

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**MARIANA GROCHOSKI**

**ESTUDO DA REGULAÇÃO EPIGENÉTICA POR METILAÇÃO DO RECEPTOR DE  
QUIMIOKINAS CXCR4 NO CÂNCER DE MAMA**

**CURITIBA  
2008**

**MARIANA GROCHOSKI**

**ESTUDO DA REGULAÇÃO EPIGENÉTICA POR METILAÇÃO DO RECEPTOR DE  
QUIMIOCINAS CXCR4 NO CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de concentração em Patologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

**Orientadora:**

Dra. Giseli Klassen - Departamento de Patologia Básica, UFPR.

**Co-orientador:**

Dr. Emanuel Maltempo de Souza - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR.

**CURITIBA  
2008**



Ministério da Educação e Desporto  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS e da SAÚDE**  
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia


## TERMO DE APROVAÇÃO

**“ESTUDO DA REGULAÇÃO EPIGENÉTICA POR METILAÇÃO DO  
RECEPTOR DE QUIMIOCINAS CXCR4 NO CÂNCER DE MAMA”**

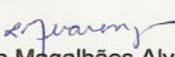
por

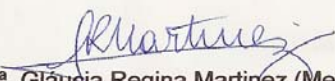
**MARIANA GROCHOSKI**

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e  
Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giseli Klassen (Orientadora e Presidente)

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Andréa Emilia Marques Stinghen (Membro Titular)

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Larissa Magalhães Alvarenga (Membro Titular)

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Regina Martinez (Membro Titular)

Curitiba, 27 de maio de 2008

À minha família, pessoas que amo, respeito e confio...por serem minha vida...

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup> Giseli Klassen, Depto. de Patologia Básica/UFPR, pela orientação, pelas críticas e pelo empenho em desenvolver este trabalho.

Ao Prof<sup>o</sup> Emanuel M. de Souza, Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular/UFPR, pela co-orientação, pelo apoio e por permitir o acesso aos equipamentos e aos laboratórios.

Às colegas de laboratório Gerusa, Edneia, Simone, Cristiane e Gleize pela paciência, pelos momentos agradáveis e pela ajuda nos momentos mais difíceis.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Iglénir Cavalli e à Prof<sup>a</sup>. Dra. Enilze Ribeiro, Depto. de Genética/UFPR, por fornecerem as amostras tumorais de mama. Ao Dr. Rubens, HC/UFPR, pelo auxílio na coleta dos dados clínicos das pacientes.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Sílvio Zanata, Depto. de Patologia Básica/UFPR, à Prof<sup>a</sup>. Dra. Guilhermina Noletto, Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular/UFPR, por disponibilizarem a estufa de CO<sub>2</sub> para o cultivo das linhagens celulares de mama.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Anamaria Camargo, do Instituto Ludwig/SP, por ceder as linhagens de mama, e, por permitir o acesso ao Laboratório de Biologia Molecular e Genômica para desenvolvimento de algumas etapas deste trabalho.

Aos alunos dos Laboratórios de Biologia Molecular, Depto. de Biologia Celular e Molecular/UFPR, de Cultivo Celular, Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular/UFPR, pelo convívio, pela ajuda e por dividir o espaço e equipamentos.

Aos alunos dos Laboratórios de Genética Molecular Humana e do LIGH, Depto. de Genética/UFPR, por auxiliarem na quantificação das amostras de RNA e DNA, na coleta das amostras tumorais de mama e das informações clínico-patológicas das pacientes.

Ao Valter Antonio de Baura, Depto. de Bioquímica/UFPR, pelas conversas, pela paciência e pelo apoio, principalmente na etapa do sequenciamento.

Ao Dr. Roberto Andreattini, Depto. de Farmacologia/UFPR, pelo auxílio na análise estatística.

Aos meus pais, Antonio e Rosicler, aos meus irmãos Daniel, Ana Paula e Mariângela, pelo incentivo, pela força, pela confiança, pela presença, por serem tão especiais e fundamentais na minha vida.

À CAPES, pelo suporte financeiro e pela bolsa de Mestrado de um ano concedida.

"O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto".

Thomas Huxley

## RESUMO

A maioria das quimiocinas e seus receptores estão envolvidos com o desenvolvimento e a progressão do câncer. O fator derivado de estroma 1 (SDF-1 ou CXCL12) interage com seu receptor, CXCR4, desencadeando a adesão, sobrevivência, proliferação e migração celular. Este receptor é superexpresso em vários tipos de câncer, inclusive de pulmão, pâncreas, cérebro e mama. No câncer de pâncreas e em melanomas demonstrou-se que a expressão poderia ser regulada pela metilação da região promotora deste gene. Diante deste contexto, objetivou-se avaliar a participação da metilação do DNA no controle da expressão do gene *CXCR4* em linhagens tumorais de mama para posterior correlação com aspectos clínico-patológicos de tumores primários de mama. Para isso, foi avaliada a expressão do gene *CXCR4* por RT-PCR. As linhagens PMC-42, MCF-7 e MDA-MB-436 apresentaram superexpressão do gene em estudo quando comparado com o gene de expressão constitutiva *GAPDH*. Por outro lado, observou-se que a linhagem MDA-MB-435 apenas expressou este gene após tratamento com agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicitidina, sugerindo que em tumores de mama poderia ocorrer a regulação da expressão gênica por metilação da região promotora do gene. Para confirmar essa hipótese e analisar o perfil de metilação, um fragmento de 184 pb da ilha de CpG-2 presente na região promotora do gene *CXCR4* foi clonada das linhagens após tratamento do DNA com agente deaminante bisulfito de sódio. Os clones obtidos foram seqüenciados e a partir da análise dos dados concluiu-se que as linhagens que superexpressaram o *CXCR4* apresentaram uma densidade de metilação inferior a 20%; enquanto a linhagem MDA-MB-435, que não expressou o *CXCR4*, apresentou um percentual de metilação superior a 90%. Os dados de seqüenciamento foram confirmados através da técnica de digestão com enzima de restrição (COBRA). A partir do perfil de metilação obtido pelo seqüenciamento, foram escolhidos os dinucleotídeos 1, 2, 3, 4, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, que se apresentaram diferencialmente metilados entre as linhagens que expressaram e não expressaram o gene *CXCR4*. Em seguida, empregou-se a técnica de MSP (*Methylation Specific PCR*) para analisar a metilação em DNA de tumores primário de mama. Observou-se que todas as 76 amostras de tumores de mama foram positivas para a reação não metilada e 36% das amostras foram positivas também para a reação metilada. Não foi observada correlação com valor estatístico entre a metilação da região promotora do gene *CXCR4* e o estadio ( $p=0,514$ ), tamanho do tumor ( $p=0,273$ ), expressão de ER ( $p=0,514$ ), expressão de PR ( $p=0,539$ ), ocorrência de metástase e óbito ( $p=0,505$ ), tipo de tumor ( $p=0,189$ ), grau de diferenciação histológico (SBR) ( $p=0,267$ ), comprometimento de linfonodos ( $p=0,793$ ), expressão do fator de crescimento ERBB2 ( $p=0,838$ ), ocorrência de recidiva ( $p=1,000$ ). A frequência de metilação para todas estas características clínico-patológicas variou de 27 a 47%. Estes resultados sugerem a regulação epigenética do gene *CXCR4* por metilação do DNA no câncer de mama, como observado em carcinomas primários de pâncreas e melanomas.

Palavras-chave: câncer de mama, receptor de quimiocinas CXCR4, metilação do DNA.

## ABSTRACT

Many chemokines and chemokine receptors are involved in the cancer development and progression. The human stromal cell-derived factor-1 (SDF-1 or CXCL12) interacts with its receptor, CXCR4, promoting adhesion, survival, proliferation and migration. This receptor is up-regulated in several types of tumors, including lung, pancreas, brain and breast. In the pancreas and in melanomas was demonstrated that the expression could be regulated by methylation of promoter region of *CXCR4* gene. In this context, we aimed to evaluate the role of cytosine methylation in the regulation of *CXCR4* gene expression in breast cancer cell lines and to verify if there is a correlation with clinic-pathologic aspects of primary breast tumor. Thus, was evaluated the CXCR4 expression in breast cancer lines through Reverse Transcription PCR (RT-PCR). It was verified that MCF-7, PMC-42 and MDA-MB-436 cell lines presented up-regulation of CXCR4 when compared with the constitutive expression gene *GAPDH*. On the other hand, it was verified that the lineage MDA-MB-435 just expressed *CXCR4* mRNA after treatment with 5'-aza-2'-deoxycytidine, suggesting that in breast tumors could exist regulation of gene expression through methylation of promoter region. To confirm this hypothesis and to analyze the methylation pattern, an 184 pb-fragment of CpG island-2 within promoter region of *CXCR4* gene was cloned after treatment of DNA with bisulfite sodium. The clones were sequenced and the analyzes of these data demonstrated that the lines that express *CXCR4* presented methylation density less that 20%. The line MDA-MB-435, that didn't express *CXCR4*, presented a methylation percentage higher to 90%. These results were confirmed by Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA). For the methylation status obtained by sequencing was choosing the dinucleotides 1, 2, 3, 4, 10, 11, 12, 13, 14,15 and 16, which showed differential methylation between the lines that expressed and didn't express the *CXCR4* gene. Following, was used Methylation Specific PCR for methylation analysis of primary breast tumor samples. We observed that all 76 breast cancer samples were positive for methylated reaction and 35,6% were also positive for unmethylated reaction. We didn't found correlation significant between methylation and unmethylation status of promoter region of *CXCR4* gene with stage ( $p=0,514$ ), tumor size ( $p=0,273$ ), ER expression ( $p=0,514$ ), PR expression ( $p=0,539$ ), occurrence of metastasis an death ( $p=0,505$ ), tumor type ( $p=0,189$ ), histology differentiation grade (SBR) ( $p=0,267$ ), lymph node involvement ( $p=0,793$ ), growth factor expression ERBB2 ( $p=0,838$ ), recurrence ( $p=1,000$ ). The frequency of methylation for all these characteristics range of 27 to 47%. These results suggest the epigenetic regulation of *CXCR4* gene by DNA methylation in breast cancer, as observed previously in pancreas carcinomas and melanomas.

Key words: breast cancer, chemokine receptor CXCR4, DNA methylation.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	A) ESTIMATIVA PARA 2008 DOS TIPOS DE CÂNCER COM MAIOR INCIDÊNCIA NA POPULAÇÃO BRASILEIRA. (B) REPRESENTAÇÃO DAS TAXAS BRUTAS DE INCIDÊNCIA DO CÂNCER DE MAMA POR 100 MIL MULHERES, ESPERADAS PARA O MESMO ANO.....	14
FIGURA 2 -	ESQUEMA DA MODIFICAÇÃO COVALENTE DO DNA.....	19
FIGURA 3 -	TOPOLOGIA GERAL DE UM RECEPTOR DE QUIMIOCINAS.....	25
FIGURA 4 -	ESQUEMA DO GENE <i>CXCR4</i> MOSTRANDO A POSIÇÃO DAS QUATRO ILHAS DE CpG E DOS FRAGMENTOS (F1 e F2) ESTUDADOS.....	34
FIGURA 5 -	ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MAPA DE RESTRIÇÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR <i>NESTED</i> .....	47
FIGURA 6 -	RESULTADO OBTIDO PELO PROGRAMA <i>CpGPLOT</i> .....	51
FIGURA 7 -	RT-PCR SEMI-QUANTITATIVO DOS GENES <i>CXCR4</i> E <i>GAPDH</i> COM 30, 35 E 38 CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO.....	53
FIGURA 8 -	RT-PCR PARA OS GENES <i>GAPDH</i> E <i>CXCR4</i> COM 35 CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO.....	55
FIGURA 9 -	RESULTADO DA ANÁLISE POR COBRA OBTIDO PARA OS FRAGMENTOS 1 (ILHA DE CpG-2) E 2 (ILHA DE CpG-3/4) DO GENE <i>CXCR4</i> .....	60
FIGURA 10 -	AMOSTRAS DE DNAs EXTRAÍDOS DOS TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.....	62
FIGURA 11 -	<i>NESTED</i> PCR DO GENE <i>SATR1</i> COM OS DNAs TUMORAIS.....	63
FIGURA 12 -	PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE MSP COM AS LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA.....	63
FIGURA 13 -	AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA TÉCNICA DE MSP REAÇÃO U E M DO GENE <i>CXCR4</i> .....	64
FIGURA 14 -	REAÇÃO DE MSP COM AMOSTRAS DE FIBROADENOMAS.....	65
FIGURA 15 -	REAÇÃO DE MSP COM AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.....	66
FIGURA 16 -	LOCALIZAÇÃO DOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE RT-PCR PARA OS GENES <i>CXCR4</i> (A) E <i>GAPDH</i> (B).....	96

## LISTA DE QUADROS, TABELAS E ESQUEMAS

QUADRO 1 -	FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DA MAMA.....	15
QUADRO 2 -	CARACTERÍSTICAS DOS INICIADORES ESPECÍFICOS PARA AS REAÇÕES DE RT-PCR.....	35
TABELA 1 -	DISTRIBUIÇÃO CATEGÓRICA DOS DADOS CLÍNICOS DAS PACIENTES ANALISADAS E A FREQUÊNCIA DE METILAÇÃO DO GENE <i>CXCR4</i> .....	70
ESQUEMA 1 -	LOCALIZAÇÃO DOS INICADORES PARA <i>NESTED</i> PCR DO FRAGMENTO 1 DA ILHA DE CpG-2 DO GENE <i>CXCR4</i> .....	39
ESQUEMA 2 -	LOCALIZAÇÃO DOS INICADORES PARA <i>NESTED</i> PCR DO FRAGMENTO 2 DAS ILHAS DE CpG 3-4 DO GENE <i>CXCR4</i> .....	40
ESQUEMA 3 -	LOCALIZAÇÃO DOS INICIADORES ESPECÍFICOS PARA REAÇÃO DE MSP.....	49
ESQUEMA 4 -	PERFIL DE METILAÇÃO OBTIDO PARA O FRAGMENTO DE 184 pb DA ILHA DE CpG-2 DO GENE <i>CXCR4</i> , PARA A LINHAGEM MDA-MB-436 (A), MCF-7 (B), PMC-42 (C) E MDA-MB-435 (D).....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-Aza-CdR - 5-aza-2'-deoxicitidina

