

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Curso de Biomedicina



ANA CAROLINA PASCHOALINI MAFRA

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO CULTIVO COM FIBRONECTINA E TGF-BETA
NA METILAÇÃO DO DNA DO PROMOTOR DO GENE *MMP2* NA LINHAGEM
TUMORAL DE MAMA MCF-7**

CURITIBA
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Curso de Biomedicina



ANA CAROLINA PASCHOALINI MAFRA

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO CULTIVO COM FIBRONECTINA E TGF-BETA
NA METILAÇÃO DO DNA DO PROMOTOR DO GENE *MMP2* NA LINHAGEM
TUMORAL DE MAMA MCF-7**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito à obtenção do grau de Bacharel
em Biomedicina, curso de Biomedicina, Univer-
sidade Federal do Paraná.

Prof.^a Orientadora: Dr.^a Giseli Klassen

CURITIBA
2014

Aos meus pais e ao meu irmão, Eduardo, que sempre me incentivaram e apoiaram, e acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Giseli Klassen, pelo acompanhamento, aprendizado, orientação e amizade, e pelas nossas divertidas aulas de inglês.

Ao curso e à Coordenação do curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio recebido.

Aos meus mestres e professores, pelo ensino, dedicação e carinho.

À CAPES e ao CNPq, pela bolsa de Iniciação Científica e pelo fomento.

Às minhas colegas de trabalho, Andressa, Isabela, Graciele, Liliane, Anna Caroline e Mariana, por serem minhas “segundas orientadoras”, grandes parceiras de trabalho e amigas, sempre.

Aos meus amigos, que assistiram ao esforço e aos estudos ao longo desses quatro anos.

E à minha família, que esteve sempre, absolutamente, ao meu lado.

Se você sonhar com o coração, nenhum desejo é impossível.

Pinóquio

RESUMO

O câncer de mama é o câncer que mais afeta as mulheres no Brasil e no mundo e as metástases decorrentes do tumor primário são a principal causa de morte por essa doença. A expressão da metaloprotease de matriz MMP-2 pelas células tumorais está associada com o processo de invasão e metástase, devido a sua capacidade de degradar componentes da matriz extracelular (MEC). As proteínas e demais componentes da MEC sinalizam para as células do tumor expressarem MMP-2, a exemplo a proteína fibronectina (FN) e o fator de sinalização TGF- β . A epigenética estuda as mudanças reversíveis e herdáveis que acontecem no genoma sem que a sequência de nucleotídeos seja alterada. A metilação do DNA influencia na expressão gênica em diversas patologias, inclusive no câncer, e promove a expressão do gene *MMP2*. Este trabalho propôs a análise da expressão e do perfil de metilação do gene *MMP2* antes e depois do cultivo da linhagem tumoral de mama MCF-7 com FN e TGF- β . Para tanto, as células foram cultivadas com TGF- β e FN nessa ordem, e em ordem contrária, com FN e TGF- β . O RNA total foi extraído das células para a realização das técnicas de RT- e qRT-PCR. O gene mostrou-se mais expresso no cultivo iniciado com TGF- β em relação ao iniciado com FN, se comparado ao controle (Mock) e ao cultivo somente com TGF- β . O DNA total foi extraído do e submetido ao tratamento com bissulfito de sódio, e a região da ilha de CpG do promotor do gene *MMP2* foi amplificada, clonada e sequenciada. Os padrões de metilação encontrados foram de 48% no cultivo somente com TGF- β ; de 35% no cultivo com TGF- β seguido de FN; e de 50% no cultivo iniciado com FN e seguido de TGF- β . Estes resultados corroboram com os resultados de qRT-PCR, indicando que a metilação da ilha de CpG do promotor do gene *MMP2* influencia na sua expressão. Ademais, os resultados apresentados confirmam a hipótese postulada pelo grupo de pesquisa de que a sinalização por FN é transitória e regulada por mecanismos epigenéticos. Finalmente, demonstra a sinalização e a influência de uma segunda molécula, o TGF- β , na expressão do gene *MMP2*, e que essa expressão é regulada pela metilação do DNA.

Palavras-chave: Câncer de mama, metástase, MMP-2, fibronectina, TGF- β , metilação do DNA

ABSTRACT

Breast cancer is the type of cancer that most affects women of Brazil and the world, and metastases arising from the primary tumor are the leading cause of death from this disease. The expression of the matrix metalloproteinase MMP-2 by tumor cells is strongly associated with the process of invasion and metastasis due to their ability to degrade components of the extracellular matrix (ECM). Proteins and other components of the ECM signal to tumor cells to express the protein, such as the protein fibronectin (FN) and the signaling factor TGF- β . Epigenetics studies the reversible changes that occur in the genome without changing the nucleotide sequence. DNA methylation influences the expression of genes, including cancer, like the *MMP2* gene. This study aimed to compare the expression of *MMP2* and the gene methylation profile on the breast cancer cell line MCF-7 upon the treatment with FN and TGF- β . Two treatments were performed, first with TGF- β , and the other initiated with FN, in order to evaluate the possible transient signaling by these molecules. Total RNA was extracted from the cells for the realization of the RT- and qRT-PCR techniques. The gene was more expressed in the treatment followed by FN than on the treatment that started with FN, compared to the control (Mock) and the treatment with TGF- β . DNA was also extracted from the culture, treated with sodium bisulfite, amplified in the CpG island promoter region of the *MMP2* gene, cloned and sequenced. The methylation patterns found in the treatments, only with TGF- β : 48%; 35% in the treatment with TGF- β followed by FN; and 50% in the treatment that started with FN, and followed by TGF- β ; corroborate the results of the qRT-PCR, indicating that methylation of the CpG island of the *MMP2* gene promoter influences its expression. Moreover, the results confirm the hypothesis posited by the research group to which the signaling from FN is transient and is regulated by epigenetic mechanisms. Finally, the influence of a second molecule, TGF- β , is shown to influence the expression of the *MMP2* gene by DNA methylation.

Key words: Breast cancer, metastasis, MMP-2, fibronectin, TGF- β , DNA methylation

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ANATOMIA DA MAMA	14
FIGURA 2 -	MARCAS MOLECULARES DO CÂNCER	16
FIGURA 3 -	SINALIZAÇÃO CANÔNICA POR TGF- β	22
FIGURA 4 -	METILAÇÃO DO DNA	24
FIGURA 5 -	CO - LOCALIZAÇÃO DA REGIÃO TRANSCRITA DO GENE <i>MMP2</i> COM A ILHA DE CPG	32
FIGURA 6 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ILHA DE CPG DO GENE <i>MMP2</i>	32
FIGURA 7 -	ILHA DE CPG DO GENE <i>MMP2</i> AMPLIFICADA POR PCR.....	33
FIGURA 8 -	EXPRESSÃO DO GENE <i>MMP2</i> NAS DIFERENTES CONDIÇÕES ANA- LISADAS.....	34
FIGURA 9 -	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE <i>MMP2</i> POR qRT-PCR	35
FIGURA 10 -	PADRÃO DE METILAÇÃO DO GENE <i>MMP2</i>	37

LISTA DE SIGLAS

- ACS – Sociedade Americana de Câncer
- ATF-2 – Fator de Transcrição Ativador 2
- CBD – Domínio de Ligação de Colágeno
- cDNA - DNA complementar
- CpG – Nucleotídeo C seguido de G
- CXCR4 – Receptor de quimiocina 4
- CXCL12 – Ligante de quimiocina 12
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- FN - Fibronectina
- GAPDH* – Gene da Gliceraldeído 3-phosfatase desidrogenase
- HPRT* – Gene da Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase
- IL-1 β – Interleucina 1 β
- INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
- MEC – Matriz Extracelular
- MMPs – Metaloproteases de Matriz
- MMP-2 – Metaloprotease de Matriz 2
- MMP2* – Gene da Metaloprotease de Matriz 2
- MMP-14 – Metaloprotease de Matriz 14
- NF- κ B – Fator Nuclear κ B
- PCR – Reação em cadeia da Polimerase
- qRT-PCR – Reação de PCR com Transcriptase Reversa em Tempo Real
- RNA – Ácido Ribonucleico
- RT-PCR – Reação de PCR com Transcriptase Reversa
- SFB – Soro Fetal Bovino
- TEM – Transição Epitelial-Mesenquimal
- TGF- β – Fator de Crescimento Transformante β
- TIMP-2 – Inibidor Tecidual de Metaloprotease de Matriz 2
- TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α
- TSS – Sítio de Início de Transcrição

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	O CÂNCER	13
2.1.1	O câncer de mama	14
2.2	MECANISMOS MOLECULARES DO CÂNCER E DAS METÁSTASES	15
2.3	METALOPROTEASES DE MATRIZ (MMPs)	18
2.3.1	Metaloprotease de Matriz do tipo 2 (MMP-2)	18
2.3.2	Fibronectina (FN)	19
2.3.3	Fator de Crescimento Transformante β (TGF- β)	20
2.4	EPIGENÉTICA	22
2.4.1	Metilação do DNA	23
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GERAL	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO	27
4.2	CULTIVO COM FIBRONECTINA E TGF- β	27
4.3	EXTRAÇÃO DE DNA E RNA E SÍNTESE DE cDNA	27
4.4	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE <i>MMP2</i>	28
4.4.1	Reação da Transcriptase Reversa (RT-PCR)	28
4.4.2	Reação da Transcriptase Reversa em Tempo Real (qRT-PCR)	28
4.4.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida	29
4.5	TRATAMENTO DO DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO	29
4.6	AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA ILHA DE CpG DO GENE <i>MMP2</i>	30
5	RESULTADOS	32
5.1	ANÁLISE IN SILICO DO GENE <i>MMP2</i>	32
5.2	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE <i>MMP2</i>	34
5.3	ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE <i>MMP2</i>	35
6	DISCUSSÃO	38
7	CONCLUSÕES	41
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

O câncer, nome dado a um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais, é uma das enfermidades que mais acometem pessoas em todo o mundo. Devido a sua carga e a sua alta taxa de mortalidade, o câncer vem chamando a atenção da comunidade médica e científica ao longo dos anos, sendo uma das doenças mais estudadas atualmente. Além disso, o câncer se caracteriza por ter uma causa multifatorial, envolvendo uma rede complexa de fatores externos e internos ao indivíduo (INCA, 2014).

O câncer de mama é o tipo mais comum de câncer que afeta as mulheres de todo o mundo, inclusive o Brasil (INCA, 2014). Seguindo as características do câncer descritas acima, o câncer de mama possui uma alta taxa de mortalidade associada ao diagnóstico tardio da doença. Porém, a maioria dos óbitos decorrentes do câncer de mama não provêm do tumor primário, mas sim das metástases (ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012).

