURA 16	PORCENTAGEM DE METILAÇÃO LINHAGEM MDA-MB-231.....	58
FIGURA 17	PORCENTAGEM DE METILAÇÃO LINHAGEM MDA-MB-436.....	59
FIGURA 18	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA HIPÓTESES DE TRATAMENTO COM LIRAGLUTIDA.....	70

## LISTA DE SIGLAS

5mC - 5-metilcitosina  
ADAM - *A desintegrin and metalloproteinases*  
CDA - Citidina desaminase  
CDKN2A - Ciclina dependente de quinase  
CD26 - Cluster de Diferenciação  
CGIs - Ilhas de CpG  
dCK - Desoxicitidina quinase  
dCMP - Desoxicitidina monofosfato  
dCTP - Desoxicitidina trifosfato  
DNMTs - DNA metiltransferases  
DM2 - Diabetes mellitus tipo 2  
DPP4 - Dipeptidil peptidase-4  
EGF - Fator de crescimento epidérmico  
GIP - Polipeptídico Insulinotrópico dependente de glicose  
GLP1 - Peptídeo semelhante a Glucagon  
IGF1 - Fator de crescimento semelhante a insulina  
IGFBP - Proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante a insulina  
IMC - Índice de massa corporal  
HOXA5 - Proteína *homeobox A5*  
LMA - Leucemia mieloide aguda  
LNH - Linfoma de Hodking  
MEC - Matriz extracelular  
MSP - Methylation specific PCR  
RASSF1 – Ras- association domain-containing protein 1  
RE- Receptor de Estrogênio  
RP - Receptor de Progesterona  
SAM – Adenosilmetionina  
SATR1 – Região satélite 1  
SGLT2 – Co-transportador sódio-glicose tipo 2  
SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único  
SU – Sulfoniluréias  
TEM – Transição epitélio-mesenquima  
TF – Fator de Transcrição  
TFBS – Transcription fator binding sites

TGF $\beta$  – Fator de transformação do crescimento

TNBC – Breast cancer triple-negative

TNF $\alpha$  – Fator de necrose tumoral

TWIST – Fator de Transcrição

TZD – Tiazolidinedionas

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1	MECANISMOS MOLECULARES DO CÂNCER .....	18
2.1.1	Transição Epitélio Mesênquima (TEM).....	18
2.2	PROTEÍNAS DA FAMÍLIA ADAM .....	21
2.2.1	Proteína ADAM33 .....	22
2.2.2	Fatores De Transcrição Na Região Promotora Do Gene <i>ADAM33</i> .....	24
2.3	FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE MAMA E SUA RELAÇÃO COM O DIABETES .....	25
2.3.1	A Função Do GLP-1 e Seus Análogos .....	29
2.3.2	Ações e Efeitos da Liraglutida .....	31
2.4	EPIGENÉTICA .....	33
2.4.1.	Metilação do DNA.....	33
2.4.2	Alterações Epigenéticas e as Neoplasias.....	35
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>37</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	39
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
<b>5.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	40
5.1	CULTIVO CELULAR.....	40
5.1.1.	Tratamento com a liraglutida e com 5-aza-2'-desoxicitidina.....	40
5.2	EXTRAÇÃO DE DNA E RNA .....	40
5.3	ELETROFORESE EM GÉIS DE AGAROSE 1% E DE POLIACRILAMIDA 8%. .....	41
5.4	TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO .....	41
5.5	ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE <i>ADAM33</i> PELA TÉCNICA DE MSP.....	42
5.6	ANÁLISE DO PROMOTOR DO GENE <i>ADAM33</i> .....	43
5.6.1	Reação de PCR nested da ilha de CpG .....	44
5.6.2	Purificação dos produtos de PCR .....	45
5.6.3	Ligação em vetor de clonagem .....	45
5.6.4	Preparo de células Eletrocompetentes.....	45

5.6.5	Eletroporação de plasmídeos.....	46
5.6.6	PCR de colônia e Purificação de DNA Plasmídial.....	46
5.7	SEQUENCIAMENTO DE DNA, PRECIPITAÇÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	47
5.8	ANÁLISE DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO PELO GENOMATIX (MATINSPECTOR).....	47
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
6.1	TÉCNICA DE PCR METILAÇÃO ESPECÍFICA (MSP) .....	49
6.2	AMPLIFICAÇÃO DA ILHA DE CPG 1 DO GENE <i>ADAM33</i> .....	50
6.3	PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR DA CGI1 DO GENE <i>ADAM33</i> .....	51
6.4	CLONAGEM E PCR DE COLÔNIA DO INSERTO DA ILHA DE CPG 1 GENE <i>ADAM33</i> .....	54
6.5	PURIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL E SEQUENCIAMENTO DO INSERTO DA CGI1 DO GENE <i>ADAM33</i> .....	55
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>62</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>68</b>
<b>9.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>70</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>71</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a doença maligna mais comum entre as mulheres de todo o mundo. Informações sobre a incidência e a mortalidade do câncer de mama são essenciais para o planejamento de medidas de saúde (Organização Mundial da Saúde, WHO 2017). De acordo com o (Agencia Internacional de Pesquisa sobre Câncer, GLOBOCAN 2012) o câncer de mama representa 25,1% de todos os cânceres sendo o mais comum entre mulheres. O câncer de pulmão é o câncer mais comum no mundo (1,8 milhão de casos, 12,9%) seguido pelo câncer de mama em mulheres que é considerado o segundo tipo de câncer mais comum (1,7 milhão de casos, totalizando 11,9%), classificado como a quinta causa de morte (522.000, 6,4% óbitos) no mundo, seguido pelo câncer colorretal (1,4 milhão de casos, 694.000 mortes), próstata (1,1 milhão de casos, 307.000 mortes), estômago (951.000 casos, 723.000 mortes) e câncer de fígado (782.000 casos com 745.000 mortes). Esses seis cânceres correspondem por 55% da incidência global (FERLAY *et al.*, 2015). No entanto, as taxas de incidência variam quase quatro vezes, com maior incidência documentada nas regiões de maior renda (92 por 100.000 na América do Norte) e menor incidência documentada em regiões de baixa renda (27 por 100.000 na África Central e Ásia Oriental). Nos Estados Unidos, o câncer de mama é responsável por 14% dos cânceres identificados. Uma em cada oito mulheres americanas será diagnosticada com câncer de mama em sua vida, com o maior percentual ocorrendo entre 55 e 64 anos (WINTERS *et al.*, 2017).

Embora a incidência deste tipo de câncer nos países desenvolvidos seja maior, as taxas de mortalidade são menores, enquanto as taxas de mortalidade se mantêm maiores nos países menos desenvolvidos. Os planos para o controle e a prevenção desse câncer constituem uma alta prioridade para os formuladores de políticas de saúde; além disso, é necessário aumentar a conscientização sobre fatores de risco e a detecção precoce em países menos desenvolvidos (GHONCHEH, M.; 2016).

No Brasil, são estimados 59.700 casos novos de câncer de mama para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres. Os cânceres de próstata (68 mil) em homens e mama (60 mil) em mulheres são os mais frequentes. À exceção do câncer de pele não melanoma, os tipos de câncer mais incidentes em homens são próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino

(8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) estão entre os principais. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer também é o primeiro mais frequente nas mulheres das Regiões Sul (73,07/100 mil), Sudeste (69,50/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil). Na Região Norte, é o segundo tumor mais incidente (19,21/100 mil) (INCA, 2018).

Atualmente, é preocupante a elevada taxa de prevalência das doenças não-transmissíveis no mundo. Os principais motivos deste aumento são o aumento da expectativa de vida, a exposição a fatores de risco e as mudanças no estilo de vida. Estudos mostram que o câncer é uma das doenças mais importantes no mundo e se prevê para 2030, o número de diagnósticos de câncer de mama em todo o mundo deverá aumentar para quase 3,2 milhões por ano (Sociedade Americana do Câncer, AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MECANISMOS MOLECULARES DO CÂNCER

Vários mecanismos moleculares estão associados ao desenvolvimento e estabelecimento das neoplasias. Dentre estes, as alterações nos oncogenes e nos supressores de tumor são preocupações diferentes do ponto de vista das pesquisas da gênese do câncer. Os efeitos sobre o comportamento celular pode ser o resultado de mutações em qualquer classe de genes, porque a maioria dos mecanismos de controle nas células envolvem componentes inibitórios (supressores de tumor) e estimuladores (proto-oncogenes). Mas do ponto de vista de uma célula tumoral, ambas as alterações têm o mesmo objetivo (SIMPSON *et al.*, 2005).

Hanahan e Weinberg (2011) propuseram características do câncer que compreendem seis capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento de tumores humanos em várias etapas. As características distintas constituem um princípio organizador para racionalizar as complexidades da doença neoplásica. Eles incluem: a manutenção da sinalização proliferativa, inibição dos supressores de crescimento, a resistência à morte celular, a imortalidade replicativa, indução da angiogênese e ativação da invasão e metástases. Essas características diferenciadas conferem ao câncer a capacidade de realizar um crescimento tumoral independente de estímulos próprios e a disseminação metastática.

#### 2.1.1 Transição Epitélio Mesênquima (TEM)

A Transição Epitélio-Mesênquima (TEM) não é um processo único de células tumorais. Sua importância é relatada em cenários biológicos diferentes como na implantação do embrião, na embriogênese e na organogênese; na cicatrização de feridas, regeneração de tecidos e fibrose; e na tumorigênese, na progressão de um carcinoma *in situ* a um invasivo, e também na resistência à apoptose e aos fármacos quimioterápicos (KALLURI; WEINBERG, 2009; MICALIZZI; FARABAUGH; FORD, 2010; MORENO-JAIME *et al.*, 2016). No fenômeno complexo da disseminação de células tumorais, um dos primeiros eventos importantes é a perda da maioria das características epiteliais, através de mudanças drásticas no citoesqueleto, como danos aos microtúbulos pela formação de dímeros  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina às proteínas

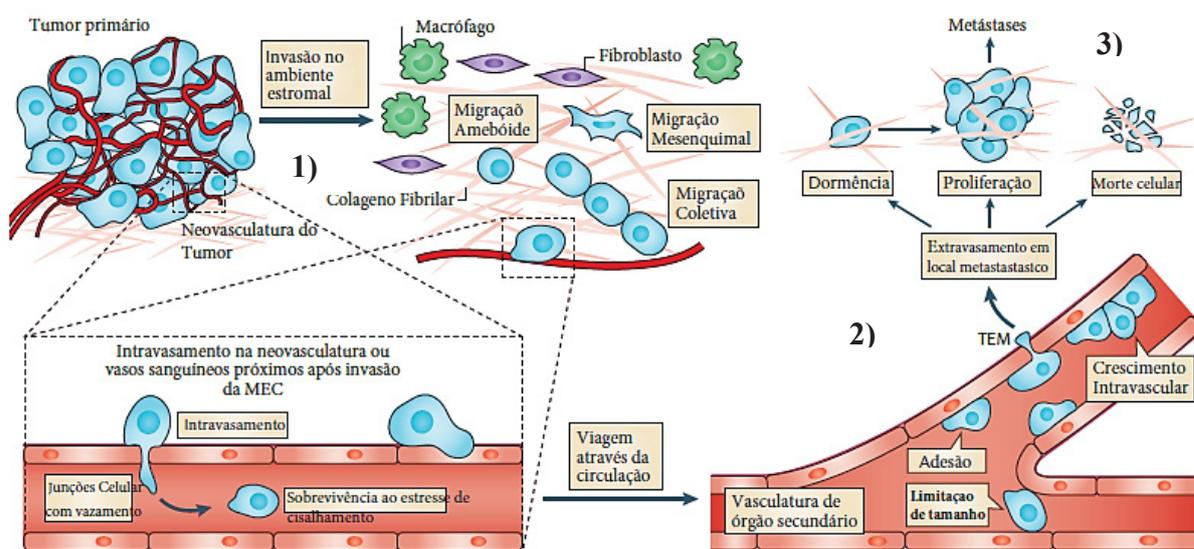
associadas a estes. Esta série de eventos é conhecida como transição epitélio-mesênquima, que é um processo no qual as células tipo epiteliais sofrem alterações bioquímicas para se tornarem células do tipo mesênquima. As junções intercelulares são perdidas e, portanto, as células tornam-se alongadas e despolarizadas, o que permite que eles se movam através da matriz extracelular (MORENO-JAIME *et al.*, 2016). De fato, a maioria das mortes (90%) em pacientes com câncer de mama é causada por invasão e metástase, características relacionadas à TEM (FEDELE, 2017).

O processo de metástase desencadeado pela TEM é um importante fator que contribui para as mortes pelo câncer de mama. A disseminação das neoplasias é geralmente distribuída em etapas inter-relacionadas, começando com a invasão local, extravasamento e posterior disseminação pela via circulatória e/ou pelo sistema linfático para órgãos distantes. Consequentemente, as células tumorais se aderem aos leitos capilares dentro do órgão alvo, proliferam e promovem a angiogênese. Enquanto essas etapas estão sendo realizadas, as células tumorais devem sobreviver na circulação, evadir aos ataques imunológicos, aderir aos capilares e extravasar para então colonizar os órgãos distantes (SCULLY *et al.*, 2012; PADUCH, 2016; CHEN *et al.*, 2018). A invasão é o primeiro passo de processo metastático e requer mudanças na adesão célula-célula, bem como na adesão celular à matriz extracelular (MEC). A aderência das células tumorais à MEC é mediada principalmente por integrinas, que formam heterodímeros transmembrana (MEGO; MANI; CRISTOFANILLI, 2010). As integrinas são receptores transmembrana encontrados ligados aos componentes da MEC, como fibronectina, laminina, colágeno, fibrinogênio e vitronectina sendo a invasão favorecida pela degradação proteolítica da MEC por diferentes proteínas, como por exemplo, através das metaloproteinases (MMP) e do sistema ativador do plasminogênio uroquinase (uPA) (SCULLY *et al.*, 2012).

Um importante grupo de mediadores moleculares de adesão célula-célula é a família das caderinas. A invasão é frequentemente acompanhada por uma mudança na expressão das caderinas, com diminuição da E-caderina, uma caderina epitelial, e aumento da regulação da N-caderina, que está intimamente associada às células mesenquimais. Também foi relatado que a E-caderina mantém as junções célula-célula, enquanto a regulação negativa da E-caderina provou ser um fator determinante no crescimento de células de câncer de mama metastático (YILMAZ; CHRISTOFORI, 2010; WENDT *et al.*, 2011).

Durante a disseminação metastática, as células de um tumor primário podem invadir os tecidos circundantes como células individuais ou coletivamente. A migração de células tumorais individuais ocorre por dois modos interconvertíveis: migração alongada ou mesenquimal e a migração arredondada ou amebóide, sendo dependente das condições microambientais (FIGURA 1) (REYMOND; D'ÁGUA; RIDLEY, 2013).

FIGURA 1- DISSEMINAÇÃO METASTÁTICA



FONTE: Adaptado de REYMOND *et al.* (2013)

Nota: As células tumorais entram na corrente sanguínea em um processo chamado de intravasamento (1), no qual as células migram através das junções das células endoteliais (CE). As células tumorais deixam a circulação em um processo chamado extravasamento (2) e envolve a interação específica de células cancerígenas com as CE através da adesão celular; e então transmigram através da barreira endotelial. Depois disso elas invadem a membrana basal (3) que envolve os vasos sanguíneos e as células podem entrar em um estado de dormência ou proliferar dentro deste novo microambiente, onde algumas delas darão origem às micrometástases e depois às macrometástases.

Os novos focos tumorais, conhecidos como micrometástases, precisam sobreviver e proliferar no novo ambiente para formar macrometástases clinicamente detectáveis (CHIANG, 2008; KIENAST *et al.*, 2009). Diversas vias moleculares caracterizam diferentes tipos de invasão e migração, como a migração de células individuais (por exemplo, migração de amebóides) ou a migração de células coletivas. Enquanto a TEM parece ser crucial na migração de células mesenquimais a ativação de RhoGTPases desempenha um papel importante na migração de células amebóides individuais (MEGO; MANI; CRISTOFANILLI, 2010).

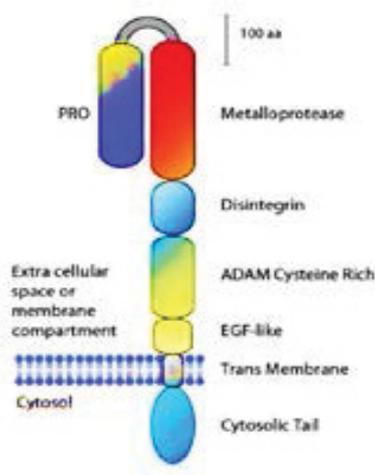
A TEM é uma via crítica no movimento de células migratórias únicas. Este processo começa com a desintegração da célula-célula que perde marcadores

epiteliais, tais como a E-caderina; e aumenta a expressão de marcadores mesenquimais, tais como a vimentina. Após a perda de adesão celular, a polaridade celular é alterada a partir da polaridade apical-basal à polaridade frontal-posterior, para iniciar a migração de células através de mudanças na actina cortical e fibras de actina que induzem a remodelação do citoesqueleto. Enzimas proteolíticas como MMPs que degradam a matriz, são ativadas e a adesão da matriz celular é modificada (IWATSUKI *et al.*, 2010; YILMAZ; CHRISTOFORI, 2010). O papel da TEM no câncer já está bem estabelecido, e supõe-se que seja um componente essencial para a metástase. Uma vez que as células tumorais alcançaram o local de metástase à distância, elas retomam o fenótipo do tumor primário através da reversão do processo, chamado transição mesênquima-epitélio (TME). Portanto, os passos do TEM parecem ser reversíveis, indicando a existência de componentes dinâmicos na progressão dos tumores (CHRISTIANSEN; RAJASEKARAN, 2006; MORENO-JAIME *et al.*, 2016).

## 2.2 PROTEÍNAS DA FAMÍLIA ADAM

A família de proteínas de membrana ADAMs (*a desintegrin and metalloproteases*) pertence a uma grande superfamília dependente do zinco chamada metzincinas e são encontradas em mamíferos e invertebrados (VAN GOOR *et al.*, 2009). A família ADAM é composta por 34 membros (ADAM1-ADAM34) e todos os membros ADAM são glicoproteínas zimogênicas transmembranas do tipo 1, que incluem 8 domínios distintos. Estes domínios incluem um domínio sinal, um pró-domínio, um domínio de metaloproteinase, um domínio de ligação de desintegrina ou integrina, uma região rica em cisteína, um fator de crescimento epidérmico (EGF), uma sequência transmembrana e uma extremidade C terminal intracelular (FIGURA 2) (WOLFSBERG *et al.*, 1995; MOCHIZUKI E OKADA, 2007; STASIKOWSKA-KANICKA *et al.*, 2016). As proteínas da família ADAM estão envolvidas em clivagens de ectodomínios de diversos fatores de crescimento, citocinas, receptores e moléculas de adesão (PENNINGTON, 2008; NIVES, G.; ZIGRINO, P.; 2016).

FIGURA 2- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA PROTEÍNA DA FAMÍLIA ADAM, CONTENDO SEUS DOMÍNIOS



FONTE: University of Helsinki (2017)

Nota: É possível observar a presença do pró-domínio, um domínio de metaloproteinase, um domínio de ligação de desintegrina ou integrina, uma região rica em cisteína, um fator de crescimento epidérmico (EGF), uma sequência transmembrana e uma extremidade C terminal intracelular

A literatura destaca uma importante participação das proteínas da família ADAM nos processos de formação e progressão tumoral através de sua função integrina e metaloproteinase. Vários membros da família de proteínas ADAM (ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17, ADAM23) e ADAM33 já foram implicadas na patogênese e progressão do câncer, o que ocorre via clivagem de diferentes componentes, migração celular e no controle de várias sinalizações envolvidas no desenvolvimento tumor (O'SHEA *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2004; ZHONG *et al.*, 2008; SENISKI *et al.*, 2009; TOQUET *et al.*, 2012a, 2012b; MULLOOLY *et al.*, 2015; MANICA *et al.*, 2017).

### 2.2.1 Proteína ADAM33

A proteína ADAM33 é um membro da família de múltiplos domínios de glicoproteínas transmembranares. Os membros da família ADAM têm atividades diferentes, como proteólise e adesão, o que os torna bons candidatos para mediar o remodelamento da matriz extracelular e as alterações na adesão celular que caracterizam certas patologias e o desenvolvimento do câncer. Além disso, alguns

autores sugerem que a ADAM33 relacionam-se com doenças de pele e hiperreatividade brônquica e na psoríase (EERDEWEGH *et al.*, 2002; DENG *et al.*, 2010).

A proteína ADAM33 contém todos os domínios característicos da família ADAM, incluindo uma sequência consenso de ligação ao zinco no sítio catalítico, que é ativo em todas as isoformas dessa proteína. A proteína imatura de aproximadamente 120 kDa é processada a uma forma madura glicosilada de aproximadamente 100 kDa (GARLISI *et al.*, 2003; POWELL *et al.*, 2004). Estudos mostraram a presença de uma forma solúvel da ADAM33 (sADAM33), de 55 kDa no meio extracelular em lavado bronco-alveolar com aparente capacidade de promover a angiogênese (PUXEDDU *et al.*, 2008). Diversos polimorfismos do gene *ADAM33* têm sido fortemente relacionados à asma (EERDEWEGH *et al.*, 2002) e essas evidências têm sido confirmadas em diversos estudos (CAKEBREAD *et al.*, 2004; HAITCHI *et al.*, 2005; HOLGATE *et al.*, 2005; PARKER *et al.*, 2009; KOBOLDT *et al.*, 2012). Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene *ADAM33* em crianças e adultos podem modificar a susceptibilidade individual para o desenvolvimento da asma de forma mais severa (EERDEWEGH *et al.*, 2002; HOLGATE *et al.*, 2005; HAITCHI *et al.*, 2005; DAVIES, 2009). Além disso, detectaram uma associação entre SNPs do gene *ADAM33* e a progressão da aterosclerose em pacientes com doença arterial coronariana (HOLLOWAY *et al.*, 2010). Sua atuação estaria relacionada com o processo de inibição da migração de células da musculatura lisa e isso poderia promover o desenvolvimento de placas ateroscleróticas instáveis.

Um estudo de Stasikowska *et al.* (2016) e Topal *et al.* (2012) revelaram um aumento significativo na imunoexpressão de ADAM33 em câncer de laringe, sugerindo um importante papel da ADAM33 na patogênese desse tipo de câncer. Além disso, a super produção de ADAM33 nas células vasculares do câncer de laringe pode estar associada aos efeitos angiogênicos dessa proteína, possivelmente envolvidos no desenvolvimento de tumores e metástases (O.STASIKOWSKA-KANICKA; M.WĄGROWSKA-DANILEWICZ; DANILEWICZ., 2016). Yang *et al.* (2010) mostraram que a regulação do gene *ADAM33* em fibroblastos pulmonares de asmáticos envolve mecanismos epigenéticos, como a modificação de histonas e a condensação de cromatina, mas não de metilação do DNA, sendo que estes mecanismos parecem ser controlados pelo fator de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ). Embora a ADAM33 tenha sido associada ao remodelamento de tecidos em doenças pulmonares, seu papel na tumorigênese ainda é amplamente desconhecido.

Estudo desenvolvido com câncer de mama mostrou que a metilação da região promotora do gene *ADAM33* está relacionada com a diminuição da proteína e está frequentemente silenciada nos tumores do tipo lobulares, contribuindo para o padrão metastático das células tumorais de mama (SENISKI *et al.*, 2009), enquanto a presença da proteína proporcionaria fenótipos menos agressivos aos tumores ductais (MANICA *et al.*, 2017).