AJCC - do inglês *American Joint Committee on Cancer*

BLAT - do inglês *BLAST-Like Alignment Tool*

BRCA1 - do inglês *Breast Cancer Gene 1*

COBRA – do inglês *Combined Bisulfite Restriction Analysis*

DNMT - DNA metiltransferase

EMBL – do inglês *European Bioinformatics Institute*

ERBB2 – receptor do fator de crescimento epidermal humano

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

GPCR - receptor acoplado à proteína G

HAT - histona acetiltransferase

HDAC - histonas desacetilase

HUVEC - célula endotelial vascular umbilical humana

JAK – do inglês *Janus Kinase*

LICR-SP - Instituto Ludwig de Pesquisa em Câncer de São Paulo

LOI - perda de *imprinting*

MGMT - do inglês *O<sub>6</sub>-methylguanine-DNA methyltransferase*

MSP – do inglês *Methylation Specific PCR*

NCBI - do inglês *National Center of Biotechnology Info*

Nr - do inglês *Non-redundant*

PCNA - antígeno nuclear de proliferação celular

Rb - proteína retinoblastoma

RE - receptor de estrógeno

RP - receptor de progesterona

RPMI - do inglês *Roswell Park Memorial Institute*

RT-PCR - do inglês *Reverse Transcription PCR*

SATR1 - seqüência satélite 1

SBR - sistema de Scarff-Bloom e Richardson – Sistema de graduação histológica para tumores de mama

SPSS - do inglês *Statistical Package for Social Science*

STAT – do ingles *Signal Transducer and Activator of Transcription*

TAM - macrófago associado ao tumor

TDG - timina DNA glicosilase

TMA - do inglês *tissue microarray*

TNM - do inglês *Tumor Node Metastasis* - Sistema de Classificação Tumoral

TSA – tricostatina A

UDG - uracil DNA glicosilase

UICC - do francês *Union Internationale Contre le Cancer*

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

VHL - gene supressor de tumor von Hippel-Lindau

## SUMÁRIO

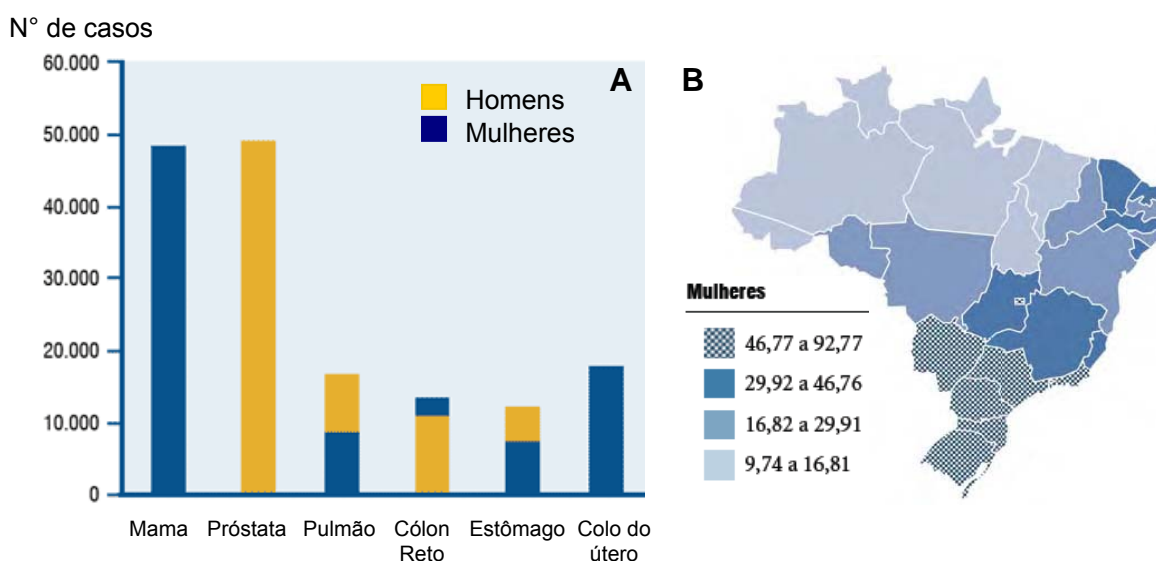
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 CÂNCER DE MAMA .....	14
1.1.1 Principais tipos de câncer de mama .....	15
1.1.2 Fatores de risco .....	15
1.1.3 Prognóstico, diagnóstico e tratamento do câncer de mama .....	16
1.1.4 Estadiamento e marcadores moleculares do câncer de mama .....	17
1.2 EPIGENÉTICA .....	19
1.2.1 Metilação e câncer .....	21
1.2.2 Terapêutica anti-tumor e metilação .....	23
1.3 RECEPTOR DE QUIMIOCINAS CXCR4 .....	24
1.3.1 Importância do par CXCR4-CXCL12 no câncer .....	26
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....	31
3.1.1 Linhagens celulares de mama .....	31
3.1.1.1 Cultivo celular .....	32
3.1.1.2 Teste para detecção de contaminação por <i>Mycoplasma hominis</i> .....	32
3.1.2 Amostras tumorais de mama .....	33
3.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ILHAS DE CpG PRESENTES NO GENE CXCR4 .....	33
3.3 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE CXCR4 EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA .....	34
3.3.1 Extração de RNA total das linhagens celulares de mama .....	35
3.3.2 Síntese da primeira fita de cDNA .....	36
3.3.3 <i>Semi-Quantitative Reverse Transcription-PCR</i> - RT-PCR Semi-Quantitativo do gene CXCR4 .....	37
3.3.4 Tratamento com agente desmetilante 5-Aza-2-deoxicitidina (5-Aza-CdR) .....	37
3.4 CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE CXCR4 .....	38
3.4.1 Desenho de iniciadores específicos para <i>Nested PCR</i> .....	38
3.4.2 Extração de DNA das linhagens e das amostras de tumores primários de mama .....	41
3.4.2.1 Extração de DNA das linhagens de mama .....	42
3.4.2.2 Extração de DNA das amostras de tumores primários de mama .....	42
3.4.3 Tratamento do DNA extraído das linhagens e dos tumores primários de mama com bissulfito de sódio .....	43
3.4.4 Amplificação dos fragmentos das ilhas de CpG do gene CXCR4 .....	43
3.4.5 Clonagem e seqüenciamento do fragmento 1 da ilha de CpG-2 do gene CXCR4 .....	44
3.4.6 <i>COmbined Bisulfite Restriction Analysis</i> - COBRA dos fragmentos das Ilhas de CpG do gene CXCR4 .....	46
3.4.6.1 Eletroforese em géis de poliacrilamida .....	47
3.4.7 Análise da metilação em amostras de tumores de mama por <i>Methylation Specific PCR</i> - MSP .....	48
3.4.7.1 Reações de MSP .....	49

3.4.7.2 Correlação entre o padrão de metilação do gene <i>CXCR4</i> nos tumores primários de mama e os dados clínico-patológicos das pacientes.....	50
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
4.1 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DO GENE <i>CXCR4</i> .....	51
4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>CXCR4</i> NAS LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA.....	52
4.3 ANÁLISE DA METILAÇÃO DO GENE <i>CXCR4</i> EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA .....	56
4.3.1 Análise da metilação pelo método de COBRA.....	60
4.4 ANÁLISE DA METILAÇÃO EM AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA .....	62
4.4.1 Análise estatística dos dados clínico-patológicos correlacionados com a metilação da região promotora do gene <i>CXCR4</i> .....	68
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>92</b>
ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO .....	92
ANEXO 2 - ESTADIAMENTO CLÍNICO.....	93
ANEXO 3 – LOCALIZAÇÃO DOS INICIADORES ESPECÍFICOS PARA RT-PCR...96	
ANEXO 4 - QUADRO DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS 76 PACIENTES E DOS RESULTADOS DE MSP .....	97

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é a principal neoplasia que acomete o sexo feminino e representa um dos maiores problemas de saúde pública em todo o mundo (MONTEIRO *et al.*, 2003). Para o ano de 2008 foram estimados mais de 180 mil novos casos entre as mulheres e aproximadamente 40 mil mortes decorrentes do câncer de mama nos EUA (JEMAL *et al.*, 2008). Para o Brasil, estima-se que neste mesmo ano o câncer de mama corresponda à terceira neoplasia de maior incidência na população (FIGURA 1), com 49.400 novos casos e com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2007).



**FIGURA 1 – (A) ESTIMATIVA PARA 2008 DOS TIPOS DE CÂNCER COM MAIOR INCIDÊNCIA NA POPULAÇÃO BRASILEIRA. (B) TAXAS BRUTAS DE INCIDÊNCIA DO CÂNCER DE MAMA POR 100 MIL MULHERES, ESPERADAS PARA O MESMO ANO.**

**FONTE: INCA, 2007.**

**NOTA:** No gráfico indicado em (A) não está representada a neoplasia mais incidente na população brasileira, que é o câncer de pele não-melanoma. No mapa indicado pelo item B, pode-se observar que nas regiões sul e sudeste o câncer de mama é a neoplasia mais incidente e freqüente entre as mulheres.

### 1.1.1 Principais tipos de câncer de mama

Os carcinomas correspondem ao principal tipo de câncer de mama e podem acometer as estruturas ductais e lobulares da glândula mamária, manifestando-se na forma *in situ*, microinvasiva ou invasiva. Em função dos adenocarcinomas serem referidos como carcinomas nos trabalhos descritos na literatura, foi adotado neste estudo o último termo. O carcinoma *in situ* corresponde a uma fase inicial do processo de tumorigênese e se caracteriza pela proliferação epitelial maligna confinada aos tecidos mamários. Nos carcinomas microinvasivos, as células neoplásicas se estendem além da membrana basal, invadindo o estroma mamário, sem formar focos tumorais maiores do que 0,1 cm em sua maior dimensão. Os tumores microinvasivos, embora representem uma forma inicial de invasão tumoral, possuem prognóstico tão favorável quanto os tumores *in situ*. Por fim, os tumores invasivos ocorrem em estádios mais avançados, quando as células tumorais rompem a membrana basal e infiltram o tecido adjacente (FILHO, 2000; HODA, *et al.*, 2001). O carcinoma ductal invasivo representa a maioria (aproximadamente 75%) dos casos de câncer de mama e, em seguida, tem-se o carcinoma lobular invasivo, o qual representa cerca de 10% dos casos (FARIA, 1999; FILHO, 2000).

### 1.1.2 Fatores de risco

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama estão listados no quadro 1, a seguir.

<b>FATORES DE RISCO</b>	<b>MAGNITUDE DO RISCO</b>
Idade avançada (superior a 45 anos)	++
História familiar de câncer de mama	++
Estimulação estrogênica prolongada: menopausa tardia (depois dos 54 anos), primeira gestação tardia (após 30 anos), menarca precoce (antes dos 12 anos) e nuliparidade	++
Doenças genéticas: síndrome de Li-Fraumeni (mutações do gene p53 em células germinativas), mutações em genes BRCA1 e 2	++



FATORES DE RISCO	MAGNITUDE DO RISCO
Exposição à radiação ionizante	++
Terapia de reposição hormonal, uso de contraceptivos orais	+
Obesidade pós-menopausa	+
Consumo de álcool, dieta	+

**QUADRO 1 - FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DA MAMA.**

**FONTE: DUMITRESCU; COTARLA, 2005.**

++ Aumento moderado a elevado no risco de desenvolver câncer de mama

+ Baixo a moderado aumento no risco de desenvolver câncer de mama

### 1.1.3 Prognóstico, diagnóstico e tratamento do câncer de mama

O acometimento dos linfonodos axilares, o tamanho do tumor, o tipo e o grau histológico, os níveis de expressão de receptores de progesterona (RP) e estrógeno (RE), constituem os principais parâmetros empregados para a determinação do prognóstico do câncer de mama (FARIA, 1999; FILHO, 2000; VIANA; MARTINS; GEBER, 2001).

A constatação de linfonodos axilares afetados ratifica o potencial metastático do tumor. A dimensão do tumor está associada, em geral, à sobrevida das pacientes e ao comprometimento de linfonodos. Certos tipos histológicos fornecem um prognóstico favorável, como o carcinoma tubular, colóide e papilar, ou o oposto, como o carcinoma inflamatório, considerado o tipo de câncer de pior prognóstico. Quanto à diferenciação histológica, os tumores mais diferenciados (graus I e II) possuem melhor prognóstico. Por fim, tumores que expressam receptores hormonais (RE+ e RP+) são mais diferenciados, apresentam melhor prognóstico e geralmente estão associados à maior sobrevida (FARIA, 1999; FILHO, 2000; VIANA; MARTINS; GEBER, 2001).

O diagnóstico precoce do câncer de mama é fundamental para o sucesso do tratamento e para a cura da doença. Quando o tumor é detectado em estadios iniciais a taxa de cura da doença é superior a 90%. No Brasil, aproximadamente 70% dos casos de câncer de mama ainda são diagnosticados tardiamente (HOSPITAL DO CÂNCER AC CAMARGO, 2008).

Os métodos de detecção do câncer de mama comumente usados incluem o auto-exame das mamas, a mamografia e o ultra-som. A prática do auto-exame é

considerada relevante, pois, segundo Morales, Pinedo e Vigil (1994), cerca de 90% das patologias mamárias são detectadas nas fases iniciais pelas próprias pacientes. A mamografia de alta resolução é apontada como o principal método diagnóstico do câncer de mama em estadio inicial, capaz de detectar alterações ainda não palpáveis, favorecendo assim o tratamento precoce, mais efetivo e menos agressivo. Recomenda-se a mamografia anual para mulheres com idade superior a 40 anos (HOSPITAL DO CÂNCER AC CAMARGO, 2008). O ultra-som apresenta baixa especificidade e altos índices de falsos positivos e negativos. É um exame que complementa a mamografia e é também empregado para guiar punções citológicas ou histológicas (VIANA; MARTINS; GEBER, 2001).