A metástase é o processo pelo qual as células do tumor primário adquirem a capacidade de invadir o tecido adjacente e a corrente sanguínea ou linfática e colonizar tecidos distantes (HANAHAN E WEINBERG, 2000). O mecanismo pelo qual essas células adquirem essa capacidade ainda é obscuro, porém algumas moléculas e proteínas já foram postuladas por participarem desse processo. Um exemplo são as metaloproteases de matriz, em especial a MMP-2, endopeptidase que degrada componentes da matriz extracelular (MEC) (SBARDELLA *et al.*, 2012).

Sabe-se que essa proteína está superexpressa em tumores de mama (ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012) sendo associada com o processo de metástase e de pior prognóstico para os pacientes. Esse aumento da expressão é ocasionado pela sinalização de moléculas presentes no tecido adjacente ao tumor, o estroma. Uma dessas moléculas é a fibronectina, proteína pertencente à MEC que, adicionada ao cultivo de células tumorais de mama, foi capaz de aumentar a expressão do gene *MMP2* e a atividade da enzima (DAS *et al.*, 2008).

Outro aspecto importante do processo de metástase é a transição epitelial-mesenquimal, programa celular que altera o fenótipo da célula tumoral, tornando-a mais invasiva (TAM E WEINBERG, 2013). Uma molécula de sinalização

responsável pela indução e manutenção deste programa é o TGF- β , também liberado pelas células presentes no estroma, o tecido de sustentação do tumor primário. Ao sinalizar para as células tumorais, estas adquirem capacidade de migração e invasão, induzindo a expressão de proteínas como a MMP-2 (KIM, SOHN E MOON, 2007).

A epigenética é o ramo da ciência que estuda as modificações que acontecem ao redor do DNA, influenciando a expressão de genes, sem que haja alteração da sequência nucleotídica (WADDINGTON, 1942; MICELI *et al.*, 2014). A metilação do DNA, mecanismo epigenético mais estudado e elucidado, altera o padrão de expressão de genes, estando presente em patologias, como o câncer de mama. Sabe-se que o gene *MMP2* é regulado epigeneticamente pela metilação do DNA em linhagens tumorais de mama (CHERNOV *et al.*, 2009).

Em conjunto, essas informações trazem que a fibronectina influencia a expressão do gene *MMP2* e a atividade da proteína MMP-2 por mecanismos epigenéticos (DAS *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2014), e que a sinalização mediada por essa molécula é transitória (PEREIRA *et al.*, 2014). Porém, a sinalização constante de invasão mediada pelo estroma próximo ao tumor e a complexidade do processo de metástase nos permite predizer que existem outras moléculas envolvidas, além da fibronectina. Entre elas, o fator de sinalização TGF- β . Além disso, a manutenção do sinal de invasão pode estar fortemente correlacionada com os mecanismos epigenéticos.

Diante dos fatos expostos, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de um mecanismo epigenético, a metilação do DNA, em uma linhagem tumoral de mama tratada tanto com a fibronectina quanto com o TGF- β , no gene *MMP2*, e associar sua expressão com o processo de invasão e metástase no câncer de mama.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O CÂNCER

O câncer é um conjunto de doenças caracterizado pelo crescimento incontrolado e pela disseminação corporal de células anormais (ACS, 2014). Sua causa se estende a diversos fatores, sendo caracterizada como uma doença multifatorial (INCA, 2014). Dentre estes fatores, encontram-se os externos, como o tabaco, infecções e exposição a produtos químicos e à radiação; e os internos, como mutações hereditárias e não hereditárias, hormônios e pré-disposição do sistema imune. Todos esses fatores em conjunto ou isolados podem desencadear o desenvolvimento do câncer (ACS, 2014).

A incidência do câncer no país e no mundo tem aumentado nos últimos anos. Segundo estimativas da *American Cancer Society* (ACS), cerca de 1.665.540 novos casos de câncer serão diagnosticados no mundo todo, sendo que a estimativa não inclui carcinomas *in situ* e pele não melanoma. Em países em desenvolvimento, como o Brasil, isto se deve principalmente pelo crescimento e envelhecimento da população e pela redução da mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas (INCA, 2014). No Brasil, portanto, a incidência de diagnósticos de câncer também aumentou, e são esperados aproximadamente 576.000 novos casos de câncer, também excluindo os casos de pele não melanoma. Em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide (INCA, 2014).

Estas estimativas, válidas tanto para o ano de 2014 quanto para o ano de 2015, refletem a situação mundial da doença, e aumenta a carga do câncer no país (INCA, 2014). Este crescente aumento da carga da doença revela a fragilidade do sistema de saúde brasileiro em assistir às pessoas com câncer, bem como demonstra o quão incapacitante e impactante ela é, justificando a busca incessante por novas terapias.

Um dos tipos de câncer que mais acomete as mulheres no Brasil e no mundo é o câncer de mama, foco deste estudo, que será mais detalhado a seguir.

2.1.1 O câncer de mama

A mama é composta por estruturas conhecidas como lóbulos e ductos (Figura 1). Cada mama possui de 15 a 20 lóbulos, responsáveis pela produção do leite durante a gravidez e a amamentação. Os ductos são os canais que levam o leite produzido nos lóbulos para o ducto maior, que culmina no mamilo, para a ejeção do leite. Além destas estruturas principais, a mama possui vasos sanguíneos e linfáticos, e é composta de tecido adiposo e tecido conjuntivo, este mais conhecido como estroma (NCI-PDQ, 2014).

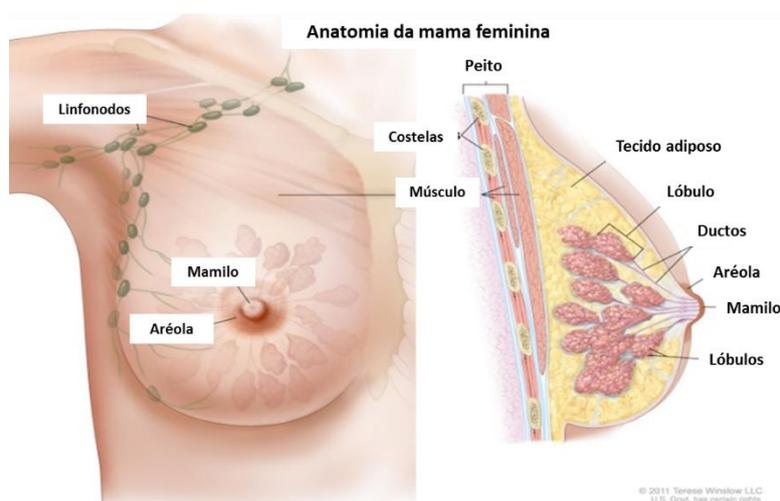


FIGURA 1 – ANATOMIA DA MAMA. Na imagem à esquerda, estão representados a auréola e o mamilo, estruturas externas da mama; e os linfonodos. À direita, a estrutura interna, com destaque para os lóbulos e ductos.

FONTE: Adaptado de *National Cancer Institute (NCI) – Physician Data Query (PDQ)*, (2014).

O câncer de mama é um dos tipos de câncer que mais acomete mulheres, sendo diagnosticado em 25% dos casos de câncer em mulheres no mundo todo (JEMAL, 2012). Para o Brasil, em 2014, são esperados 57.120 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2014).

Fatores ambientais e estilo de vida têm relevante importância no desenvolvimento do câncer de mama, uma vez que a incidência e mortalidade por essa neoplasia apresentam variação em relação à distribuição geográfica e à condição socioeconômica (TRICHOPOULOS *et al.*, 2008; INCA, 2014). As taxas de

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

Os principais tipos de câncer de mama acometem as suas duas estruturas características, os lóbulos e ductos. O carcinoma ductal, o mais comum, com 80% dos tumores diagnosticados, pode ser *in situ*, ou seja, o tumor encontra-se restrito à membrana basal do epitélio do ducto; ou invasivo, ultrapassando a membrana basal e atingindo outros tecidos, como o estroma. O outro tipo de câncer de mama, lobular, é mais raro, representando cerca 15% dos casos, e pode ser também *in situ* ou invasivo, sendo classificado pelas mesmas características descritas acima, para o ductal (NCI-PDQ, 2014; SCHMITT E GOBBI, 2006; BOMBONATI E SGROI, 2011).

O dado mais preocupante para o sistema nacional de saúde, no entanto, é a taxa de mortalidade associada a esta doença, que ainda permanece muito alta no Brasil. Conforme as estimativas do INCA para 2014 e 2015, essa alta taxa de mortalidade é devido, principalmente, ao diagnóstico tardio do câncer de mama, detectado nos estágios mais avançados da doença. A principal característica desse estágio avançado é a ocorrência de metástases. Portanto, no caso do câncer de mama, o tumor primário não é a principal causa de morte das pacientes, mas sim a distribuição de células tumorais à distância, as chamadas metástases, que serão descritas com mais detalhe adiante (WEIGELT *et al.*, 2005).

2.2 MECANISMOS MOLECULARES DO CÂNCER E DAS METÁSTASES

Hanahan e Weinberg (2011) já caracterizaram o câncer quanto às suas principais marcas moleculares. Foram descritas dez marcas moleculares que promovem a progressão tumoral. São elas: manutenção dos sinais de proliferação; escape da ação de supressores de tumor; resistência a sinais indutores de morte celular; indução de imortalidade replicativa e de angiogênese; ativação de invasão e metástase; instabilidade genômica e mutações; inflamação pró-tumoral; alteração do metabolismo energético; e evasão do sistema imune (Figura 2). A

carcinogênese se dá, então, sob o desenvolvimento dessas marcas, que acontecem em conjunto ou exclusivamente (HANAHAN E WEINBERG, 2011). Compreender cada uma dessas características e desvendar como funcionam no câncer e a favor do câncer são os desafios que a ciência e clínica enfrentam atualmente, indo de encontro com a complexidade que a doença representa.