### 2.2.2 Fatores De Transcrição Na Região Promotora Do Gene *ADAM33*

A região promotora do gene *ADAM33* contém ilhas de CpG que são regulatórias da expressão (SENISKI *et al.*, 2009). Nesta mesma região, há diversas regiões nas quais podem se ligar vários fatores de transcrição, que podem de alguma maneira interferir na expressão do gene, favorecendo ou inibindo. Entre eles, se encontram o HOXB6, que funciona como o fator de transcrição que participa do desenvolvimento do pulmão e da pele. Quando sua expressão fica alterada, esse evento é associado à leucemia mieloide aguda e ao câncer colorretal (VIDER *et al.*, 2000; GIAMPAOLO *et al.*, 2002). O FT NKX2-5 atua no desenvolvimento do músculo cardíaco, e as miocardiopatias relatam a alteração da sua expressão (XU *et al.*, 2017) além de hipotireoidismo (VIDER *et al.*, 2017). Outro FT, o CDX2, participa como regulador de genes específicos do intestino, atuando na sua diferenciação, e sua expressão defeituosa propicia a inflamação intestinal e tumorigênese em cânceres de cólon e hepático (SHAH *et al.*, 2017). Todos os FT anteriores são considerados como *homeobox*, ou seja, consistem de fatores que se ligam a uma região de domínio no DNA de determinado gene, contendo cerca de 180 pares de bases e que participam no desenvolvimento dos organismos e determinam a identidade de segmentos individuais do embrião em sua etapa inicial, promovendo à célula progenitora sua identidade espacial e posicional. Outro fator importante encontrado foi o SATB1, responsável por recrutar fatores de remodelamento da cromatina e com isso controlar a sua estrutura e a expressão gênica. Patologias associadas a alteração deste fator são os carcinoma de esôfago e genes essenciais para a maturação de células T imunes CD8 nos timócitos (GONG *et al.*, 2009; SONG *et al.*, 2017). Também foram observados como possíveis ligantes os fatores FOXA1, GATA3, DEAF-1 e HINFP que estão envolvidos no desenvolvimento embrionário, estabelecimento de expressão gênica tecido-específica e regulação da expressão gênica em tecidos diferenciados.

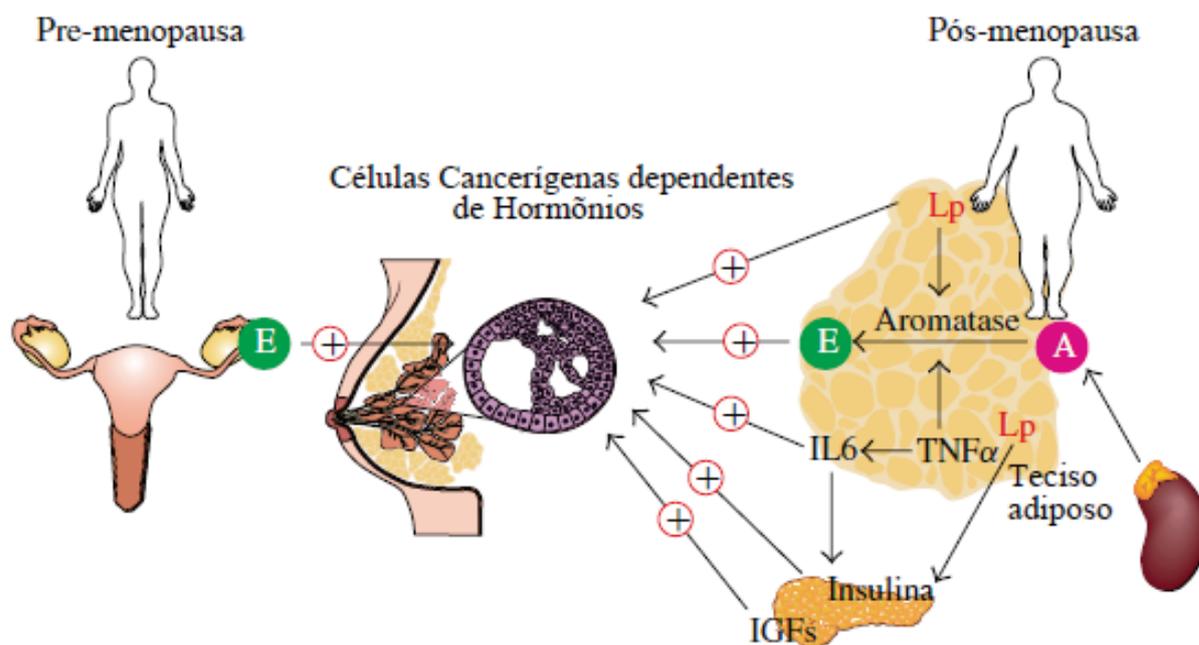
O FOXA1 é considerado como um ativador transcricional para albumina e transferrina hepáticas. Entre as doenças envolvidas com a desregulação deste fator está o câncer de mama luminal, já que entre suas vias relacionadas estão os efetores diretos de p53; estando também relacionado a outros carcinomas esofágicos e pulmonares (LIN *et al.*, 2002; MALIK *et al.*, 2010). O GATA3 é um importante fator no desenvolvimento de células T, e desempenha um papel importante na biologia de células endoteliais; sendo as doenças associadas a sua expressão defeituosa o hipoparatiroidismo, a surdez neurossensorial e a doença renal (GARCIA-CLOSAS *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2009; HOU *et al.*, 2017). O FT DEAF-1 atua sobre genes em que as proteínas se unem ao seu próprio promotor, tal como receptor de estrógeno, e ao de vários genes alvo. Alterações nesse FT estão relacionados com convulsões e desordens do desenvolvimento intelectual (RAJAB *et al.*, 2015). Sua ação também interfere na proliferação de células epiteliais e ramificações laterais em glândulas mamárias (HUGGENVIK *et al.*, 1998; BARKER *et al.*, 2008). O fator de transcrição HINFP interatua com a proteína 2 de união a metil-CpG (MBD), que tem afinidade pelo DNA metilado, e além disso, é um componente do complexo de histona deacetilase MeCP1 (HDAC), desenvolvendo um papel de metilação no DNA e na repressão da transcrição. Achados em pesquisas anteriores o relacionam com a metilação e o silenciamento do promotor em linhagens celulares de câncer de próstata (PULUKURI; RAO, 2006). E finalmente os NKX6-1 e HMGA-1 estão envolvidos com a codificação de proteínas e a regulação gênica, além de estar associados com o Diabetes mellitus, pois são necessários para o desenvolvimento das células  $\beta$ , além de unir-se ao promotor e regular o gene da insulina, enquanto o HMGA-1 é um regulador chave da expressão gênica do receptor da insulina (CHIEFARI *et al.*, 2011).

### 2.3 FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE MAMA E SUA RELAÇÃO COM O DIABETES

O Câncer de Mama é um tipo de câncer multifatorial, que envolve fatores biológicos, endócrinos, de comportamento e de estilo de vida, envelhecimento, fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher, histórico familiar, alta densidade do tecido mamário (razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama) (FERLAY *et al.*, 2015). Existe uma forte e importante relação entre o câncer de mama e o diabetes, mostrando que ambos podem ocorrer simultaneamente, principalmente quando se

leva em consideração de que, para cada 5 Kg/m<sup>2</sup> de aumento do IMC (índice de massa corporal) na mulher, se observa um aumento de 12% na incidência do câncer de mama pós-menopausa (MUNSELL *et al.*, 2014). Esse aumento da incidência da neoplasia mamária em mulheres obesas pode ser atribuído principalmente à maior síntese de estradiol, a partir da aromatase expressa no tecido adiposo, enzima responsável pela conversão de androgênios em estrogênio (KHANDEKAR; COHEN; SPIEGELMAN, 2011). Além disso, os adipócitos produzem várias adipocinas, como a leptina e citocinas inflamatórias, que podem influenciar a atividade da aromatase e a proliferação celular dependente de estrogênio (FIGURA 3).

FIGURA 3 - DIFERENTES MECANISMOS DE DEPENDÊNCIA DE ESTROGÊNIO PARA CÂNCER DE MAMA RELACIONADOS A HORMÔNIOS EM MULHERES PRÉ E PÓS-MENOPAUSA



FONTE: Adaptado de MACCIO; MADEDDU (2011)

Nota: Em mulheres na pré-menopausa, o principal local de síntese de estrogênio é o ovário. Em mulheres na pós-menopausa, o tecido adiposo é a principal fonte de estrogênio circulante. Abreviaturas: IGFs, Fator de Crescimento; IL, interleucina; TNF $\alpha$ , fator de necrose tumoral; Lp, leptina; E, estradiol; A, aromatase.

O tecido adiposo que suporta e envolve o tecido glandular mamário desempenha um papel central e inclui uma mistura de adipócitos maduros, fibroblastos indiferenciados e macrófagos. Alterações na distribuição de fibroblastos podem regular a síntese local de estrogênio, o que influencia o desenvolvimento do tumor mamário. É importante ter em mente que os fibroblastos, em termos de

quantidade, coincidem com os dos adipócitos e que ambos os componentes influenciam uns aos outros em sua capacidade funcional peculiar (ZHAO *et al.*, 1995).

Em estudos com células em cultura, a leptina também promove diretamente a proliferação celular e a angiogênese, enquanto inibe a apoptose. Estudos populacionais associam a leptina elevada ao aumento da incidência de câncer colorretal, câncer de mama na pós-menopausa e, potencialmente de outros tipos de cânceres (GUO *et al.*, 2012). Outro hormônio derivado do tecido adiposo é a adiponectina, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram os efeitos anti-inflamatórios, inibitórios tumorais e de sensibilização à insulina por adiponectina. A adiponectina reduzida pode promover o desenvolvimento de câncer através do aumento da resistência à insulina e inflamação, ou por alterações na sinalização celular que aumentam a proliferação e a angiogênese (CHAO; PAGE, 2008; LUO *et al.*, 2014; LU *et al.*, 2015; HAMMARSTEN *et al.*, 2018; MEAKIN *et al.*, 2018). Vários estudos prospectivos relacionam à diminuição da adiponectina com o aumento do câncer de cólon (BECKER; DOSSUS; KAAKS, 2009).

Estudos múltiplos de metanálises sugeriram uma ligação entre o diabetes e uma variedade de diferentes tipos de câncer, incluindo câncer colorretal, endométrio, pancreático, bexiga, fígado, próstata, incluindo o Linfoma de Hodgking (LNH) (CHAO; PAGE, 2008; LUO *et al.*, 2014; HAMMARSTEN *et al.*, 2018; MEAKIN *et al.*, 2018). O diabetes ainda possui alguns agravantes que o relacionam diretamente com o câncer, uma vez que existem mecanismos fisiopatológicos inter-relacionados que incluem a hiperinsulinemia, hiperglicemia e inflamação, que têm sido implicados no aumento do risco de câncer, através de sua influência em processos neoplásicos (GARG *et al.*, 2014). A resistência à insulina, a hiperinsulinemia (endógena por resistência à insulina ou exógena devido à insulina administradas) e os níveis elevados de fator de crescimento similar a Insulina (IGF-1) reduzem a apoptose. Também se sabe que a insulina tem propriedades mitógenas, em particular, tanto o fígado quanto o pâncreas, estão expostos a um nível elevado de insulina produzida endogenamente. Acredita-se que os efeitos da insulina e da hiperinsulinemia na tumorigênese são mediados pelo receptor de insulina, que é expresso em tecidos normais e nos tumores, e a desregulação dessas vias de sinalização durante a resistência à insulina e a hiperinsulinemia poderiam resultar na proliferação celular e poderia aumentar a progressão da doença (FRASCA *et al.*, 2008; GODSLAND, 2010; GARG *et al.*, 2014).

O IGF-1 e seu receptor também foram implicados no desenvolvimento de câncer por ativação de vias de sobrevivência e proliferação celular. A insulina inibe a produção da proteína de ligação ao IGF-1 (IGFBP) e possivelmente IGFBP-2, levando a um aumento nos níveis de IGF-1 livre, ou seja, a forma ativa do fator de crescimento. Esta forma ativa de IGF-1 estaria então disponível para se ligar a receptores de IGF-1, os quais, como os receptores de insulina, são expressos em grandes quantidades também por tecidos tumorais. Esta ligação inicia uma via de sinalização nas células cancerosas que favorece o crescimento do tumor, ativa a mitogênese e inibe a apoptose (HE *et al.*, 2017; SCHMID; GHIRLANDA; NIESSEN, 2017).

Existem agora evidências consideráveis de que esses hormônios e as redes de transdução de sinais que eles regulam, têm papéis importantes na neoplasia, e o aumento da incidência de diabetes leva a uma crescente diversidade de tratamentos farmacológicos que são principalmente destinadas a aumentar os níveis de insulina ou reduzir a glicose circulante, e que em alguns casos, apresentam efeitos na proliferação celular.

Estes fármacos para o diabetes podem resultar em efeitos diretos ou indiretos sobre a resistência à insulina e os níveis de insulina circulantes ou outros mecanismos, como é o caso do cloridrato de metformina (disponível em marcas genéricas). A metformina é uma biguanida oral, bem estabelecida como o tratamento de primeira linha do DM2 (Diabetes *mellitus* tipo 2) que reduz a glicemia inibindo a gliconeogênese hepática e diminuindo os níveis circulantes de insulina. Os análogos da insulina humana recombinante (IH), as tiazolidinedionas (TZD), as sulfoniluréias (SU) estão entre as classes mais antigas de medicamentos disponíveis para o tratamento do DM2, e que consistem de inibidores do co-transportador sódio-glicose tipo 2 (SGLT2) que bloqueariam a reabsorção renal de glicose, causando glicosúria.

As atuais e novas terapias baseadas em hormônios produzidos pelo intestino em resposta à ingestão de alimentos ou às incretinas que são uma classe relativamente nova de medicamentos para tratar o DM2. As terapias com incretinas são divididas em dois grandes grupos, agonistas do receptor do peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1RA) e inibidores da dipeptidil peptidase-4 (DPP4) entre eles a exenatida (Byeta®) e a liraglutida (NovoNordisk®) (BAGGIO; DRUCKER, 2007; YEE *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2010; NÚÑEZ *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2014; TSILIDIS *et al.*, 2014; KOWALL *et al.*, 2015).

### 2.3.1 A Função Do GLP-1 e Seus Análogos

As incretinas são hormônios secretados pelo trato gastrointestinal para a circulação em resposta à ingestão de nutrientes que promovem a secreção de insulina estimulada pela glicose (KREYMANN *et al.*, 1987). Esse fenômeno representa aproximadamente 50% a 70% do total de insulina secretada após a ingestão de glicose. A administração oral de glicose está associada a um aumento dos níveis de insulina no plasma em comparação com a mesma quantidade de glicose administrada por via intravenosa (MCINTYRE; HOLDSWORTH; TURNER, 1964).

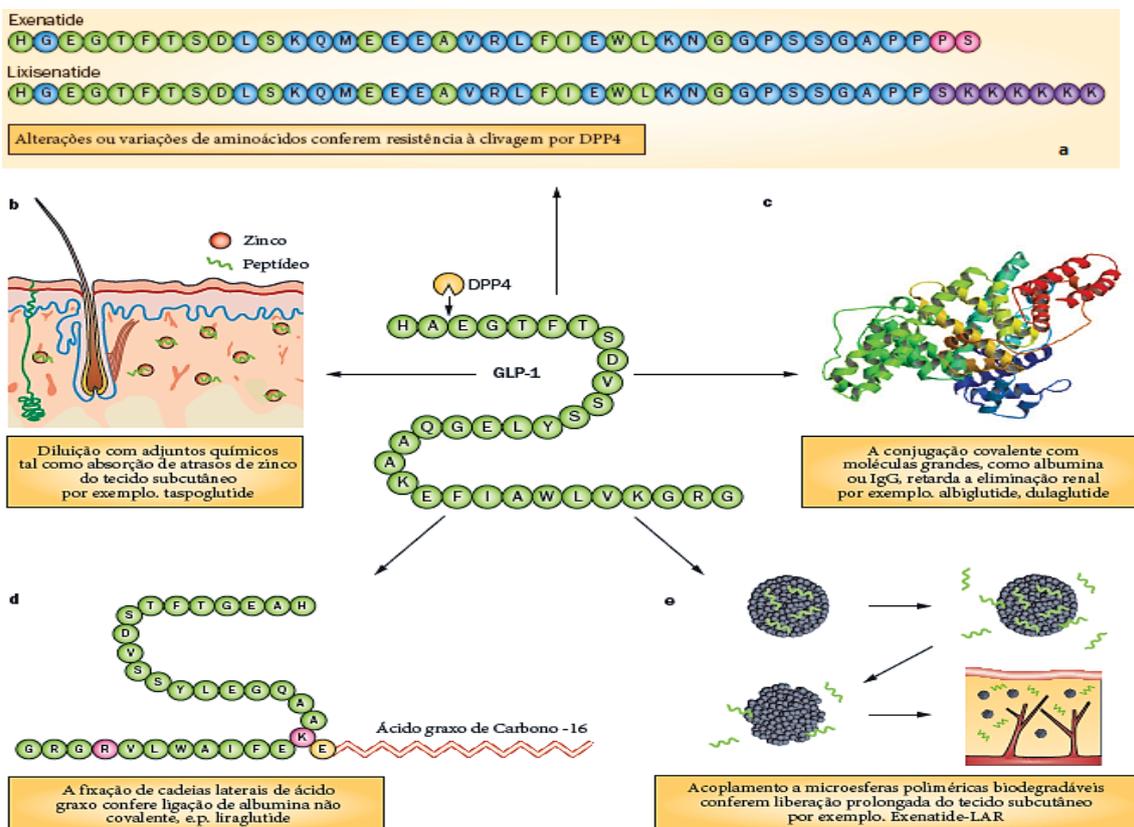
O primeiro hormônio incretina identificado isolado a partir de extratos de células K de intestino delgado (delgado proximal) foi inicialmente denominado de polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), em função da sua capacidade de inibir a secreção de ácido gástrico em cães. A descoberta de um segundo hormônio incretina, o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1), foi realizada a partir de clonagem e sequenciamento de genes pró-glucagon de mamíferos (BAGGIO; DRUCKER, 2007). Além do glucagon, o gene pró-glucagon também codifica 2 peptídeos 50% homólogos ao glucagon e, por conseguinte, eram apropriadamente denominados peptídeos do tipo glucagon-1 e peptídeo do tipo glucagon-2. Com base na sua homologia com o glucagon, ambos os peptídeos foram analisados para determinar a sua atividade insulínica, mas apenas o GLP-1 foi capaz de estimular a secreção de insulina. O GLP-1 é um produto proteolítico pós-translacional tecido específico do gene pró-glucagon, liberado pelas células-L intestinais (delgado distal e colon proximal) em resposta à ingestão de nutrientes e melhora a secreção de insulina estimulada pela glicose (KREYMANN *et al.*, 1987; MOJSOV; WEIR; HABENER, 1987). As células-L endócrinas intestinais estão localizadas no íleo distal e no cólon, no entanto, essas células podem ser encontradas em todas as regiões do intestino humano. Seu subtipo epitelial aberto entra em contato direto com os nutrientes luminiais através de sua superfície apical, tecido neural e vascular, através de sua superfície basolateral. Consequentemente, a secreção de GLP-1 a partir de células L intestinais é estimulada por uma variedade de fatores nutrientes, neuronais e endócrinos (MORTENSEN *et al.*, 2003; THEODORAKIS, 2005; BAGGIO; DRUCKER, 2007).

A meia-vida do GLP-1 bioativo na circulação é inferior a dois minutos devido à rápida inativação pela enzima proteolítica DPP-4 ubíqua. A DPP-4, também conhecida

como cluster de diferenciação 26 (CD26), é uma serina protease que cliva especificamente os dipeptídeos a partir do extremo amino de oligopeptídeos ou proteínas que contêm um resíduo de alanina ou prolina na posição 2, modificando ou inibindo a sua atividade. O GLP-1, que contém um penúltimo resíduo de alanina é, portanto, um substrato para a DPP-4, é rapidamente metabolizado em GLP-1-NH2 (MENTLEIN; GALLWITZ; SCHMIDT, 1993; CHO; FUJITA; KIEFFER, 2014).

Assim, vários agonistas do receptor de GLP-1 foram desenvolvidos para fornecer ações estendidas *in vivo*. Estes agonistas do receptor de GLP-1 podem ser categorizados como de curta duração, proporcionando a ativação do receptor de vida curta (tal como exenatida e lixisenatida) ou compostos de atuação prolongada (por exemplo, albiglutide, dulaglutida, exenatida de ação prolongada e liraglutida), que ativam continuamente o receptor de GLP-1 na dose recomendada. As diferenças farmacocinéticas entre esses medicamentos levam a diferenças importantes em seus perfis farmacodinâmicos (FIGURA 4).

FIGURA 4 - ESTRATÉGIAS EMPREGADAS PARA DESENVOLVER AGONISTAS DO RECEPTOR DE GLP-1 COM MEIA-VIDA *IN VIVO* PROLONGADA



FONTE: Adaptado de MEIER (2012)

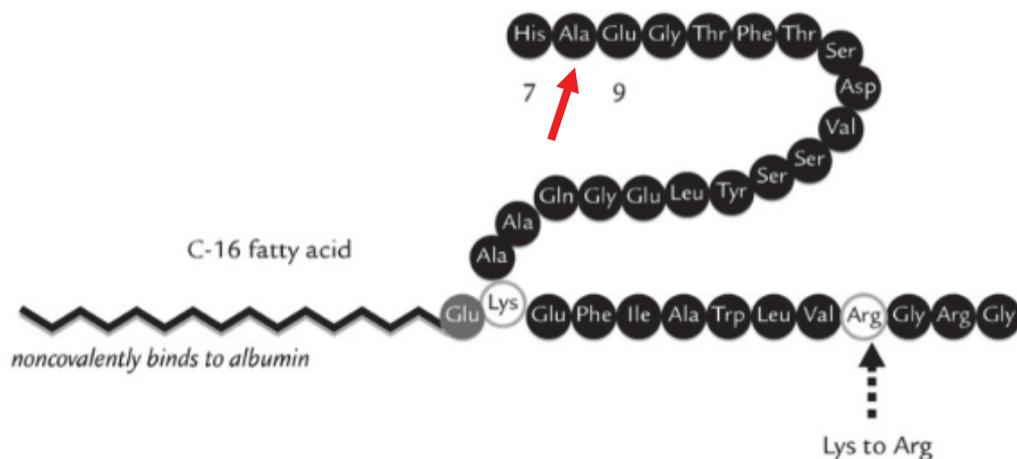
Nota: A sequência de aminoácidos N-terminal do GLP-1 humano nativo é mostrada em verde claro (centro) e o local de clivagem por DPP4 é indicado. Os painéis mostram estratégias empregadas para desenvolver: **a)** exenatida e lixisenatida; **b)** taspoglutide; **c)** albiglutide e dulaglutide; **d)** liraglutide e **e)** exenatide-LAR. Abreviaturas: DPP4, dipeptidil peptidase 4; GLP-1, peptídeo do tipo glucagon 1; LAR, liberação de ação prolongada.

Agonistas do receptor de GLP-1 de curta duração primeiramente reduzem os níveis de glicose no sangue pós-prandial por inibição do esvaziamento gástrico, enquanto que os compostos de ação prolongada, têm um efeito mais forte sobre os níveis de glicose em jejum, que é mediada predominantemente através de suas ações insulínótropas e glucagonostáticas (MEIER, 2012).

### 2.3.2 Ações e Efeitos da Liraglutida

A liraglutida (Victoza, NovoNordisk®) é um análogo do peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) de ação prolongada, com 97% de similaridade ao GLP-1 nativo, ligado de forma não covalente a albumina e resistente a DPP4. Seu perfil farmacocinético é estendido ao da molécula do GLP-1, para uma dose uma vez ao dia porque tem uma meia-vida mais longa do que a exenatida. A liraglutida foi produzida pela adição de um espaçador de ácido alfa-glutâmico acoplado a um grupo de ácido graxo C16, e pela substituição do aminoácido lisina pela arginina na posição 34 (FIGURA 5), com um ácido palmítico acoplado a sua estrutura química que garante uma meia-vida de até 13 horas na circulação devido à ligação não covalente à albumina, e, assim, possibilitando uma única dose diária deste medicamento (DRUCKER, 2007; MACUT *et al.*, 2017).

FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DA LIRAGLUTIDA.



FONTE: Adaptado de NAUCK (2016)

Nota: Esta possui 97% de homologia com o GLP-1, cuja diferença está na adição do ácido palmítico na lisina de posição 26, o que aumenta o tempo da liraglutida no organismo por se ligar à albumina, e pela troca da lisina pela arginina na posição 34. A DPP-4 é uma enzima responsável pela degradação da GLP-1 (flecha vermelha) e sua atividade é diminuída na liraglutida devido à ligação à albumina.

Entre as vantagens da liraglutida como a secreção de insulina dependente de glicose de uma maneira resistente à degradação, estudos mostram que a liraglutida promove a perda de peso e suprimem o apetite por causa do retardo do esvaziamento gástrico, e podendo subsequentemente melhorar a resistência insulínica pela ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), que promovem a translocação do transportador de glicose tipo 4 para a membrana plasmática e, aumentando assim, a captação de glicose. A liraglutida também reduz as concentrações plasmáticas de glucagon; e em ensaios pré-clínicos mostraram que a liraglutida reduz a esteatose hepática e ovário policístico em mulheres obesas. Embora seja atualmente utilizado apenas para o tratamento de pessoas com diabetes e pacientes com obesidade, estes dados representam uma opção atrativa para o tratamento de outras patologias. A exemplo da exenatida que mostrou certa diminuição da proliferação celular, com efeitos pró-apoptóticos e seletivos em células tumorais, especialmente em linhagens tumorais de mama, a liraglutida poderia apresentar efeitos semelhantes ainda não estudados (LIGUMSKY *et al.*, 2012; YAMAZAKI; SATOH; WATANABE, 2014; SAUNDERS *et al.*, 2018).

Para contribuir para novas terapias, tem se levado em consideração o uso de fármacos já utilizados na prática clínica para outros fins, que possam apresentar efeitos antitumorais ou anti-metastáticos. Neste contexto, as medicações chamadas de análogos de GLP-1, como por exemplo, o exenatida (Byeta®, Lilly) ou exedin-4, poderiam ter importantes implicações clínicas na terapia do câncer de mama (LIGUMSKY *et al.*, 2012). Em células hepáticas neoplásicas foram evidenciadas uma diminuição na taxa de proliferação e aumento na autofagia e senescência celular através do estímulo de TGF- $\beta$ 1 destas células após o uso de liraglutida (KRAUSE *et al.*, 2017). Por conseguinte, a terapia e a cirurgia contribuem para a diminuição dos tumores primários, contudo as medicações não têm apresentado efeitos sobre as células metastáticas. A alta incidência, agressividade e a letalidade de muitos tipos de cânceres, juntamente com os efeitos colaterais e a quimio-resistência das novas drogas antitumorais na clínica, representam um problema de saúde pública e abrem a possibilidade de reposição de drogas. Nesses casos uma medida comum é o

aumento da dosagem da medicação, acompanhado pelo aumento dos efeitos citotóxicos do tratamento. Além disso, o desenvolvimento de drogas anticâncer é particularmente longo e de alto custo, o que torna a reposição de drogas já existentes promissoras para o desenvolvimento de novos tratamentos. Neste contexto, o uso de medicações ou fármacos já utilizados para outras doenças seria uma alternativa viável, uma vez que dados como a farmacocinética e farmacodinâmica, toxicidade e excreção já são bem estabelecidos (LIANG *et al.*, 2010; WÜRTH *et al.*, 2016).

## 2.4 EPIGENÉTICA

A heterogeneidade intratumoral é o principal obstáculo para um tratamento efetivo do câncer de mama. Os mecanismos responsáveis pela criação da diversidade celular em uma neoplasia envolvem tanto fatores genéticos ou herdados, como aqueles provenientes do ambiente que atuam principalmente sobre a epigenética. A epigenética estuda eventos herdáveis que alteram a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA (VERMA E SRIVASTAVA, 2002). A metilação do DNA é essencial para o desenvolvimento de vertebrados.

A expressão gênica é controlada dinamicamente pelos mecanismos epigenéticos através das modificações pós-traducionais das histonas, proteínas associadas com a compactação da cromatina e do próprio DNA. Isso requer que todos estes elementos para a manutenção da estrutura da cromatina e a identidade da célula no contexto de um fenótipo celular normal. A alteração da regulação epigenética é um evento comum no câncer humano (SIMÓ-RIUDALBAS; ESTELLER, 2015).

Vários fatores influenciam na regulação epigenética de genes através de alterações na estrutura da cromatina, mas as modificações covalentes das histonas e do DNA são possivelmente os elementos mais importantes neste processo.

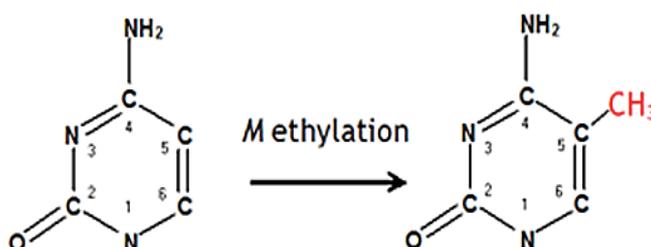
### 2.4.1. Metilação do DNA

Em 1975, a descrição de que a metilação do DNA poderia ser responsável pela manutenção estável de um padrão particular de expressão gênica contribuiu desde então, para o reconhecimento da metilação do DNA como um dos principais cooperadores para a expressão gênica. Especificamente, a metilação do DNA

estabelece um estado silenciado da cromatina, colaborando com as proteínas modificadoras de nucleossomos (JAENISCH; BIRD, 2003).

A metilação do DNA é o evento epigenético mais estudado e atua em processos como a inativação do cromossomo X, o *imprinting* genômico, embriogênese, gametogênese e o silenciamento de elementos repetitivos de DNA. A metilação do DNA é uma modificação química covalente resultante da adição de um grupamento metil (-CH<sub>3</sub>) em citosinas seguidas por guaninas na sequência gênica, os chamados dinucleotídeos CpG (BIRD, 2002). A metilação do CpG é catalisada por enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs), e que, a partir da 5-adenosilmetionina (SAM), transferem o grupo metil à posição 5 do anel pirimídico da citosina (C) (FIGURA 6) gerando a 5-metilcitosina (5mC) (BESTOR, 2000).

FIGURA 6 – METILAÇÃO DA CITOSINA



FONTE: CHAKAROV *et al.* (2014)

**Nota:** A metilação da citosina ocorre através da adição de um grupo metil (CH<sub>3</sub>) ao carbono localizado na posição 5 do anel aromático da citosina. A reação é catalisada pela enzima DNA metiltransferase (DNMT). Este processo ocorre tipicamente em sítios nos quais a citosina é seguida por guanina na sequência do DNA (sítios CpG).

Os dois principais grupos distintos de DNMTs conhecidos são as DNMT1, também denominadas de manutenção, uma vez que atuam predominantemente nos processos de divisão celular, fazendo cópias do padrão de metilação do DNA já existente; e as segundas estão divididas em DNMT3A e DNMT3B, também denominadas *de novo*, uma vez que o seu papel é centrado na adição de grupos metil nas sequências de DNA que ainda não foram modificadas (BESTOR, 2000).

As regiões que têm um elevado teor de G+C em relação à média do genoma são denominadas “Ilhas de CpG” (CGIs). As ilhas de CpGs se encontram nas regiões promotoras de 70% dos genes em humanos, sendo tipicamente menos metiladas em relação aos dinucleotídeos CpG encontrados ao longo do genoma (SAXONOV; BERG; BRUTLAG, 2006). Gardiner-Garden e Frommer (1987) definiram as “ilhas de CpG” como regiões de 200 pares de bases de DNA, tendo uma relação de G+C

superior a 50% e a razão entre CpG observado/esperado maior ou igual a 0,6 (GARDINER-GARDEN; FROMMER, 1987). A maioria das ilhas de CpG permanecem não metiladas em todos os estágios do desenvolvimento de todos os tipos de tecidos, enquanto os dinucleotídeos CpG presentes ao longo do gene tornam-se metilados (MÜLLER; GRÜBER; ANTEQUERA, 2003).

Nos casos em que ocorre a metilação da CGI há repressão da transcrição do gene através da inibição da ligação dos fatores de transcrição ou pela mudança na estrutura da cromatina (BIRD, 2002). A ordem na qual esses fatos ocorrem pode variar e ainda não foi totalmente elucidada (DWORKIN; HUANG; TOLAND, 2009).

#### 2.4.2 Alterações Epigenéticas e as Neoplasias

As alterações nos perfis de metilação estão associados ao desenvolvimento de diversas doenças, incluindo o câncer. Uma das maiores influências na gênese de tumores são as alterações no padrão de metilação do DNA, fazendo com que os ácidos nucleicos alterem sua estrutura e função, possibilitando a transcrição de sequências gênicas outrora não transcritas (TING; MCGARVEY; BAYLIN, 2006). No câncer, a metilação do DNA é profundamente alterada; nos tumores humanos há uma perda de metilação global e uma aquisição de padrões de hipermetilação em certos promotores, especialmente nos genes supressores tumorais, que levam sua inativação, uma das marcas típicas das células tumorais (ESTELLER, 2000). Em humanos, ocorre uma perda da metilação global, principalmente em proto-oncogenes, e a hipermetilação de genes com a função de supressores tumorais (TODD e WONG, 1999).

Além disso, estas mudanças na metilação do DNA estão associadas com a presença de um padrão aberrante de modificações de histonas (ESTELLER, 2007). Estudos ainda mostram que, além das ilhas de CpG nas regiões regulatórias dos genes, a metilação de ilhas de CpG ao longo do corpo do gene, mais especificamente em introns, também provoca alteração na expressão gênica, possivelmente pela atração ou repulsão de fatores de transcrição e por modificações estruturais da cromatina (GOPALAKRISHNAN; VAN EMBURGH; ROBERTSON, 2008). Entretanto, os mecanismos que desencadeiam essas alterações epigenéticas ainda não foram completamente elucidados. Alguns genes comumente hipermetilados em câncer de mama estão envolvidos na evasão à apoptose (*HOXA5*, *TWIST1*) e senescência

celular (*CCND2*, *CDKN2A*), enquanto outros regulam o reparo do DNA (*BRCA1*), crescimento (*ESR1*, *PGR*) e invasão tecidual (*CDH1*) (TAPIA *et al.*, 2008; DWORKIN *et al.*, 2009; JOVANOVIĆ *et al.*, 2010; NASS *et al.*, 2000; HSU *et al.*, 2013). Uma das aplicações dos mecanismos epigenéticos para a clínica é a reversibilidade dos padrões uma vez estabelecidos com o uso de agentes desmetilantes. Uma medicação já utilizada na prática clínica para tratamento de síndromes mielodisplásicas (SABA, 2007) e na análise do perfil epigenético *in vitro* é o 5-aza-2'-desoxicitidina (5-Aza) conhecido como decitabine e comercializado como Dacogen®. O 5-Aza pertence à família dos aza-nucleosídeos, moléculas análogas da pirimidina que inibem a DNMT. O seu mecanismo de ação biológica promove uma desmetilação progressiva pela sua capacidade de se incorporar nas fitas de DNA recém-sintetizadas, e como possui similaridade com a citosina, forma ligações covalentes irreversíveis com os sítios ativos da DNMT. Essa inserção leva a uma diminuição da atividade de DNMT um catalisador que permite a diferenciação continuar durante o processo de replicação, portanto, impede a metilação dos genes. Isso é importante em síndromes mielodisplásicas como a leucemia mieloide aguda (LMA), nas quais as células mieloides imaturas são frequentemente detidas nas primeiras formas de desenvolvimento (NAVADA *et al.*, 2014).

### 3. JUSTIFICATIVA

O Grupo de estudos em Epigenômica/CNPq estuda novos marcadores moleculares em câncer de mama desde de 2005, e o gene *ADAM33* vem sendo um dos alvos de estudo. Em nosso primeiro trabalho, analisamos o gene *ADAM33* utilizando um painel de linhagens tumorais de mama. O gene apresentou expressão diminuída devido a hipermetilação do promotor do gene *ADAM33*. A partir dos dados de sequenciamento de linhagens que expressam ou não o gene *ADAM33*, foram planejados iniciadores apropriados para utilizar a técnica de MSP (*methylation specific PCR*) em tumores. Assim, foi possível realizar a mesma análise iniciada com as linhagens nos tumores primários de mama. Foi demonstrado uma diferença significativa nos carcinomas lobulares invasivos, onde 76,2% destes apresentavam o promotor do gene *ADAM33* hipermetilado ( $p = 0,0002$ ) (SENISKI *et al.*, 2009). Além disso, existe uma expressão variada do gene *ADAM33* nas linhagens tumorais de câncer de mama, das quais, todas são provenientes de carcinomas ductais invasores. Contudo, a validação da proteína ADAM33 como biomarcador molecular de câncer de mama dependia de sua utilização em imunohistoquímica. Para isso, em continuidade ao trabalho iniciado em 2009 com o gene *ADAM33*, foi realizada a clonagem de uma parte do gene. A partir da expressão de um domínio da proteína ADAM33 recombinante foram produzidos anticorpos monoclonais contra a proteína ADAM33, e padronizada sua expressão em diferentes carcinomas mamários, mostrando que a presença da proteína seria um fator importante para a diminuição da agressividade dos tumores de mama (MANICA *et al.*, 2017).

A biologia molecular vem auxiliando a desvendar os passos utilizados ou as vias de ativação intracelular que conduzem ao câncer de mama. Sabe-se a bastante tempo que não existe um caminho único, mas uma série complexa de acontecimentos moleculares que levam para vias distintas e divergentes em relação ao câncer de mama invasivo (SIMPSON *et al.*, 2005). Contudo, os mecanismos de evasão celular das células tumorais aos tratamentos disponíveis na clínica, sobretudo nas células metastáticas, que não são sensíveis aos fármacos atualmente disponíveis, tem se tornado um dos objetivos dos estudos moleculares. Mesmo assim, o vislumbre de novas moléculas pela indústria farmacêutica principalmente na implementação nos estudos clínicos, é um fator limitante, seja pelo investimento, ou pela demora na determinação do seu uso.

Um dos trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Epigenética procurou avaliar se a liraglutida poderia também contribuir para alteração do perfil epigenético de genes relacionados com a neoplasia mamária. Foi observado que a liraglutida diminuiu em aproximadamente 40% a migração das linhagens mesenquimais MDA-MB-231 e MDA-MB-436. Em ambas as linhagens ocorreu aumento significativo da expressão *CDH1*, associado à desmetilação do promotor deste gene (TOLEDO, 2017). Este gene é bem descrito na literatura como uma molécula de adesão epitelial, assim como a proteína ADAM33, e a sua perda contribui para migração das células tumorais. A partir dos trabalhos anteriores, sabia-se que a linhagem MDA-MB-231 não expressa o gene *ADAM33*, enquanto a linhagem MDA-MB-436 o expressa pouco. É sabido igualmente que estas linhagens após tratamento com 5-aza-2'-desoxicitidina ambas as linhagens apresentaram efeitos, ocorrendo a presença e o aumento da expressão, respectivamente (SENISKI *et al*, 2009). Em 2016 no trabalho de conclusão de curso de COSTA foi observado que a linhagem MDA-MB-231 passou a expressar o gene *ADAM33* após tratamento com liraglutida (COSTA, 2016). Além disso, CHEQUIN *et al.* (em preparação) verificou que houve não só aumento de expressão do gene *ADAM33*, mas de vários genes relacionados com agressividade da linhagem tumoral. A partir destes resultados, foi proposto o projeto do presente mestrado, uma vez que haviam fortes indícios de que a liraglutida poderia influenciar no perfil de metilação da região promotora do gene *ADAM33*.

Para avaliar se a alteração da expressão do gene *ADAM33* nas amostras de nosso estudo era influenciada pelo perfil de metilação do gene, inicialmente foi realizada a técnica de MSP a partir do DNA tratado com bissulfito, na qual é possível diferenciar amostras não metiladas das metiladas de modo rápido e eficiente. Com essa técnica, foi possível determinar se de fato os CpGs 47, 51, 52 e 53, utilizados na sequência dos oligos iniciadores e presentes na região amplificada poderiam estar desmetilados através da técnica adotada. Contudo, se este resultado fosse promissor, seria interessante investigar se outros CpGs próximos poderiam estar desmetilados.

Sendo assim, neste trabalho buscou-se avaliar o efeito do fármaco liraglutida (Victoza, NovoNordisk®) sobre as linhagens tumorais de mama, comparando com o composto 5-aza-2'-desoxicitidina, um conhecido agente desmetilante, e seus efeitos sobre a metilação de *ADAM33* nas linhagens tumorais MCF-7, MDA-MB-231 e MDA-MB-436.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o perfil de metilação do gene *ADAM33* em linhagens tumorais de mama quando submetidas a tratamento com 5-aza-2'-desoxicitidina e liraglutida.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar alterações no perfil de metilação do gene *ADAM33* nas linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MDA-MB-436 nos diferentes tratamentos através de PCR específica para metilação - MSP (*methylation specific PCR*).
2. Avaliar o perfil de metilação do promotor do gene *ADAM33* sobre tratamento com 5-aza-2'-desoxicitidina e liraglutida após sequenciamento.
3. Avaliar e compreender alteração do perfil de metilação após os tratamentos, buscando explicações para o evento epigenético a partir da análise in silico dos fatores de transcrição relacionados com as diferentes linhagens.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 CULTIVO CELULAR

O material biológico utilizado foram três linhagens celulares de tumor de mama cedidas pelo instituto Ludwig/SP MDA-MB-231; MDA-MB-436 e MCF-7. O cultivo foi realizado em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% inativado a 55°C e contendo gamicina 40 µg/ml. A linhagem MCF7 recebeu suplementação de insulina (5 µg/mL) conforme protocolos da ATCC. As amostras contendo aproximadamente 10<sup>6</sup> células foram retiradas do nitrogênio líquido, descongeladas a 37°C e repassadas para uma garrafa de cultivo (25 cm<sup>3</sup>) contendo aproximadamente 4 mL de meio de cultura e acondicionadas em estufa com tensão de CO<sub>2</sub> a 5%. O meio de cultura foi regularmente trocado em dias alternados, dependendo da necessidade de cada linhagem celular.

#### 5.1.1. Tratamento com a liraglutida e com 5-aza-2'-desoxicitidina.

Para o tratamento com a liraglutida (Victoza®, Novo Nordisk), 300.000 células foram transferidas para 6 poços de placas de cultura, sendo 3 poços para tratamento com liraglutida e 3 poços para o controle, sem a droga. Após 24 horas, as células foram lavadas três vezes com tampão PBS 1X, para a retirada do SFB, sendo adicionados posteriormente 2 ml de meio RPMI com 0,1% SFB e, nos poços de tratamento, foi acrescentado liraglutida na concentração de 30 nM. Foram realizados os períodos de 24 e 48 horas de tratamento, sendo que o liraglutida foi adicionado a cada 24 horas. Para o tratamento com 5-aza-2'-desoxicitidina (5-Aza) (Sigma), em torno de 5 x 10<sup>5</sup> células foram adicionadas a placas de 6 poços, e o meio de cultura contendo 1 µM do reagente foi trocado diariamente durante 7 dias. (PRYZBYLKOWSKI; OBAJIMI; KEEN, 2008).

### 5.2 EXTRAÇÃO DE DNA E RNA

A extração de DNA e RNA das células após os tratamentos foi realizada a partir do protocolo *All Prep DNA/RNA mini kit* (Qiagen), de acordo com o manual do

fabricante. Este protocolo proporciona a extração simultânea das moléculas dos dois ácidos nucleicos de modo satisfatório e qualitativo.

### 5.3 ELETROFORESE EM GÉIS DE AGAROSE 1% E DE POLIACRILAMIDA 8%.

Os produtos das reações de PCR foram analisados em gel de poliacrilamida 8%, preparado a partir de uma solução de acrilamida e bisacrilamida (29:1), TEMED como doador de elétrons da reação e persulfato de amônio (APS) 20% como catalisador da reação (SANGUINETTI; DIAS NETO; SIMPSON, 1994). A eletroforese foi conduzida em aparato de gel médio a 80-120 V por aproximadamente uma hora em tampão TBE 1 X (ácido bórico 100 mM e EDTA 10 mM). Após a eletroforese, o gel foi incubado por três minutos em solução fixadora (0,75% de ácido acético, 10% de etanol absoluto) sob agitação suave. A esta solução foi adicionada 0,24% de nitrato de prata e o gel permaneceu sob agitação por mais dez minutos. Após impregnação do DNA com prata, o gel foi lavado com água destilada e a este adicionado o revelador (hidróxido de sódio 3% e formaldeído 0,5%) por mais cinco minutos, sob agitação contínua. Após a revelação das bandas, o gel foi lavado com água destilada duas vezes, e deixado por mais cinco minutos em solução fixadora, e em seguida o gel foi seco em papel celofane.

Os produtos das reações de PCR foram visualizados em géis de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,2 µg/mL.

### 5.4 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

Para análise de metilação, as amostras de DNA foram submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio utilizando os reagentes do protocolo do kit *EpiTec Bisulfite* (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante. A eficiência dessa técnica no tratamento do DNA foi verificada por meio da *nested*-PCR, uma técnica, na qual reduz a amplificação inespecífica de bandas, utilizando os iniciadores da sequência satélite SATR-1 (COSTA *et al.*, 2006). Os iniciadores utilizados para a amplificação da SATR-1 foram universal-1 5' GTT ATA TTA TTT TTT GTT TTT TTG e reverso-1 5' ACA TTT CCT TAT AAT ATT ATT CC; universal-2 5' TAT AGT GGT GGT GTA TAT TTG e reverso-2 5' CAC CTA ACC TAT AAT ATT TCT TC. A reação

de PCR foi de um volume final de 20  $\mu$ L, contendo 1x de solução tampão; 1,5 mM de  $MgCl_2$ ; 0,2 mM de dNTPs; 0,3  $\mu$ M de cada iniciador; 1U de *Taq* Normal (Invitrogen) e 0,8  $\mu$ L de DNA tratado com bissulfito de sódio. As condições de amplificação para a primeira e segunda reação (QUADRO 1).

QUADRO 1- CONDIÇÕES DAS REAÇÕES UTILIZADAS NAS REAÇÕES SATR1

Reação 1		Reação 2	
T°	Tempo	T°	Tempo
94°C	5'	94°C	5'
94°C	1'	94°C	1'
50°C	2'	50°C	2'
72°C	1'	72°C	1'
94°C	1'	94°C	1'
52°C	2'	52°C	2'
72°C	1'	72°C	1'
94°C	1'	94°C	1'
54°C	1'	54°C	1'
72°C	1'	72°C	1'

Diagrama de agrupamento das condições de reação:

- Reação 1:
  - 1x: 94°C 5', 94°C 1', 50°C 2', 72°C 1'
  - 5x: 94°C 1', 52°C 2', 72°C 1'
  - 35x: 94°C 1', 54°C 1', 72°C 1'
- Reação 2:
  - 1x: 94°C 5', 94°C 1', 50°C 2', 72°C 1'
  - 5x: 94°C 1', 52°C 2', 72°C 1'
  - 35x: 94°C 1', 54°C 1', 72°C 1'

FONTE: O autor (2018)

### 5.5 ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE ADAM33 PELA TÉCNICA DE MSP

O estudo da metilação do promotor do gene *ADAM33* foi realizado nas linhagens tratadas ou não com liraglutida e 5-Aza utilizando a técnica de MSP (*Methylation Specific PCR*) descrita por Herman et al., 1996. Os iniciadores foram desenhados para a situação metilada (gene silenciado por metilação) e para a situação não metilada (gene ativo) (SENISKI *et al.*, 2009) sendo realizada uma reação de PCR para cada condição. A região de escolha para o desenho dos iniciadores foi uma região rica em CpG e que possuem pelo menos um dinucleotídeo CG diferencialmente metilado dentro da sua sequência. Na (TABELA 1) estão as sequências, temperaturas de anelamento e os dinucleotídeos englobados dos iniciadores para MSP padronizados e escolhidos para este trabalho.