Para confirmação do diagnóstico são utilizados outros exames, incluindo a biópsia. A cintilografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética possibilitam determinar o estadiamento da doença bem como a ocorrência de metástases (VIANA; MARTINS; GEBER, 2001).

A cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia são as intervenções terapêuticas tradicionais no tratamento do câncer. Recentemente, também tem sido utilizada a imunoterapia e hormonioterapia para modulação da resposta biológica no câncer de mama (VIANA; MARTINS; GEBER, 2001).

#### 1.1.4 Estadiamento e marcadores moleculares do câncer de mama

O sistema TNM, criado pelo AJCC (*The American Joint Committee on Cancer*), é o mais utilizado e está baseado na avaliação do tamanho do tumor primário (T), no envolvimento de linfonodos (N) e na presença de metástases distantes (M). Geralmente, cada letra é acompanhada por um número para indicar a extensão da doença. Este sistema pode empregar critérios clínicos, cTNM, baseado nas evidências obtidas antes do tratamento, a partir de biópsia, por exemplo; ou patológicos, pTNM, fundamentado na análise histopatológica pós-cirurgia (INCA, 2004). Os valores possíveis para T, N e M, bem como a classificação dos tumores em estadios estão expostos no item ANEXO 2.

O estadiamento do câncer e a expressão de marcadores moleculares são fundamentais na definição do tratamento, para fornecer indicações de prognóstico e de possibilidade de recuperação da paciente (INCA, 2004; HOSPITAL DO CÂNCER AC CAMARGO, 2008).

Dentre os principais marcadores moleculares no câncer de mama estão o oncogene *ERBB2* e os receptores de estrógeno e progesterona (RE e PR).

O proto-oncogene *ERBB2* codifica uma glicoproteína transmembrana contendo 185 kDa, semelhante ao receptor do fator de crescimento epidermal e que possui atividade tirosina quinase em sua porção carboxiterminal (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Este gene encontra-se superexpresso em aproximadamente 20% a 25% dos carcinomas ductais de mama, mas estes índices podem aumentar para 40% em casos de pacientes linfonodo positivo (L+) (HAN *et al.*, 1997, *apud* SILVA; SADDI; MOMOTUK, 2002). Em geral, mulheres com carcinoma *ERBB2* positivo (*ERBB2+*) possuem uma doença mais agressiva, com pior prognóstico, menor sobrevida e maior probabilidade de reincidência (HENRY; HAYES, 2006).

A oncoproteína *ERBB2* é alvo de imunoterapia específica utilizando o anticorpo monoclonal Herceptin, também designado de trastuzumabe. Este anticorpo, desenvolvido em 1992, se liga com grande afinidade ao domínio extracelular do *ERBB2*, impedindo a sinalização de crescimento desencadeada pela interação entre este receptor e seu ligante (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

O receptor de estrógeno também é importante no contexto do câncer de mama, por mediar os efeitos do estrógeno. Dois terços de todos os tumores são receptor de estrógeno positivo (RE+) (OSBPRNE, 1998, *apud* GRUVBERGER *et al.*, 2001). Os REs, após ligação ao estrógeno, mudam de conformação e se ligam diretamente ao DNA, controlando a transcrição de genes específicos (LEADER *et al.*, 2006). Tumores mais agressivos, com pouca diferenciação celular, apresentam pouca ou nenhuma expressão de RE (MILLIS, 1980; CLARKE *et al.*, 1994).

Pacientes com tumor RE+ são tratadas com drogas anti-estrogênicas ou inibidores da aromatase. O tamoxifeno é um modulador seletivo do RE que bloqueia os efeitos do estrógeno por se ligar competitivamente ao RE. Os inibidores de aromatase possuem um mecanismo de ação diferente. Estes reduzem os níveis de estrógenos por impedir a síntese deste hormônio através da reação de aromatização dos andrógenos, nos tecidos periféricos. A maioria dos tumores RE+ são inicialmente responsivos ao tamoxifeno, mas muitas pacientes desenvolvem resistência ao tratamento. Nestes casos, são indicados os inibidores de aromatase, tais como o anastrozol e letrozol. Entretanto, existem pacientes que se tornam resistentes a essas duas abordagens de tratamento (IKEDA; INOUE, 2004).

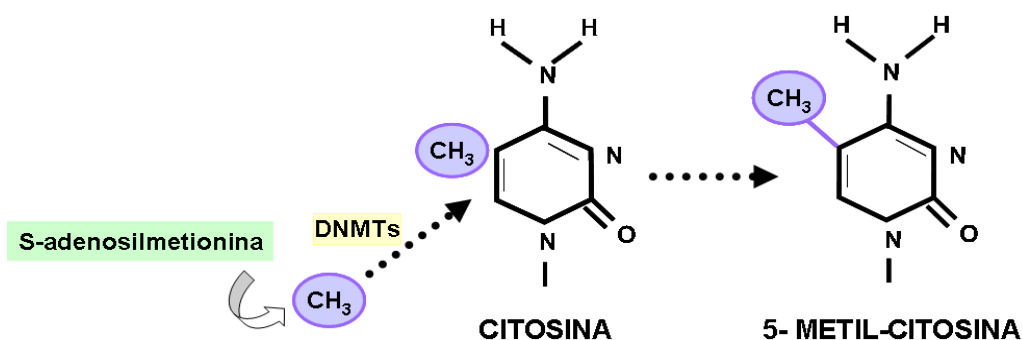
O receptor de progesterona também é um marcador molecular importante e a perda da expressão deste receptor e do RE constitui um potencial mecanismo de resistência à terapia hormonal (LIU *et al.*, 2004).

## 1.2 EPIGENÉTICA

O termo epigenética foi introduzido na década de 1940 por Conrad e Waddington e inicialmente foi definido como o processo no qual a informação genética de um organismo interage com o ambiente, definindo seu fenótipo (MURREL *et al.*, 2005). Atualmente, a epigenética é caracterizada como um fenômeno que envolve a alteração herdável da expressão gênica que não implica uma alteração da seqüência de nucleotídeos e sim, uma modificação da conformação do DNA (VERMA; SRIVASTAVA, 2002; FAZZARI; GREALLY, 2004).

Um dos principais mecanismos que acarretam a alteração da estrutura tridimensional da molécula de DNA é a modificação covalente do DNA, comentada a seguir (WAGGONER, 2007).

O processo de metilação do DNA (FIGURA 2) envolve a adição covalente do grupo metil (CH<sub>3</sub>), que advém do doador S-adenosilmetionina, ao carbono 5' da citosina, formando a quinta base do DNA humano, a 5-metilcitosina, identificada em 1948 (SINGAL; GINDER, 1999). As citosinas metiladas correspondem a 0,75-1% do total de bases do DNA (WORM; GULBERG, 2002).



**FIGURA 2 - ESQUEMA DA MODIFICAÇÃO EPIGENÉTICA DO DNA.**  
**FONTE: Adaptado de RODENHISER; MANN, 2006.**

Em geral, as citosinas adjacentes a uma guanina (no contexto 5'CG3'), portanto, pertencentes aos dinucleotídeos CpGs (a letra *p* entre as bases citosina e guanina denota o grupo fosfato), são passíveis de serem metiladas (BIRD, 2002).

Os dinucleotídeos CpGs são pouco representados ao longo do genoma e a grande maioria destes (cerca de 70% a 90%), com exceção dos CGs presentes nas ilhas de CpGs, encontra-se metilado no homem e na maioria dos vertebrados (SINGAL; GINDER, 1999; NAKAO, 2001; HELLEBREKERS; GRIFFIOEN; ENGELAND, 2007).

Os dinucleotídeos são encontrados em maiores concentrações nas ilhas de CpG, as quais estão geralmente presentes na região 5'UTR dos genes, especialmente no promotor e no primeiro exon. As ilhas são regiões com cerca de 1 kb de tamanho, que ocorrem em média a cada 100 kb e possuem frequência de dinucleotídeos CpG aproximadamente 10 vezes maior que o restante do genoma. Estas possuem uma razão de CpG para GpC de pelo menos 60% e ocorrem em mais da metade dos genes em humanos (ROBERTSON; JONES, 2000; BIRD, 2002; DAS; SINGAL, 2004).

A metilação é catalisada por um grupo de enzimas, denominadas de DNA metilases ou DNA metiltransferases (DNMTs). Dentre elas citam-se: DNMT1 e DNMT3, com suas isoformas.

A DNMT1 reconhece preferencialmente substratos de DNA que se apresentam metilados em apenas uma fita (o que se denomina de DNA hemimetilado), possibilitando que, durante a replicação, ocorra a propagação do padrão de metilação às fitas recém sintetizadas (BIRD, 2002). A DNMT3a e a DNMT3b metilam com igual eficiência o DNA hemimetilado e não metilado, *in vitro* e *in vivo* e são altamente expressos em células tronco-embriônicas (YANG; YAN; DAVIDSON, 2001). Estas enzimas geralmente atuam no processo de metilação *de novo*, adicionando grupos metil em locais do DNA em que não existe metilação, mesmo na fita oposta (DAS; SINGAL, 2004).

Ao contrário das DNMTs, as desmetilases atuam ativamente promovendo a desmetilação do DNA. A 5-metilcitosina glicosilase, por exemplo, remove a citosina metilada do DNA e, através do mecanismo de reparo o resíduo de citosina é novamente adicionado (DAS; SINGAL, 2004).

A metilação do DNA é importante nos processos de silenciamento do cromossomo X inativo das mulheres, no *imprinting* genômico e também está vinculada ao mecanismo de silenciamento gênico (BAYLIN, 2005).

A metilação da citosina pode afetar a expressão dos genes por impedir estericamente a ligação de fatores de transcrição a seus sítios de reconhecimento

presentes na região reguladora de seus respectivos genes. Por exemplo, a metilação inibe a ligação dos fatores de transcrição AP-2, myc, E2F e NF- $\kappa$ B, que reconhecem seqüências que apresentam dinucleotídeos CpGs (SINGAL; GINDER, 1999). A inativação gênica também pode decorrer do recrutamento de complexos contendo repressores transcricionais e HDACs (histonas desacetilases) ao DNA metilado (DAS; SINGAL, 2004). A MeCP2, uma proteína de ligação ao grupo metil (MBP), por exemplo, possui um domínio de interação com as citosinas metiladas e também se associa com o co-repressor transcricional Sin3, o qual pode se ligar diretamente às HDACs 1 e 2 (ROBERTSON; JONES, 2000). Tem sido verificado, inclusive, que as DNMTs podem suprimir a atividade transcricional dos genes por recrutar diretamente as HDACs (ROUNTREE *et al.*, 2001).

Os padrões de metilação são estabelecidos nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário pelas metilases *de novo* DNMT3a e DNMT3b e são copiados nas células somáticas pela DNMT1 de manutenção (BIRD, 2002; TURKER, 2002). Após ocorrer a fertilização, inicia-se uma onda de desmetilação durante a clivagem, seguido pela metilação *de novo* do genoma principalmente após a implantação do blastocisto e, esse processo pode continuar lentamente durante o restante do desenvolvimento (TURKER, 2002; JAENISCH; BIRD, 2003). Acredita-se que esse processo de desmetilação-remetilação converte os padrões de metilação específicos dos gametas para os específicos de tecidos somáticos (BIRD, 2002). Assim, com a diferenciação do embrioblasto, genes tecidos específicos são desmetilados de maneira tecido-específica, enquanto os genes constitutivos permanecem desmetilados (YANG; YAN; DAVIDSON, 2001; TURKER, 2002).

### 1.2.1 Metilação e câncer

Acredita-se que os mecanismos epigenéticos são importantes para a iniciação da tumorigênese e para a manutenção do estado alterado das células tumorais. Embora o padrão de metilação seja estabelecido durante o desenvolvimento embrionário e seja mantido durante a vida do indivíduo, sabe-se que a idade, bem como a dieta, podem modificar esse padrão, comprometendo o controle normal da expressão dos genes e levando à instabilidade genética (YOO; JONES, 2006). Uma dieta pobre em folato, por exemplo, tem sido associada à

indução de câncer de fígado vinculado à hipometilação genômica e aumento da expressão de oncogenes, como o *kras* e o *myc* (JAENISCH; BIRD, 2003).

A neoplasia é epigeneticamente caracterizada pela desmetilação global do DNA, com hipermetilação localizada de genes específicos (WILSON; POWER; MOLLOY, 2007; YOO; JONES, 2006).

A avaliação do nível total de 5-metilcitosina após análise por *Southern Blotting* do DNA tumoral digerido com enzimas que reconhecem sítios de restrição contendo citosinas metiladas, forneceu a primeira evidência de que o genoma das células neoplásicas encontra-se hipometilado em relação às células normais (FEINBERG; VOLGSTEIN, 1983).

Muitos dos efeitos globais da desmetilação decorrem da ativação de elementos transponíveis, normalmente dormentes, e de seqüências retrovirais presentes no genoma humano. A expressão bialélica de genes imprintados resultante da hipometilação também pode favorecer o desenvolvimento de tumores. A LOI (perda de *imprinting*) do gene IGF-2 (fator de crescimento tipo insulina-2), por exemplo, torna os indivíduos mais susceptíveis ao desenvolvimento do câncer colorretal (WILSON; POWER; MOLLOY, 2007).

Ao contrário da hipometilação, a hipermetilação adquiriu destaque no contexto do câncer somente a partir da metade da década de 80. O silenciamento gênico decorrente da metilação aberrante foi demonstrado em 1986 com a calcitonina, a qual é um marcador para o câncer de pulmão de pequenas células. Este tipo de tumor maligno apresenta alta capacidade metastática, que está fortemente relacionada ao tabagismo, visto que apenas 1% dos casos ocorre em indivíduos não-fumantes. É caracterizado por apresentar células epiteliais geralmente pequenas, arredondadas ou ovais, que crescem em aglomerados e são capazes de secretar hormônios polipetídicos (BAYLIN *et al.*, 1986; COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996).