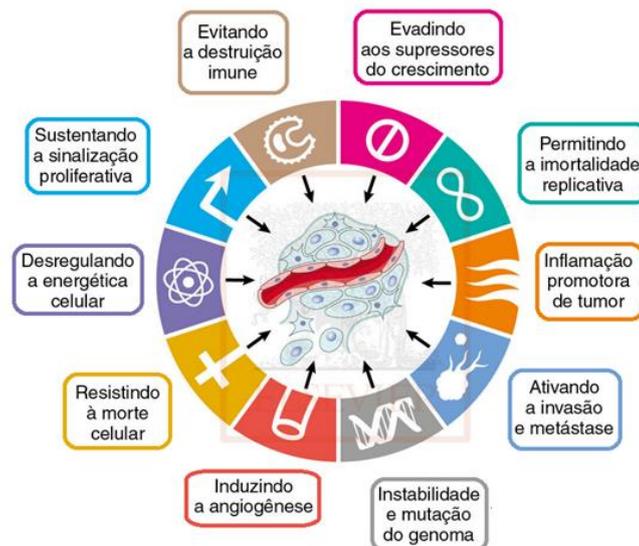


FIGURA 2 – MARCAS MOLECULARES DO CÂNCER. A imagem representa as dez marcas moleculares do câncer: manutenção dos sinais de proliferação, escape dos supressores de tumor, evasão do sistema imune, ativação da imortalidade replicativa, inflamação pró-tumoral, ativação de invasão e metástase, indução de angiogênese, instabilidade genômica e mutação, resistência à apoptose e alteração no metabolismo energético.

FONTE: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

Além disso, o microambiente tumoral tem um papel crítico como regulador na progressão tumoral por seu contato direto com as células tumorais, atuando como uma fonte importante de fatores de crescimento, de motilidade, angiogênicos, entre outros que afetam significativamente a biologia tumoral, como as metástases e resistência à terapia (BISSELL *et al.*, 2002; OHTANI, 1998).

Em algum momento durante o desenvolvimento da maioria dos tipos de cânceres humanos, a massa do tumor primário pode gerar algumas células que passam a invadir tecidos adjacentes e depois adquirem a capacidade de migração para locais distantes, aonde podem se estabelecer para formar novas colônias, denominadas metástases (HANAHAN E WEINBERG, 2000).

O processo de metástase pode ser definido como o espalhamento das células do tumor para outros locais do corpo, colonizando outros tecidos e formando tumores secundários. Este processo pode ser dividido basicamente em duas etapas principais: a disseminação física das células cancerosas do tumor primário para tecidos distantes; e a adaptação dessas células ao microambiente desses tecidos distantes, resultando em uma colonização bem sucedida (TALMADGE E FIDLER, 2010). Este sucesso na colonização de órgãos distantes reflete a malignidade dessas células, e implica nas altas taxas de mortalidade para o câncer de mama, que pode chegar até 90% (ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012).

Para o câncer de mama, os principais alvos de colonização das células metastáticas são os pulmões, o fígado, os ossos, linfonodos e cérebro. Não obstante, sabe-se que a colonização de órgãos secundários no processo de metástase não acontece de forma aleatória. Isso ocorre pela ligação de receptores de quimiocinas, expressas pelas células tumorais, com seus ligantes específicos, expressos pelas células do tecido a ser colonizado. No caso do câncer de mama, o receptor CXCR4, superexpresso em células tumorais mamárias, se liga à quimiocina CXCL12, expressa preferencialmente nos principais tecidos-alvo de metástase, como pulmões e ossos, direcionando a colonização das células tumorais (MULLER *et al.*, 2000).

Porém, para que as células tumorais atinjam a corrente sanguínea ou linfática e se espalhem para outros órgãos, é necessário que ultrapassem barreiras teciduais. Uma dessas barreiras é o estroma, tecido conjuntivo de sustentação da mama e suas estruturas. O estroma é composto por membrana basal, leucócitos, capilares, fibroblastos e pela matriz extracelular (MEC), localizada em torno das células tumorais (KASPAR *et al.*, 2006). A MEC é formada por elementos fluidos, como glicosaminoglicanas e proteoglicanas; e fibrosos, como as proteínas estruturais, dentre elas o colágeno, e proteínas adesivas, como fibronectina e laminina (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2005).

Tendo isso em vista, a degradação dos componentes da MEC é um passo essencial para que a metástase ocorra, e as proteínas degradantes de matriz extracelular desempenham um papel chave neste processo.

2.3 METALOPROTEASES DE MATRIZ (MMPs)

Proteases produzidas pelo tumor e pelas células do estroma são as responsáveis pela degradação da MEC e sua expressão é normalmente associada a um prognóstico ruim (ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012). Entre elas, destacam-se as metaloproteases de matriz (MMPs), que são endopeptidases zinco-dependentes que atuam na clivagem de diversos substratos constituintes da MEC (STAMENKOVIC, 2000). Atualmente, estão descritas 24 endopeptidases da família das MMPs (SBARDELLA *et al.*, 2012). Essas enzimas são responsáveis pelo remodelamento de tecidos e pelo desenvolvimento de certos órgãos, e na regulação de processos inflamatórios, de maneira fisiológica. Além disso, estão envolvidas em algumas patologias, dentre elas, o câncer (KESSENBROCK *et al.*, 2011).

Geralmente, a atividade das MMPs é regulada fisiologicamente de maneira intrínseca para evitar perturbações na arquitetura tecidual. Nos diversos tipos de câncer, no entanto, esta atividade torna-se desregulada, inclusive no câncer de mama (ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012). Estudos demonstram que essas enzimas são altamente expressas nos estágios iniciais de invasão tumoral e estão envolvidas nas etapas iniciais da carcinogênese mamária (STAMENKOVIC, 2000; ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012). Dentre elas, uma das mais estudadas e mais descritas é a metaloprotease de matriz do tipo 2, a MMP-2, alvo deste estudo.

2.3.1 Metaloprotease de Matriz do tipo 2 (MMP-2)

A MMP-2 ou gelatinase A é uma enzima membro da classe das gelatinases, assim denominadas pela presença de um sítio catalítico de ligação de colágeno (*Collagen Binding Domain - CBD*), capaz de degradar colágeno do tipo IV (SBARDELLA *et al.*, 2012). A MMP-2 é secretada na forma de zimogênio (pró-MMP-2), ou seja, para sua ativação é necessária a clivagem pós-traducional do seu pró-domínio na presença das moléculas TIMP-2 e MMP-14, na superfície celular (SBARDELLA *et al.*, 2012).

Essa metaloprotease de matriz é expressa constitutivamente em quase todos os tecidos humanos, principalmente por fibroblastos, células endoteliais e

epiteliais, estando envolvida em diversos processos biológicos e também patológicos, como neoplasias, doenças cardiovasculares e autoimunes (SBARDELLA *et al.*, 2012). Além da sua função principal de degradação de colágeno, a MMP-2 também participa da ativação proteolítica de fatores de crescimento do estroma, como o fator de crescimento transformante beta (*Transforming Growth Factor beta* – TGF- β), fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alfa* – TNF- α) e interleucina um beta (IL-1 β) (KRSTIC E SANTIBANEZ, 2014).

No câncer, se encontra superexpressa em uma variedade de tumores malignos. Níveis elevados de MMP-2 são encontrados em tumores de mama, cérebro, ovário, pâncreas, cólon e reto, bexiga, próstata e pulmão, e em câncer de pele do tipo melanoma. Sua expressão e atividade está comumente associada com agressividade do tumor e pior prognóstico (BAUVOIS, 2012). Isso acontece porque a metaloprotease MMP-2 atua na degradação final das fibras de colágeno, possibilitando a remodelagem da MEC e, deste modo, facilitando a migração das células tumorais a partir do tecido circundante (ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012).

Por conseguinte, estudar os fatores que influenciam no aumento da expressão desta proteína podem ajudar na melhora do prognóstico da doença e no desenvolvimento de terapias associadas, no intuito de melhorar o tratamento ou até parar o processo de metástase.

2.3.2 Fibronectina (FN)

A MEC, citada anteriormente como componente do estroma, não é apenas um meio de suporte mecânico, mas também um modulador de sinais para as células (LELIÈVRE, 2009). Nesse contexto, sabe-se que a degradação da MEC pela MMP-2 é capaz de gerar ou liberar moléculas bioativas que influenciam na progressão tumoral. Tais moléculas fazem parte da rede de informação contida na MEC que pode desencadear, por exemplo, migração celular e angiogênese (BAUVOIS, 2012).

Diante disso, a relação entre as metaloproteases e as proteínas que compõem a MEC tem uma importância primordial na progressão de tumores. A MEC compõe o microambiente no qual as células estão inseridas, e é composta por, dentre outras moléculas citadas anteriormente, fibronectina (FN) em baixas

quantidades (LELIÈVRE, 2009). Por sua vez, a fibronectina desempenha muitas funções biológicas incluindo a integridade estrutural da MEC, a ligação entre as células, migração, controle da morfologia e diferenciação celular (STEFFENSEN *et al.*, 2002). Entretanto, essa proteína não está presente no tecido normal da mama, mas apresenta-se altamente expressa em tumores mamários (IOACHIM *et al.*, 2002), estando associada à malignidade do tumor e ao prognóstico da doença (HELLEMAN *et al.*, 2008). A expressão da FN está relacionada com a transição epitelial-mesenquimal (TEM), que constitui um evento inicial para as metástases (HELLEMAN *et al.*, 2008; PARK E SCHWARZBAUER, 2013).

Durante a TEM, algumas proteínas têm sua expressão aumentada, como a FN e a MMP-2, a qual participa ativamente desse processo (PARK E SCHWARZBAUER, 2013). Feng e colaboradores (2007) avaliaram o perfil de expressão gênica em tumores primários de mama e em tumores metastáticos linfonodo-positivos e observaram que os genes que codificam as proteínas MMP-2 e fibronectina estavam mais expressos em tumores primários. Esse perfil é indicativo do envolvimento inicial dessas moléculas no processo metastático, no qual é necessária inicialmente a adesão das células tumorais à membrana basal, mediada por moléculas da MEC, tais como a fibronectina; e, então, a degradação dessa membrana, que ocorre por meio de proteases, como a MMP-2, para que aconteça a invasão de vasos sanguíneos e linfáticos (FENG *et al.*, 2007).

Além disso, Das e colaboradores (2008) constataram o aumento da expressão e da atividade de MMP-2 na linhagem tumoral de mama MCF-7 cultivada com FN. Os autores propuseram vias de sinalização que poderiam estar envolvidas no processo de ativação da enzima, porém não avaliaram os fatores responsáveis por regular a expressão desse gene e aumentar a atividade da MMP-2.

2.3.3 Fator de Crescimento Transformante β (TGF- β)

Geralmente, as células inseridas no tumor primário apresentam características predominantemente epiteliais. No entanto, para que possam invadir o tecido adjacente, se disseminarem e formarem colônias metastáticas em tecidos distantes, as células neoplásicas epiteliais precisam mudar, no mínimo por um

curto período de tempo, para um fenótipo mais mesenquimal. Para tanto, as células precisam ativar um programa biológico complexo denominado transição epitelial-mesenquimal (TEM) (TAM E WEINBERG, 2013). Durante a TEM, as células cancerosas perdem suas características epiteliais, incluindo adesão célula-célula, polaridade e imobilidade; e adquirem traços mesenquimais, como a mobilidade, capacidade de invasão e vários atributos de células-tronco (TAM E WEINBERG, 2013).