TABELA 1 – INICIADORES PARA A REAÇÃO METILADA (M) E NÃO METILADA (U)

INICIADOR	SEQUÊNCIA	TEMPERATURA DE ANELAMENTO °C	CPGS	FRAGMENTO (PB)
ADFM47	5' GTT TGA GGT TGT ATC GGG TA	64	47	
ADRM51	5' ACT CGC AAC TCC GAC TCC G	64	51,52,53	64
ADFU47	5' GTT TGA GGT TGT ATT GGG TA	64	47	
ADRU51	5' ACT CAC AAC TCC AAC TCC A	64	51,52,53	64

FONTE: Adaptado SENISKI *et al.*, (2009)

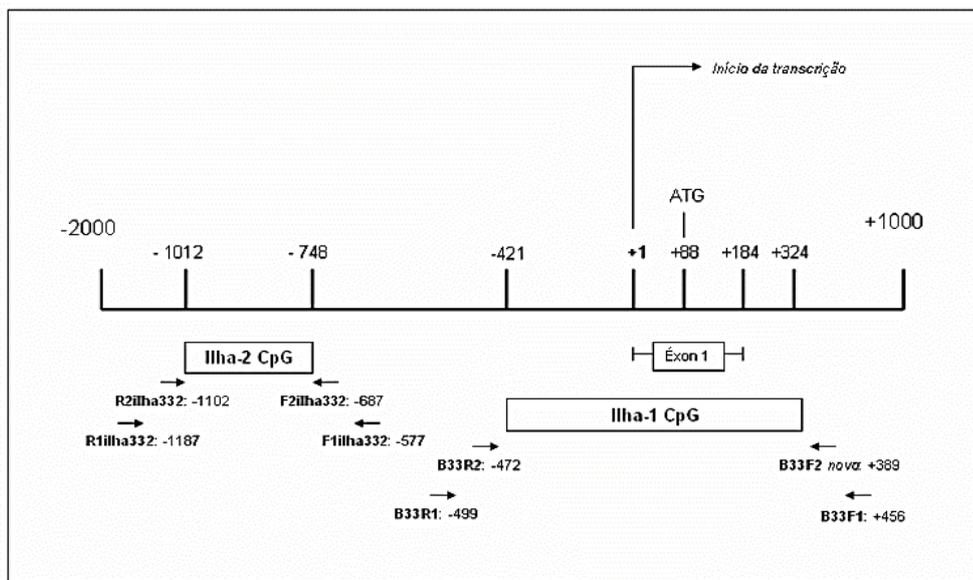
As reações de MSP foram padronizadas por SENISKI *et al.*, 2009 e reavaliadas neste trabalho. As condições das reações com os iniciadores U e M escolhidos continham um volume final de 20 uL, e incluíam solução tampão 1X; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 uM de dNTPs; 8 pmoles de cada iniciador; 1U de *Taq* Normal (Invitrogen) e 1 uL de DNA tratado com bissulfito de sódio. As condições de amplificação foram: 95°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, temperatura de anelamento (Tabela 1) por 15 segundos e 45 segundos de extensão a 72°C; e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. As reações foram analisadas em géis de poliacrilamida 8% e posteriormente em gel de agarose 1,2%.

## 5.6 ANÁLISE DO PROMOTOR DO GENE ADAM33

Os iniciadores utilizados para este estudo foram os mesmos já padronizados para estudo das ilhas de CpG do gene *ADAM33* (SENISKI *et al.*, 2009). A figura 7 mostra um esquema da região promotora do gene e a localização dos iniciadores em estudo na ilha de CpG 1 (CGI1). Para amplificação da CGI1 foram utilizados dois pares iniciadores, uma vez que foram utilizados também na técnica de *nested* PCR. O primeiro par de iniciadores foram utilizados para uma reação de PCR de menor estringência e o segundo par para outra reação de PCR com maior estringência, utilizando como molde o produto da primeira reação de PCR. A sequência dos iniciadores foi a seguinte para a primeira reação PCR: iniciador universal B33F1 (5' AGG GAG TTA TGT TTT TTG TTT TGT TAG) e iniciador reverso B33R1 (5' ATT ACC

TAA ACC TTA CTA TCC TTA); para a segunda reação *Nested*, a sequência do iniciador universal B33F2 (5' GGG TTA GTT TAA GTA TAT TTG AG), e o iniciador reverso B33R2 (5' ACA CCC AAT ACA AAT AAA TAA CC).

FIGURA 7 - ESQUEMA DE UM FRAGMENTO DE 2000 PARES DE BASES ANTES DA REGIÃO PROMOTORA E 1000 PARES DE BASES APÓS O INÍCIO DA REGIÃO CODIFICANTE DO GENE *ADAM33*.



FONTE: SENISKI *et al.* (2009)

### 5.6.1 Reação de PCR nested da ilha de CpG

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20 uL contendo 1x tampão de PCR, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 uM dNTPs, 1U de Taq Platinum (Invitrogen), 0,3 uM de iniciadores e 2 uL de DNA previamente tratado com bissulfito de sódio. As reações *nested* foram realizadas nas mesmas condições utilizando entre 1 e 5 uL do produto da primeira reação como molde. As reações foram realizadas em condições de *touch up* com incremento de 2°C na temperatura de anelamento após o primeiro ciclo e com aumento de mais 2°C após o sexto ciclo e seguindo com esta temperatura de anelamento até o final da reação. Para a primeira reação foram utilizados 95°C por 5 minutos, seguidos de 1 ciclo de 94°C por 3 minutos, 48°C por 2 minutos, e 72°C por 3 minutos. Em seguida, foram realizados 5 ciclos de 94°C por 3 minutos, 50°C por 2 minutos, e 72°C por 3 minutos. Por fim, foram feitos 35 ciclos de 94°C a 3 minutos, 52°C por 2 minutos e 72°C por 3 minutos. Para a reação *nested*, o produto de PCR foi gerado a partir de 2 uL da PCR 1 utilizada como molde, sob as condições 95°C por 5

minutos, seguidos de 1 ciclo de 94°C por 2 minutos, 55°C por 2 minutos, e 72°C por 3 minutos. Em seguida, foram realizados 5 ciclos de 94°C por 2 minutos, 57°C por 1 minuto, e 72°C por 2 minutos. Por fim, foram feitos 35 ciclos de 94°C a 3 minutos, 59°C por 2 minutos e 72°C por 3 minutos, seguido de um último ciclo de 72°C por 5 minutos. O produto esperado era de 860 pares de bases.

#### 5.6.2 Purificação dos produtos de PCR

Após eletroforese para confirmar a amplificação, o fragmento de DNA a partir da eletroforese em gel de agarose foi submetido a purificação utilizando o protocolo PureLink Quick® Gel Extraction (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. O DNA foi eluído da coluna com tampão TES (10 mM Tris-HCl, pH 8.5). Ao final da purificação o produto foi submetido a uma nova eletroforese, e a partir da concentração de produto obtido, o fragmento foi utilizado para a ligação ao vetor de clonagem.

#### 5.6.3 Ligação em vetor de clonagem

O fragmento de DNA anteriormente purificado foi inserido no vetor pGEM-T®easy (Promega), vetor linearizado com pontas T em ambas extremidades. O vetor e o fragmento de restrição são ligados covalentemente através de ligações fosfodiéster no sentido 3' → 5' em uma proporção de 3:1 (inserto: vetor). Em um sistema de 10 uL foi adicionado o vetor, o inserto (± 300 ng do produto de PCR purificado), T4 ligase 1 uL e tampão 2x. Este sistema foi incubado pelo menos 4 horas a 4°C e em seguida foi eletroporado em estirpes de *Escherichia coli* DH10B eletrocompetentes.

#### 5.6.4 Preparo de células Eletrocompetentes

Para esta técnica, quatro colônias de *Escherichia coli* DH10B isoladas a partir de uma placa de LA (Luria Bertani ágar 15 g/L) contendo estreptomicina 20 ug/mL foram crescidas em meio LB líquido por cerca de 16h a 37°C sob agitador rotário 180-220 rpm. No dia seguinte, cerca de 1 mL deste pré-inóculo foi adicionado a um novo

frasco contendo 100 mL de meio SOB (*Super Optimal Broth Medium*) e antibiótico e incubado novamente no agitador rotatório sob as mesmas condições aproximadamente 3 horas até atingir a densidade ótica (D.O) entre 0,5 a 0,6 em leitura de 600 nm. Após a leitura, o volume foi transferido para tubos de 50 mL e incubado 30 minutos no gelo. O volume então foi centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C, o pellet de células foi ressuspensão com água ultrapura e este passo foi repetido mais uma vez. A última lavagem foi realizada com glicerol 15% sob a mesma condição de centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em glicerol 15%, e a bactéria armazenada em alíquotas de 40 uL em tubos do tipo eppendorf a -80°C.

#### 5.6.5 Eletroporação de plasmídeos

Cerca de 2 uL da ligação foi misturado com a bactéria eletrocompetente, transferidos para a cubeta de eletroporação e submetidos a um pulso padrão de 1800 oms no eletroporador X-cell (BioRad). Após o choque, as células foram recuperadas com 1 mL de meio LB por 1 hora a 37°C, sob agitação. Após a recuperação, as culturas foram crescidas em meio LA, contendo antibiótico estreptomicina 20 ug/mL, ampicilina 250 ug/mL, X-Gal 25 ug/mL e IPTG 45 ug/mL e incubadas a 37°C por 12/14 horas. As colônias positivas foram selecionadas por alfa-complementação.

#### 5.6.6 PCR de colônia e Purificação de DNA Plasmídial

Pelo menos 8 colônias brancas de cada ligação foram submetidas a reação de PCR para a confirmação da presença do inserto. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 10 uL, contendo tampão de PCR 1X (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM, dNTPs a 200 uM, *Taq* polimerase a 1 U/uL (Invitrogen) e 8 pmoles de iniciadores específicos para o inserto estudado (B33 F2 e B33 R2). As condições da ciclagem para a reação foram: desnaturação inicial por 5 min a 95°C, 94°C por 1 minuto, anelamento a 59°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 min por 35 ciclos, e extensão final de 2 minutos. Os produtos foram observados em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata.

Após a confirmação da presença do inserto por PCR, o clone foi crescido em meio líquido LB, incubado a 37°C sob agitação de 180 – 220 rpm durante 14 a 16 horas. Após seu crescimento, a cultura foi aliquoteada em tubos de 1,5 ml e centrifugada a 8000 rpm por 3 minutos, e o precipitado submetido a extração do DNA plasmidial utilizando o protocolo do QIAprep spin (Qiagen) conforme especificações do fabricante.

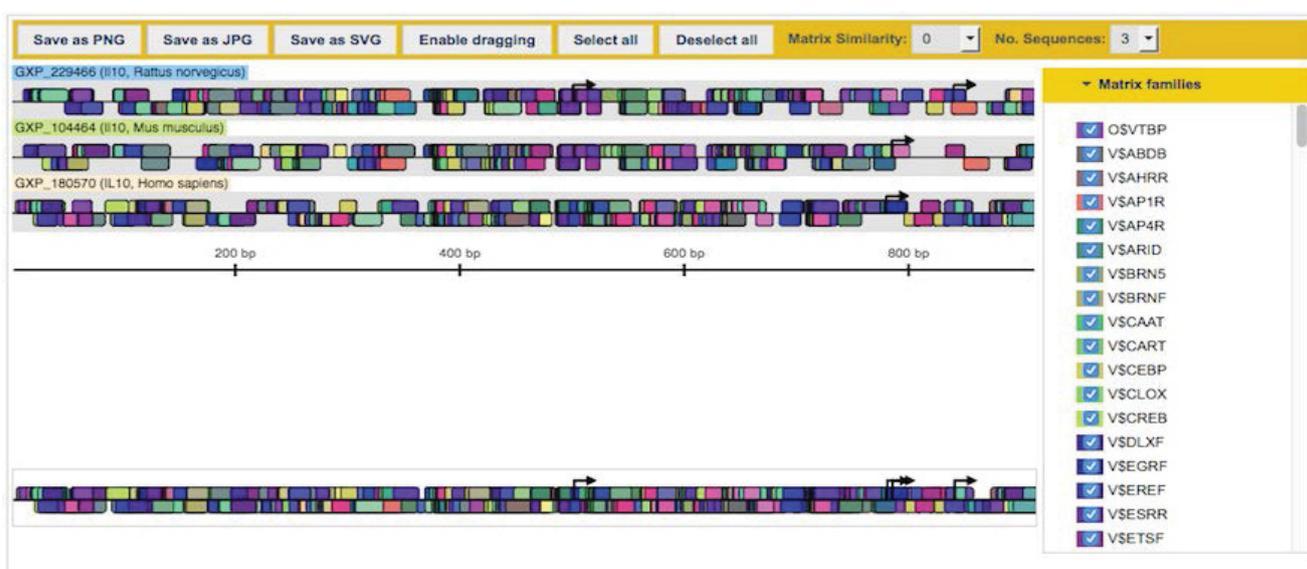
### 5.7 SEQUENCIAMENTO DE DNA, PRECIPITAÇÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS

O sequenciamento dos plasmídeos foi realizado segundo a técnica de terminação com dideoxynucleotídeos descrita por Sanger *et al.* (1977) e modificada por Karger *et al.* (1991). Cerca de 500 ng de DNA plasmidial purificado foi utilizado para reação de sequenciamento pelo protocolo *Big Dye Terminator* (Applied Biosystems) em um sistema de 10 uL contendo: 1 uL de *Big Dye Terminator* v3.0, 1 ul de tampão *Save Money* 2,5 X (200 mM TrisHCl e 5 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µl do iniciador reverso M13 (Invitrogen). As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 96 °C por 1 minuto, seguido por 30 ciclos a desnaturação por 95°C por 30 segundos e 60°C por 2 minutos 30 segundos de anelamento e extensão, e por fim 1 ciclo 10°C por 15 minutos. Após a reação foi realizado a precipitação do DNA adicionando acetato de amônio a 7,5 M a um volume final de 60 uL de etanol absoluto e incubado por pelo menos 15 minutos -20°C. O precipitado foi centrifugado por 30 minutos, 10000 xg e o sobrenadante descartado e aos tubos foi adicionado 150 uL de etanol 70%, e novamente centrifugado por 30 minutos a 10000 xg. Os produtos do sequenciamento foram submetidos a eletroforese capilar no sequenciador automático ABI XL3500 (*Applied Biosystems*). Os eletroesferogramas das reações foram posteriormente analisados utilizando o software livre *BioEdit* e a sequência de DNA foi analisada com software *ClustalW*, para comparação do padrão de metilação observado após as condições de tratamento propostos para cada linhagem.

### 5.8 ANÁLISE DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO PELO GENOMATIX (MATINSPECTOR)

A partir da sequência de nucleotídeos do gene *ADAM33*, foram identificados os sítios de união aos fatores de transcrição TF utilizando o software *Genomatix* (*MatInspector*®) (FIGURA 8), em uma ampla biblioteca de descrições de matriz. A partir da obtenção dos resultados dos dinucleotídeos diferencialmente metilados sob as condições de tratamento, foi avaliada uma predição dos fatores de transcrição potencialmente funcionais (TFBS), ancorados nas posições dos dinucleotídeos metilados. Assim, de acordo com a distribuição foram explorados os possíveis lugares de união de ativadores e repressores que se uniam a sequência reguladora de DNA específica e as funções em diferentes contextos biológicos segundo os dados da literatura.

FIGURA 8- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SOFTWARE GENOMATIX (MATINSPECTOR®)



FONTE: Genomatix, MatInspector® (2018)

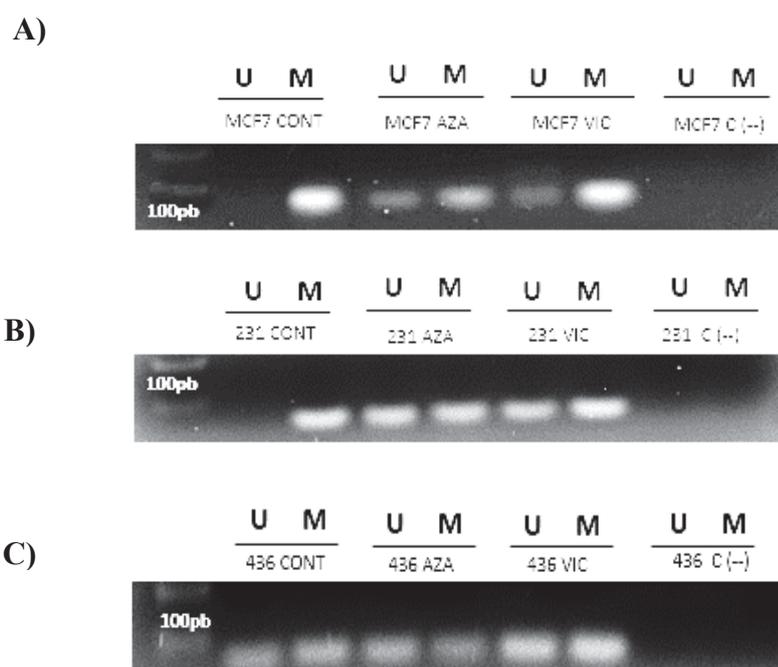
**Nota:** Com a sequência gênica inserida para se avaliar os possíveis FT ligados nos CpGs diferencialmente metilados.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 TÉCNICA DE PCR METILAÇÃO ESPECÍFICA (MSP)

Após as linhagens MCF7, MDA-MB-231 e MDA-MB-436 serem tratadas com liraglutida e posteriormente o DNA ser tratado com bissulfito de sódio, a região da ilha 1 foi avaliada pela técnica de MSP. Os iniciadores (SENISKI *et al.*, 2009) amplificaram o DNA metilado ou não metilado representado pelos fragmentos M (*methylated*) ou U (*unmethylated*), respectivamente, com um fragmento correspondente ao amplicom de 64 pb. A (FIGURA 9) mostra a reação de amplificação das reações M e U utilizando DNA tratado das linhagens MCF7, MDA-MB-231 e MDA-MB-436, onde se esperava que as linhagens MCF7 e MDA-MB-231 apresentassem no controle positivo somente o fragmento M por não possuir expressão do gene *ADAM33*. O resultado obtido a partir da reação de MSP-PCR das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 tratadas com liraglutida e 5-Aza demonstrou que após os tratamentos, o fragmento da condição não metilada apareceu após PCR e eletroforese em ambas as linhagens.

FIGURA 9 – PCR-MSP DO GENE *ADAM33* NAS LINHAGENS MCF7, MDA-MB-231 E MDA-MB-436.



FONTE: O autor (2018)

**Nota:** A) Linha 1- MM 100 pb; 2 e 3 MCF7 U e M; 4 e 5 MCF7 U e M tratado com 5- Aza U e M; 6 e 7 MCF7 tratado com Liraglutida U e M; 8 e 9 MCF7 Controle Negativo U e M. B) Linha 1- MM 100pb; 2 e

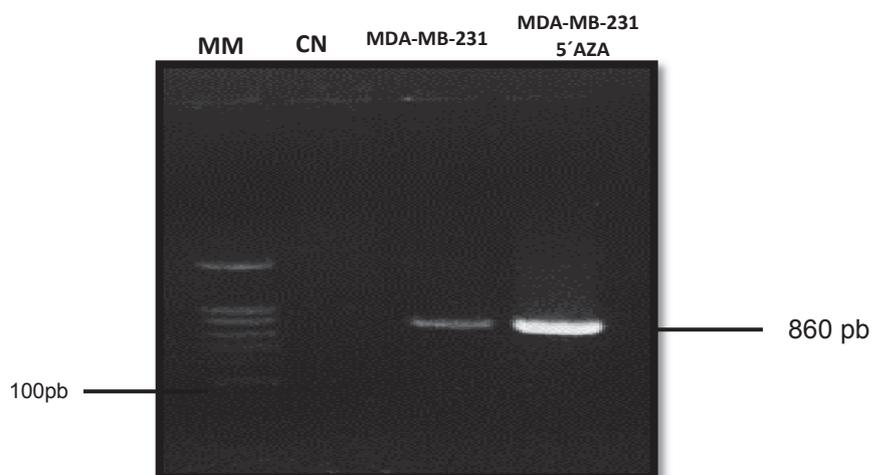
3 MDA-MB-231 U e M; 4 e 5 MDA-MB-231 depois de tratamento com 5- Aza U e M; 6 e 7 MDA-MB-231 depois de tratamento com Liraglutida U e M; 8 e 9 MDA-MB-231 Controle Negativo U e M. **C)** Linha 1- MM 100 pb; 2 e 3 MDA-MB-436 U e M; 4 e 5 MDA-MB-436 depois do tratamento com 5- Aza U e M; 6 e 7 MDA-MB-436 depois do tratamento com Liraglutida; 8 e 9 MDA-MB 436 Controle Negativo U e M. Eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo.

O resultado surpreendente, é que as linhagens MCF7, MDA-MB-231 e MDA-MB-436 tratadas com a liraglutida foram capazes de diminuir a metilação do gene *ADAM33* em cultivo celular. Dados após tratamento com 5-Aza corroboram o que já foi observado por (SENISKI *et al.*, 2009), mas os obtidos com a liraglutida são inéditos. A partir dos resultados promissores obtidos pela técnica de MSP-PCR, decidiu-se prosseguir na realização da clonagem e sequenciamento, possibilitando uma visualização completa do perfil de metilação do gene da *ADAM33*.

## 6.2 AMPLIFICAÇÃO DA ILHA DE CPG 1 DO GENE *ADAM33*

Para avaliar como a liraglutida altera o padrão de metilação da região promotora da *ADAM33*, a CGI1 foi clonada a partir da obtenção do DNA das linhagens tumorais de mama tratadas com liraglutida e com 5-Aza. Inicialmente, o DNA extraído foi tratado com bissulfito de sódio, que converte as citosinas não metiladas em timinas, e este utilizado como molde na reação de PCR-*nested* (FIGURA 10)<sup>1</sup>.

FIGURA 10 -. PADRONIZAÇÃO DA PCR-NESTED PARA A LINHAGEM MDA-MB-231 CONTROLE E TRATADA COM 5-AZA.



FONTE: O autor (2017)

Nota: Linha 1 marcador molecular 100 pb; 2- controle negativo; 3 MDA-MB-231 sem tratamento; 4 - MDA-MB-231 tratada com 5-Aza. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

<sup>1</sup> Para fins de ilustração, apenas algumas amplificações foram adicionadas ao texto.