O silenciamento epigenético pode predispor a eventos mutacionais durante a progressão do câncer, por exemplo, através da inativação de genes de reparo do DNA. O gene de reparo *MLH1* (homóloga à proteína codificada em *E. coli*, pelo gene *mutL*) é freqüentemente hipermetilado em tumores que possuem instabilidade de microsatélite, como o colorretal (NAKAGAWA *et al.*, 2001, *apud* JONES; BAYLIN, 2002). O gene de reparo *MGMT* (*O*<sub>6</sub>-metilguanina-DNA metiltransferase) também é

silenciado por hipermetilação em tumores, como o de cólon, pulmão, linfóide, entre outros (ESTELLER *et al.*, 1999, 2000, 2001, *apud* JONES; BAYLIN, 2002).

A hipermetilação pode também silenciar genes supressores de tumor, como o gene *VHL* (Von Hippel-Lindau), no carcinoma de rim (HERMAN *et al.*, 1994, *apud* ROBERTSON; JONES, 2000); *Rb* (retinoblastoma), no retinoblastoma (STIRZAKER *et al.*, 1997, *apud* ROBERTSON; JONES, 2000), *APC* (polipose adenomatosa do cólon), no carcinoma colorretal (HILTUNEN *et al.*, 1997, *apud* ROBERTSON; JONES, 2000), etc.

A metilação pode influenciar a tumorigenicidade por aumentar a probabilidade da ocorrência de mutações de transição C→T, como verificado com o gene supressor de tumor *p53*, em que 50% das mutações pontuais incidem nas citosinas metiladas (JONES; BAYLIN, 2002). Tais mutações ocorrem em função dos resíduos de 5-metilcitosina serem mais susceptíveis à deaminação. A deaminação da citosina forma a uracila, a qual é rapidamente reconhecida e reparada pela uracil DNA glicosilase (UDG); mas, a deaminação da 5-metilcitosina gera timina, que, por ocorrer naturalmente no DNA é mais difícil de ser detectada e reparada pela timina DNA glicosilase (TDG) (JIRICNY, 1996, *apud* ROBERTSON; JONES, 2000; YANG; YAN; DAVIDSON, 2001).

No câncer de mama, os genes que codificam os receptores ovarianos (RE e RP), o gene supressor de tumor *BRCA1* e outros genes envolvidos com regulação do ciclo celular (*p16<sup>INK4a</sup>*), detoxificação (*GSTP1*) e metástase (*E-caderina*, *TIMP-3*) são os mais freqüentemente metilados (YAN, DAVIDSON, 2001).

### 1.2.2 Terapêutica anti-tumor e metilação

O estudo da metilação pode ser muito útil para o diagnóstico precoce e para definição do tratamento de vários tipos de tumores. O perfil de metilação permite distinguir entre tipos e sub-tipos de tumores e auxilia na escolha do agente quimioterapêutico para o tratamento. A metilação do gene de reparo *MGMT*, por exemplo, aumenta a sensibilidade dos gliomas ao tratamento com agentes alquilantes (ESTELLER *et al.*, 2000, *apud* DAS; SINGAL, 2004).

Como a metilação das ilhas de CpG é mais freqüente nas células tumorais, pois, como dito anteriormente, em geral, nas células normais os dinucleotídeos encontram-se desmetilados, a metilação pode ser um alvo importante na terapia



anti-tumoral (BAYLIN, 2005). Além disso, ao contrário das alterações genéticas, a possibilidade de reverter as modificações epigenéticas torna viável o tratamento epigenético do câncer (YOO; JONES, 2006; HELLEBREKERS; GRIFFIOEN; ENGELAND, 2007).

Dentre as substâncias empregadas na terapia do câncer estão os inibidores de metilação, que incluem os análogos de nucleosídeos e os não análogos de nucleosídeos. Os primeiros podem ser divididos em análogos ribonucleosídeos ou desoxirribonucleosídeos. Ambos possuem o carbono 5 do anel da citosina modificado e são metabolizados por quinases que os convertem a nucleotídeos trifosfato para posterior incorporação ao RNA ou DNA, respectivamente (YOO; JONES, 2006).

O principal análogo desoxirribonucleosídeo usado no tratamento do câncer é o 5-Aza-2'-deoxicitina (5-Aza-CdR). Este é capaz de inibir a metilação do DNA mesmo em concentrações micromolares, mas, apresenta-se instável em soluções aquosas, dificultando sua administração (KOPELOVICH; CROWELL; FAY, 2003; YOO; JONES, 2006). Apesar de amplamente empregado no tratamento anti-câncer apresenta efeitos tóxicos e pode ser mutagênico *in vivo*. Além disso, demonstrou-se que é capaz de ativar transcricionalmente genes sem promotores metilados e de promover modificação da estrutura da cromatina, aumentando a acetilação e a metilação da Lys4 da histona H3 (SOENGAS *et al.*, 2001, NGUYEN *et al.*, 2002, *apud* LAIRD, 2005). O principal mecanismo de inibição da metilação mediada pelo 5-Aza-CdR decorre da formação do complexo covalente droga-DNMT (YOO; JONES, 2006).

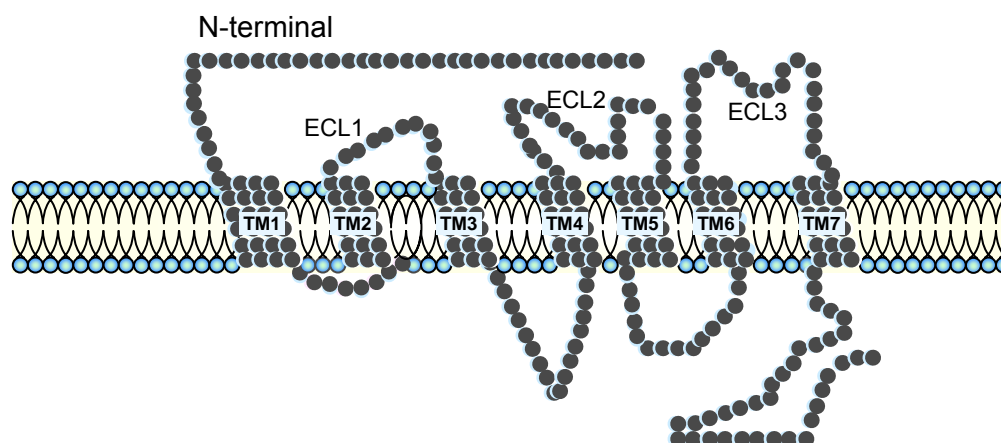
### 1.3 RECEPTOR DE QUIMIOCINAS CXCR4

O gene *CXCR4*, localizado no cromossomo humano 2q21.3, apresenta uma região promotora, contendo cerca de 2,6 kb, e dois exons separados por uma seqüência intrônica de aproximadamente 2,1 kb. O primeiro exon possui 104 pb e codifica os cinco primeiros aminoácidos da proteína e a região 5'UTR. O segundo exon possui aproximadamente 1,6 kb, dentre os quais 1044 pb codificam os 347 aminoácidos restantes da proteína que possui 352 resíduos (CARUZ *et al.*, 1998; WEGNER *et al.*, 1998).

Duas isoformas de proteínas CXCR4, derivadas de *splices* transcricionais alternativos, têm sido caracterizadas. O variante transcricional 1 (NM\_001008540), também conhecido como CXCR4-Lo, representa o maior transcrito e codifica a isoforma mais extensa (isoforma *a*) (ENTREZ GENE, 2008).

O gene *CXCR4* foi inicialmente clonado de leucócitos (LOETSCHER *et al.*, 1994), mas, é também constitutivamente expresso em tecidos não hematopoiéticos, incluindo coração, intestino, brônquios, cérebro, dentre outros (LAVI *et al.* 1997; DWINELL *et al.*, 1999; EDDLESTON *et al.*, 2002; FURUYA *et al.*, 2007).

O CXCR4 é um receptor de quimiocinas que possui sete domínios hidrofóbicos transmembrana em alfa-hélice (7-TMR) (FIGURA 3) e também é designado de receptor acoplado à proteína G (GPCR), em função de seu mecanismo de sinalização, que envolve a ligação dos *loops* intracelulares à proteína G heterotrimérica ( $\alpha\beta\gamma$ ) (ROLLINS, 1997). O terminal carboxi do receptor contém resíduos de serina e treonina, que são passíveis de serem fosforilados após interação ligante-receptor e estão envolvidos na transdução de sinais bem como na dessensibilização (FUTASHI *et al.*, 2007).



**FIGURA 3 - TOPOLOGIA GERAL DE UM RECEPTOR DE QUIMIOCINAS.**

**FONTE:** Adaptado de FERNANDEZ; LOLIS, 2002.

**NOTA:** A extremidade aminoterminal e três *loops* ficam expostos para fora da célula, enquanto três *loops* e a extremidade carboxiterminal ficam voltados para o compartimento citoplasmático. ECL: *loops* extracelulares; TM: domínios transmembrana.

O receptor de quimiocinas CXCR4 desencadeia seus efeitos biológicos através da interação com a quimiocina ligante, CXCL12 (fator derivado de célula de estroma-1, SDF-1). As quimiocinas, também designadas de citocinas quimiotáticas ou quimioatraentes, constituem um grupo de pequenas proteínas solúveis e básicas,

cujo peso molecular varia, em geral, de oito a 10 kDa. Estas moléculas são classificadas a partir do arranjo dos dois primeiros, dos quatro, resíduos conservados de cisteína, adjacentes à extremidade aminoterminal. Os dois maiores grupos são as quimiocinas CXC que apresentam um aminoácido entre duas cisteínas e as quimiocinas CC que possuem duas cisteínas adjacentes (ROLLINS, 1997; BAJETTO *et al.*, 2001; FERNANDEZ, LOLIS, 2002; BALKWILL, 2004; KULBE *et al.*, 2004; LAURENCE, 2005).

A nomenclatura dos receptores e das quimiocinas consiste da família, seguida da letra “R” ou “L”, para denotar receptor ou ligante, respectivamente, e por último, um número de identificação que indica a ordem de descoberta. Assim, CXCL12 é uma quimiocina pertencente à família CXC, número 12. O mesmo vale para o receptor, pois a sistemática está baseada na estrutura de seu ligante (MURPHY *et al.*, 2000).

O CXCR4 tem como ligante único o CXCL12, ao contrário do que é verificado para a maioria das quimiocinas e dos receptores de quimiocinas. Em geral, uma quimiocina pode se ligar a vários receptores e um receptor pode ter várias quimiocinas ligantes, estabelecendo uma relação denominada de “promíscua”. A especificidade da interação CXCR4-CXCL12 foi demonstrada em estudos com ratos *knockout* para o CXCR4 ou para o CXCL12, em que se verificaram defeitos no coração, no sistema nervoso, na hematopoiese e na formação dos vasos sanguíneos do intestino (ZOU *et al.*, 1998).

A ligação entre o CXCR4 e seu ligante induz uma mudança de conformação deste receptor, que resulta na ativação da proteína G. Resumidamente, essa ativação produz mensageiros lipídicos secundários, como o fosfatidilinositol trifosfato e diacilglicerol, desencadeando o aumento transiente da concentração de cálcio citosólico e a ativação de proteínas quinases, respectivamente. As quinases, por sua vez, fosforilam moléculas efetoras, como as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) ativando, na maioria dos casos, a via ERK1/2 (MAJKA *et al.*, 2000; SORIANO *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2004; PENG *et al.*, 2005).

### 1.3.1 Importância do par CXCR4-CXCL12 no câncer

A interação CXCR4-CXCL12 ativa vias de sinalização intracelulares que desencadeiam inúmeros efeitos biológicos, como sobrevivência, proliferação e

invasão celular, contribuindo com o desenvolvimento do câncer. Estes efeitos podem resultar de uma ação autócrina, parácrina ou indireta (LUKER; LUKER, 2006).

O CXCL12 pode apresentar um efeito indireto no câncer através do recrutamento de leucócitos, especialmente dos macrófagos associados ao tumor (TAMs) (ORIMO *et al.*, 2006). As implicações dos leucócitos no câncer são divergentes. Em princípio, poderiam reconhecer e atuar contra as células tumorais, mas, poderiam também fornecer sinais (como expressar fatores de crescimento e angiogênicos, metaloproteínases, etc.) que favorecem o desenvolvimento tumoral (BEN-BARUCH, 2006; ROLLINS, 2006). Esta quimiocina também pode ser secretada pelas próprias células tumorais, via autócrina, ou pelas células do estroma, via parácrina, atuando diretamente sobre a massa tumoral. De forma parácrina, a proteína CXCL12 secretada pelos fibroblastos presentes no estroma tumoral também conferem vantagens de crescimento ao tumor via angiogênese (LAURENCE, 2005; BEN-BARUCH, 2006; ORIMO *et al.*, 2005).

A proteína CXCR4 é o receptor de quimiocinas mais freqüentemente expresso por células tumorais, estando expresso em mais de 20 tipos de tumores (ZLOTNIK, 2004).

Jordan *et al.* (1999) verificaram que a proteína CXCR4 esteve expressa em células de adenocarcinoma de cólon (HT-29). Majka *et al.* (2000) e Crazzolara *et al.* (2000) também constataram superexpressão deste receptor em células de Jurkat (de leucemia de célula T) e em células ATL-2 (de linfoma de célula T).

A elevada expressão do receptor *CXCR4* também foi constada em células tumorais de rim *VHL* negativo, de carcinoma de ovário (CAOV3) e de câncer de mama (MCF-7), quando expostas à hipóxia. Isto decorre em parte da ativação da via HIF-1/hipóxia. Foi demonstrado que, em baixas concentrações de oxigênio, ocorre o recrutamento do fator de transcrição HIF-1 (fator indutor de hipóxia-1) ao promotor do *CXCR4*, o qual regula positivamente a expressão deste gene (SCHIOPPA *et al.*, 2003; STALLER *et al.*, 2003). A superexpressão do gene *CXCR4* pela ação de fatores de transcrição foi observada ainda na linhagem de tumor de próstata, PC-3. Com estas células foi demonstrado que o fator nuclear- $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) regula positivamente a transcrição deste gene. Além disso, verificou-se que, sob estímulo da proteína CXCL12, ocorre a ativação deste fator. Isso porque o inibidor de proteínas  $\kappa\beta$  ( $I\kappa\beta$ ) é inativado pela fosforilação via MAP quinase dependente de CXCL12 (KUKREJA *et al.*, 2005).