Acredita-se que, tanto em células neoplásicas quanto em situações fisiológicas, a ativação do programa de TEM depende de uma convergência de sinais múltiplos que a célula recebe do microambiente ao seu redor. Logo, fatores de sinalização parácrina e autócrina são responsáveis por induzir e manter o programa, ativando uma diversa rede de vias intracelulares correspondentes (TAM E WEINBERG, 2013). Dentre esses fatores de sinalização, destaca-se o TGF- β , importante mediador que desencadeia cascatas responsáveis por induzir o programa da TEM durante o período embrionário e na progressão tumoral (ZAVADIL E BÖTTLINGER, 2005).

O TGF- β sinaliza canonicamente através de dois receptores de serina / treonina-quinases distintos, TGF- β R1 e TGF- β R2, que, em seguida, fosforilam proteínas Smad2 ou Smad3 citoplasmáticas. As Smad2 ou Smad3 fosforiladas e ativas formam complexos com Smad4, que, em seguida, translocam para o núcleo para regular os genes que são importantes no controle do destino celular (Figura 3). Em vários carcinomas, a sinalização por TGF- β é comumente hiperativada e promove a invasão e metástase (ZAVADIL E BÖTTLINGER, 2005). Por consequência, a inibição da sinalização por TGF- β tem o potencial de bloquear a indução do programa de TEM e, portanto, a progressão da doença.

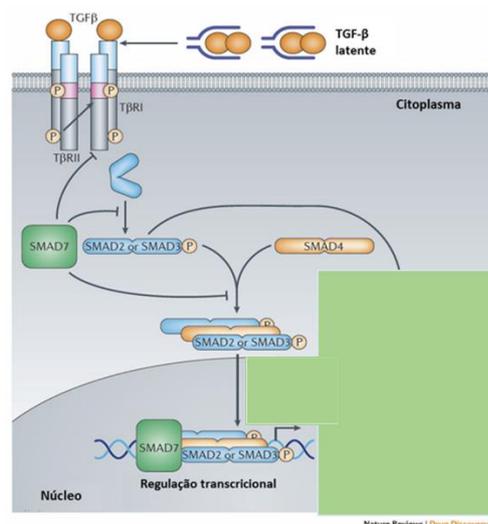


FIGURA 3– SINALIZAÇÃO CANÔNICA POR TGF-β. A imagem apresenta a via de sinalização clássica do TGF-β, via Smad2/3. O ligante se liga no receptor serina/treonina quinase que fosforila e ativa as Smads que, associadas a outras proteínas intranucleares, funcionam como fatores de transcrição gênica.

FONTE: Adaptado de Akhurst e Hata (2012).

A sinalização por TGF-β também resulta na regulação epigenética direta de genes-alvo, sendo que as próprias Smad2 e Smad3 estão associadas com certos reguladores epigenéticos, responsáveis pela abertura da cromatina e metilação do DNA de determinados genes (XI *et al.*, 2011). Por exemplo, o TGF-β do tipo 1 (TGF-β1) induz a expressão de colágeno do tipo I em fibroblastos cardíacos por alterações na metilação do DNA (PAN *et al.*, 2013). Além disso, o silenciamento do supressor de tumor *p15ink4b* por metilação diante da sinalização por TGF-β também já foi observado (THILLAINADESAN *et al.*, 2012). Já Khin e colaboradores (2011) observaram a hipermetilação de promotores de vários genes relacionados com a sinalização por TGF-β no câncer.

2.4 EPIGENÉTICA

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

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

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

2.4.1 Metilação do DNA

Uma das modificações epigenéticas melhor descritas em eucariontes é a metilação do DNA. O processo de metilação ocorre quando um grupo metil oriundo da 5-adenosilmetionina (SAM – doador universal de metil) é adicionado à posição 5 do anel pirimídico da citosina (C), gerando a 5-metilcitosina (5mC), processo este catalisado pelas enzimas DNA Metiltransferases (DNMTs) (BIRD, 2007; AUCLAIR E WEBER, 2012) (Figura 4).

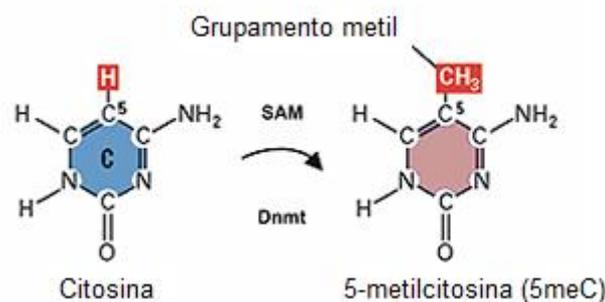


FIGURA 4 – METILAÇÃO DO DNA. A enzima DNMT insere um grupamento metil no carbono 5 da citosina seguida de guanina, a partir da molécula S-adenosil-metionina (SAM).

FONTE: Adaptado de < http://www.hgu.mrc.ac.uk/people/r.meehan_researchb.html > .

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

vista a existência da grande quantidade de DNA repetitivo presente no genoma humano (REIK, 2007).

A metilação do DNA ocorre quase exclusivamente no contexto de dinucleotídeos CpG, que são pouco frequentes no genoma, exceto em sequências curtas de DNA denominadas 'ilhas de CpG', que possuem alta densidade desses dinucleotídeos (BIRD, 1986; AUCLAIR E WEBER, 2012). Quando uma região apresenta um tamanho maior do que 0,5 kb de DNA e contém mais do que 55% de nucleotídeos CG é denominada como ilha de CpG (GARDINER-GARDEN, 1987). As ilhas de CpG encontram-se geralmente posicionadas nas regiões 5' dos genes, ou seja, associadas às suas regiões promotoras e reguladoras (ANTEQUERA, 2003; AUCLAIR E WEBER, 2012). A maioria das ilhas de CpG encontra-se não metilada em todos os estágios do desenvolvimento de todos os tipos de tecido (ANTEQUERA, 2003). Nos casos em que ocorre metilação da ilha de CpG, há a repressão da transcrição deste gene, que pode ocorrer através da inibição da ligação dos fatores de transcrição ou por mudança na estrutura da cromatina (BIRD, 2007; NOWSHEEN *et al.*, 2012).

Os perfis de metilação do DNA apresentam-se modificados em muitas doenças, em particular em todos os tipos de câncer, que mostram tanto uma ampla hipometilação do genoma como uma hipermetilação incomum de genes supressores de tumores ou de RNAs não-codificantes (FEINBERG E VOGELSTEIN, 1983; AUCLAIR E WEBER, 2012). Em tecidos tumorais, genes supressores de tumor são muitas vezes inativados epigeneticamente por metilação, quando comparados com o tecido normal (NOWSHEEN *et al.*, 2012). A metilação de ilhas de CpG desempenha um importante papel na regulação transcricional, a qual geralmente é alterada em processos patológicos (DAWSON E KOUZARIDES, 2012).

Um exemplo de alteração do padrão de metilação em processos patológicos é a expressão do gene da MMP-2 no câncer. Chernov e colaboradores (2009) estudaram a influência da metilação na ilha de CpG do promotor do gene *MMP2* na linhagem tumoral de mama MCF-7. Um método de análise de expressão gênica é tratar diferentes linhagens tumorais de mama com diferentes substâncias e comparar o perfil de metilação adquirido, correlacionando-o com a expressão da proteína MMP-2 e sua função no processo de invasão e metástase no câncer.

Neste contexto, a equipe do laboratório realizou um trabalho que relacionou a expressão gênica e a atividade proteica da MMP-2 em linhagens tumorais de mama à exposição da FN ao longo de diferentes intervalos de tempo, e investigou os mecanismos moleculares que participam desta indução. Os achados, envolvendo mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA e a marcação de histonas, comprovaram a indução da expressão do gene pela exposição à FN, e propuseram a elaboração da teoria de que a sinalização imposta pela fibronectina é transitória (PEREIRA *et al.*, 2014). Entretanto, acredita-se que outras moléculas estejam envolvidas no programa de TEM e metástase, como, por exemplo, o TGF- β .

Ademais, a relação entre o TGF- β e as MMPs no câncer já foi descrita, sendo que a sinalização por TGF- β em células tumorais e do estroma induz a expressão de MMPs (KRSTIC E SANTIBANEZ, 2014). A indução da expressão de MMP-2, inclusive, já foi observada por alguns autores (KIM, SOHN E MOON, 2007; BINKER *et al.*, 2011). Kim e colaboradores (2007) observaram a indução da expressão da proteína via um fator de transcrição envolvido com a via de sinalização do TGF- β , o ATF-2. Já Binker e colaboradores (2011) constataram o aumento da expressão de MMP-2 pela via de sinalização inflamatória induzida pelo TGF- β , via NF- κ B, por exemplo. Contudo, relações entre a regulação epigenética do gene *MMP2* induzida por TGF- β ainda não foram feitas ou descritas.

Por esse motivo, estudar os mecanismos epigenéticos pelo qual o TGF- β pode influenciar a expressão de genes, inclusive o gene *MMP2*, é um alvo para a maior compreensão de sua influência no processo de TEM e metástase. Para tanto, é necessário que se compreenda a epigenética e os mecanismos pelo qual atua, descritos a seguir.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do TGF- β e da fibronectina em diferentes cultivos sobre o mecanismo epigenético de metilação do DNA que regula a expressão do gene *MMP2* na linhagem tumoral de mama MCF-7.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o padrão de expressão do gene *MMP2* após o cultivo da linhagem MCF-7 com TGF- β e FN em diferentes cultivos através de PCR quantitativo;
- Clonar e sequenciar a ilha de CpG do promotor do gene *MMP2* da linhagem MCF-7 após os cultivos com TGF- β e FN;
- Avaliar a diferença no padrão de metilação da ilha de CpG do promotor do gene *MMP2* após os diferentes cultivos;
- Correlacionar o padrão de expressão com o padrão de metilação avaliados de acordo com os cultivos feitos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

A linhagem celular utilizada neste projeto, MCF-7, foi cedida pelo Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer (SP). O cultivo da linhagem foi realizado em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Gibco) a 10%, glutamina 2 mM e gamicina 40 µg/ml, em estufa com tensão de 5% de CO₂ e a 37°C.