Esta estratégia de amplificação é utilizada quando a região a ser amplificada tem pouco número de cópias, e isso ocorre em nosso trabalho devido ao tratamento do DNA com o bissulfito de sódio proporcionar uma diminuição da concentração de DNA após tratamento

### 6.3 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR DA CGI1 DO GENE *ADAM33*

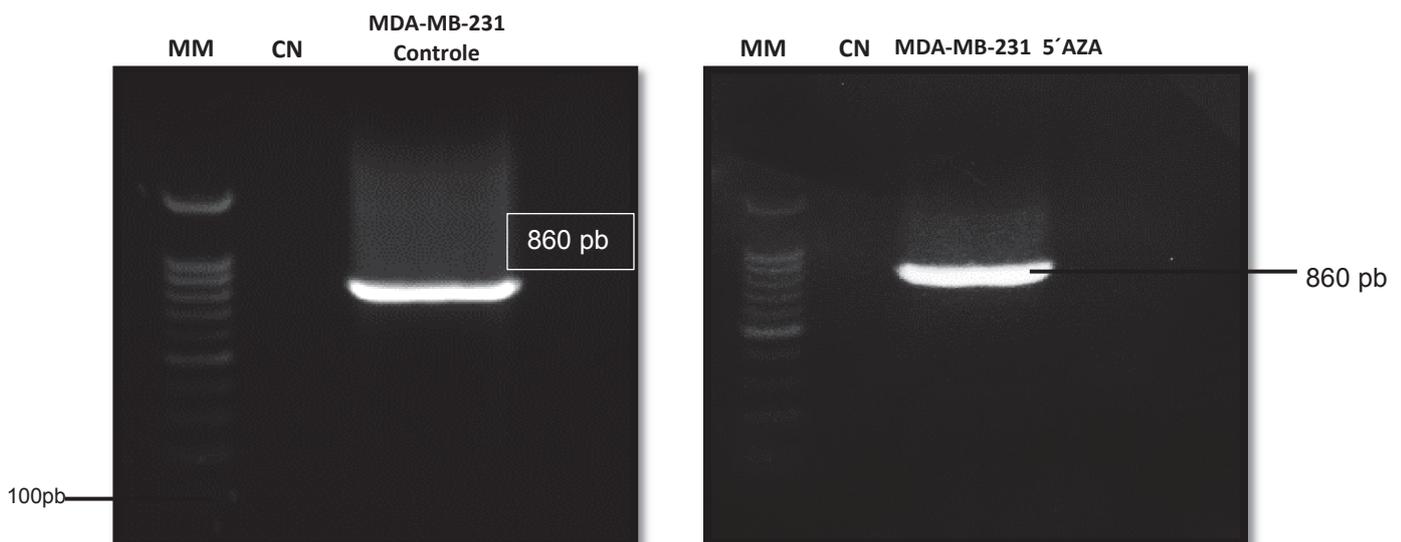
Pode-se observar o fragmento desejado a partir da reação de *nested* a obtenção em qualidade e quantidades adequadas para dar seguimento à clonagem. Após a reação de padronização, o DNA tratado das linhagens foi novamente amplificado em volumes maiores e submetidos a purificação em gel de agarose (FIGURA 11).

FIGURA 11 – PCR PRÉ-PURIFICAÇÃO

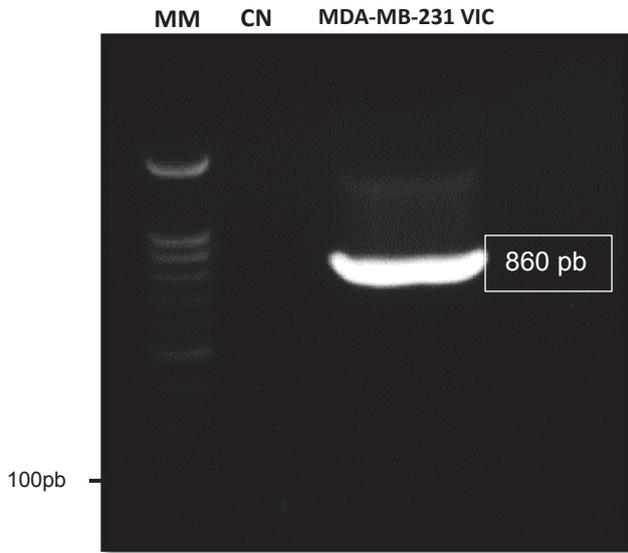
#### 11.1) Purificação Agarose 0,8%

##### 11.1) a Linhagem MDA-MB-231 Controle

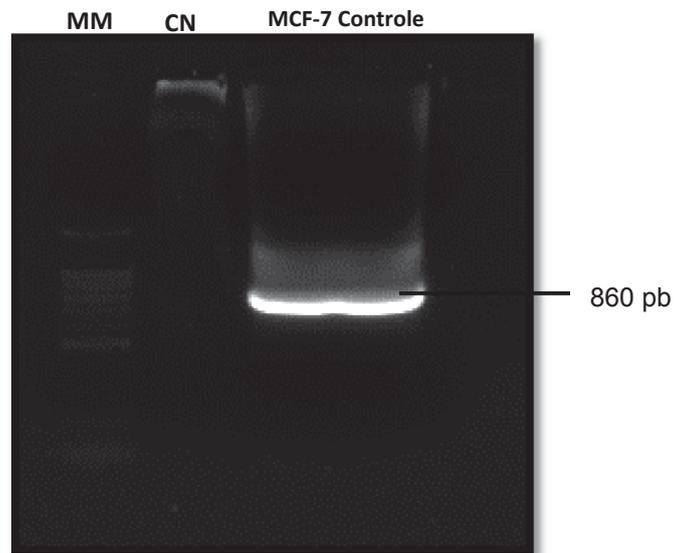
##### 11.1) b Linhagem MDA-MB-231 5'AZA



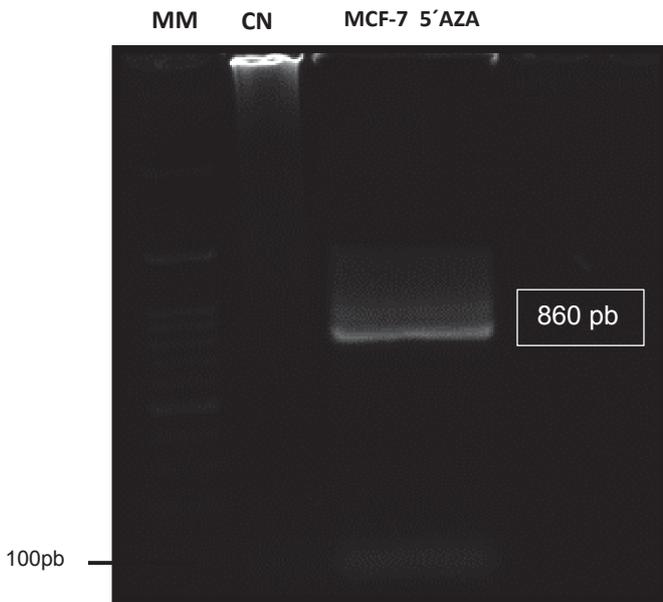
11.1) c Linhagem MDA-MB-231 VIC



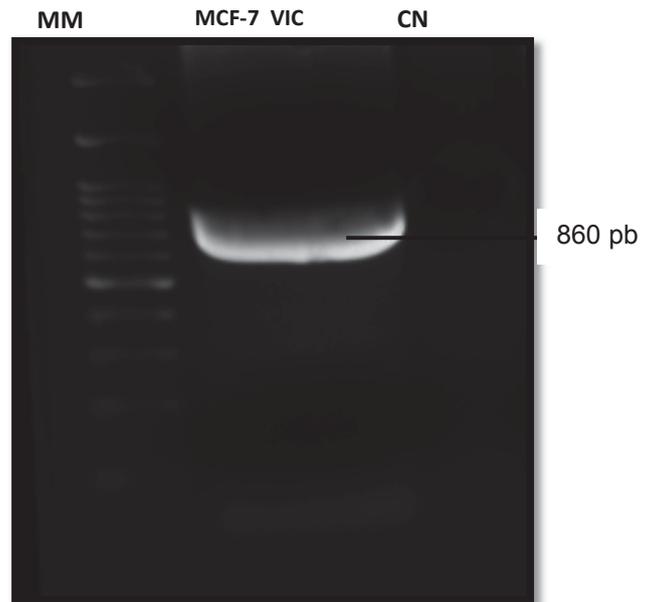
11.1) d Linhagem MCF7 Controle



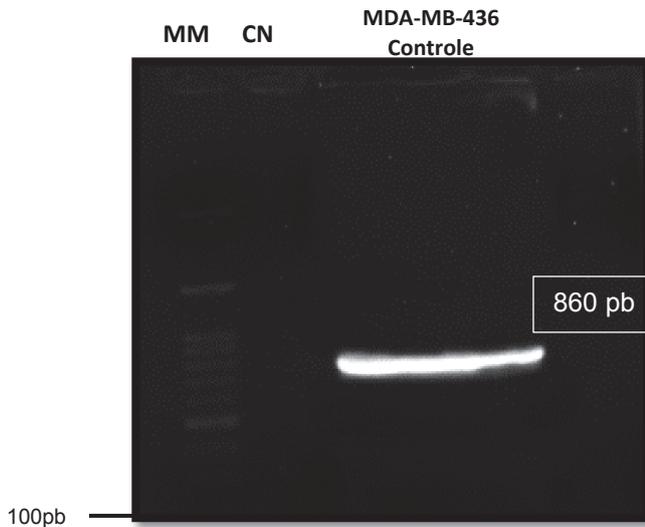
11.1) e Linhagem MCF7 5'AZA



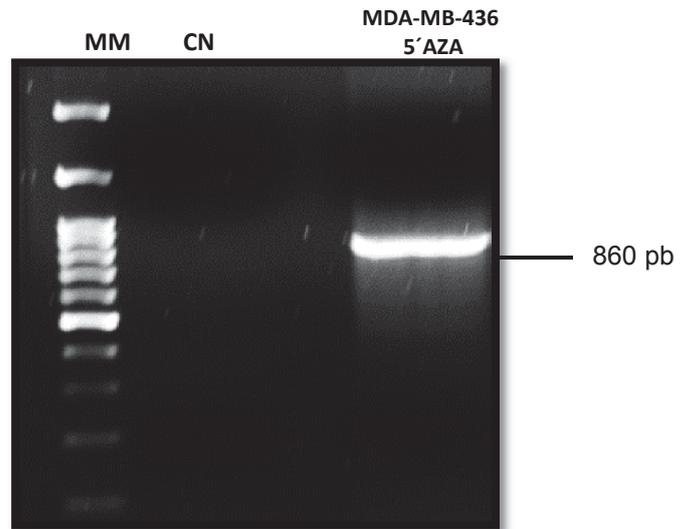
11.1) f Linhagem MCF7 VIC



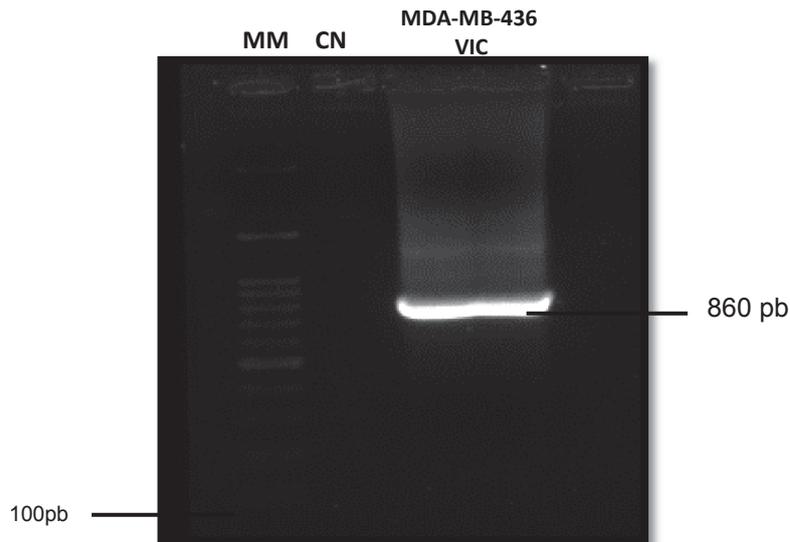
11.1) g Linhagem MDA-MB-436 Controle



11.1) h Linhagem MDA-MB-436 5'AZA



11.1) i Linhagem MDA-MB-436 5'AZA

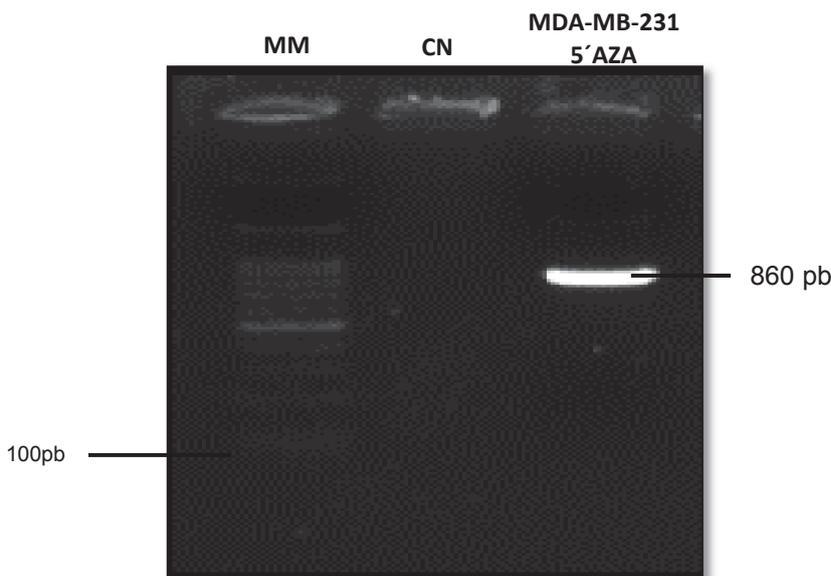


FONTE: O autor (2017)

**Nota:** **A)** Linha 1- marcador molecular 100 pb; 2-controle negativo da reação de PCR; 3- DNA amplificado a partir da linhagem MDA-MB-231 controle; **B)** Linha 1- marcador molecular 100 pb; 2-controle negativo da reação de PCR; 3- DNA amplificado a partir da linhagem MDA-MB-231 5'Aza; **C)** Linha 1- marcador molecular 100 pb; 2-controle negativo da reação de PCR; 3- DNA amplificado a partir da linhagem MDA-MB-231 tratado com VIC; **D)** Linha 1- marcador molecular 100 pb; 2-controle negativo ; 3- DNA amplificado a partir da linhagem MCF-7 controle; **E)** Linha 1- marcador molecular 100 pb; 2-controle negativo; 3- DNA amplificado a partir da linhagem MCF-7 5'Aza; **F)** Linha 1- marcador molecular 100 pb; 2- DNA amplificado a partir da linhagem MCF-7 VIC; 3- controle negativo; **G)** Linha 1- marcador molecular 100 pb; 2-controle negativo; 3- DNA amplificado a partir da linhagem MDA-MB-436 controle; **H)** Linha 1- marcador molecular 100 pb; 2-controle negativo; 3- DNA amplificado a partir da linhagem MDA-MB-436 5'Aza; **I)** Linha 1- marcador molecular 100 pb; 2-controle negativo; 3- DNA amplificado a partir da linhagem MDA-MB-436 tratado com VIC. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

Após da purificação, o produto resultante foi submetido à nova eletroforese para verificar a eficiência da purificação e quantificação visual para a etapa seguinte de clonagem. Na (FIGURA 12) se observa que a purificação foi eficiente.

FIGURA 12- ELETROFORESE DO PRODUTO DE PCR *NESTED*, DEPOIS DA PURIFICAÇÃO



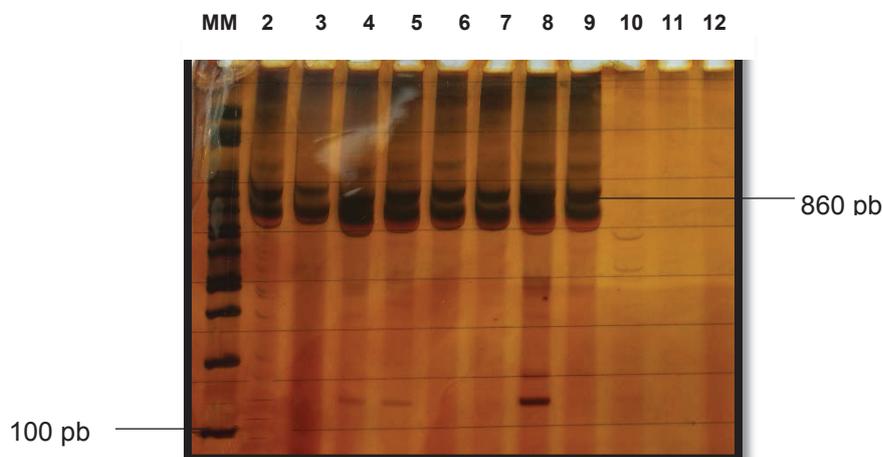
**Nota:** A partir da linhagem MDA-MB-231 tratada com 5-Aza. Linha 1 marcador molecular 100 pb; Linha 2 controle negativo; 3 MDA-MB-231 5-Aza.

#### 6.4 CLONAGEM E PCR DE COLÔNIA DO INSERTO DA ILHA DE CPG 1 GENE *ADAM33*

Após a purificação, o produto de PCR foi ligado ao vetor. O vetor utilizado para clonar os fragmentos de PCR foi o plasmídeo *pGEM-T®easy* (Promega) que possui pontas T. Após a incubação, as ligações foram transformadas em células eletrocompetentes, e os clones recombinantes foram selecionados através da  $\alpha$ -complementação. Este processo permite selecionar clones com inserto, pois a bactéria transformada terá o gene *LacZ* interrompido, ou seja, ausência da enzima  $\beta$ -galactosidase, gerando colônias brancas. Caso o inserto não seja adicionado, o gene *LacZ* estará funcional e pela presença galactosidase clivará o corante X-gal deixando as colônias azuladas. Após a clonagem, 8 colônias foram submetidas a reação de

PCR de colônia (FIGURA 13). A presença do fragmento de interesse na linhagem MDA-MB-231 tratados com 5-Aza.

**FIGURA 13** - PCR DE COLÔNIA DOS CLONES SELECIONADOS



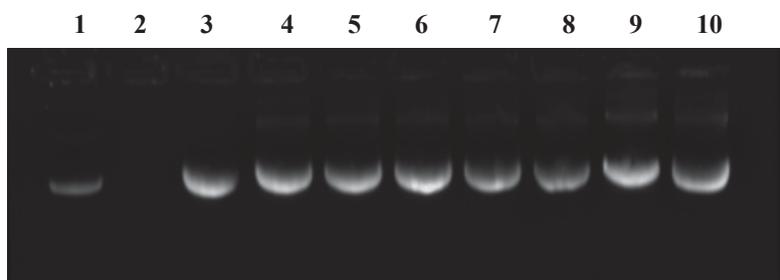
FONTE: O autor (2017)

Nota: Linhas 1; marcador molecular 100 pb; linhas 2 até 9, são colônias MDA-MB-231 tratadas com 5-Aza e positivas para o inserto de 860 pares de bases; 10-12 colônias MDA-MB-231 negativas para o inserto. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata.

### 6.5 PURIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL E SEQUENCIAMENTO DO INSERTO DA CG11 DO GENE *ADAM33*

A partir da verificação da presença do inserto por PCR, as colônias foram crescidas em meio LB líquido para purificação do DNA plasmídial (FIGURA 14).

**FIGURA 14** - MINIPREP DA LINHAGEM MDA-MB-231 TRATADOS COM 5-AZA



FONTE: O autor (2017)

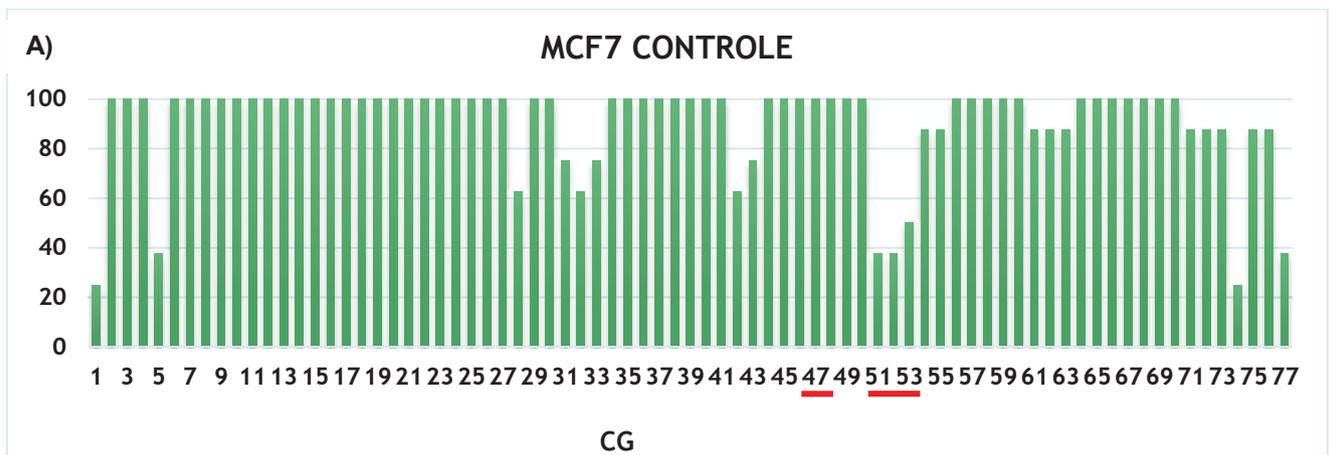
NOTA: Linha 1 pGEM 100 ng/uL; 3 a 10 - colônias submetidas a purificação. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

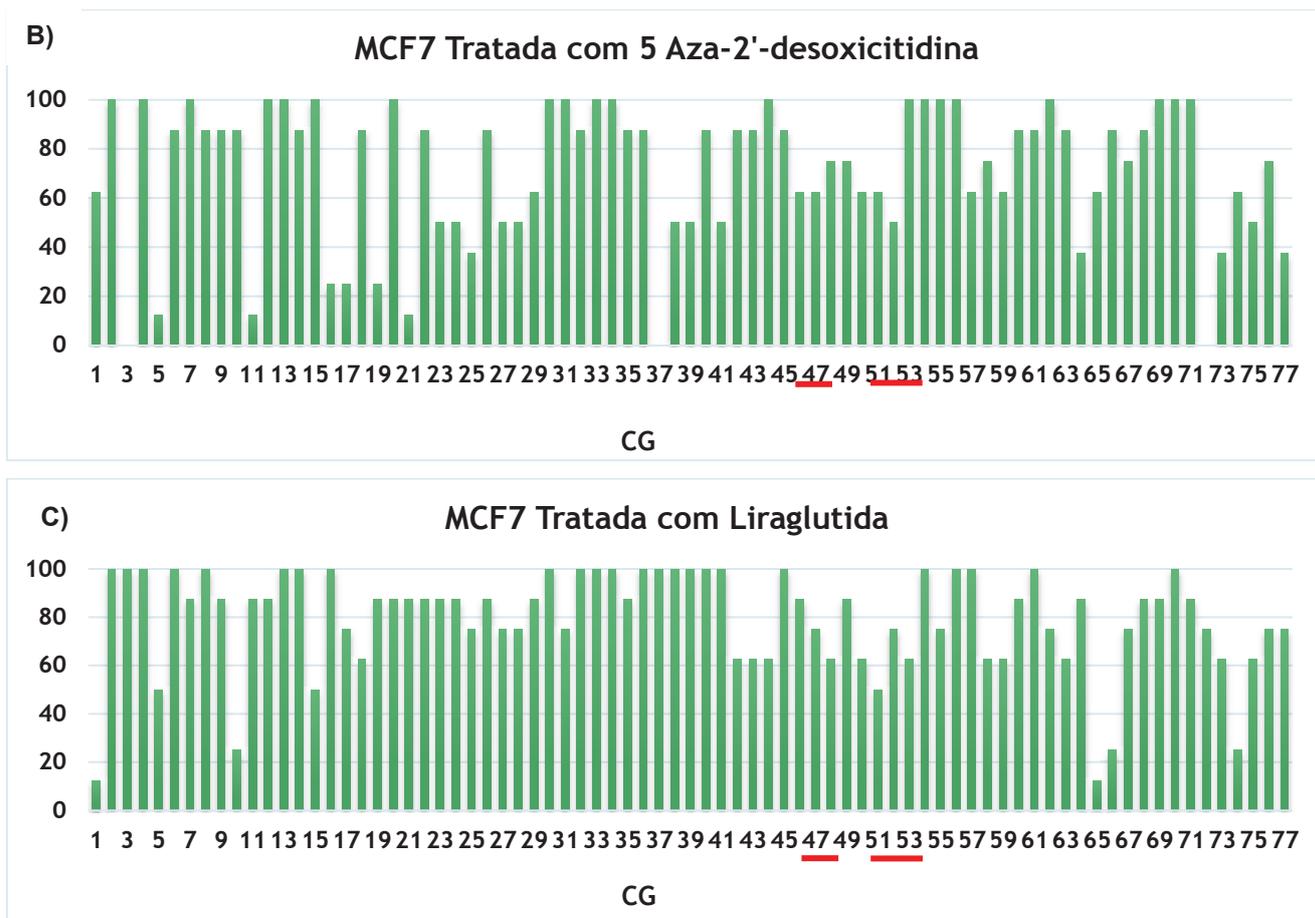
Após a purificação do DNA plasmídial, este foi submetido a eletroforese em gel de agarose e posterior análise da concentração para a realização da técnica de

sequenciamento. Assim cada colônia foi sequenciada e os dados foram utilizados para a elaboração dos gráficos das (FIGURAS 15, 16 ,17). Acima de cada gráfico, é apresentada a porcentagem de metilação da ilha 1 que possui 77 CGs, de cada linhagem celular sob as diferentes condições. Os gráficos mostram o perfil de metilação encontrado para cada dinucleotídeo CG dos oito clones de cada linhagem.