Em 2001, Muller *et al.*, pioneiros na pesquisa de marcadores moleculares de metástases, forneceram uma importante contribuição para o entendimento dos mecanismos pelos quais o par CXCR4-CXCL12 atuam. Além de mostrar a migração direcionada de células tumorais de mama, que superexpressam a proteína CXCR4, à órgãos-alvo de metástase (pulmão, linfonodo, etc.), que expressam altos níveis de CXCL12, constataram que esta quimiocina induz a polimerização da actina e, que a incubação das células tumorais com anticorpo anti-CXCR4 ou anti-CXCL12 bloqueavam a capacidade de quimiotaxia e invasão mediada pelo CXCL12.

Alguns antagonistas da proteína CXCR4 que bloqueiam ou diminuem os efeitos da interação receptor-ligante também foram descobertos. Tamamura *et al.* (2003) constataram que análogos de T140 (TC14012, TE14005 e 4F-benzoil-TN14003) são capazes de inibir a migração induzida pelo CXCL12 em células tumorais de mama (MDA-MB-231), de linfoma de célula T (Sup-T1) e de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs). Além disso, verificaram a redução de metástases pulmonares em ratos SCID-MDA-MB-231+ tratados com 4F-benzoil-TN14003. O AMD3100 também é um antagonista do CXCR4 capaz de inibir a proliferação, migração e invasão (JIANG *et al.*, 2007).

No câncer de mama e em outros tipos de tumores malignos, o perfil de expressão do receptor CXCR4 foi bastante estudado por imunohistoquímica. Cabioglu *et al.* (2005) constataram a expressão predominantemente citoplasmática desta proteína em tumores linfonodo positivo, embora essa associação não tenha atingido relevância estatística. Em tumores linfonodo negativo a expressão mais comum do CXCR4 foi a nuclear.

Salvucci *et al.* (2006), ao analisar diversos tipos histológicos de câncer de mama, invasivos e pré-invasivos, também constataram a expressão da proteína CXCR4. Eles notaram inclusive o aumento na proporção de células com alta marcação nuclear para este receptor com a progressão do câncer, de forma que foi constatada a expressão nuclear da proteína CXCR4 em 22% de células normais, 45% dos tumores ductais *in situ* e 67% dos carcinomas invasivos. A elevada expressão nuclear do CXCR4 esteve associada com metástase à linfonodos, e, a forte marcação citoplasmática de CXCR4 esteve associada a tumores de maior grau histológico, RE negativo, RP negativo e ERBB2 positivo. Também foi observada menor sobrevida em pacientes com forte expressão nuclear e citoplasmática deste receptor (SALVUCCI *et al.*, 2006).

Em carcinomas de células escamosas e adenocarcinomas de esôfago também foi observada a expressão da proteína CXCR4. Gockel *et al.* (2006) constataram maior expressão deste receptor em amostras pT3-4, pN+, pM0, para os dois tipos histológicos considerados.

A funcionalidade deste receptor após estímulo com a proteína CXCL12 foi demonstrada em vários trabalhos. A atividade do receptor CXCR4 foi constatada através do aumento dos níveis de cálcio citosólico, da migração e proliferação celular, da ativação de vias intracelulares (como a AKT e PI-3K), dentre outros (JORDAN *et al.*, 1999; MAJKA *et al.*, 2000; CRAZZOLARA *et al.*, 2001; PENG *et al.*, 2005).

O papel do CXCR4 no desenvolvimento e na progressão do câncer, bem como sua participação em outros processos, como de infecção pelo HIV, tornaram-no um possível alvo-terapêutico e o foco de muitas pesquisas.

Estudos com linhagens celulares de melanomas, linhagens tumorais de pâncreas e amostras de adenocarcinoma ductais pancreáticos demonstraram a correlação entre a expressão do *CXCR4* e a metilação do seu promotor (SATO *et al.*, 2005; MORI *et al.*, 2005). Além disso, Sato *et al.* (2005) também lançaram a hipótese de que linhagens tumorais de mama poderiam ter o gene *CXCR4* regulado por esse mesmo mecanismo. Assim, neste trabalho nos propomos a estudar uma ilha de CpG do gene *CXCR4* ampliando o conhecimento desse mediador na tumorigênese no câncer de mama.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação da metilação do DNA no controle da expressão do gene *CXCR4* em linhagens tumorais de mama para posterior correlação dos achados de metilação em tumores primários com aspectos clínico-patológicos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o padrão de expressão do receptor de quimiocina *CXCR4* em linhagens tumorais de mama, através de RT-PCR;
- Tratar com agente desmetilante 5-Aza-CdR a linhagem tumoral que não expressou o gene *CXCR4* a fim de verificar que a inativação deste receptor decorre da metilação da citosina;
- Clonar e seqüenciar um fragmento da ilha de CpG presente no promotor deste gene, para identificar os dinucleotídeos CG diferencialmente nas linhagens de estudo;
- Correlacionar o padrão de metilação obtido para o fragmento da ilha de CpG estudada com o padrão de expressão gênica encontrado nas linhagens celulares;
- Confirmar o perfil de metilação obtido pelo seqüenciamento através da análise de restrição combinada com bissulfito de dois fragmentos de diferentes ilhas de CpG presentes no gene *CXCR4*;
- Estudar o padrão de metilação do gene *CXCR4*, através de MSP, em amostras de tumores primários de mama, a fim de confirmar que o perfil de metilação obtido para as linhagens também é verificada em amostras de tumor de mama;
- Correlacionar os dados de metilação das amostras tumorais com os dados clínico-patológicos das pacientes a fim de determinar o envolvimento deste gene nos processos de formação e progressão tumoral em mama.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

##### 3.1.1 Linhagens tumorais de mama

Neste estudo foram utilizadas as linhagens tumorais de mama humana MCF-7 (linhagem de referência, ATCC HTB-22™), PMC-42 (WHITEHEAD *et al.*, 1984), MDA-MB-435 (ATCC HTB-129™) e MDA-MB-436 (ATCC HTB-130™), gentilmente cedidas pelo Instituto Ludwig de Pesquisa em Câncer de São Paulo (LICR-SP).

A MCF-7 é uma célula epitelial RE+ de adenocarcinoma de mama, obtida a partir de efusão pleural de pacientes (ATCC, 2008). A PMC-42 é uma linhagem de carcinoma de mama, RE+ e RP+, com característica de célula-tronco, o que justifica sua capacidade de formar organóides com diferentes tipos morfológicos, capazes de secretar proteínas do leite, em cultura (WHITEHEAD *et al.*, 1984; ACKLAND; MICHALCZYK; WHITEHEAD, 2001). A MDA-MB-436 é uma célula pleomórfica ER- de adenocarcinoma de mama, também obtida a partir de efusão pleural de pacientes (ATCC, 2008). A MDA-MB-435 foi inicialmente descrita em 1978 como uma linhagem metastática de câncer de mama e foi depositada no ATCC como MDA-MB-435S (CAILLEAU; OLIVE; CRUCIGER, 1978). Esta linhagem é altamente agressiva, assim como a MDA-MB-436, não expressa RE e E-caderina. A origem desta célula foi muito discutida, pois esta linhagem não expressa alguns genes típicos do epitélio mamário (pS2, mamaglobina e proteína indutora da prolactina), mas, por outro lado, expressa genes típico de melanócitos (receptor retinóide X, ACP-5, tirosinase, proteína relacionada à tirosina). Apesar desta característica, designada de infidelidade de linhagem (expressão de marcadores de diferentes linhagens), admite-se que a MDA-MB-435 é uma linhagem de mama. Como esta linhagem é bastante invasiva, portanto, associada a tumores mais avançados, pressupõe-se que esta célula pode sofrer, devido à instabilidade genética, dediferenciação, perdendo alguns marcadores típicos da mama e ganhando outros marcadores (ELLSION *et al.*, 2002; SELLAPPAN *et al.*, 2004).



### 3.1.1.1 Cultivo celular

As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino- SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 2 mM de glutamina (Gibco, Gaithersburg, MD, USA), garamicina 40 µg/mL (Schering-Plough, Rio da Janeiro, RJ, Brasil), ciprofloxacina 10 µg/mL (Hallexlstar, Goiânia, Goiás, Brasil) e anfotericina B 2,5 µg/mL (Cristalia, Itapira, SP, Brasil). As linhagens PMC-42, MDA-MB-435 e MDA-MB-436 também receberam suplementação do hormônio insulina 5 µg/mL (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) e a PMC-42 também foi cultivada na presença de hidrocortisona 5 µg/mL (União Química, SP, Brasil).

Alíquotas de linhagens com aproximadamente  $10^6$  células/mL, congeladas em SFB 40% e DMSO 10%, foram retiradas do nitrogênio líquido (-196°C), descongeladas a 37°C, transferidas dos tubos criogênicos para garrafas com área de cultivo igual a 25 cm<sup>2</sup>, contendo o meio de cultura devidamente suplementado, e, incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio foi trocado regularmente e o crescimento celular foi acompanhado. Quando se obteve uma monocamada de células aderidas à garrafa com aproximadamente 80-90% de confluência, efetuou-se a amplificação da cultura para posterior extração de RNA ou DNA e para estoque. A expansão da cultura foi efetuada através do tratamento com tripsina 0,25% (TrypLE™ Express, Gibco, Gaithersburg, MD, USA).

### 3.1.1.2 Teste para detecção de contaminação por *Mycoplasma hominis*

A fim de verificar a ocorrência de contaminação da cultura por *Mycoplasma hominis* efetuou-se uma reação de PCR para detectar DNA genômico deste microrganismo no cultivo.

Para tanto, no momento da troca de garrafa foi coletado aproximadamente 1 mL da suspensão de células, estas foram concentradas por centrifugação e uma pequena quantidade de célula foi coletada com um palito e adicionada ao sistema contendo um volume final de 15 µL e 1X tampão de *Taq* Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de dNTPs, 0,6 U de *Taq* polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 1,25 pmoles de iniciadores específicos (MycoA F 5'GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG 3' e MycoB R 5'CGG ATA ACG CTT GCG

ACC TAT G 3'). As condições de amplificação foram: desnaturação por 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final da ciclagem as moléculas foram extendidas por 7 minutos a 72°C. Os produtos da reação foram aplicados em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata 10% (item 3.4.6.1). Foi utilizada como controle uma amostra de DNA contaminada proveniente do Instituto Ludwig. No caso de haver contaminação por *M. hominis* seria verificado um fragmento de 455 pares de bases. Para evitar contaminação foi feita suplementação com antibiótico ciprofloxacina como descrito acima.

### 3.1.2 Amostras tumorais de mama

Foram utilizadas 76 amostras de tumores primários de mama, dentre elas 51 amostras de carcinomas ductais invasivos, uma amostra de carcinoma ductal *in situ*, 21 amostras de carcinomas lobulares invasivos e três amostras de fibroadenomas. Todas as amostras foram gentilmente cedidas pela Dra. Enilze S. F. Ribeiro e pelo Dr. Iglénir João Cavalli, responsáveis pelo Banco de Tumores do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, do Depto. de Genética/UFPR. As amostras catalogadas neste banco de tumores foram obtidas mediante consentimento informado das pacientes (ANEXO 1) e aprovação do Comitê de Ética, processo nº 25000.007020/2003-93; registro no CONEP: 7220 e parecer nº 251/2003, de 20/02/2003, do Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba-PR (proveniência das amostras sob responsabilidade do Dr. Rubens Silveira Lima).

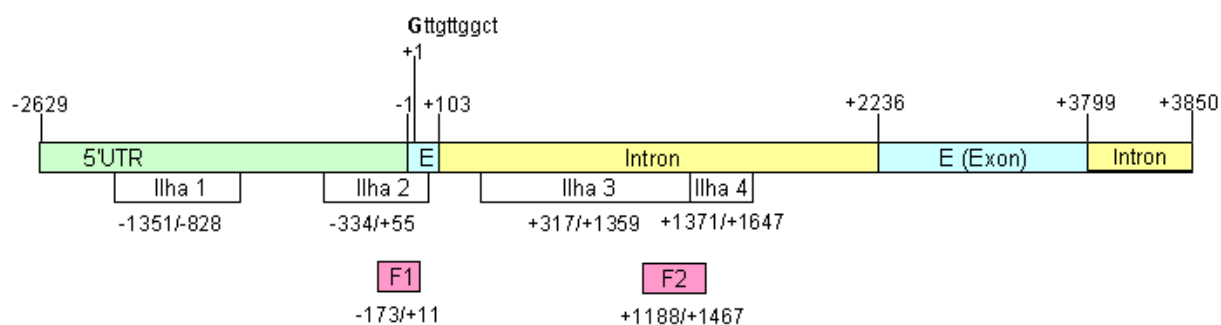
Os laudos foram obtidos de pacientes internadas no Hospital de Clínicas da UFPR e no Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba-PR. A idade das pacientes variou de 15 a 84 anos (média de 58 anos, desvio padrão de 15 anos).

### 3.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ILHAS DE CpG PRESENTES NO GENE CXCR4

Para a identificação da região promotora do receptor CXCR4 descrito para humano, foi obtida a seqüência do RNAm (seqüência de referência NM\_003467.2) deste gene pelo programa *Unigene* (Hs.593413) disponível no site do *National Center of Biotechnology Info- NCBI* (UNIGENE, 2008). Esta foi então submetida à análise no programa *Human Blat Search* (HUMAN BLAT, 2008). Neste *site* foi

possível obter a localização do gene no cromossomo e a seqüência de nucleotídeos que representava desde a região promotora até o segundo intron do gene *CXCR4* (2,6 Kb antes e 1,7 kb após o nucleotídeo +1 descrito por Wegner *et al.*, 1998).

A presença de ilhas de CpG neste fragmento foi determinado com auxílio do recurso *CpGPlot*, disponível na página do grupo *European Bioinformatic Institut-EMBL* (*CpGPLOT*, 2008). Esta análise seguiu os parâmetros estipulados pelo *CpGPlot* que considera como ilhas de CpG os fragmentos com mais de 200 pb, contendo pelo menos 50% de G+C e uma razão entre a freqüência observada e a esperada de dinucleotídeos CG superior ou igual a 0,6 (GARDINER-GARDEN; FROMMER, 1987). Na região analisada constatou-se a presença de quatro ilhas de CpG no gene *CXCR4* (FIGURA 4).