4.2 CULTIVO COM FIBRONECTINA E TGF-β

Em uma placa de seis poços de 35 mm de diâmetro, as células da linhagem MCF-7 foram cultivadas com 10 ng/ml de TGF-β (Sigma) por dez dias (ZHOU *et al.*, 2013). No décimo dia de cultivo, as células foram lavadas quatro vezes com PBS 1x, retiradas dos poços com *Tryple* (Gibco) por quatro minutos, centrifugadas e lavadas três vezes com meio RPMI sem soro fetal bovino (SFB) e contadas. Cerca de 3 x 10⁵ células foram adicionadas a três poços contendo 40 µg/ml de FN (Gibco) e meio RPMI sem SFB (DAS *et al.*, 2008). A placa foi incubada por 5 horas em estufa a 37°C com tensão de 5% de CO₂. Concomitantemente, manteve-se um poço de células sem cultivo, como controle.

Em uma placa de seis poços com 35 mm de diâmetro, as células da mesma linhagem foram plaqueadas em três poços contendo 40 µg/ml de FN, e incubadas durante 24 horas. Após esse período, o meio de cultivo foi retirado, as células foram lavadas com PBS 1x e o meio RPMI completo com 10 ng/ml de TGF-β foi adicionado. As células foram incubadas em estufa a 37°C com tensão de 5% de CO₂, e mantidas em cultivo durante dez dias.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA E RNA E SÍNTESE DE cDNA

Após os cultivos, as células foram submetidas à extração de DNA e RNA utilizando o *AllPrep Kit* (Qiagen), conforme especificações do fabricante. O RNA

total purificado foi então submetido à síntese de cDNA, utilizando-se o *High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems)*, conforme protocolo do fabricante. Para tal, foram utilizados aproximadamente 1000 ng de RNA total, 1 µl de RT enzima mix 20X e 10 µl de tampão 2X, em um volume total de 20 µl de reação. Como controle de síntese de cDNA foi utilizado o gene de expressão constitutiva *GAPDH*, com os iniciadores universal 5' – CTGCACCACCAACTGCTTA – 3' e *GAPDH* reverso 5' – CATGACGGCAGGTCAGGTC – 3', sob as condições: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos; 3 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, 35 vezes; e 1 ciclo de 72°C por 5 minutos. As reações foram realizadas em um volume final de 20 µL, contendo 1 µL de cDNA, tampão 1X de PCR (Invitrogen), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 200 µM, 1 U/µl de *Taq Platinum* (Invitrogen) e 8 pmoles de cada um dos iniciadores específicos. O tamanho do fragmento esperado é de 296 pb.

4.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE *MMP2*

4.4.1 Reação da Transcriptase Reversa (RT-PCR)

Os iniciadores específicos utilizados para a amplificação do gene *MMP2* foram: universal 5' – TACACCTACACCAAGAACTTC – 3' e reverso 5' – GTCCTTGAAGAAGATCTC – 3'. As condições de amplificação para o gene *MMP2* foram 1 ciclo de 95°C por 5 minutos; 3 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, 35 vezes; e 1 ciclo de 72°C por 5 minutos. As reações foram realizadas em um volume final de 20 µL, contendo 1 µL de cDNA, tampão 1X de PCR (Invitrogen), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 200 µM, 1 U/µl de *Taq Platinum* (Invitrogen) e 8 pmoles de cada um dos iniciadores específicos. O tamanho do fragmento esperado é de 194 pb.

4.4.2 Reação da Transcriptase Reversa em Tempo Real (qRT-PCR)

Para o desenvolvimento desta técnica foram utilizados os iniciadores: para o gene normalizador *HPRT*, universal 5' –GAACGTCTTGCTCGAGATG-TGA- 3' e reverso 5' – TCCAGCAGGTTCAGCAAAGAAT - 3'; e para o gene alvo *MMP2*, universal 5'- AGCTCCCGGAAAAGATTGATG - 3' e reverso 5' – CAGGG-TGCTGGCTGAGTAGAT - 3'.

Primeiramente, foram realizados ensaios para determinação do fator de diluição de cada par de iniciadores utilizados, do fator de diluição de cada amostra de cDNA, da curva de eficiência de cada par de iniciadores utilizados e, por fim, a quantificação da expressão do gene na linhagem estudada. Para o desenvolvimento do protocolo da PCR em tempo real foram utilizados: *SYBR®Green 1x (Applied Biosystems)*, os iniciadores em concentrações testes de 150 nM, 300 nM, 600 nM e 900 nM; e o cDNA alvo em diluições testes de 1:2, 1:5, 1:10, 1:50 e 1:100, em sistemas de 10µL no equipamento *StepOne Plus (Applied Biosystems)*. Todos os ensaios foram acompanhados pela realização de controles negativos, que consistiram na adição de todos os reagentes, exceto a enzima.

Os resultados obtidos foram submetidos ao método estatístico $\Delta\Delta C_t$, um dos métodos mais utilizados para determinar as diferenças nas concentrações de amostras distintas (BUSTIN, 2009). Os valores de $\Delta\Delta C_t$ foram posteriormente aplicados na fórmula de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, que possibilitou a construção de gráficos que facilitaram a visualização dos resultados obtidos (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Os gráficos obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o teste *t* de *Student*, e apenas os dados com $p < 0,05$ foram considerados.

4.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

O produto da reação de RT-PCR foi visualizado em gel de poliacrilamida 8%, após eletroforese em tampão TBE 1x, a 80V por uma hora e 30 minutos. Os géis de poliacrilamida 8% foram preparados utilizando-se uma solução de acrilamida e bisacrilamida na proporção 29:1, TEMED a 0,1% (*Life Technologies*) como doador de elétrons da reação e persulfato de amônio (APS) a 0,1% como catalisador da reação. A revelação dos resultados é feita pela impregnação com nitrato de prata segundo o método (SANGUINETTI *et al.*, 1994).

4.5 TRATAMENTO DO DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO

O bissulfito de sódio promove a desaminação de citosinas não metiladas convertendo-as em uracila (que após a reação de PCR são convertidas em timinas). As citosinas metiladas mantêm-se como citosinas, já que o grupamento metil protege contra a primeira etapa da reação de desaminação (CLARK *et al.*, 1994). O tratamento com bissulfito de sódio do DNA extraído dos dois cultivos foi realizado com o kit *Epitect* (Qiagen), seguindo-se o protocolo do fabricante.

Para avaliar a eficiência dessa técnica no tratamento do DNA, foi realizada um *nested*-PCR para a sequência satélite SATR-1. Esta sequência foi caracterizada como hipometilada em amostras tumorais de câncer de mama (COSTA *et al.*, 2006). Esta característica lhe é conferida pela alta taxa de nucleotídeos T na região analisada. Para a reação *nested*, que consiste de duas reações com diferentes condições de adstringência, foram utilizadas as temperaturas de anelamento sendo 56, 58 e 60°C. Os iniciadores utilizados para a amplificação do controle SATR-1 foram: Universal-1 5' – GTTATATTATTTTTGTTTTTTG – 3', Reverso-1 5' – ACATTCCTTATAATATTATTCC – 3', Universal-2 5' – TATAGTGGTGGTGTATATTTG – 3' e Reverso-2 5' – CACCTAACCTATAATATTTCTTC – 3' de acordo com Costa *et al.*, 2006.

4.6 AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA ILHA DE CpG DO GENE *MMP2*

A amplificação da ilha de CpG do promotor do gene *MMP2* foi feita utilizando-se os iniciadores universal 5' – AAGGGATTGTTAGGATTTG – 3' e reverso 5' – ACTCTTTATCCRTTTAAAC – 3' (CHERNOV *et al.*, 2009). As condições de amplificação foram 95°C por cinco minutos; três ciclos de 94°C por 45 segundos, 51°C por 45 segundos e 72°C por dois minutos, uma vez; seguido de três ciclos de 94°C por 45 segundos, 53°C por 45 segundos e 72°C por dois minutos, cinco vezes; seguido de três ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por dois minutos, 38 vezes; por fim, um ciclo de 72°C por cinco minutos.

Após a reação de PCR, os produtos dos dois cultivos foram purificados a partir de eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando-se o protocolo do *QUIAEX II Gel Extration Kit* (Qiagen). Os produtos purificados foram em seguida

clonados no vetor *pGEMTeasy*[®] (Promega), e eletroporados em estirpe de *Escherichia coli* DH10B. Os clones recombinantes foram selecionados por α -complementação e submetidos à reação de PCR de colônia para a confirmação da presença do inserto. Cerca de 12 clones que se mostraram positivos na PCR de colônia foram submetidos à extração de DNA plasmidial, utilizando o *kit QiaPrep* (Qiagen). Em torno de 300 a 500 ng de cada preparação foram sequenciadas utilizando-se o *kit Big Dye terminator* e o sequenciador XL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE IN SILICO DO GENE *MMP2*

O gene *MMP2* localiza-se no cromossomo 16q13-q21, possui 31.017 pares de base e 13 éxons. A figura 5 co-localiza a região transcrita do gene (mRNA) no cromossomo 16, bem como a ilha de CpG alvo desse estudo.

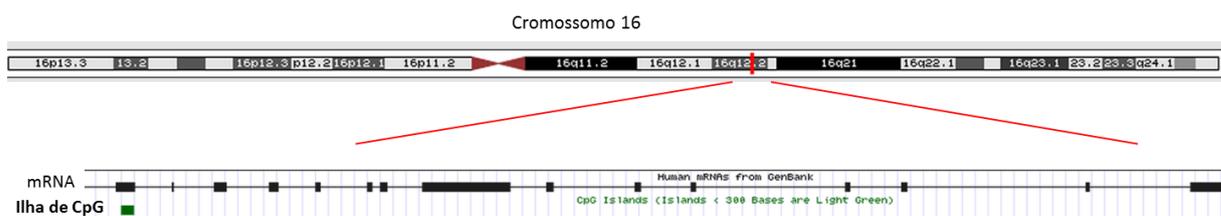


FIGURA 5 – CO - LOCALIZAÇÃO DA REGIÃO TRANSCRITA DO GENE *MMP2* COM A ILHA DE CpG. Localização do gene *MMP2* no cromossomo 16, representado por um traço vermelho; bem como da região transcrita do gene (mRNA), abaixo, em traços pretos; e da ilha de CpG alvo do estudo, representada por um traço verde.

FONTE: Adaptado do software *BLAT*, disponível em: <http://genome.ucsc.edu/FAQ/FAQblat.html>

A região compreendendo 2550 pares de bases, que engloba desde a região promotora até o início do primeiro éxon, foi avaliada para o gene *MMP2* utilizando o programa *Methprimer* (Figura 6).