Pode-se observar que a linhagem MCF7 (FIGURA 15), apresentou a região densamente metilada, em um valor global de 89,9%, corroborando assim os dados vistos por (SENISKI *et al.*, 2009). Após o tratamento da linhagem MCF7 com o 5-Aza, é esperado que ele induza a uma diminuição na metilação global e isso foi observado na ilha CpG do gene *ADAM33*, decaindo o valor da metilação para 71,2% modificando assim alguns CGs dentro dessa sequência. Alguns dos dinucleotídeos que apresentaram uma importante diminuição da metilação foram os 3, 11, 16, 17, 19, 21, 37, 64 e 72. A linhagem tratada com a liraglutida por sua vez, apresentou modificações no perfil de metilação de vários CGs, apresentando um perfil de metilação de 78,9% muito similar ao valor obtido com 5-Aza. Pode-se observar que nos CGs 10, 15, 65 e 66 apresentou uma importante diminuição da taxa de metilação.

FIGURA 15 – PERFIL DE METILAÇÃO DA LINHAGEM MCF7





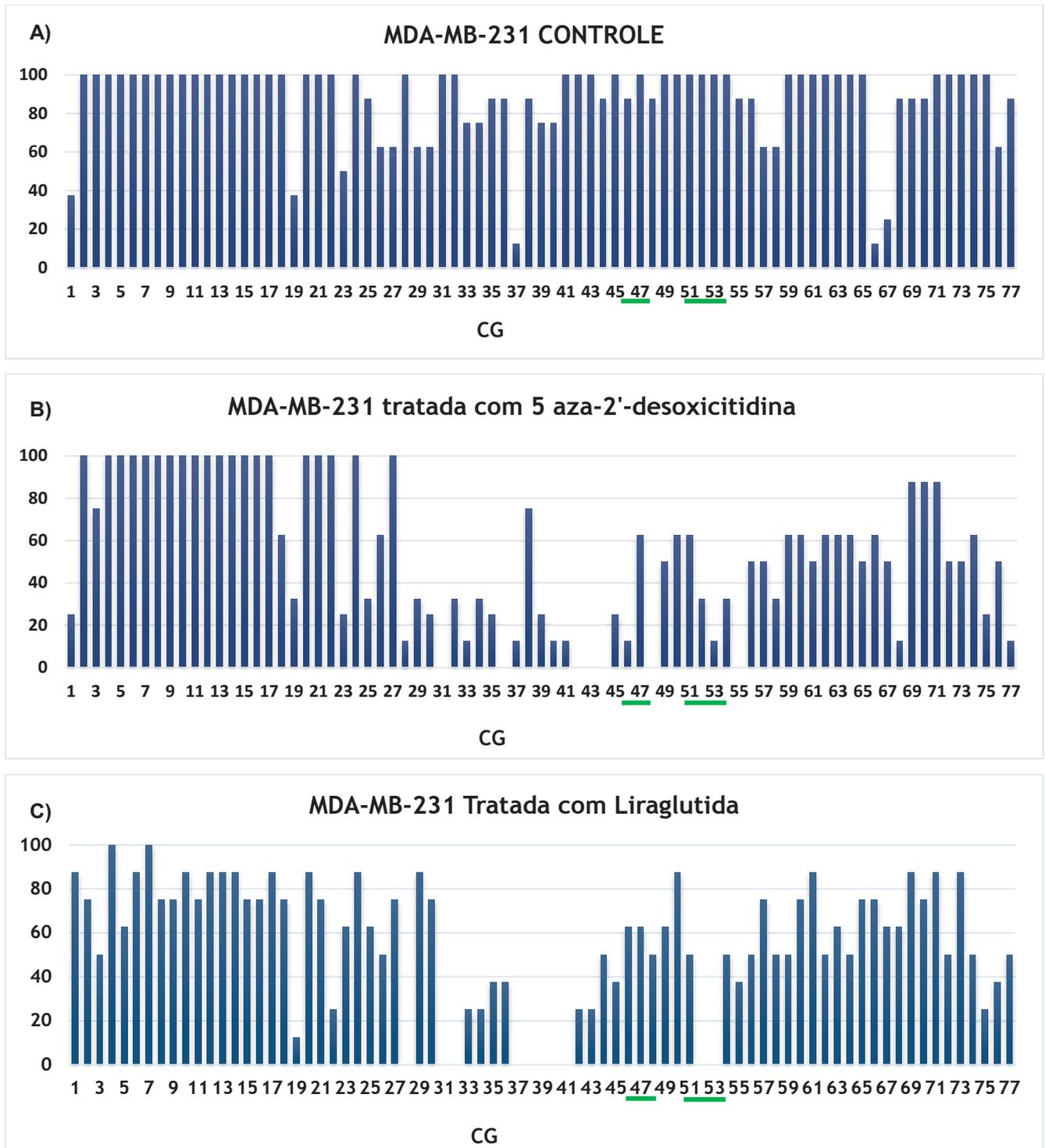
FONTE: O autor (2018)

NOTA: Gráficos representativos das porcentagens de metilação de cada dinucleotídeo CpG contido na região promotora da ilha de CpG 1 do gene *ADAM33*. **A)** Linhagem Controle; **B)** Linhagem MCF7 tratada com 5-Aza; **C)** Linhagem MCF7 Tratada com Liraglutida. Em risco vermelho, estão destacadas as regiões que foram escolhidas para o desenho dos iniciadores para a reação de MSP.

A (FIGURA 16) demonstra o perfil de metilação da linhagem MDA-MB-231 controle, o qual se apresentou densamente metilada com valor de 91,2%, semelhante ao que foi observado por (SENISKI *et al.*, 2009). A linhagem MDA-MB-231 quando foi submetida ao tratamento com 5-Aza induziu a diminuição no perfil de metilação, sendo que, em alguns CGs ocorreu a desmetilação total, tais como o 31, 36, 42, 43, 44, 48, 54 e 55. O perfil de metilação global foi reduzido para 54,5%, ou seja, apresentou uma redução de 36% na metilação do gene *ADAM33*. Surpreendentemente, a linhagem MDA-MB-231 tratada com liraglutida (FIGURA 16 C) também produziu um perfil de desmetilação semelhante ao que foi mostrado com 5-Aza. Algumas regiões apresentaram desmetilação completa, baixando o perfil de metilação para 54,7%, estando praticamente idêntica a linhagem tratada com 5-Aza, um potente e conhecido agente desmetilante. Os CpGs desmetilados também foram semelhantes entre as

duas condições testadas, sendo os mais interessantes os CGs 28, 31, 32, 37, 38, 39, 40, 41, 52 e 53. Ao que tudo indica, a liraglutida se mostrou como um agente desmetilante para o gene *ADAM33*, assim como o 5-Aza.

FIGURA 16 – PERFIL DE METILAÇÃO DA LINHAGEM MDA-MB-231

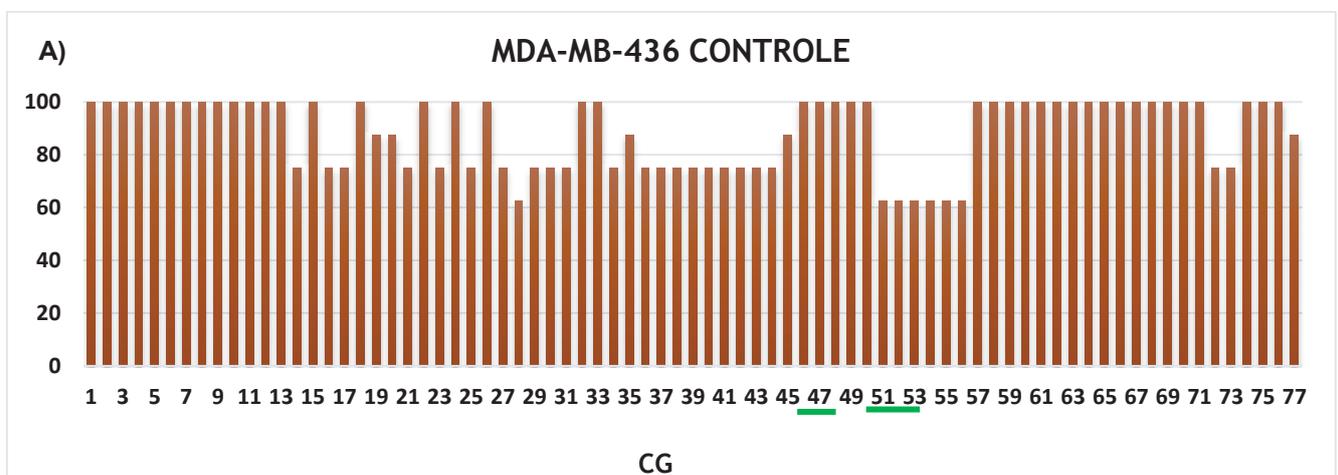


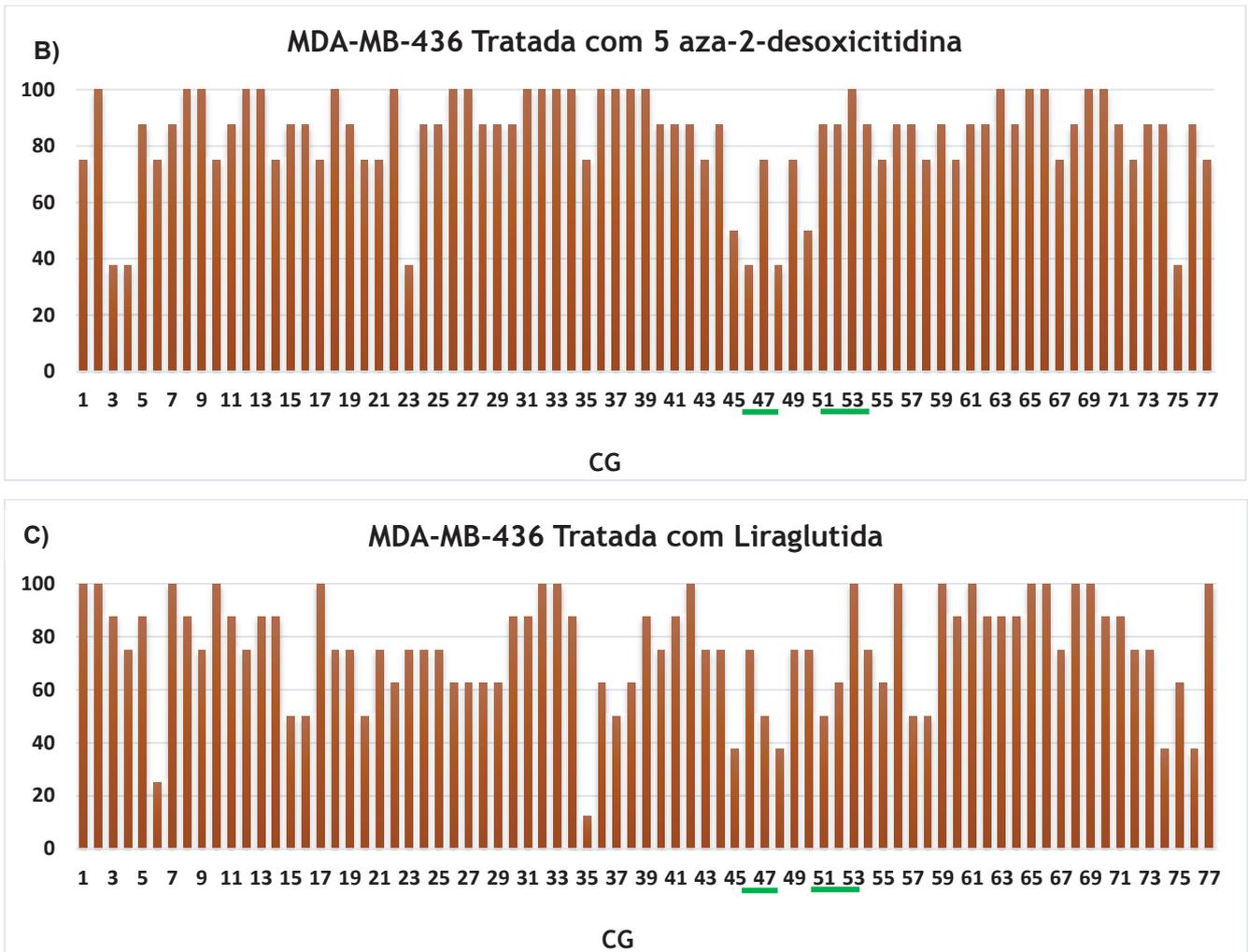
FONTE: O autor (2018)

NOTA: Gráficos representativos das porcentagens de metilação de cada dinucleotídeo CpG contido na região promotora da ilha de CpG 1 do gene *ADAM33*. **A)** Linhagem Controle MDA-MB-231; **B)** Linhagem MDA-MB-231 tratada com 5-Aza; **C)** Linhagem MDA-MB-231 Tratada com liraglutida. Em risco verde, estão destacadas as regiões que foram escolhidas para o desenho dos iniciadores para a reação de MSP.

A linhagem controle MDA-MB-436 (FIGURA 17), também apresentou uma densa metilação de 88,6%. A linhagem MDA-MB-436 tratada com o 5-Aza, não mostrou alteração do perfil de metilação, tendo uma porcentagem de 84,6%, embora seja possível observar que há diminuição dos CpGs aonde se localizam os oligos já validados para a técnica de MSP, mais os CGs que diminuiram depois do tratamento foram 3, 4, 6, 46, 48 e 75. Ao que tudo indica, a MDA-MB-436 mostrou-se refratária ao tratamento com o agente desmetilante 5-Aza, casos já relatados na literatura. O mais curioso, contudo, foi que, quando a linhagem MDA-MB-436 foi tratada com liraglutida (FIGURA 17 C), o perfil de metilação diminuiu para 75,3%, uma redução de 13% em relação do controle, sendo o mesmo não obtido com 5-Aza. Ainda foi possível observar que alguns CpGs como o 6, 35, 45, 48, 74 e 76 apresentaram valores de metilação abaixo de 50%. Este dado se mostra muito relevante uma vez que se considerarmos apenas a análise do MSP, está variação no perfil global não poderia ter sido observada, característica relevante quando se trata de uma medicação de amplo uso.

FIGURA 17 – PERFIL DE METILAÇÃO DA LINHAGEM MDA-MB 436.





FONTE: O autor (2018)

NOTA: Gráficos representativos das porcentagens de metilação de cada dinucleotídeo CpG contido na região promotora da ilha de CpG 1 do gene *ADAM33*. **A)** Linhagem Controle MDA-MB-436; **B)** Linhagem MDA-MB-436 tratada com 5-Aza; **C)** Linhagem MDA-MB-436 Tratada com Liraglutida. Em risco verde, estão destacadas as regiões que foram escolhidas para o desenho dos iniciadores para a reação de MSP.

Através destes resultados, a sequência do gene *ADAM33* foi avaliada quanto aos possíveis locais de ligação aos fatores transcricionais regulatórios através do software *Genomatix (MatInspector®)*. Foi possível observar que estas regiões se tratam de prováveis ligantes dos TFBS, através do análise e posição de cada CpG dentro da sequência. No total foram achados aproximadamente 200 TFBS, dos quais foi feita uma seleção daqueles que tinham uma especificidade com nosso motivo experimental. Dentre eles, destacam-se os fatores HOXF, NKX25, HOMEZ, CDX2 e TLX, os quais são considerados como *homeobox*. A região dos fatores FOXA1, GATA3, NUDR e HNFP estão envolvidos com a regulação e a proliferação de células epiteliais e ramos laterais na glândula mamária e se encontram diferencialmente

metilados. No tratamento com o liraglutida houveram diferenças nos CpGs em regiões associadas aos fatores NKX6 e HMGA-1 que estão envolvidos com a codificação de proteínas e a regulação gênica em câncer de mama, além de estar associados com o Diabetes mellitus (CHIEFARI *et al.*, 2011).

## 7. DISCUSSÃO

A metilação do DNA desempenha um papel vital nas células normais e alterações no seu perfil contribui para o aparecimento de doenças. A determinação do perfil de metilação nas células doentes é crucial para o desenvolvimento de novas terapias. Indubitavelmente, a importância clínica dos marcadores epigenéticos desempenha um papel crucial na medicina de precisão para pacientes com câncer. Alterações nos padrões de metilação do DNA são consideradas um evento precoce no desenvolvimento do tumor e surgiram como uma característica de muitos tipos de câncer, incluindo câncer de mama. A metilação do DNA aberrante tem sido frequentemente associada às características clínicas e histopatológicas de pacientes com câncer de mama, como estágio tumoral, positividade dos receptores hormonais, tempo de sobrevida ou mutações somáticas, bem como subtipos moleculares (FLEISCHER *et al.*, 2017). Este tipo de alteração desempenha um papel importante na regulação normal da expressão gênica e a perda de regulação pode contribuir significativamente para o início, desenvolvimento e progressão do câncer. Além disso são consideradas como aberrações epigenéticas, pois levam ao silenciamento de genes supressores de tumor e outros mediadores negativos do desenvolvimento neoplásico (SANDHU *et al.*, 2014). Diferentes estudos contribuem para que a hipermetilação do DNA aberrante que produz o silenciamento epigenético ocorra em genes sensíveis à metilação, bem como para a hiperatividade da enzima DNMT, como também é atribuído ao subtipo molecular basal do câncer de mama (ROLL *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos mostraram que o liraglutida, assim como o 5-aza-2'-desoxicitidina foi capaz de modificar o padrão de metilação do gene *ADAM33*, uma importante proteína de adesão celular, com alterações descritas no câncer de mama e na asma. Para conferir a expressão do gene *ADAM33* nas amostras de nosso estudo, foi importante começar pela técnica MSP uma vez que os iniciadores já estavam disponíveis. Àqueles iniciadores foram desenhados dentro de uma região rica em CpGs que possuíam pelo menos um dinucleotídeo CG diferencialmente metilado na linhagem normal, que expressa o gene; e tumorais que não expressam o gene. Com esta técnica é possível diferenciar amostras não metiladas das metiladas de modo rápido e eficiente que independem do sequenciamento. Esta técnica é conhecida e considerada de boa viabilidade para estratégias baseadas em reações

de PCR, como MSP, para avaliar modificações de metilação em pequenas quantidades de materiais biológicos. A técnica de MSP também revolucionou as técnicas moleculares uma vez que eliminou os frequentes resultados falso-positivos devido à digestão parcial das enzimas sensíveis à metilação inerentes aos métodos anteriores de PCR para detectar a metilação (HERMAN *et al.*, 1996).

O perfil de metilação das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 tratadas com liraglutida e 5-Aza demonstrou que o fragmento da condição não metilada apareceu após PCR e eletroforese em ambas as linhagens (FIGURA 9). Na linhagem MDA-MB-436, que já apresentava o fragmento para as ambas condições, permaneceu com o perfil semelhante. Embora a técnica de MSP seja de grande relevância e última determinação de alteração do padrão de metilação, esta técnica não evidencia todas as alterações que possam estar ocorrendo na região analisada. Assim, em virtude do liraglutida mostrar-se aparentemente um regulador epigenético, foi dado início ao processo de amplificação, purificação e clonagem do gene *ADAM33* nas três linhagens tumorais (MCF7, MDA-MB-231 e MDA-MB-436) com diferentes perfis moleculares. A linhagem MCF7 possui características epiteliais, expressa o receptor de estrogênio alfa (RE- $\alpha$ ) e o receptor de progesterona (RP), além de possuir uma baixa capacidade invasiva. Já a linhagem MDA-MB-231 é chamada de triplo-negativo (TNBC), altamente agressiva, com capacidade invasiva pela degradação proteolítica da matriz extracelular, e pouco diferenciada, pois não possui expressão de receptor de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (PR), bem como HER2 (receptor do fator de crescimento epidérmico humano), enquanto a linhagem MDA-MB-436 é uma linhagem triplo negativo com características de morfologia pleomórficas com componentes celulares multinucleares (KATHRYN; SIREESHA V; STANLEY, 2012; LEE; OESTERREICH; DAVIDSON, 2015).

Após clonagem, confirmação da presença do inserto nas colônias (FIGURA 13), extração do DNA plasmidial (FIGURA 14) e sequenciamento (FIGURA 15-16-17), foi possível afirmar que a taxa de metilação (após o tratamento com 5-Aza, um agente desmetilante comercial) diminuiu. Na linhagem MCF7, o gene *ADAM33* após sequenciamento obteve os valores de 89,9% para a condição controle, 71,2% após o tratamento com 5-Aza, enquanto que o tratamento com a liraglutida foi de 78,9% (FIGURA 15). Para a linhagem MDA-MB-231 controle, a taxa global de metilação foi de 91,2%, enquanto a linhagem após tratamento com 5-Aza foi de 54,5% (FIGURA 16), estando de acordo com a técnica de MSP. Os resultados obtidos a partir dos

tratamentos realizados com a liraglutida mostraram que o perfil de metilação global foi de 54,7%, desmetilando em torno de 36,5% em relação ao controle. Se considerarmos que a diminuição do perfil de metilação entre as duas condições testadas se assemelham, é possível inferir que a liraglutida poderia estar atuando como um agente desmetilante, com efeito similar ao 5-Aza. Ao que parece, o liraglutida possui um poderoso efeito desmetilante sobre o gene *ADAM33* não específico, uma vez que o padrão se repetiu entre as duas linhagens. Já para a linhagem MDA-MB-436 a taxa global de metilação foi 88,6% para 84,6% com o 5-Aza e, com a liraglutida, foi de 75,3%. Se considerarmos a taxa de diminuição da metilação, podemos dizer que ocorreu uma desmetilação de 13% da região promotora do gene *ADAM33* após o tratamento com liraglutida.

Se analisarmos individualmente os CpGs modificados pelos tratamentos, podemos observar que ocorreu uma desmetilação semelhante entre os CpGs da sequência promotora de *ADAM33* quando submetida ao tratamento com 5-Aza e com a liraglutida e estes dados são inéditos na literatura. As linhagens tumorais embora apresentem heterogeneidade entre si, podem se comportar de maneiras diferentes diante de mesmos compostos adicionados, podendo a liraglutida estimular vias diferentes nas linhagens. O GLP-1 age de diferentes maneiras nos diferentes tipos de células, como por exemplo, ele é capaz de induzir a proliferação celular das células  $\beta$ -pancreáticas pela via do AMP cíclico, enquanto que nas células tumorais de mama, o GLP-1 ativa vias diferentes do AMPc, que podem levar à inibição da proliferação celular (LIGUMSKY *et al.*, 2012).