**FIGURA 4 – ESQUEMA DO GENE *CXCR4* MOSTRANDO A POSIÇÃO DAS QUATRO ILHAS DE CpG E DOS FRAGMENTOS (F1 e F2) ESTUDADOS.**

**NOTA:** F1 e F2 (indicados pelos quadrados em rosa) são as regiões do gene *CXCR4* analisadas neste trabalho. O nucleotídeo +1 corresponde resíduo G presente no começo do exon 1 (segundo Wegner *et al.*, 1998). A localização da região 5'UTR, dos exons e dos introns em relação ao nucleotídeo +1 está indicado acima; enquanto a localização das ilhas de CpG está exposta logo abaixo do esquema.

### 3.3 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE *CXCR4* EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA

Neste estudo o padrão de expressão do gene *CXCR4* nas linhagens tumorais de mama foi analisado ao nível de transcrito, através da técnica de RT-PCR.

Para as reações de RT-PCR foram utilizados iniciadores específicos que anelavam entre os exons 1 e 2, na região 3' do gene de estudo, e, entre os exons 7 e 8, da região 3' do gene de expressão constitutiva, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*GAPDH*), usado como controle (ANEXO 3). Os iniciadores

planejados foram avaliados pelo programa *OLIGOTECH* (OLIGOTECH, 2008) e suas seqüências, bem como o tamanho dos fragmentos esperados na amplificação são mostrados no quadro 2.

INICIADORES	TM (°C) OLIGOTECH	FRAGMENTO ESPERADO	FRAGMENTO COM DNA CONTAMINANTE EXON+INTRON
F <i>GAPDH</i> 5' CTG CAC CAC CAA CTG CTT A 3'	67,6	296 pb	489 pb
R <i>GAPDH</i> 5' CAT GAC GGC AGG TCA GGT C 3'	71,9		
F <i>CXCR4</i> 5' CAG CAG GTA GCA AAG TGA 3'	64,5	396 pb	2488 pb
R <i>CXCR4</i> 5' AGC GTG ATG ACA AAG AGG 3'	64,5		

## QUADRO 2 - CARACTERÍSTICAS DOS INICIADORES ESPECÍFICOS PARA AS REAÇÕES DE RT-PCR.

### 3.3.1 Extração de RNA total das linhagens celulares de mama

Para isolar o RNA total das linhagens celulares foi utilizado o reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), segundo especificações do fabricante. A purificação de RNA com tal reagente é uma adaptação do método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987).

Em resumo, efetuou-se a lise das células com o reagente TRIzol®, seguida da separação da fase aquosa com clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), precipitação com isopropanol absoluto (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), lavagem com etanol 75% em água DEPC e ressuspensão em água DEPC. Os RNAs extraídos foram armazenados a -80°C.

A integridade do RNA total extraído foi inferida através da aplicação de 1 µg de cada amostra em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo 0,2 µg/mL e visualizado em luz UV (TFX-35-M, Life Technologies, V03-6608/DP-001-FDC, Vilber Lourmat, Deutschland). Antes de ser aplicado, o RNA total foi desnaturado a 65°C por 5 minutos, e mantido em condição desnaturante, em tampão de amostra contendo 7 M de uréia e 30% de glicerol. A qualidade do RNA foi avaliada a partir

das intensidades relativas das bandas 28S e 18S dos RNAs ribossômicos. Foram considerados íntegros os RNAs que apresentaram tais bandas bem evidentes, tendo a primeira o dobro da intensidade da segunda.

A quantificação de RNA foi efetuada por espectrofotometria, em comprimento de onda de 260 nm, considerando-se que 1  $DO_{260nm}$  equivale a 40  $\mu\text{g/mL}$  de RNA. O grau de contaminação com proteínas foi estimado a partir da relação entre as leituras efetuadas a 260 e 280 nm, devendo o valor variar de 1,6 a 1,8. Foi utilizado o espectrofotômetro GeneQuantII (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

### 3.3.2 Síntese da primeira fita de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir da transcrição reversa de aproximadamente 500 ng de RNA total, na presença de 200 U da enzima transcriptase reversa (Superscript II, GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA) segundo instruções do fabricante.

A primeira fita de cDNA foi gerada em uma reação com volume final de 20  $\mu\text{L}$  contendo 500  $\mu\text{M}$  de dNTP (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA), 25  $\mu\text{g/mL}$  de OLIGO dT (IDT, Coralville, IA, USA), 1X solução tampão de primeira fita (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA), 40 U de inibidor de RNase (rRNasin, Promega, Madison, WI, USA), 10  $\mu\text{M}$  de DTT (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA) e a enzima Superscript II (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA). Inicialmente, a mistura de RNA, água e iniciador foi incubada a 65°C por 5 minutos para promover a abertura de possíveis estruturas secundárias. A reação de síntese de cDNA foi realizada a 42°C por 60 minutos e a 72°C por 15 minutos. O cDNA sintetizado foi estocado a -20°C.

Para verificar a eficiência de síntese e a qualidade do cDNA utilizou-se como controle a amplificação por PCR de um fragmento de 296 pb do gene de expressão constitutiva *GAPDH*. Para isto empregou-se 1  $\mu\text{L}$  do cDNA em reações de volume final de 20  $\mu\text{L}$ , contendo 1X tampão de *Taq* Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  de dNTPs, 1 U de *Taq* Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 8 pmoles de iniciadores específicos. As condições de amplificação usadas foram: desnaturação inicial do cDNA por 10 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 63°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 5

minutos. Os dados sobre os iniciadores utilizados para o gene *GAPDH* estão expostos no quadro 2, item 3.3. Para todas as reações de PCR foi utilizado um controle interno, denominado de *no*. No sistema do tubo *no* eram colocados todos os reagentes da reação de PCR, com exceção do DNA. Assim, a amplificação de fragmentos no *no* era um indicativo de que havia contaminação com DNA exógeno. Quando se verificavam bandas neste controle, a reação era repetida. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.

### 3.3.3 *Semi-Quantitative Reverse Transcription-PCR*- RT-PCR Semi-Quantitativo do gene *CXCR4*

Para o estudo do padrão de expressão do gene *CXCR4* foi utilizada a técnica de RT-PCR Semi-Quantitativo.

As reações foram feitas em duplicatas para o gene em estudo e para o gene *GAPDH*, utilizado como controle. Nos sistemas com volume final de 20 µL foram adicionados 1-2 µL do cDNA sintetizado, 1X tampão de *Taq* Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTPs, 1 U de *Taq* Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 8 pmoles de iniciadores específicos. As condições da reação para o gene *CXCR4* foram: desnaturação do cDNA a 95°C por 10 minutos, seguido de ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento à 58°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com extensão final de 72°C por 10 minutos. As ciclagens utilizadas foram: 30, 35, 38. As condições de amplificação para o gene controle foram detalhadas no item 3.3.2. Os dados sobre os iniciadores utilizados para o gene *CXCR4* estão expostos no quadro 2, item 3.3. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.

### 3.3.4 Tratamento com agente desmetilante 5-Aza-2'-deoxicitidina (5-Aza-CdR)

Para confirmar o papel da metilação na regulação da expressão do gene *CXCR4*, a linhagem MDA-MB-435, que não expressou o RNAm deste gene, foi tratada com o agente desmetilante 5-Aza-CdR.

Em resumo, uma quantidade de  $10^6$  células/mL, foi transferida para uma garrafa média de 75 cm<sup>2</sup> e cultivada por 24 horas em meio devidamente suplementado. Após a adesão das células na garrafa, estas foram cultivadas por cinco dias consecutivos em meio apropriado acrescido de 1 µM de 5-Aza-CdR (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). O meio e a droga foram trocados diariamente. Após este período, efetuou-se a extração do RNA total (item 3.3.1) da linhagem, para síntese de cDNA (item 3.3.2) e análise de expressão por RT-PCR, cujas condições foram descritas no item 3.3.3. O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo.

#### 3.4 CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE *CXCR4*

A análise do padrão de metilação do gene *CXCR4* foi feita inicialmente com linhagens tumorais de mama e, posteriormente, com amostras de tumores primários de mama. Em princípio efetuou-se o crescimento das linhagens tumorais para, em seguida, efetuar a extração do DNA destas, através do método de fenol:clorofórmio. O DNA purificado foi submetido ao tratamento com o reagente bissulfito de sódio e, este DNA modificado foi então utilizado como molde em reações de *nested* PCR, com iniciadores específicos para amplificação dos fragmentos F1 e F2 das ilhas de CpG. Os produtos amplificados foram purificados, mas, apenas o fragmento 1 foi clonado e seqüenciado. Em paralelo, efetuou-se a confirmação dos resultados obtidos pelo seqüenciamento através da análise da restrição combinada com bissulfito (COBRA) dos dois fragmentos (F1 e F2).

Quanto às amostras tumorais, o DNA extraído das células tumorais e tratado com bissulfito de sódio foi analisado pela técnica MSP (*Methylation Specific PCR*).

##### 3.4.1 Desenho de iniciadores específicos para *Nested* PCR

A *nested* PCR é uma técnica que envolve duas reações de PCR, com dois pares de iniciadores distintos: um flanqueando a região de interesse (iniciadores *nested*, ou internos) e outro mais externo a esta região (primeiro par de iniciadores, iniciadores externos). A primeira reação é feita com os iniciadores externos em condições menos específicas, visto que o DNA tratado com bissulfito de sódio fica









#### 3.4.2.1 Extração de DNA das linhagens tumorais de mama

A extração de DNA das linhagens foi feita através do método fenol:clorofórmio, como descrito por Costa *et al.* (2006).

Em síntese, as células foram digeridas durante a noite em tampão TES (1 M Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 M EDTA e 10% SDS), contendo 200 µg/mL de proteinase K (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 200 µg/mL de RNase A (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA). Em seguida, efetuou-se a extração com 1 volume de fenol:clorofórmio (Invitrogen/Merck; Carlsbad, CA, USA/Whitehouse Station, NJ, USA) até a obtenção de uma fase aquosa transparente livre de proteínas. Após recuperação da fase aquosa, o DNA foi precipitado com 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M, pH 5; e 2 volumes de etanol absoluto (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA). Após centrifugação, o precipitado de DNA foi lavado com etanol 70%, ressuspenso em água ultra-pura estéril e armazenado a 4°C.

A qualidade e quantidade do DNA purificado foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A presença de uma banda única foi indicativo de que o DNA estava bem dissolvido e não estava degradado. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop ND-1000 UV-VIS, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA), disponível no LICR-SP.

#### 3.4.2.2 Extração de DNA dos tumores primários de mama

Para extração do DNA dos tumores, um fragmento de aproximadamente 1 cm de cada amostra foi picotado com auxílio de um bisturi e digerido a 55°C em 500 µL de tampão TES (10 mM TrisHCl, 50 mM EDTA, 2,7% SDS), contendo 62,5 µg/mL de Proteínase K (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 100 µg/mL de RNase A (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA). Após dissolução completa da massa tumoral, efetuou-se a extração segundo protocolo descrito por Costa *et al.* (2006).

A qualidade e quantidade do DNA purificado também foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. O DNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro GeneQuant II (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA).

### 3.4.3 Tratamento do DNA extraído das linhagens e dos tumores primários de mama com bissulfito de sódio

Os DNAs devidamente quantificados foram submetidos ao tratamento com o bissulfito de sódio. Este agente promove a deaminação de citosinas não metiladas em uracilas, as quais após a reação de PCR são convertidas em timinas. Por outro lado, as citosinas metiladas permanecem como citosinas, pois o grupamento metila protege contra a reação de deaminação. O método empregado para tratar o DNA com bissulfito de sódio corresponde a uma adaptação do método de Jerónimo *et al.* (2001).

O tratamento de DNA com bissulfito de sódio foi feito utilizando o *EpiTect® Bissulfite kit* (Qiagen, Valencia, California, USA), segundo protocolo fornecido pelo fabricante. Basicamente, este tratamento consistiu na conversão mediada pelo bissulfito de sódio das citosinas não-metiladas; ligação do DNA tratado à sílica presente na membrana de uma coluna; lavagem e dessulfonação do DNA ligado à membrana; lavagem para remoção do agente de dessulfonação (hidróxido de sódio) e eluição do DNA convertido pelo bissulfito. O DNA tratado foi armazenado a -80°C.

Para avaliar a qualidade do tratamento, efetuou-se uma reação de PCR com o gene da seqüência repetitiva denominado *SATR1*, como descrito por Costa *et al.* (2006).

### 3.4.4 Amplificação dos fragmentos das ilhas de CpG do gene *CXCR4*

Os fragmentos das ilhas de CpGs do gene *CXCR4* foram amplificados por *nested* PCR. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 1X tampão de *Taq* Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTPs, 1 U de *Taq* Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 pmoles de iniciadores e 1-5 µL de DNA (0,02-0,1 µg/µL) previamente tratado com bissulfito de sódio. As reações *nested* foram realizadas nas mesmas condições utilizando-se 1-5 µL do produto da primeira reação.