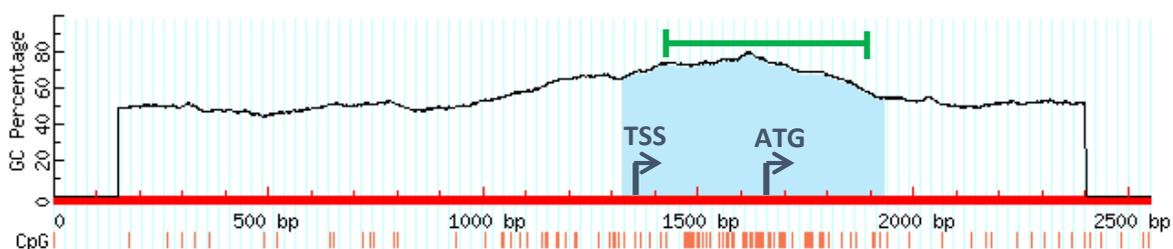


FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ILHA DE CpG DO GENE *MMP2*. A ilha de CpG está representada pela sombra azul, na região promotora do gene (1,5 kb a montante e 1,5 kb a jusante do início de transcrição do gene *MMP2*). O traço verde indica a região avaliada neste projeto, e as flechas indicam o início da transcrição (TSS) e o início da tradução (códon ATG).
FONTE: Adaptado do software *Methprimer*, disponível em: <http://www.urogene.org/methprimer>.

A região escolhida compreende uma sequência de 396 pares de bases que contém 49 dinucleotídeos CG e está destacada com um traço verde na Figura 6. Esta ilha está posicionada entre os nucleotídeos + 111 e + 446, e con-

5.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE *MMP2*

Os produtos de RT-PCR dos dois cultivos foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% e revelados com nitrato de prata. Além destes produtos, foram aplicados também os produtos de RT-PCR da mesma linhagem submetida ao cultivo com FN por 24 horas e ao cultivo com TGF- β a 10 ng/ml por dez dias. Estes cultivos foram realizados por outras alunas do laboratório, e serão utilizados para comparação e análise com os resultados obtidos neste trabalho. O produto de amplificação do gene *MMP2* possui 194 pares de base, e o produto do gene endógeno de controle da síntese de cDNA, *GAPDH*, possui 296 pares de base (Figura 8).

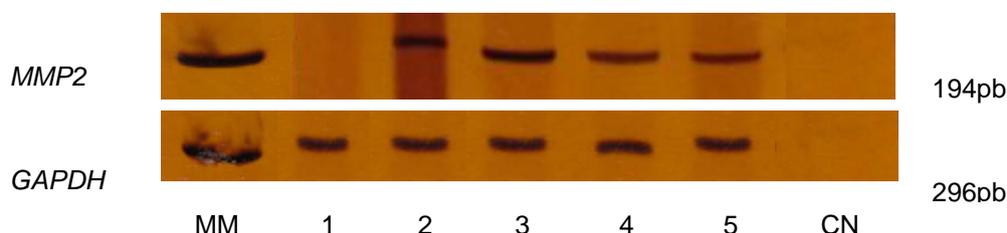


FIGURA 8 – EXPRESSÃO DO GENE *MMP2* NAS DIFERENTES CONDIÇÕES ANALISADAS. Os números representam as diferentes amostras: 1, MCF-7 normal; 2, MCF7 cultivada com FN; 3, MCF-7 cultivada com TGF- β ; 4, MCF-7 cultivada com TGF- β e FN; e 5, MCF-7 cultivada com FN e TGF- β . MM: marcador molecular de massa; e CN: controle negativo. FONTE: O autor (2014).

Na linhagem tumoral de mama MCF-7 não há a expressão do gene *MMP2*, como pode ser observado pela ausência de banda no gel de poliacrilamida da Figura 8. Portanto, todas as condições de cultivo avaliadas induziram a expressão do gene *MMP2*, pois apresentaram a banda de 194 pares de base no gel. Para quantificar a expressão do gene *MMP2* após as condições de cultivo, a técnica de qRT-PCR foi realizada e os dados estão representados na Figura 9 a seguir.

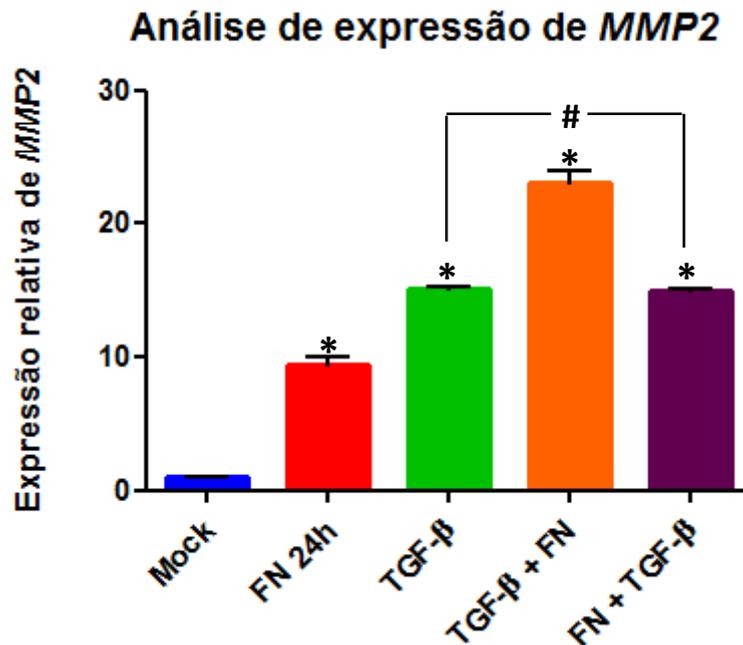


FIGURA 9 – GRÁFICO DA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *MMP2* POR qRT-PCR. No eixo y, a quantidade de expressão relativa ao controle Mock, calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. No eixo x, as amostras com as diferentes condições de cultivo. Amostras marcadas com * são significativamente diferentes ($p < 0,05$) do controle (Mock). O símbolo # indica diferença estatisticamente relevante ($p < 0,05$) da amostra TGF-β + FN em relação às amostras TGF-β e FN + TGF-β.

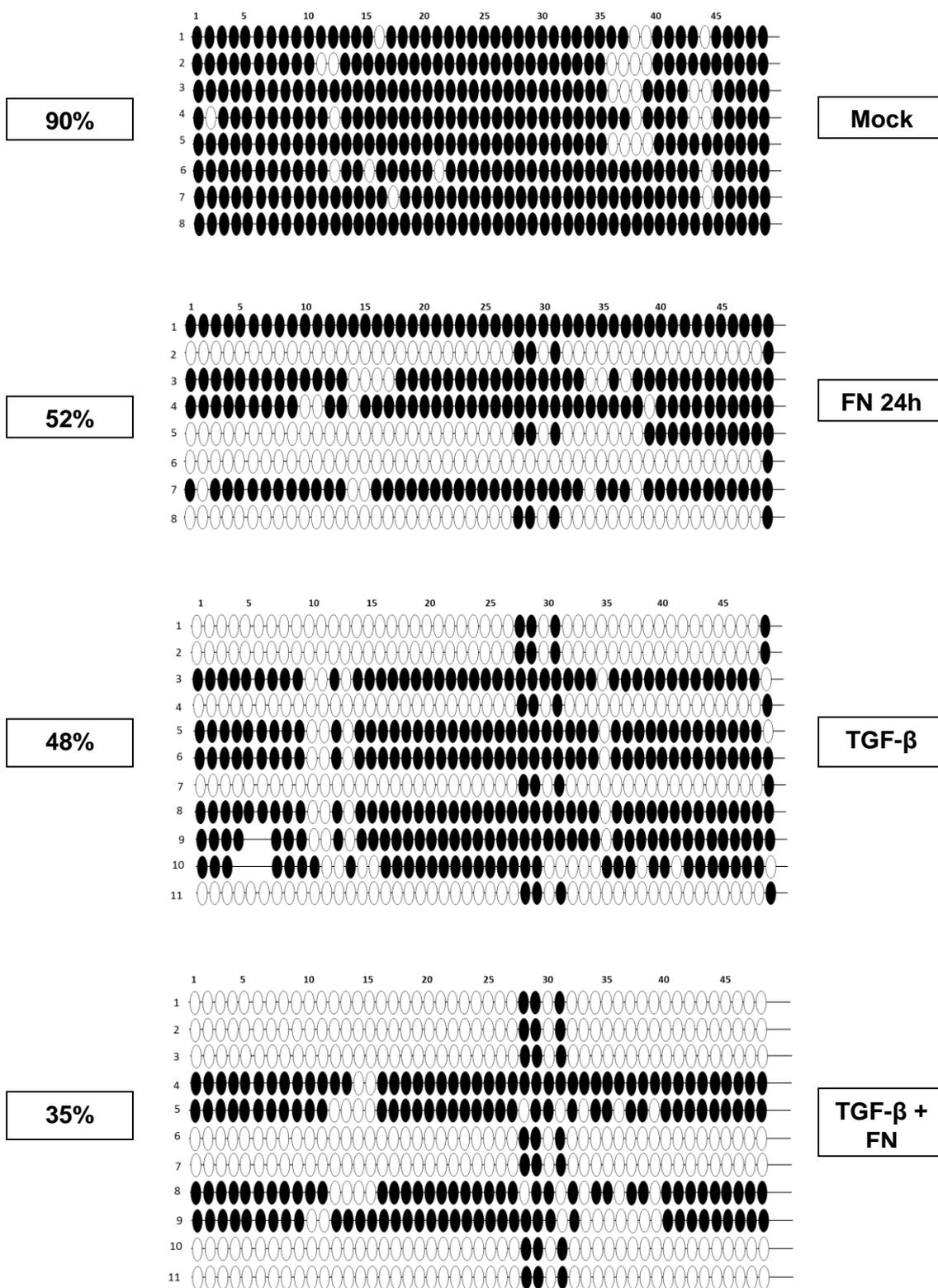
FONTE: O autor (2014).

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar um aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão relativa de *MMP2* comparados com o controle. A amostra que teve o maior aumento da expressão desse gene foi a cultivada com TGF-β e FN ($p = 0,001$). A amostra que teve o menor aumento de expressão relativa foi a cultivada com FN ($p = 0,003$). As amostras cultivadas com TGF-β, somente, e com FN e TGF-β exibiram aumento de expressão relativa semelhantes ($p < 0,0001$ para ambas), e não apresentaram diferença de expressão entre si ($p = 0,3978$). As outras amostras, quando comparadas entre si, tiveram diferença de expressão relativa, sendo que a condição de cultivo que mais induziu a expressão desse gene foi o de TGF-β seguido de FN.