Além disso, outros CpGs próximos também poderiam estar desmetilados mostrando que este processo pode estar relacionado com a definição dada por (TURKER, 1999) de que certos promotores atuam como ilhas de propagação da metilação. Se assim for, uma diminuição significativa na metilação da região promotora do gene *ADAM33* levaria a uma perda desse equilíbrio e permitiria que a metilação do DNA se espalhasse para a região promotora a partir de focos pré-existentes, permitindo sua transcrição. Esse modelo representaria o que foi descrito anos depois por (TURKER, 2002), em que a desmetilação proporcionaria a ligação de fatores repressores e daí então levariam a re-metilação do promotor, em um processo dinâmico.

O tratamento com 5-aza-2'-desoxicitidina na prática clínica tem se mostrado eficiente em tumores líquidos, mas refratário para os tumores sólidos, levando a

utilização limitada do composto para fins terapêuticos. Outros autores ainda descrevem que certas células passam a não responder mais aos efeitos ao tratamento com o composto, mostrando-se resistentes durante o tratamento. Esta resistência está correlacionada com múltiplos mecanismos farmacológicos do metabolismo de nucleosídeos aberrantes, o que resulta em uma menor incorporação do 5-aza-2'-desoxicitidina no DNA. O seu mecanismo de ação se inicia quando incorporado à célula, sendo 5-aza-2'-desoxicitidina então fosforilado pela desoxicitidina quinase (dCK) formando o derivado monofosforilado 5-aza-dCMP, que logo é então fosforilado para sua forma ativa 5-aza-dCTP, que é a forma que então se incorpora ao DNA e leva a progressiva desmetilação. Existem diferentes metabólitos de 5-aza-2'-desoxicitidina que também podem ser substratos para catabolizar enzimas, como a citidina desaminase (CDA), que catalisa a inativação de citidina e da desoxicitidina em uridina a desoxiuridina, diminuindo assim a quantidade de 5-aza-dCTP que pode ser formado; além do 5-aza-2'-desoxicitidina possuir uma meia-vida curta de minutos, sendo rapidamente deaminado por CDA dentro das células. Portanto, sugere-se que a resistência das células ao tratamento possa ser devido à instabilidade genética espontânea e à instabilidade genética induzida pelo próprio 5-aza-2'-desoxicitidina (QIN *et al.*, 2009). Neste sentido, novos fármacos com ação desmetilante e efeito mais prolongado, como também insensíveis aos mecanismos de resistência poderiam auxiliar nos tratamentos dos pacientes oncológicos. Sobretudo se tal medicação apresentasse efeitos menos tóxicos que os próprios quimioterápicos ou mesmo o efeito tóxico do 5-Aza seriam extremamente importantes para o bem-estar do paciente durante o tratamento.

Assim, como demonstrado aqui, a linhagens MCF7, MDA-MB-231 e MDA-MB-436 tratadas com liraglutida apresentaram o perfil de metilação similar ao da linhagem tratada com 5-Aza sugerindo que esse medicamento tem ação desmetilante sobre promotores de certos genes alvo, dentre eles o *ADAM33*. Se isto ocorre também em outros genes, será alvo de futuros estudos em andamento no laboratório.

Para este trabalho também foi importante a análise dos FT, já que se trata de uma ilha de CpG localizada na região promotora do gene. Na análise de ambos tratamentos 5-Aza e liraglutida, foram achados TFBS em comum tais como HOXF, NKX25, HOMEZ, CDX2 e TLX, os quais são considerados como *homeobox*. Os FT *homeobox* desempenham um papel vital no desenvolvimento anatômico de tecidos e órgãos durante o estágio inicial do desenvolvimento embrionário, assim como

possuem um papel vital na proliferação de células tumorais. Estes FT específicos atuam como parte de um sistema regulador do desenvolvimento, que proporciona às células uma identidade específica (MISHRA; GUDA, 2017). O fator NKX25 atua em células de câncer de mama, e na homeostase da glucose por ser ativador transcricional de vários genes hepáticos (FU *et al.*, 2016). Este fator é requerido para a união do receptor de estrógeno a outro fator, o GATA3, que é expresso em grande parte no epitélio luminal da mama normal e em tumores de mama positivos para RE (GARCIA-CLOSAS *et al.*, 2007). Isto nos sugere que a sua presença a partir da desmetilação dos sítios de CpG poderia de certa forma fazer com que as linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-436, ambas consideradas linhagens triplos negativas (pela ausência de fatores de prognóstico tais como estrógeno e progesterona), a longo prazo, se tornariam menos invasivas e metastáticas, pela re-expressão do gene *ESR1* (RE). Outro FT também encontrado, foi o SATB1, relatado como modificador epigenético em sequências específicas dos genes alvo diretamente associados ao processo de metástase, regulando negativamente os genes supressores de tumor (HAN *et al.*, 2008; PURBEY *et al.*, 2009). O FT FOXA1 presente na região está relacionado ao desenvolvimento embrionário tecido-específica. Seu recrutamento depende da distribuição da histona H3K5m1, em genes que são regulados pelo estrogênio, além de participar na regulação da apoptose inibindo a expressão do gene *BCL2*. Outro fator associado a ambos os tratamentos foi o DEAF-1. Este FT se liga às sequências com múltiplas cópias de CG presentes no seu próprio promotor, e está envolvido com a regulação e a proliferação de células epiteliais e ramos laterais na glândula mamária. A literatura descreve já que normalmente se encontram hipermetilados (BARKER *et al.*, 2008), e na possibilidade de estarem diferencialmente metilados após os tratamentos pode estar relacionado ao diabetes com o aumento da prevalência de câncer de mama, pela própria indução da proliferação do epitélio mamário.

Se considerarmos apenas o tratamento com o liraglutida houveram diferenças nos CpGs em regiões associadas aos fatores NKX6 e HMGA-1, os quais estão associados com o desenvolvimento de células  $\beta$  na diabetes mellitus pela sua capacidade de se unir ao promotor do gene de insulina, e na regulação da progressão metastática de células cancerígenas (BARKER *et al.*, 2008). O fator HMGA-1 (High Mobility Group A) interage com trechos de DNA rico em AT, formando complexos estereoespecíficos e multiproteicos nas regiões promotoras de genes. Nas células

normais, a presença de HMGA-1 limita a embriogênese, sendo encontrado em altos níveis em células transformadas, e representando uma característica geral em doenças humanas, incluindo carcinomas derivados de tecidos de tireoide, próstata, colón e mama (PEGORARO *et al.*, 2013). Já o NKX6-1 tem afinidade por sequências ricas em AT específicas em regiões promotoras de vários genes e sua ação seria bifuncional. A literatura relata que a hipermetilação do promotor do gene NKX6-1 tem sido detectada em várias linhagens celulares de câncer de colo de útero e tecidos de carcinoma de células escamosas, impedindo assim sua expressão. Além disso, se atribui que presença de NKX6-1 inibiu a invasão e metástases do câncer, através da regulação epigenética da TEM (LI *et al.*, 2016), sendo assim, a sua presença após o tratamento com liraglutida poderia contribuir para diminuição da malignidade associada às células tumorais avaliadas.

## 8. CONCLUSÕES

A presença de hipermetilação na região promotora do gene *ADAM33* promove o seu silenciamento gênico, já observado pela ausência da expressão em diferentes linhagens avaliadas neste laboratório. Sobre as condições testadas, foi possível observar por MSP que as linhagens MCF7, MDA-MB-231 e MDA-MB-436 alteraram o perfil de metilação quando foram tratadas com liraglutida, passando a apresentar o fragmento da condição não metilada, sugerindo uma ação semelhante entre liraglutida e o 5-Aza. Os resultados de sequenciamento mostraram uma diminuição no perfil global de metilação quando tratadas com 5-Aza da MCF7 para 71,2%, na MDA-MB-231 para 54,5%, e na MDA-MB-436 para 84,6%, respectivamente. E estas mesmas linhagens quando tratadas com liraglutida apresentaram diminuição da metilação global da MCF7 para 78,9%, MDA-MB-231 para 54,7% e MDA-MB-436 para 75,3%, respectivamente. Os CpGs 3, 4, 6, 11, 16, 17, 19, 21, 25, 28, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 48, 53, 54, 55, 68, 75 e 77 mostraram-se diferencialmente desmetilados quando são tratados com o 5-aza, e os CpGs 3, 6, 10, 15, 22, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 48, 52, 53, 55, 57, 58, 65, 66, 74, 75 e 76 somente quando tratados com liraglutida. Em ambas as condições, foram observadas diferenças nos CpGs 3, 9, 10, 15, 16, 19, 21, 22, 23, 28, 29, 30, 32, 35, 37, 38, 42, 43, 44, 46, 48, 54, 55, 57, 65, 68, 72, 74, 76 e 77.

A análise de genes diferencialmente metilados abrange as principais vias relacionadas à divisão celular, diferenciação, migração e outros processos biológicos, que são muito importantes no desenvolvimento e progressão do câncer. A análise dos FT presentes na região promotora de *ADAM33* e sua provável regulação pela metilação do DNA nas linhagens avaliadas, há várias proteínas *homeobox* importantes, como por exemplo, os *HOXF*, *NKX25*, *HOMEX*, *CDX2* e *TLX*. A região dos fatores *FOXA1*, *GATA3*, *NUDR* e *HNFP* estão envolvidos com a regulação e a proliferação de células epiteliais e ramos laterais na glândula mamária e se encontram diferencialmente metilados. No tratamento com o liraglutida houveram diferenças nos CpGs em regiões associadas aos fatores *NKX6* e *HMGA-1*, os quais estão associados com o desenvolvimento de células  $\beta$  na diabetes. O *NKX6-1* tem sido detectado em várias linhagens celulares de câncer de colo de útero e tecidos de carcinoma de células escamosas, e se atribui sua presença a inibição da invasão e metástases do câncer, através da regulação epigenética da TEM. Sendo assim, a sua presença após

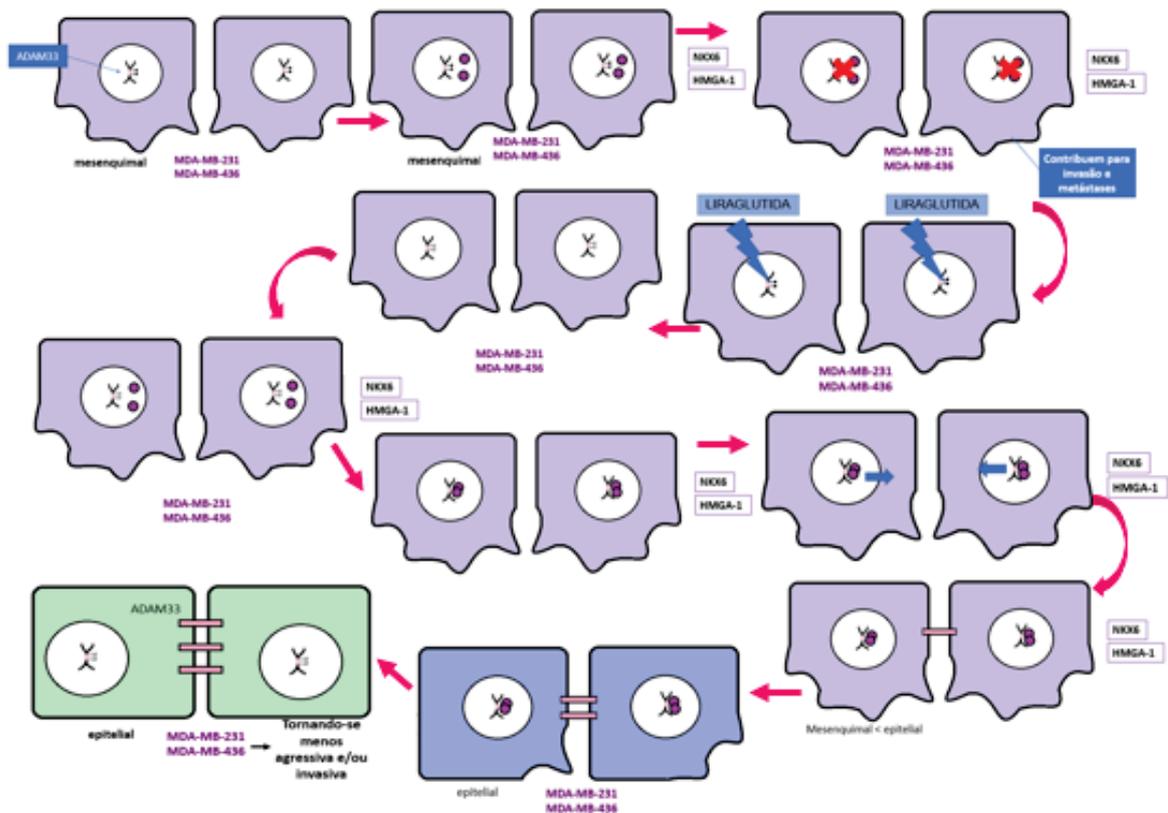
o tratamento com liraglutida poderia contribuir para diminuição da malignidade associada às células tumorais avaliadas. Estes resultados são inéditos na literatura, mostrando como um medicamento para um fim terapêutico diferente (diabetes) é capaz de proporcionar alteração no perfil de metilação de um gene relacionado ao câncer de mama.

A partir desses resultados, a liraglutida se mostrou capaz de atuar na reversão da hipermetilação das células tumorais de mama, podendo ser utilizado como um adjuvante na terapia do câncer de mama, porém mais estudos são necessários para verificar o potencial *in vivo* da liraglutida, assim como sua interação com outros fármacos.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por tudo isso apontado neste trabalho, nossa hipótese propõe que a partir do tratamento com liraglutida, células tumorais com características de fenótipo mesenquimal e mais agressivo que possuem o gene *ADAM33* metilado, e, portanto, sem a presença da proteína na membrana da célula, e ainda esta metilação seria capaz de impedir a ligação dos fatores de transcrição NKX6 e HMGA; passariam a desmetilar o gene *ADAM33*, e outras regiões do genoma, facilitando com que esses fatores de transcrição, consigam se aproximar da região promotora do gene *ADAM33*, e promover a sua expressão, produzindo a proteína capaz de se mobilizar até a membrana plasmática, desenvolvendo suas funções de comunicação célula-célula. A partir desse mecanismo então, essas células tumorais agora com a presença de *ADAM33*, perderiam o fenótipo mesenquimal e passariam ao fenótipo epitelial, diminuindo sua agressividade e características invasivas e metastáticas (FIGURA 18).

FIGURA 18- REPRESENTAÇÃO ESQUEMATICA HIPOTESIS DE TRATAMENTO COM LIRAGLUTIDA



FONTE: O autor (2018)

## REFERÊNCIAS

- BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D. J. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2131–2157, 2007.
- BARKER, H. E.; SMYTH, G. K.; WETTENHALL, J.; WARD, T. A.; BATH, M. L.; LINDEMAN, G. J.; VISVADER, J. E. Deaf-1 regulates epithelial cell proliferation and side-branching in the mammary gland. **BMC Developmental Biology**, v. 8, p. 1–14, 2008.
- BECKER, S.; DOSSUS, L.; KAAKS, R. Obesity related hyperinsulinaemia and hyperglycaemia and cancer development. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 115, n. 2, p. 86–96, maio 2009.
- BESTOR, T. H. **The DNA methyltransferases of mammals**. 2000. 9 2000.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, p. 6–21, 2002.
- CAKEBREAD, J. a; HAITCHI, H.-M.; HOLLOWAY, J. W.; POWELL, R. M.; KEITH, T.; DAVIES, D. E.; HOLGATE, S. T. The role of ADAM33 in the pathogenesis of asthma. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 25, n. 3–4, p. 361–375, 1 fev. 2004.
- CHAKAROV, S.; PETKOVA, R.; RUSSEV, G.; ZHELEV, N. DNA damage and mutation. Types of DNA damage. **BioDiscovery**, n. 11, p. 1, 23 fev. 2014.
- CHAO, C.; PAGE, J. H. Type 2 Diabetes Mellitus and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. **American Journal of Epidemiology**, v. 168, n. 5, p. 471–480, 2 jul. 2008.
- CHEN, W.; HOFFMANN, A. D.; LIU, H.; LIU, X. Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. **npj Precision Oncology**, v. 2, n. 1, p. 4, 2018.
- CHIANG, A. C. **Molecular Basis of Metastasis**. 2008.
- CHIEFARI, E.; TANYOLAÇ, S.; PAONESSA, F.; PULLINGER, C. R.; CAPULA, C.; IIRITANO, S.; MAZZA, T.; FORLIN, M.; FUSCO, A.; DURLACH, V.; DURLACH, A.; MALLOY, M. J.; KANE, J. P.; HEINER, S. W.; FILOCAMO, M.; FOTI, D. P.; GOLDFINE, I. D.; BRUNETTI, A. Functional variants of the HMGA1 gene and type 2 diabetes mellitus. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 305, n. 9, 2011.
- CHO, Y. M.; FUJITA, Y.; KIEFFER, T. J. Glucagon-Like Peptide-1: Glucose Homeostasis and Beyond. **Annual Review of Physiology**, v. 76, n. 1, p. 535–559, 2014.
- CHRISTIANSEN, J. J.; RAJASEKARAN, A. K. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. **Cancer Research**, v. 66, n. 17, p. 8319–8326, 2006.
- COSTA, F. F.; PAIXÃO, 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.; CAMARGO, A. A. SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 165, n. 2, p. 135–143, mar. 2006.

- COSTA, F. F.; VERBISCK, N. V; SALIM, A. C. M.; IERARDI, D. F.; PIRES, L. C.; SOARES, F.; SIMPSON, A. J.; CAMARGO, A. a. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene**, v. 23, n. 7, p. 1481–1488, 8 fev. 2004.
- DENG, W.; LIANG, W.-B.; GAO, L.; WANG, Y.-Y.; LV, M.-L.; ZHU, Y.; ZHANG, L. Association of ADAM33 polymorphisms and susceptibility to psoriasis. **DNA and cell biology**, v. 29, n. 8, p. 435–9, 2010.
- DRUCKER, D. J. Review series The role of gut hormones in glucose homeostasis. **Pancreas**, v. 117, n. 1, p. 24–32, 2007.
- DWORKIN, A. M.; HUANG, T. H. M.; TOLAND, A. E. Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. **Seminars in cancer biology**, v. 19, n. 3, p. 165–171, 2009.
- EERDEWEGH, P. Van; LITTLE, R. D.; MASTRO, R. G. Del; FALLS, K.; SIMON, J.; CLOUGHK, J. B.; HOLLOWAYK, J. W.; HOLTATEK, S. T.; KEITH, T. P. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. **Nature**, v. 418, n. July, p. 426–430, 2002.
- ESTELLER, M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: Promoter hypermethylation of DNA repair genes. **European Journal of Cancer**, v. 36, n. 18, p. 2294–2300, 2000.
- ESTELLER, M. Epigenetic gene silencing in cancer: The DNA hypermethylation. **Human Molecular Genetics**, v. 16, n. R1, p. 50–59, 2007.
- FEDELE, M. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Breast Cancer : Focus on Basal-Like Carcinomas. p. 1–19, 2017.
- FERLAY, J.; SOERJOMATARAM I, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN D, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-386, 2015.
- FLEISCHER, T.; TEKPLI, X.; MATHELIER, A.; WANG, S.; NEBDAL, D.; DHAKAL, H. NAUME, B.; ESKELAND, R.; FRIGESSI, A.; TOST, J.; HURTADO, A.; KRISTENSEN, V. N. DNA methylation at enhancers identifies distinct breast cancer lineages. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1379, 9 dez. 2017.
- FRASCA, F.; PANDINI, G.; SCIACCA, L.; PEZZINO, V.; SQUATRITO, S.; BELFIORE, A.; VIGNERI, R. The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 114, n. 1, p. 23–37, 2008.
- FU, X.; JESELSON, R.; PEREIRA, R.; HOLLINGSWORTH, E. F.; CREIGHTON, C. C. K.; SCHIFF, R. FOXA1 overexpression mediates endocrine resistance by altering the ER transcriptome and IL-8 expression in ER-positive breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 43, p. E6600–E6609, 2016.
- GARCIA-CLOSAS, M.; TROESTER, M. A.; QI, Y.; LANGERØD, A.; YEAGER, M.; GRAM, I. T.; KRISTENSEN, V.; BØRRESEN-DALE, A. L.; CHANOCK, S.; PEROU, C. M. Common genetic variation in GATA-binding protein 3 and differential susceptibility to breast cancer by estrogen receptor  $\alpha$  tumor status. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 16, n. 11, p. 2269–2275, 2007.
- GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG Islands in vertebrate genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 196, n. 2, p. 261–282, jul. 1987.

GARG, S. K.; MAURER, H.; REED, K.; SELAGAMSETTY, R. Diabetes and cancer: two diseases with obesity as a common risk factor. **Diabetes Obes Metab**, v. 16, n. 2, p. 97–110, 2014.

GARLISI, C. G.; ZOU, J.; DEVITO, K. E.; TIAN, F.; ZHU, F. X.; LIU, J.; SHAH, H.; WAN, Y.; MOTASIM BILLAH, M.; EGAN, R. W.; UMLAND, S. P. Human ADAM33: protein maturation and localization. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, n. 1, p. 35–43, jan. 2003.

GIAMPAOLO, A.; FELLI, N.; DIVERIO, D.; MORSILLI, O.; SAMOGGIA, P.; BRECCIA, M.; LO COCO, F.; PESCHLE, C.; TESTA, U. Expression pattern of HOXB6 homeobox gene in myelomonocytic differentiation and acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 16, n. 7, p. 1293–1301, 2002.

GODSLAND, I. F. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer. **Clinical Science**, v. 118, n. 5, p. 315–332, 2010.

GONG, H.; WANG, Z.; ZHAO, G. wei; LV, X.; WEI, G. hong; WANG, L.; LIU, D. pei; LIANG, C. chuan. SATB1 regulates  $\beta$ -like globin genes through matrix related nuclear relocation of the cluster. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 383, n. 1, p. 11–15, 2009.

GOPALAKRISHNAN, S.; VAN EMBURGH, B. O.; ROBERTSON, K. D. DNA methylation in development and human disease. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 647, n. 1–2, p. 30–38, 2008.

GUO, S.; LIU, M.; WANG, G.; TORROELLA-KOURI, M.; GONZALEZ-PEREZ, R. R. Oncogenic role and therapeutic target of leptin signaling in breast cancer and cancer stem cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1825, n. 2, p. 207–222, abr. 2012.

HAITCHI, H. M.; POWELL, R. M.; SHAW, T. J.; HOWARTH, P. H.; WILSON, S. J.; WILSON, D. I.; HOLGATE, S. T.; DAVIES, D. E. ADAM33 expression in asthmatic airways human embryonic lungs. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, n. 9, p. 958–965, maio 2005.

HAMMARSTEN, J.; DAMBER, J.-E.; HAGSHENO, M. A.; MELLSTRÖM, D.; PEEKER, R. A stage-dependent link between metabolic syndrome components and incident prostate cancer. **Nature Reviews Urology**, 2018.

HAN, H. J.; RUSSO, J.; KOHWI, Y.; KOHWI-SHIGEMATSU, T. SATB1 reprogrammes gene expression to promote breast tumour growth and metastasis. **Nature**, v. 452, n. 7184, p. 187–193, 2008.

HE, L.; ZHANG, S.; ZHANG, X.; LIU, R.; GUAN, H.; ZHANG, H. Effects of insulin analogs and glucagon-like peptide-1 receptor agonists on proliferation and cellular energy metabolism in papillary thyroid cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 10, p. 5621–5631, 2017.

HERMAN, J. G.; GRAFF, J. R.; MYOHANEN, 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**, v. 93, n. 18, p. 9821–9826, 1996.