As reações foram efetuadas com incremento de 2°C na temperatura de anelamento após o primeiro ciclo e com aumento de mais 2°C após o sexto ciclo, seguindo com esta temperatura de anelamento até o final da reação. Para o fragmento 1, foi utilizada na primeira reação uma temperatura inicial de anelamento

igual a 53°C e para a reação *nested* a temperatura inicial foi igual a 57°C. Para o fragmento 2, a temperatura inicial da primeira reação foi 47°C e a da reação *nested* foi 51°C. As condições de amplificação tanto na primeira reação como na reação *nested* foram: desnaturação inicial do DNA por 12 minutos a 94°C; seguida por 1 ciclo de desnaturação a 94°C por 3 minutos, anelamento por 3 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos; seguida por 5 ciclos de desnaturação a 94°C por 3 minutos, anelamento por 3 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final da ciclagem as moléculas foram estendidas por 7 minutos a 72°C. Os dados sobre os iniciadores utilizados para as reações de *nested* PCR estão expostos no item 3.4.1. A análise da amplificação foi feita em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

#### 3.4.5 Clonagem e seqüenciamento do fragmento 1 da ilha de CpG-2 do gene *CXCR4*

Inicialmente, o fragmento 1 da ilha de CpG-2 do gene *CXCR4* amplificado por *nested* PCR foi purificado em gel de agarose 1%, utilizando o *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen, Valencia, California, USA), seguindo as especificações do fabricante. Em seguida, efetuou-se a ligação do amplicon de 184 pb ao vetor pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) em uma reação com um volume final de 10 µL, contendo 1X tampão de ligação (Promega, Madison, WI, USA), 50 ng de pGEM®-T Easy, 3 U de T4 DNA ligase (Promega, Madison, WI, USA) e aproximadamente 9 ng do produto de PCR preparado no mesmo dia. Esse sistema foi incubado durante a noite à 4°C e armazenado a -20°C.

Esse sistema permite a clonagem de produtos de PCR que possuem adeninas nas extremidades 3', adicionadas por algumas polimerases termoestáveis, como a enzima *Taq* polimerase. O vetor linearizado possui timinas nas pontas 3', aumentando a eficiência de ligação com o produto de PCR. Como o fragmento que se deseja clonar se insere no gene *lac*, que codifica a β-galactosidase, é possível identificar os clones recombinantes a partir da coloração das colônias na presença de X-Gal. Nas células que possuem o vetor sem inserto a enzima cliva este substrato produzindo uma coloração azulada.

O produto de ligação foi então utilizado para transformação de bactérias DH10B eletrocompetentes, preparadas conforme descrito por Sambrook e Russel, (2001). Após eletroporar o plasmídeo recombinante nesta estirpe bacteriana e de recuperar as células em meio SOC, a suspensão de células foi plaqueada em meio LA contendo estreptomicina 20 µg/mL, ampicilina 250 µg/mL, IPTG 45 µg/mL e X-Gal 25 µg/mL. Esse meio proporciona o isolamento de clones por alfa complementação. As colônias brancas em sua maioria entre colônias azuis devem ter o inserto clonado no vetor.

Para a confirmação da clonagem foram selecionadas 12 colônias isoladas de cada placa. Cada colônia foi coletada com um palito estéril e semeada para uma nova placa (placa mãe). Com o mesmo palito foram inoculadas células bacterianas em um tubo contendo a mistura da reação de PCR.

As reações de PCR de colônia foram realizadas em um volume final de 20 µl contendo tampão 1X de *Taq* Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTPs, 1 U de *Taq* polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 8 pmoles de iniciadores F2 e R2 (item 3.4.1). As condições de amplificação foram: desnaturação por 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 61°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final da ciclagem as moléculas foram extendidas por 7 minutos a 72°C. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Após constatar os clones que possuíam o vetor recombinante, efetuou-se a extração de DNA plasmidial com o *QIAprep® Miniprep Kit* (Qiagen, Valencia, California, USA). Resumidamente, uma colônia isolada foi inoculada em meio LB, contendo os antibióticos adequados, e incubada a 37°C, 180-220 rpm (C25Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, NJ, USA), durante a noite. A cultura crescida foi aliquoteada, as células foram concentradas por centrifugação e, em seguida, lisadas sob condições alcalinas, na presença de RNase A. O lisado foi neutralizado e o DNA plasmidial foi ligado à membrana de sílica de uma coluna. A coluna foi lavada e o DNA foi eluído em tampão com baixa concentração de sal ou com água ultra-pura, pH 7,0-8,5. A qualidade e a quantidade de DNA plasmidial foi inferida em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, comparando as amostras a 100 ng de pGEM (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O produto da miniprep foi armazenado a -20°C.

A partir do DNA plasmidial extraído de cada um dos oito clones, efetuou-se a reação de seqüenciamento. O seqüenciamento foi realizado segundo a técnica de terminação com dideoxinucleotídeos descrita por Sanger, Nicklen e Coulson (1977) utilizando-se o *Big Dye® Terminator Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), segundo as instruções do fabricante.

A reação de seqüenciamento foi realizada em um sistema de 10 µL contendo 2 µL de Big Dye Terminator v3.0 100RR, 1 µL de tampão *Save Money* 2,5X (200 mM TrisHCl, pH 8,5; 5 mM MgCl<sub>2</sub>), 5 pmol/µL de iniciador universal ou reverso M13 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e aproximadamente 250 ng de DNA plasmidial. As condições utilizadas foram: desnaturação inicial de 96°C por 1 minuto, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos e anelamento a 60°C por 2 minutos e 30 segundos. Os produtos amplificados foram precipitados em isopropanol 75%, lavados em etanol 65%, secos a 37°C. O DNA plasmidial precipitado foi ressuspensão em tampão contendo formamida deionizada e corante BlueDextran/EDTA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), na razão de 5:1. Por fim, as amostras foram submetidas à eletroforese por capilaridade no seqüenciador automático de DNA ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), no ILCR-SP ou no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da UFPR.

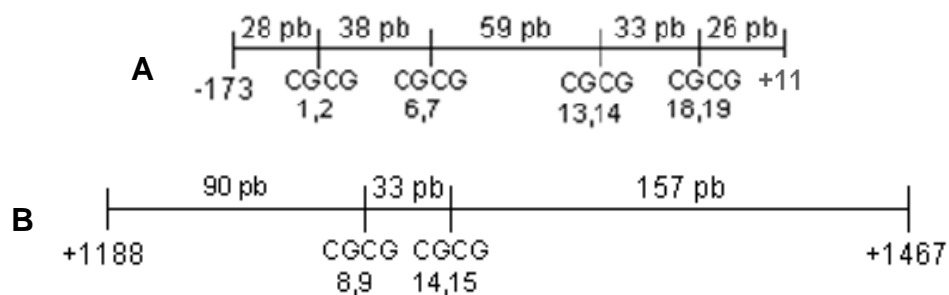
#### 3.4.6 *COmbined Bisulfite Restriction Analysis*- COBRA dos fragmentos das ilhas de CpG do gene *CXCR4*

Os dois fragmentos das duas ilhas de CpG presentes no gene *CXCR4* foram submetidos à análise de restrição combinada com bissulfito (XIONG; LAIRD, 1997). Esta técnica, utilizada para confirmar os dados obtidos por seqüenciamento, permite uma análise mais limitada, visto que somente é possível inferir o perfil de metilação dos dinucleotídeos presentes nos sítios de restrição da enzima *Bst*U1. Assim, a digestão completa do DNA ocorre somente se os dinucleotídeos CpGs contidos nos sítio CGCG que a aludida enzima reconhece, mantiverem-se não modificados após tratamento com bissulfito de sódio.

Brevemente, cerca de 50 ng do produto de PCR purificado foi digerido com 2 U da enzima *Bst*U1 (New England Biolabs, Hertfordshire, England, UK), por 4 horas em um sistema com volume final de 20 µL contendo 2 µL de 1X tampão *Neb*

*buffer 2* (New England Biolabs, Hertfordshire, England, UK). Os produtos de digestão foram aplicados em géis de poliacrilamida 12% (item 3.4.6.1).

Na figura 5 estão representados os mapas de restrição para o fragmento 1 da ilha de CpG-2 e para o fragmento 2 das ilhas 3/4 do gene *CXCR4*.



**FIGURA 5 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MAPA DE RESTRIÇÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR *NESTED*. (A) FRAGMENTO 1 E (B) FRAGMENTO 2.**

#### 3.4.6.1 Eletroforese em géis de poliacrilamida

O perfil de digestão da enzima *Bst*U1 bem como os produtos de MSP, detalhado a seguir, foram avaliados por eletroforese em géis de poliacrilamida 12% e 8%, respectivamente.

Os géis foram preparados utilizando-se uma solução de poliacrilamida e bis-acrilamida (proporção 29:1), 0,1% de persulfato de amônio (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 0,025% de TEMED (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A eletroforese foi conduzida em aparato de gel médio, a 100-120 V, por aproximadamente 1 hora.

Os géis foram corados com nitrato de prata (SANGUINETTI *et al.*, 1994). Para tanto, o gel com aproximadamente 56 cm<sup>2</sup> foi incubado por três minutos em 50 mL de solução fixadora (0,75% ácido acético glacial, 10% etanol absoluto), sob agitação suave, à temperatura ambiente. A esta solução foi adicionado 1 mL de nitrato de prata 10% e manteve-se o gel incubado sob agitação suave por 10 minutos. Após impregnação do DNA com prata, o gel foi lavado com água ultra-pura, foram adicionados 50 mL de revelador (3% hidróxido de sódio, 0,5% formaldeído) e manteve-se agitando por pelo menos 5 minutos, à temperatura ambiente, até visualização das bandas. Após a revelação, o gel foi incubado em



solução fixadora por 10 minutos, lavado com água ultra-pura e seco em papel celofane.

#### 3.4.7 Análise da metilação em amostras de tumores de mama por *Methylation Specific* PCR- MSP

A partir do perfil de metilação do fragmento 1 (referente à ilha de CpG-2) obtido para todas as linhagens através do seqüenciamento foi possível determinar quais dinucleotídeos se apresentaram diferencialmente metilados. Foram escolhidos os CpGs 1, 2, 3, 4, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 que se apresentaram predominantemente metilados na linhagem que não expressou o gene *CXCR4* e que se apresentaram predominantemente desmetilados nas linhagens que expressaram tal gene. Sobre estes dinucleotídeos foram desenhados os iniciadores utilizados nas reações de MSP com as amostras de tumores primários de mama. Além desse critério, ressalta-se que não foi possível desenhar os iniciadores para MSP em outra região.

A técnica de MSP é bastante importante porque permite analisar o perfil de metilação de uma amostra sem ter que efetuar os passos de clonagem e seqüenciamento. Esta metodologia se baseia na diferença entre a seqüência do DNA metilado e não metilado após tratamento com bissulfito de sódio e, como não é possível saber se o DNA das amostras tumorais está ou não metilado são desenhados dois pares de iniciadores utilizados, um para a condição metilada (gene desligado por metilação) e outra para a não metilada (gene ativo). Assim, efetuam-se duas reações de PCR, cada qual com um par de iniciadores específicos.

Os iniciadores para as reações de MSP com o gene *CXCR4* foram desenhados sobre os CpGs diferencialmente metilados citados anteriormente, com auxílio dos programas *Methprimer* (METHPRIMER, 2008) e *Oligotech* (OLIGOTECH, 2008). A localização dos iniciadores no gene, para a situação metilada e não-metilada, segue exposta no esquema 3.



Os sistemas para condição metilada (M) apresentavam um volume final de 20  $\mu$ L contendo 1X tampão de *Taq* Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 3,5 mM de  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M de dNTPs, 8 pmoles de cada iniciador e 1U de *Taq* Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As condições de amplificação foram: 10 minutos a 95°C para ativação da enzima, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 61°C por 15 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos, e, um ciclo para extensão final de 72°C por 5 minutos.

As reações foram analisadas em géis de poliacrilamida 8% corados com nitrato de prata (item **3.4.6.1**).

### 3.4.7.2 Correlação entre o padrão de metilação do gene *CXCR4* nos tumores primários de mama e os dados clínico-patológicos das pacientes

Foram levantados os dados clínico-patológicos de todas as pacientes através da análise dos laudos das biópsias dos tumores primários e dos prontuários do Hospital Nossa Senhora das Graças e do Hospital de Clínicas, com o auxílio do Dr. Rubens Silveira Lima.

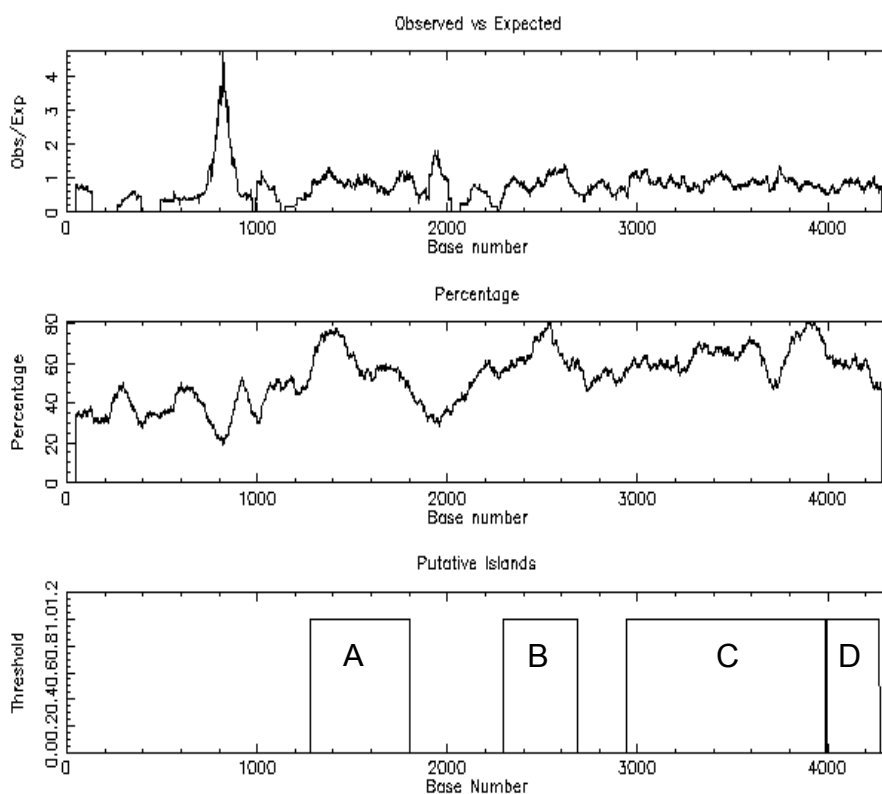
Os dados clínicos levantados foram: idade da paciente na data do diagnóstico da doença, estadiamento do tumor segundo a classificação TNM da União Internacional contra o Câncer (UICC) (ANEXO 2), tamanho do tumor, classificação do grau histológico tumoral conforme SBR (Scarff-Bloom-Richardson), comprometimento linfonodal, presença dos marcadores moleculares RE, PR e ERBB-2, presença de metástase no momento e no seguimento terapêutico da paciente, e aparecimento de recidivas e óbito.