5.3 ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE *MMP2*

Após o sequenciamento, foi possível analisar o perfil de metilação da ilha de CpG do promotor do gene *MMP2* frente as diferentes condições de cultivo da linhagem MCF-7, representados na Figura 10.

Metilação Global



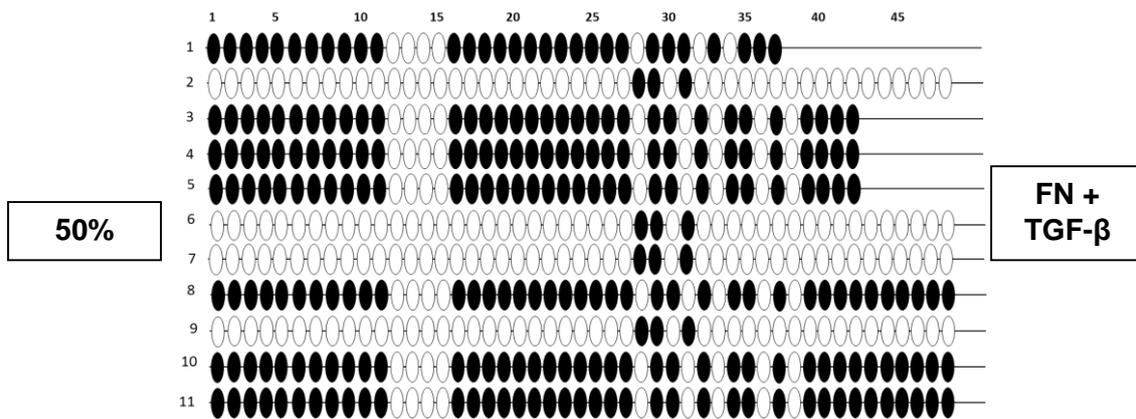


FIGURA 10 – PADRÃO DE METILAÇÃO DO GENE *MMP2*. Cada círculo representa um dinucleotídeo CG, sendo que os em branco representam os CGs não metilados e, os em preto, os CGs metilados. A ausência de círculos representa CGs indeterminados. Os 49 CGs da ilha foram analisados, numerados acima dos clones, que correspondem às linhas, de cima para baixo. À esquerda, a porcentagem de metilação global; à direita, a condição de cultivo.
 FONTE: Adaptado de Pereira *et al.*, (2014); Pereira, (2014); e o autor (2014).

Comparando-se o padrão de metilação do controle Mock com os padrões apresentados pelos cultivos, pode-se observar que a porcentagem de metilação global diminuiu. O cultivo com TGF- β por dez dias resultou numa porcentagem de metilação global de cerca 48%, uma diminuição de aproximadamente 35% em relação ao controle. O cultivo com FN e TGF- β apresentou resultado semelhante, com uma porcentagem de metilação global de 50%. O cultivo que apresentou a maior redução na metilação global foi o com TGF- β e FN, que resultou numa porcentagem de metilação de cerca de 35%.

6 DISCUSSÃO

As metástases são responsáveis por cerca de 90% dos casos de óbito decorrentes do câncer de mama (SETHI E KANG, 2011). Um dos passos para que a invasão ocorra é a degradação dos componentes da MEC adjacente ao tumor, processo este que pode ser mediado pela metaloprotease de matriz MMP-2 (SBARDELLA *et al.*, 2012). Portanto, a interação entre a MEC e a célula tumoral é de extrema importância para que proteínas como as MMPs sejam expressas, ativadas e abram caminho pelo tecido para possibilitar a migração e a invasão das células neoplásicas.

A fibronectina é uma proteína componente da MEC, porém não encontra-se expressa normalmente na mama (IOACHIM *et al.*, 2002). Portanto, sua expressão no tecido mamário está associada com a malignidade do tumor e um pior prognóstico (HELLEMAN *et al.*, 2008). Ademais, estudos mostram que a FN induz a expressão de *MMP2* e a atividade da enzima MMP-2 (DAS *et al.*, 2008; KIM, SOHN E MOON, 2007; PARK E SCHWARZBAUER, 2013). No entanto, o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não foi totalmente elucidado.

Em um estudo publicado pelo grupo do laboratório, foi constatado que mecanismos epigenéticos estão envolvidos com o aumento da expressão de *MMP2* diante da sinalização por FN em linhagens tumorais de mama (PEREIRA *et al.*, 2014). Dentre os mecanismos descritos, estão a alteração do padrão de metilação do promotor do gene após os cultivos com FN, se comparados ao controle. Após diversos tempos de cultivo com FN, ainda, foi constatado que o maior aumento na expressão do gene *MMP2* coincidia com a maior taxa de desmetilação do promotor do gene, no período de exposição de 12 horas. Porém, após realizar o recultivo das células tratadas, sem adição de FN, a taxa de metilação aumentava novamente, não chegando aos níveis do controle, mas de maneira significativa em relação ao cultivo. Essa taxa de remetilação levou ao autor a criar a hipótese de que a sinalização induzida pela FN para a expressão do gene *MMP2* é transitória (PEREIRA, 2014). No entanto, mais estudos precisavam ser realizados para que se pudesse complementar esse estudo.

Uma interessante alternativa para que se pudesse estudar mais a fundo a teoria da sinalização transitória foi adicionar ao cultivo celular com FN uma outra molécula capaz de promover a metástase no câncer de mama, o TGF- β

(KIM, SOHN E MOON, 2007), e avaliar o seu efeito sobre a expressão do gene *MMP2* e a metilação do seu promotor.

O TGF- β é uma das principais proteínas indutoras do processo de transição epitelial-mesenquimal, um programa celular biológico que permite com que células percam suas características epiteliais e ganhem traços mesenquimais (TAM E WEINBERG, 2013). A TEM ocorre com frequência durante o período embrionário, de maneira fisiológica, mas também aparece no câncer, contribuindo para a aquisição de características às células tumorais que as permitam migrar para tecidos distantes do tumor primário. Em outras palavras, a TEM está intimamente ligada ao processo de metástase no câncer, e relacioná-la por meio do TGF- β com a fibronectina na expressão do gene alvo poderia prolongar o mecanismo de sinalização envolvido.

Os resultados de qRT-PCR mostram que o cultivo com TGF- β seguido de FN foi o responsável pelo maior aumento na expressão do gene *MMP2*. O cultivo com TGF- β somente e o iniciado com FN seguido de TGF- β resultaram em um aumento semelhante da expressão do gene, se comparados com o controle, porém não de maneira tão significativa quanto o cultivo com TGF- β seguido de FN. Os resultados da metilação global do promotor do gene corroboram com os resultados de expressão, já que o cultivo com TGF seguido de FN apresentou a mais baixa taxa de metilação global (34,8%), enquanto os cultivos com TGF e com FN seguido de TGF apresentaram taxas semelhantes e mais altas (48% e 50,8%, respectivamente). Estes resultados são estatisticamente relevantes, já que a linhagem MCF-7, por característica não invasiva, não expressa *MMP2*, e a taxa de metilação global do promotor chega a ser 90% (PEREIRA *et al.*, 2014).

O fato de existir uma relação direta entre os resultados de expressão e o padrão de metilação do promotor comprova a regulação epigenética do gene *MMP2* diante da sinalização conjunta da FN e do TGF na linhagem tumoral de mama MCF-7. Alguns autores já relacionaram a sinalização por TGF e a expressão de genes por modificações epigenéticas (PAN *et al.*, 2013; THILLAINADESAN *et al.*, 2012; KHIN *et al.*, 2011). Porém, a alteração do padrão de expressão do gene *MMP2*, em específico, pela metilação do DNA, em conjunto com a fibronectina, é um resultado inédito produzido neste trabalho.

Além do mais, a diferença encontrada entre os cultivos no padrão de expressão e de metilação do gene pode ser explicada pela teoria de Pereira e colaboradores (2014) da sinalização transitória da fibronectina. Afinal de contas, o maior aumento na expressão e maior diminuição da taxa de metilação foram encontrados no cultivo que recebeu a FN por último, um dia antes do DNA ser extraído para análise. No cultivo que se iniciou com FN, seguiram-se dez dias de cultivo com TGF até que o DNA fosse extraído e analisado. Este intervalo foi suficiente para que ocorresse a remetilação do promotor e a expressão do gene diminuísse, apesar da constante sinalização por TGF.

A diferença encontrada no resultado de expressão do gene nos cultivos somente com FN e somente com TGF- β pode ser devido às diferentes vias de sinalização que essas moléculas utilizam. A FN, por exemplo, utiliza a interação mediada pelo contato com o receptor de integrina $\alpha 5\beta 1$ para mediar sua sinalização (AKIYAMA *et al.*, 1995). Já o TGF- β utiliza de algumas vias para que seu sinal seja transduzido, como, por exemplo, a via canônica, pelas proteínas Smad; ou a via alternativa, mediada pelas proteínas p38 e MAPK (AKHURST E HATA, 2012). Portanto, essas duas moléculas podem igualmente influenciar na expressão do gene, de maneiras diferentes.

O resultado do segundo cultivo traz que a FN produz uma sinalização que influencia na expressão de *MMP2*. Porém, a partir do momento que esta proteína está ausente, mecanismos de remetilação são ativados, apesar da presença de TGF- β . O cultivo com TGF também induziu a expressão do gene, apenas não de maneira tão significativa quanto o iniciado com TGF- β e depois com fibronectina. Averiguar se esse aumento é suficiente para que ocorra a indução do processo de migração e invasão celular são passos para um próximo estudo. Além do que, certamente, existem outras moléculas com papel chave no processo de invasão e metástase que formam uma rede complexa de sinalização, podendo ser igualmente alvos de estudos futuros.