HOLGATE, S. T.; DAVIES, D. E.; POWELL, R. M.; HOLLOWAY, J. W. ADAM33: A Newly Identified Gene in the Pathogenesis of Asthma. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 655–668, nov. 2005.

HOU, Y.; SHEN, R.; CHAUDHARY, S.; TONKOVICH, D.; LI, Z. Utility of different immunostains for diagnosis of metastatic breast carcinomas in both surgical and cytological specimens. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 30, p. 21–27, 2017.

HUGGENVIK, J. I.; MICHELSON, R. J.; COLLARD, M. W.; ZIEMBA, A. J.; GURLEY, P.; MOWEN, K. A. Characterization of a nuclear deformed epidermal autoregulatory factor-1 (DEAF-1)-related (NUDR) transcriptional regulator protein. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 12, n. 10, p. 1619–1639, 1998.

INCA. **Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil**. [s.l.: s.n.]

IWATSUKI, M.; MIMORI, K.; YOKOBORI, T.; ISHI, H.; BEPPU, T.; NAKAMORI, S.; BABA, H.; MORI, M. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. **Cancer Science**, v. 101, n. 2, p. 293–299, fev. 2010.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, v. 33, n. 3S, p. 245–254, 2003.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. a. Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420–1428, 2009.

KATHRYN, J. C.; SIREESHA V, G.; STANLEY, L. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. **Breast Dis**, v. 32, p. 35–48, 2012.

KHANDEKAR, M. J.; COHEN, P.; SPIEGELMAN, B. M. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 12, p. 886–895, 2011.

KIENAST, Y.; BAUMGARTEN, L. Von; FUHRMANN, M.; KLINKERT, W. E. F.; GOLDBRUNNER, R.; HERMS, J.; WINKLER, F. technical reports Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. **Nature Medicine**, v. 16, n. 1, p. 116–122, 2009.

KOBOLDT, D. C.; FULTON, R. S.; MCLELLAN, M. D.; SCHMIDT, H.; KALICKI-VEIZER, J.; MCMICHAEL, J. F.; FULTON, L. L.; DOOLING, D. J.; DING, L.; MARDIS, E. R.; WILSON, R. K.; ALLY, A.; BALASUNDARAM, M.; BUTTERFIELD, Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61–70, 23 set. 2012.

KOWALL, B.; STANG, A.; RATHMANN, W.; KOSTEV, K. No reduced risk of overall, colorectal, lung, breast, and prostate cancer with metformin therapy in diabetic patients: database analyses from Germany and the UK. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v. 24, n. 8, p. 865–874, ago. 2015.

KREYMAN, B.; GHATEI, M. A.; WILLIAMS, G.; BLOOM, S. R. Glucagon-Like Peptide-1 7-36: a Physiological Incretin in Man. **The Lancet**, v. 330, n. 8571, p. 1300–1304, 1987.

LEE, A. V.; OESTERREICH, S.; DAVIDSON, N. E. MCF-7 Cells - Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 7, p. 1–4, 2015.

LI, H. J.; YU, P. N.; HUANG, K. Y.; SU, H. Y.; HSIAO, T. H.; CHANG, C. P.; YU, M. H.; LIN, Y. W. NKX6.1 functions as a metastatic suppressor through epigenetic regulation of the epithelial-mesenchymal transition. **Oncogene**, v. 35, n. 17, p. 2266–2278, 2016.

LIANG, X.; CHEN, C.; ZHAO, Y.; WANG, P. C. Multi-Drug Resistance in Cancer. v. 596, 2010.

LIGUMSKY, H.; WOLF, I.; ISRAELI, S.; HAIMSOHN, M.; FERBER, S.; KARASIK, A.; KAUFMAN, B.; RUBINEK, T. The peptide-hormone glucagon-like peptide-1 activates cAMP and inhibits growth of breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 132, n. 2, p. 449–461, 3 abr. 2012.

LIN, L.; MILLER, C. T.; CONTRERAS, J. I.; PRESCOTT, M. S.; DAGENAIS, S. L.; WU, R.; YEE, J.; ORRINGER, M. B.; MISEK, D. E.; HANASH, S. M.; GLOVER, T. W.; BEER, D. G. The hepatocyte nuclear factor 3 alpha gene, HNF3alpha (FOXA1), on chromosome band 14q13 is amplified and overexpressed in esophageal and lung adenocarcinomas. **Cancer research**, v. 62, n. 18, p. 5273–5279, 2002.

LU, Y.; RODRÍGUEZ, L. A. G.; MALGERUD, L.; GONZÁLEZ-PÉREZ, A.; MARTÍN-PÉREZ, M.; LAGERGREN, J.; BEXELIUS, T. S. New-onset type 2 diabetes, elevated HbA1c, anti-diabetic medications, and risk of pancreatic cancer. **British Journal of Cancer**, v. 113, n. 11, p. 1607–1614, 2015.

LUO, J.; LIN, H. C.; HE, K.; HENDRYX, M. Diabetes and prognosis in older persons with colorectal cancer. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 7, p. 1847–1854, 2014.

MACCIÒ, A.; MADEDDU, C. Obesity, Inflammation, and Postmenopausal Breast Cancer: Therapeutic Implications. **The Scientific World JOURNAL**, v. 11, p. 2020–2036, 2011.

MACUT, D.; BOŽIĆ-ANTIĆ, I.; BJEKIĆ-MACUT, J.; TZIOMALOS, K. Management of endocrine disease: Polycystic ovary syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. **European Journal of Endocrinology**, v. 177, n. 3, p. R145–R158, 2017.

MALIK, S.; JIANG, S.; GAREE, J. P.; VERDIN, E.; LEE, A. V.; O'MALLEY, B. W.; ZHANG, M.; BELAGULI, N. S.; OESTERREICH, S. Histone Deacetylase 7 and FoxA1 in Estrogen-Mediated Repression of RPRM. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, n. 2, p. 399–412, 2010.

MANICA, G. C. M.; RIBEIRO, C. F.; OLIVEIRA, M. A. S. de; PEREIRA, I. T.; CHEQUIN, A.; RAMOS, E. A. S.; KLASSEN, L. M. B.; SEBASTIÃO, A. P. M.; ALVARENGA, L. M.; ZANATA, S. M.; NORONHA, L. De; RABINOVICH, I.; COSTA, F. F.; SOUZA, E. M.; KLASSEN, G. Down regulation of ADAM33 as a Predictive Biomarker of Aggressive Breast Cancer. **Scientific Reports**, v. 7, p. 44414, 15 mar. 2017.

MCINTYRE, N.; HOLDSWORTH, C.; TURNER, D. New Interpretation of Oral Glucose Tolerance. **Lancet**, v. 2(749), p. 20–21, 1964.

MEAKIN, P. J.; MEZZAPESA, A.; BENABOU, E.; HAAS, M. E.; BONARDO, B.; GRINO, M.; BRUNEL, J.; DESBOIS-MOUTHON, C.; BIDDINGER, S. B.; GOVERS, R.; ASHFORD, M. L. J.; PEIRETTI, F. The beta secretase BACE1 regulates the expression of insulin receptor in the liver. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1306, 3 dez. 2018.

MEGO, M.; MANI, S. A.; CRISTOFANILLI, M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 7, n. 12, p. 693–701, 2010.

MEIER, J. J. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 12, p. 728–742, 2012.

- MENTLEIN, R.; GALLWITZ, B.; SCHMIDT, W. E. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7–36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. **European Journal of Biochemistry**, v. 214, n. 3, p. 829–835, 1993.
- MICALIZZI, D. S.; FARABAUGH, S. M.; FORD, H. L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: Parallels between normal development and tumor progression. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, n. 2, p. 117–134, 2010.
- MISHRA, N. K.; GUDA, C. Genome-wide DNA methylation analysis reveals molecular subtypes of pancreatic cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 17, p. 28990–29012, 25 abr. 2017.
- MOJISOV, S.; WEIR, G. C.; HABENER, J. Insulintropin: Glucagon-like peptide 1 (7–37) co- encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. **Journal of Clinical Investigation**, v. 79, p. 616–619, 1987.
- MORENO-JAIME, B.; ESPARZA-LÓPEZ, J.; CASTRO-SÁNCHEZ, A.; ESCOBAR-ARRIAGA, E.; MEDINA-FRANCO, H.; LEÓN-RODRÍGUEZ, E.; DE JESUS IBARRA-SANCHEZ, M. El factor de crecimiento epidérmico induce transición epitelio-mesénquima en cultivos primarios de cáncer de mama. **Gaceta Mexicana de Oncología**, v. 15, n. 1, p. 10–15, 2016.
- MORTENSEN, K.; CHRISTENSEN, L. L.; HOLST, J. J.; ORSKOV, C. GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. **Regulatory Peptides**, v. 114, n. 2–3, p. 189–196, 2003.
- MÜLLER, V.; GRÜBER, G.; ANTEQUERA, F. Cellular and Molecular Life Sciences Structure , function and evolution of CpG island promoters. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 60, n. 3, p. 1647–1658, 2003.
- MULLOOLY, M.; MCGOWAN, P. M.; KENNEDY, S. A.; MADDEN, S. F.; CROWN, J.; O 'DONOVAN, N.; DUFFY, M. J. ADAM10: a new player in breast cancer progression&quest; **British Journal of Cancer**, v. 113, n. 6, p. 945–951, 18 set. 2015.
- MUNSELL, M. F.; SPRAGUE, B. L.; BERRY, D. A.; CHISHOLM, G.; TRENTHAM-DIETZ, A. Body mass index and breast cancer risk according to postmenopausal estrogen-progestin use and hormone receptor status. **Epidemiologic Reviews**, v. 36, n. 1, p. 114–136, 2014.
- NAVADA, S. C.; STEINMANN, J.; LÜBBERT, M.; SILVERMAN, L. R. Clinical development of demethylating agents in hematology. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 1, p. 40–46, 2 jan. 2014.
- NÚÑEZ, M.; MEDINA, V.; CRICCO, G.; CROCI, M.; COCCA, C.; RIVERA, E.; BERGOC, R.; MARTÍN, G. Glibenclamide inhibits cell growth by inducing G0/G1 arrest in the human breast cancer cell line MDA-MB-231. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 14, 2013.
- O.STASIKOWSKA-KANICKA; M.WĄGROWSKA-DANILEWICZ; DANILEWICZ., M. Immunohistochemical study on ADAM33 in sinonasal inverted papillomas and squamous cell carcinomas of the larynx. **Archives of Medical Science**, v. 12, n. 1, p. 89–94, 2016.
- O'SHEA, C.; MCKIE, N.; BUGGY, Y.; DUGGAN, C.; HILL, A. D. K.; MCDERMOTT, E.; O'HIGGINS, N.; DUFFY, M. J. Expression of ADAM-9 mRNA and protein in human breast cancer. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 105, n. 6, p. 754–61, jul. 2003.

PADUCH, R. The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis. **Cellular Oncology**, v. 39, n. 5, p. 397–410, 2016.

PARKER, J. S.; MULLINS, M.; CHEUNG, M. C. U.; LEUNG, S.; VODUC, D.; VICKERY, T.; DAVIES, S.; FAURON, C.; HE, X.; HU, Z.; QUACKENHUSH, J. F.; STIJLEMAN, I. J.; PALAZZO, J.; MATRON, J. S.; NOBEL, A. B.; MARDIS, E.; NIELSEN, T. O.; ELLIS, M. J.; PEROU, C. M. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 8, p. 1160–1167, 2009.

PEGORARO, S.; ROS, G.; PIAZZA, S.; SOMMAGGIO, R.; CIANI, Y.; ROSATO, A.; SGARRA, R.; DEL SAL, G.; MANFIOLETTI, G. HMGA1 promotes metastatic processes in basal-like breast cancer regulating EMT and stemness. **Oncotarget**, v. 4, n. 8, p. 1293–308, 2013.

POWELL, R. M.; WICKS, J.; HOLLOWAY, J. W.; HOLGATE, S. T.; DAVIES, D. E. The splicing and fate of ADAM33 transcripts in primary human airways fibroblasts. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 31, n. 1, p. 13–21, jul. 2004.

PRYZBYLKOWSKI, P.; OBAJIMI, O.; KEEN, J. C. Trichostatin A and 5 Aza-2' deoxycytidine decrease estrogen receptor mRNA stability in ER positive MCF7 cells through modulation of HuR. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 111, n. 1, p. 15–25, 2008.

PULUKURI, S. M.; RAO, J. S. CpG island promoter methylation and silencing of 14-3-3 $\sigma$  gene expression in LNCaP and Tramp-C1 prostate cancer cell lines is associated with methyl-CpG-binding protein MBD2. **Oncogene**, v. 25, n. 33, p. 4559–4572, 2006.

PURBEY, P. K.; SINGH, S.; NOTANI, D.; KUMAR, P. P.; LIMAYE, A. S.; GALANDE, S. Acetylation-Dependent Interaction of SATB1 and CtBP1 Mediates Transcriptional Repression by SATB1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 5, p. 1321–1337, 2009.

PUXEDDU, I.; PANG, Y. Y.; HARVEY, A.; HAITCHI, H. M.; NICHOLAS, B.; YOSHISUE, H.; RIBATTI, D.; CLOUGH, G.; POWELL, R. M.; MURPHY, G.; HANLEY, N. a; WILSON, D. I.; HOWARTH, P. H.; HOLGATE, S. T.; DAVIES, D. E. The soluble form of a disintegrin and metalloprotease 33 promotes angiogenesis: Implications for airway remodeling in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 6, p. 1400–1406.e4, jun. 2008.

QIN, T.; JELINEK, J.; SI, J.; SHU, J.; ISSA, J.-P. J. Mechanisms of resistance to 5-aza-2J-deoxycytidine in human cancer cell lines. **Proteins**, v. 113, n. 3, p. 659–667, 2009.

RAJAB, A.; SCHUELKE, M.; GILL, E.; ZWIRNER, A.; SEIFERT, F.; GONZALEZ, S. M.; KNIERIM, E. Recessive DEAF1 mutation associates with autism, intellectual disability, basal ganglia dysfunction and epilepsy. **Journal of Medical Genetics**, v. 52, n. 9, p. 607–611, 2015.

REYMOND, N.; D'ÁGUA, B. B.; RIDLEY, A. J. Crossing the endothelial barrier during metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 12, p. 858–870, 2013.

ROLL, J. D.; RIVENBARK, A. G.; JONES, W. D.; COLEMAN, W. B. DNMT3b overexpression contributes to a hypermethylator phenotype in human breast cancer cell lines. **Molecular Cancer**, v. 7, n. c, p. 1–14, 2008.

- SANDHU, R.; RIVENBARK, A. G.; MACKLER, R. M.; LIVASY, C. A.; COLEMAN, W. B. Dysregulation of microRNA expression drives aberrant DNA hypermethylation in basal-like breast cancer. **International Journal of Oncology**, v. 44, n. 2, p. 563–572, 2014.
- 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. 914–21, nov. 1994.
- SAUNDERS, K. H.; UMASHANKER, D.; IGEL, L. I.; KUMAR, R. B.; ARONNE, L. J. Obesity Pharmacotherapy. **Medical Clinics of North America**, v. 102, n. 1, p. 135–148, 2018.
- SAXONOV, S.; BERG, P.; BRUTLAG, D. L. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 5, p. 1412–1417, 31 jan. 2006.
- SCHMID, C.; GHIRLANDA, C.; NIESSEN, M. Prevention of tumour cell apoptosis associated with sustained protein kinase B phosphorylation is more sensitive to regulation by insulin signalling than stimulation of proliferation and extracellular signal-regulated kinase. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 432, n. 1–2, p. 41–54, 2017.
- SCULLY, O. J.; BAY, B.-H.; YIP, G.; YU, Y. Breast cancer metastasis. **Cancer genomics & proteomics**, v. 9, n. 5, p. 311–20, 2012.
- SENISKI, G. G.; CAMARGO, A. a; IERARDI, D. F.; RAMOS, E. A. S.; GROCHOSKI, M.; RIBEIRO, E. S. F.; CAVALLI, I. J.; PEDROSA, F. O.; DE SOUZA, E. M.; ZANATA, S. M.; COSTA, F. F.; KLASSEN, G. ADAM33 gene silencing by promoter hypermethylation as a molecular marker in breast invasive lobular carcinoma. **BMC Cancer**, v. 9, n. 1, p. 80, 6 dez. 2009.
- SHAH, S. S.; WU, T. T.; TORBENSON, M. S.; CHANDAN, V. S. Aberrant CDX2 expression in hepatocellular carcinomas: An important diagnostic pitfall. **Human Pathology**, v. 64, n. 2017, p. 13–18, 2017.
- SIMÃO-RIUDALBAS, L.; ESTELLER, M. Targeting the histone orthography of cancer: Drugs for writers, erasers and readers. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 11, p. 2716–2732, 2015.
- SIMPSON, P. T.; REIS-FILHO, J. S.; GALE, T.; LAKHANI, S. R. Molecular evolution of breast cancer. **The Journal of Pathology**, v. 205, n. 2, p. 248–254, jan. 2005.
- SONG, G.; LIU, K.; YANG, X.; MU, B.; YANG, J.; HE, L.; HU, X.; LI, Q.; ZHAO, Y.; CAI, X.; FENG, G. SATB1 plays an oncogenic role in esophageal cancer by up-regulation of FN1 and PDGFRB. **Oncotarget**, v. 8, n. 11, p. 17771–17784, 2017.
- THEODORAKIS, M. J. Human duodenal enteroendocrine cells: source of both incretin peptides, GLP-1 and GIP. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 290, n. 3, p. E550–E559, 2005.
- TING, A. H.; MCGARVEY, K. M.; BAYLIN, S. B. The cancer epigenome--components and functional correlates. **Genes & development**, v. 20, n. 23, p. 3215–3231, 2006.
- TOLEDO, M. EFEITO DA LIRAGLUTIDA SOBRE A METILAÇÃO DO DNA E A EXPRESSÃO DE MARCADORES DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA. 2017.

TOQUET, C.; COLSON, A.; JARRY, A.; BEZIEAU, S.; VOLTEAU, C.; BOISSEAU, P.; MERLIN, D.; LABOISSE, C. L.; MOSNIER, J.-F. ADAM15 to  $\alpha 5\beta 1$  integrin switch in colon carcinoma cells: A late event in cancer progression associated with tumor dedifferentiation and poor prognosis. **International Journal of Cancer**, v. 130, n. 2, p. 278–287, 15 jan. 2012a.

TOQUET, C.; COLSON, A.; JARRY, A.; BEZIEAU, S.; VOLTEAU, C.; BOISSEAU, P.; MERLIN, D.; LABOISSE, C. L.; MOSNIER, J. F. ADAM15 to  $\alpha 5\beta 1$  integrin switch in colon carcinoma cells: A late event in cancer progression associated with tumor dedifferentiation and poor prognosis. **International Journal of Cancer**, v. 130, n. 2, p. 278–287, 15 jan. 2012b.

TSILIDIS, K. K.; CAPOTHANASSI, D.; ALLEN, N. E.; RIZOS, E. C.; LOPEZ, D. S.; VAN VELDHoven, K.; SACERDOTE, C.; ASHBY, D.; VINEIS, P.; TZOULAKI, I.; IOANNIDIS, J. P. A. Metformin does not affect cancer risk: A cohort study in the U.K. clinical practice research datalink analyzed like an intention-to-treat trial. **Diabetes Care**, v. 37, n. 9, p. 2522–2532, 2014.

TURKER, M. S. The establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mouse somatic cells. **Seminars in cancer biology**, v. 9, n. 5, p. 329–337, 1999.

TURKER, M. S. Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. **Oncogene**, v. 21, n. 35 REV. ISS. 3, p. 5388–5393, 2002.

VIDER, B. Z.; ZIMBER, A.; CHASTRE, E.; GESPACH, C.; HALPERIN, M.; MASHIAH, P.; YANIV, A.; GAZIT, A. Deregulated expression of homeobox-containing genes, HOXB6, B8, C8, C9, and Cdx-1, in human colon cancer cell lines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 272, n. 2, p. 513–518, 2000.

VIDER, B. Z.; ZIMBER, A.; CHASTRE, E.; GESPACH, C.; HALPERIN, M.; MASHIAH, O'MALLEY, B. W.; ZHANG, M.; BELAGULI, N. S.; OESTERREICH, S. Histone Deacetylase 7 and FoxA1 in Estrogen-Mediated Repression of RPRM. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 30, n. 8, p. 399–412, 2017.

WENDT, M. K.; TAYLOR, M. A.; SCHIEMANN, B. J.; SCHIEMANN, W. P. Down-regulation of epithelial cadherin is required to initiate metastatic outgrowth of breast cancer. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 14, p. 2423–2435, 2011.

WINTERS, S.; MARTIN, C.; MURPHY, D.; SHOKAR, N. K. **Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 151

WÜRTH, R.; THELLUNG, S.; BAJETTO, A.; MAZZANTI, M.; FLORIO, T.; BARBIERI, F. Drug-repositioning opportunities for cancer therapy: Novel molecular targets for known compounds. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 1, p. 190–199, 2016.

XU, J.-H.; GU, J.-Y.; GUO, Y.-H.; ZHANG, H.; QIU, X.-B.; LI, R.-G.; SHI, H.-Y.; LIU, H.; YANG, X.-X.; XU, Y.-J.; QU, X.-K.; YANG, Y.-Q. Prevalence and Spectrum of NKX2-5 Mutations Associated With Sporadic Adult-Onset Dilated Cardiomyopathy. **International Heart Journal**, v. 58, n. 4, p. 521–529, 2017.

YAMAZAKI, S.; SATOH, H.; WATANABE, T. Liraglutide enhances insulin sensitivity by activating amp-activated protein kinase in male wistar rats. **Endocrinology**, v. 155, n. 9, p. 3288–3301, 2014.

YANG, X.; KO, G. T.; SO, W. Y.; MA, R. C.; YU, L. W.; KONG, A. P.; ZHAO, H.; CHOW, C.-C.; TONG, P. C.; CHAN, J. C. The Associations of Hyperglycaemia and Insulin Usage with the Risk of Cancer in Type 2 Diabetes - the Hong Kong Diabetes Registry.

**Diabetes**, v. 59, n. May, p. 2337–2337, 2010.

YEE, L. D.; WILLIAMS, N.; WEN, P.; YOUNG, D. C.; LESTER, J.; JOHNSON, M. V.; FARRAR, W. B.; WALKER, M. J.; POVOSKI, S. P.; SUSTER, S.; ENG, C. Pilot study of rosiglitazone therapy in women with breast cancer: Effects of short-term therapy on tumor tissue and serum markers. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 1, p. 246–252, 2007.

YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G. Mechanisms of Motility in Metastasizing Cells. **Molecular Cancer Research**, v. 8, n. 5, p. 629–642, 2010.

ZHANG, L.; WANG, X.; HAN, D.; DUAN, H.; ZHAO, Y. Association of single nucleotide polymorphisms in GATA-3 with allergic rhinitis. **Acta Oto-Laryngologica**, v. 129, n. 2, p. 190–194, 2009.

ZHAO, Y.; NICHOLS, J. E.; BULUN, S. E.; MENDELSON, C. R.; SIMPSON, E. R. **Aromatase P450 gene expression in human adipose tissue. Role of a Jak/STAT pathway in regulation of the adipose-specific promoter.** *The Journal of biological chemistry*, 1995.

ZHONG, J. L.; POGHOSYAN, Z.; PENNINGTON, C. J.; SCOTT, X.; HANDSLEY, M. M.; WARN, A.; GAVRILOVIC, J.; HONERT, K.; KRUGER, A.; SPAN, P. N.; SWEEP, F. C. G. J.; EDWARDS, D. R. Distinct Functions of Natural ADAM-15 Cytoplasmic Domain Variants in Human Mammary Carcinoma. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 3, p. 383–394, 22 fev. 2008.