7 CONCLUSÕES

O TGF, fator de sinalização responsável pelo processo de transição epitelial-mesenquimal, em conjunto com a proteína de matriz extracelular fibronectina, foi capaz de regular epigeneticamente a expressão do gene *MMP2* na linhagem tumoral de mama MCF7. Após o cultivo com TGF seguido de FN, constatou-se o maior aumento de expressão do gene juntamente com a menor taxa de metilação do promotor, ao passo que, no cultivo com FN seguido de TGF, a expressão foi menor e a taxa de metilação maior. As modificações observadas confirmam que a sinalização por fibronectina é transitória, pois, uma vez que o estímulo (FN) foi retirado essas modificações não permaneceram estabilizadas. Esses dados já observados pelo nosso grupo e complementam o estudo sobre a regulação epigenética do gene *MMP2*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACS : American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2014. Disponível em <www.cancer.org>. Acesso em : novembro de 2014.
- AKHURST, R.J. ; HATA, A. Targeting the TGF β signalling pathway in disease. **Nat Rev Drug Discovery**, v. 11, n. 10, p. 780-811, 2012.
- ANTEQUERA, F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. **Cell Mol Life Sci**, v.60, n.8, p.1647-58, 2003.
- ARTACHO-CORDÓN, F.; RÍOS-ARRABAL, S.; LARA, P. C.; *et al.* Matrix metalloproteinases: Potential therapy to prevent the development of second malignancies after breast radiotherapy. **Surgical oncology**, p. 1–9, 2012.
- AUCLAIR, G.; WEBER, M. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. **Biochimie**, p. 1-10, 2012.
- BAUVOIS, B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1825, n. 1, p. 29–36, 2012.
- BINKER, B.M.G.; BINKER-COSEN, A.A.; GAISANO, H.Y.; de COSEN, R.H.; COSEN-BINKER, L.I. TGF- β 1 increases invasiveness of SW1990 cells through Rac1/ROS/NF- κ B/IL-6/MMP-2. **Bioch Biophys Res Com**, v. 405, n. 1, p. 140-145, 2011.
- BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396–8, 2007.
- BIRD, A. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. **Nature**, v. 321, n. 6067, p. 209-13, 1986.
- BISSELL, M.J.; RADISKY, D.C.; RIZKI, A.; WEAVER, V.M.; PETERSEN, O.W. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. **Differentiation; research in biological diversity**, n. 70, p. 537-546, 2002.
- BOMBONATI, A.; SGROI, D. C. The molecular pathology of breast cancer progression. **The Journal of pathology**, v. 223, n. 2, p. 307–17, 2011.
- BUSTIN, S. A.; *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time pcr experiments. **Clinical Chemistry**, vol.55, n.4, p.611-622, 2009.
- CHERNOV, A. V.; *et al.* Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells. **J Biol Chem**, v.284, n.19, p.12727-34, 2009.
- CLARK, S. J.; *et al.* High sensitivity mapping of methylated cytosines. **Nucleic Acids Res**, v.22, n. 15, p. 2990-7, 1994.
- COSTA, F.F; PAIXÃO, V. A.; CAVALHER, F. P.; CUNHA, I. W.; *et al.* SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer. **Cancer Genet Cytogenet.**, v. 165, n. 2, p. 135-43, 2006.

DAS, S.; BANERJI, A.; FREI, E.; CHATTERJEE, A. Rapid expression and activation of MMP-2 and MMP-9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium. **Life Sciences**, v. 82, n. 9-10, p. 467-76, 2008.

DAWSON, M. A.; KOUZARIDES, T. Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. **Cell**, v. 150, n. 1, p. 12-27, 2012.

FEINBERG, A. P. e TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nat Rev Cancer**, v.4, n.2, p.143-53, 2004.

FEINBERG, A. P.; VOGELSTEIN, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. **Nature**, v. 301, n. 5895, p. 89-92, 1983.

FENG, Y.; SUN, Æ. B.; LI, Æ. X.; *et al.* Differentially expressed genes between primary cancer and paired lymph node metastases predict clinical outcome of node-positive breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat**, p. 319–329, 2007.

GARDINER-GARDEN, M. e FROMMER, M. CpG islands in vertebrate genomes. **J Mol Biol**, v.196, n.2, p.261-82, 1987.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HELLEMAN, J.; JANSEN, M. P. H. M.; RUIGROK-RITSTIER, K.; *et al.* Association of an extracellular matrix gene cluster with breast cancer prognosis and endocrine therapy response. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 17, p. 5555–64, 2008.

INCA: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2014- incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: novembro de 2014.

IOACHIM, E.; CHARCHANTI, A.; BRIASOULIS, E.; KARAVASILIS, V.; TSANOU, H. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin , fibronectin , collagen type IV and laminin in breast cancer : their prognostic value and role in tumour invasion and progression. **European Journal of Cancer**, v. 38, p. 2362–2370, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KASPAR, M.; ZARDI, L.; NERI, D. Fibronectin as target for tumor therapy. **Intl J cancer. Journal international du cancer**, v. 118, n. 6, p. 1331–9, 2006.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52–67, 2011.

KHIN, S.S.; KITAZAWA, R.; KONDO, T.; IDEI, Y.; FUJIMOTO, M.; HARAGUCHI, R.; MORI, K.; KITAZAWA, S. Epigenetic Alteration by DNA Promoter Hypermethylation of Genes Related to Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Signaling in Cancer. **Cancers (Basel)**, v. 3, n. 1, p. 982-93, 2011.

KIM, E.S.; SOHN, Y.W.; MOON, A. TGF-beta-induced transcriptional activation of MMP-2 is mediated by activating transcription factor (ATF)2 in human breast epithelial cells. **Cancer Lett.**, v. 252, n. 1, p. 147-56, 2007.

KRSTIC, J.; SANTIBANEZ, J.F. Transforming growth factor-beta and matrix metalloproteinases: functional interactions in tumor stroma-infiltrating myeloid cells. **ScientificWorldJournal**, v. 2014, Article ID 521754, 2014.

LELIÈVRE, S. A. Contributions of extracellular matrix signaling and tissue architecture to nuclear mechanisms and spatial organization of gene expression control. **BBA - Gen Sub**, v. 1790, n. 9, p. 925–935, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

MICELI, M.; BONTEMPO, P.; NEBBIOSO, A.; ALTUCCI, L. Natural compounds in epigenetics: A current view. **Food Chem Toxicol**, v. 73, p. 71-83, 2014.

MOMPARLER, R. L. Cancer epigenetics. **Oncogene**, v.22, n.42, p.6479-83, 2003.

MULLER, A.; HOMEY, B.; SOTO, H.; GE, N.; CATRON, D. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, v. 410, p. 50–56, 2001.

NCI-PDQ: National Cancer Institute – Physician Data Query. Breast cancer topics 2014. Disponível em <www.cancer.org/cancertopics/pdq>. Acesso em: novembro de 2014.

NOWSHEEN, S.; AZIZ, K.; TRAN, P. T. *et al.* Epigenetic inactivation of DNA repair in breast cancer. **Cancer lett**, p. 1-10., 2012.

OHTANI, H. Stromal reaction in cancer tissue: pathophysiologic significance of the expression of matrix-degrading enzymes in relation to matrix turnover and immune/inflammatory reactions. **Pathol Int**, v.48, n.1, p.1-9, 1998.

PAN, X.; CHEN, Z.; HUANG, R.; YAO, Y.; MA, G. Transforming growth factor β 1 induces the expression of collagen type I by DNA methylation in cardiac fibroblasts. **PLoS One**, v. 8, n. 4, e60335, 2013.

PARK, J.; SCHWARZBAUER, J. E. Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition. **Oncogene**, February, p. 1–9, 2013.

PEREIRA, I.T. **Regulação da ativação epigenética do gene *MMP2* diante da sinalização da fibronectina em linhagens tumorais de mama.** Dissertação (mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

PEREIRA, I.T.; RAMOS, E.A.; COSTA, E.T.; CAMARGO, A.A.; MANICA, G.C.; KLASSEN, L.M.; CHEQUIN, A.; BRAUN-PRADO, K.; PEDROSA, F.DE O;

SOUZA, E.M.; COSTA, F.F.; KLASSEN, G. Fibronectin affects transient *MMP2* gene expression through DNA demethylation changes in non-invasive breast cancer cell lines. **PLoS One**, v. 9, n. 9, 2014.

RAMOS, E.A.; GROCHOSKI, M.; BRAUN-PRADO, K.; SENISKI, G.G.; CAVALLI, I.J.; RIBEIRO, E.M.; CAMARGO, A.A.; COSTA, F.F.; KLASSEN, G. Epigenetic changes of CXCR4 and its ligand CXCL12 as prognostic factors for sporadic breast cancer. **PLoS One**, v. 6, n. 12, e29461, 2011.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v.447, n.7143, p.425-32, 2007.

SANGUINETTI, C. J; DIAS NETO, E. *et al.* Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v.17, n.5, p. 914-2, 1994.

SBARDELLA, D.; FASCIGLIONE, G. F.; GIOIA, M.; *et al.* Human matrix metalloproteinases: an ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes. **Mol Asp of Med**, v. 33, n. 2, p. 119–208, 2012.

SCHMITT, F.; GOBBI, H. Mama. In: BRASILEIRO-FILHO, G. *et al.* (Ed.). **Bogliolo: patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 613-643, 2006.

SETHI, N.; KANG, Y. Unravelling the complexity of metastasis — molecular understanding and targeted therapies. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, p. 735–748, 2011.

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

STEFFENSEN, B.; XU, X.; MARTIN, P. A; ZARDENETA, G. Human fibronectin and MMP-2 collagen binding domains compete for collagen binding sites and modify cellular activation of MMP-2. **Matrix Biol: journal of the Intl Soc for Matrix Biol**, v. 21, n. 5, p. 399–414, 2002.

TALMADGE, J.E.; FIDLER, I.J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. **Cancer Res**, v. 70, n. 14, p. 5649-69, 2010.

TAM, W. L.; WEINBERG, R. A. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. **Nat Med**, v. 19, n. 11, p. 1438–1449, 2013.

THILLAINADESAN, G.; CHITILIAN, J.M.; ISOVIC, M.; ABLACK, J.N.; MYMRYK, J.S.; TINI, M.; TORCHIA, J. TGF- β -dependent active demethylation and expression of the p15ink4b tumor suppressor are impaired by the ZNF217/CoREST complex. **Mol Cell**, v. 46, n. 5, p. 636-49, 2012.

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

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

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

XI, Q.; WANG, Z.; ZAROMYTIDOU, A.I.; ZHANG, X.H.; CHOW-TSANG, L.F.; LIU, J.X.; KIM, H.; BARLAS, A.; MANOVA-TODOROVA, K.; KAARTINEN, V.;

STUDER, L.; MARK, W.; PATEL, D.J.; MASSAGUÉ, J. A poised chromatin platform for TGF- β access to master regulators. **Cell**, v. 147, n. 7, p. 1511-24, 2011.

ZAVADIL, J.; BÖTTINGER, E.P. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. **Oncogene**, v. 24, n. 37, p. 5764-74, 2005.

ZHOU, Y.H.; LIAO, S.J.; LI, D.; LUO, J.; WEI, J.J.; YAN, B.; SUN, R.; SHU, Y.; WANG, Q.; ZHANG, G.M.; FENG, Z.H. TLR4 ligand/H₂O₂ enhances TGF- β 1 signaling to induce metastatic potential of non-invasive breast cancer cells by activating non-Smad pathways. **PLoS One**, v. 8, n. 5, e65906, 2013.