A análise da associação entre as variáveis qualitativas foi realizada utilizando o programa *Statistical Package for Social Science* (SPSS 12.0), através do teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Foi estabelecido um erro de 5%, dessa forma, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISE *IN SILICO* DO GENE *CXCR4*

Para analisar a existência de ilhas de CpG no gene *CXCR4*, a seqüência de RNAm foi submetida à análise no programa *Human Blat* através do qual foi possível adquirir a seqüência que englobava desde a região promotora até o intron do gene (2,6 kb antes e 1,7 kb após o início da transcrição). Esta seqüência, por sua vez, foi submetida à análise no programa *CpGPlot*. Na figura 6 está exposto o gráfico obtido por este programa, que permite verificar a existência de quatro ilhas de CpG no gene *CXCR4*.



**FIGURA 6 - RESULTADO OBTIDO PELO PROGRAMA *CpGPlot*. (A) RAZÃO ENTRE O OBSERVADO/ESPERADO DA FREQUÊNCIA DE DINUCLEOTÍDEOS CG; (B) PORCENTAGEM DE CG; (C) LOCALIZAÇÃO DAS ILHAS DE CpG.**

**FONTE: *CpGPlot*, 2008.**

**NOTA:** No terceiro gráfico (C) estão indicadas as quatro ilhas de CpG presentes no gene *CXCR4*. A ilha de CpG-1 possui 524 pb (A), a ilha 2 possui 389 pb (B), a terceira ilha possui 1043 pb (C) e a última ilha possui 277 pb (D).

O gráfico superior mostra a razão entre o número observado e o esperado de dinucleotídeos CpG. O número esperado de dinucleotídeos é calculado pela seguinte fórmula: Esperado = (número de citosinas x número de guaninas)/ comprimento da ilha. No segundo gráfico, está exposto, em porcentagem, o conteúdo de guaninas + citosinas. E, no último gráfico estão expostas as ilhas de CpG presentes neste gene. O programa *CpGPlot* define como ilha de CpG a região com mais de 200 pb, contendo pelo menos 50% de G+C e uma razão entre a frequência observada e a esperada de dinucleotídeos CG superior ou igual a 0,6 (GARDINER-GARDEN; FROMMER, 1987).

#### 4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *CXCR4* NAS LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA

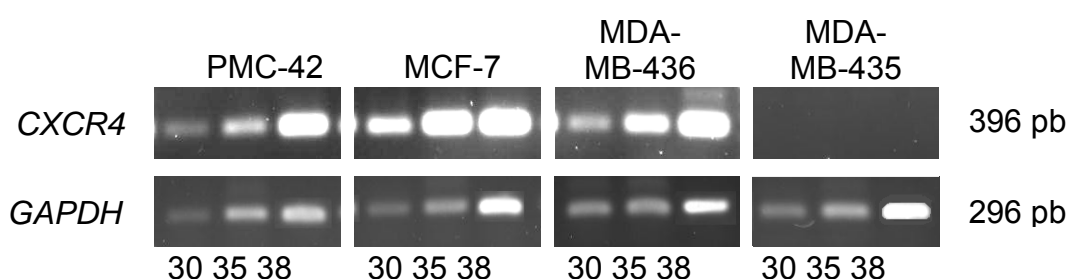
A análise da expressão do gene *CXCR4* foi efetuada através de RT-PCR. Para isso, o RNA total das linhagens tumorais foi extraído com o reagente TRIzol®, analisado qualitativamente em gel de agarose 1% e quantificado (**item 3.3.1**). Após corrida eletroforética, pode-se constatar que as amostras de RNA total extraídas tinham boa qualidade, visto que as bandas 18S e 28S, correspondentes ao RNA ribossômico, estavam bem visíveis. Além disso, parecia haver quantidade suficiente de RNA e ausência de contaminação com DNA genômico. A eficiência da purificação foi confirmada após análise em espectrofotometria, em que se observou que os valores de concentração das amostras variaram de 473,6 a 758,0 ng/μL e a razão 260/280 nm variou de 1,5 a 1,69. As concentrações obtidas, embora representem apenas uma estimativa, permitem pressupor que as amostras possuíam quantidades satisfatórias e, apesar da razão  $DO_{260}/DO_{280}$  obtida sugerir que os RNA totais não estavam muito puros (visto que os valores foram inferiores a 1,8), os contaminantes presentes não atrapalharam as reações subseqüentes.

Após quantificação, foram utilizados aproximadamente 500 ng de RNA total em reações de transcrição reversa com iniciadores oligo dT, para síntese da primeira fita de cDNA (**item 3.3.2**). Para verificação da eficiência desta síntese foi empregado como controle o gene *GAPDH*.

Os resultados de RT-PCR com o gene de expressão constitutiva mostraram o fragmento esperado de 296 pb em todas as linhagens, como observado na figura 7. Com este resultado constatou-se que o cDNA sintetizado tinha boa qualidade e

quantidade e, conseqüentemente, pode-se deduzir que a extração de RNA também foi eficiente. Além disso, pode-se verificar que o cDNA sintetizado não apresentava contaminação com DNA genômico; uma vez que, não foi observado o fragmento de 489 pb, que representariam a presença do íntron.

Uma vez constatada qualidade e quantidade adequadas de cDNA, este foi utilizado como molde em reações de RT-PCR semi-quantitativo com 30, 35 e 38 ciclos de amplificação para o *CXCR4* e o *GAPDH* (item 3.3.3). Comparando-se o perfil de amplificação do gene *CXCR4* com o perfil de expressão do *GAPDH* foi possível inferir se existia regulação da expressão do gene de estudo (FIGURA 7).



**FIGURA 7 - RT-PCR SEMI-QUANTITATIVO DOS GENES *CXCR4* E *GAPDH* COM 30, 35 E 38 CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO.**

**NOTA:** Gel de agarose 1% representando o perfil de expressão do gene de estudo *CXCR4* e do gene controle *GAPDH* nas linhagens tumorais de mama PMC-42, MCF-7, MDA-MB-436, MDA-MB-435.

Os níveis de expressão do gene *CXCR4* variaram entre as linhagens celulares, conforme se pode constatar na figura acima. A confirmação dessa variabilidade poderia ser confirmada com experimentos de PCR em tempo real, que não puderam ser realizados. Entretanto, mesmo sem quantificar, podemos verificar que o gene *CXCR4* tem expressão aumentada nas linhagens PMC-42, MCF-7 e MDA-MB-436, quando comparado com o gene *GAPDH*. Este resultado concorda com outros trabalhos descritos na literatura em que se verificou a aumentada expressão do *CXCR4* em linhagens tumorais de mama e em outros tipos de câncer.

Muller *et al.* (2001), Kang *et al.* (2005), Lee *et al.* (2004) e Holland *et al.* (2006) também constataram a superexpressão do gene ou da proteína *CXCR4* através de RT-PCR ou Western Blotting, respectivamente, em linhagens tumorais de mama, como a MDA-MB-231, MCF-7, MDA-MB-436, BT-549, MDA-MB-453, MDA-MB-134 e DU4475. Este mesmo resultado foi confirmado em linhagens celulares de outros tipos de câncer, como IGROV e CAOV-3 (câncer de ovário), ATL-2 e células

de Jurkat (linfoma), PC-3 e LNCaP (câncer de próstata) e em IGR-N91, SH-SY5Y (neuroblastoma) (SCOTTON *et al.*, 2001; SINGH *et al.*, 2004; MEIER *et al.*, 2007).

Holland *et al.* (2006) atentaram para um detalhe muito importante que trata da relação entre funcionalidade e expressão do receptor CXCR4. Estes observaram uniformidade de expressão do transcrito e da proteína CXCR4, bem como similar afinidade de ligação à proteína CXCL12 entre linhagens de câncer de mama não invasivas e metastáticas (MDA-MB-231, BT-549 e MDA-MB-453, MDA-MB-134). No entanto, somente nas células altamente invasivas foi observada a ativação deste receptor em resposta ao CXCL12. Majka *et al.* (2000) também constataram, em plaquetas, que o elevado nível de expressão do gene *CXCR4* não esteve relacionado com a funcionalidade deste receptor. Assim, pode-se concluir que embora uma célula possua altos níveis de expressão da proteína CXCR4, não significa que este receptor vai estar ativo e desencadeando seus efeitos biológicos via interação com a proteína CXCL12.

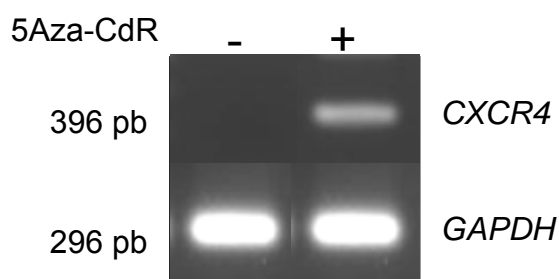
A inativação do receptor CXCR4 pode ocorrer pelo bloqueio da sinalização intracelular (HOLLAND *et al.*, 2006). Soriano *et al.* (2002) mostraram que, em células de mieloma (IM-9), a superexpressão da SOCS3 (proteína supressora de sinalização de citocina 3) acarreta a inativação funcional do CXCR4 por impedir a associação da subunidade  $G\alpha$  da proteína G e do complexo JAK/STAT ao CXCR4, bloqueando assim tais vias.

No câncer de mama o aumento da expressão do gene *CXCR4* pode ser induzida por variados fatores, como NF- $\kappa$ B, VEGF (BACHELDER, WENDT, MERCURIO, 2002; HELBIG *et al.*, 2003), IFN- $\gamma$  (ZHANG *et al.*, 2007) e pela hipóxia característica do microambiente de tumores sólidos (SCHIOPPA *et al.*, 2003; SHIM *et al.*, 2006). O CXCL12 também pode estimular a superexpressão do CXCR4 via autócrina (derivado da célula tumoral) ou parácrina (derivada das células do estroma) (BURGER, KIPPS, 2006). Por outro lado, a proteína CXCL12 também pode acarretar a diminuição temporária dos níveis de CXCR4 de superfície celular, pois após o receptor ser ativado por esta quimiocina ele é internalizado e geralmente degradado (FUTASHI *et al.*, 2007). A expressão autócrina e parácrina do CXCL12 confere vantagens à célula tumoral. A ausência ou a redução da expressão desta quimiocina nesta célula e a elevada expressão em órgãos distantes poderia promover a atração das células tumorais a possíveis órgãos-alvo de metástase, conferindo uma vantagem seletiva em termos de aquisição de potencial metastático.

Por outro lado, a expressão de CXCL12 pelas células tumorais poderia favorecer a retenção celular no tumor primário, promovendo a proliferação e sobrevivência celular (WENDT *et al.*, 2007).

Também está bem estabelecido que a expressão gênica pode ser regulada epigeneticamente, tanto pelo mecanismo de metilação das citosinas, quanto de acetilação das histonas. Em tumores de pâncreas e em melanomas foi constatado que a expressão do *CXCR4* pode ser regulada pela metilação do DNA (MORI *et al.*, 2005; SATO *et al.*, 2005).

Do painel de células analisadas neste trabalho a MDA-MB-435 foi a única linhagem que apresentou o gene *CXCR4* inativo. Neste caso, a fim de verificar se o silenciamento decorria da metilação das citosinas presentes na ilha de CpG, foi efetuado o tratamento desta célula com 5-Aza-CdR (item 3.3.4). A avaliação da re-expressão do transcrito após tratamento com tal agente desmetilante também foi feita através de RT-PCR (FIGURA 8). Da mesma forma como citado anteriormente, a qualidade do RNA total extraído desta linhagem foi analisado após corrida eletroforética em gel de agarose 1% e a concentração, bem como a pureza da amostra, foi estimada por espectrofotometria. A amostra apresentou concentração igual a 283,9 ng/ $\mu$ L e a razão 260/280 nm foi igual a 1,875. Estes valores sugerem quantidade satisfatória de RNA total e ausência de contaminação com proteínas e fenol.



**FIGURA 8 - RT-PCR PARA OS GENES *GAPDH* E *CXCR4* COM 35 CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO.**

**NOTA:** Gel de agarose 1% representando a expressão do gene *CXCR4* antes (-) e após (+) o tratamento com 5-Aza-CdR.

O resultado obtido por RT-PCR foi muito importante, porque, conforme exposto na figura acima, é possível observar que o gene *CXCR4* voltou a ser expresso após o tratamento com agente desmetilante, sugerindo que pelo menos



em linhagens tumorais de mama tal gene está sendo regulado pelo mecanismo de metilação. Esta afirmativa é reforçada por outros trabalhos descritos na literatura os quais demonstraram que, embora a re-expressão do gene após o tratamento com 5-Aza-CdR seja um forte indicativo de que existe regulação da expressão gênica devido à metilação do DNA, nem sempre a célula volta a expressar o gene após este tratamento, pois, a expressão gênica pode ser regulada por outro tipo de mecanismo, por exemplo, através do remodelamento da cromatina. Neste caso, o tratamento com outras substâncias, como a tricostatina A (inibidor de desacetilases) pode promover a expressão gênica (YOO; JONES, 2006).

Sato *et al.* (2005) constataram maior expressão do gene *CXCR4* após tratamento de células tumorais de pâncreas com tricostatina A e 5-Aza-CdR. A resposta de cada linhagem ao tratamento foi variada. Em três células (AsPC1, BxPC3 e MiaPaCa2) tanto o 5-Aza-CdR quanto a TSA promoveram superexpressão do gene *CXCR4*, enquanto na célula Capan1, densamente metilada, somente a administração conjunta das duas drogas foi capaz de induzir a forte expressão do RNAm deste gene. Esta célula também foi tratada com acetato de forbol miristato (PMA), o qual é um ativador do promotor do gene *CXCR4*, e constatou-se, que mesmo adicionando tal substância, o aumento na expressão do gene em questão só ocorria quando também era administrado TSA e 5-Aza-CdR. Com melanomas, isso também foi confirmado. Mori *et al.* (2005) mostraram que a administração combinada de 5-Aza-CdR com TSA aumentou a expressão do gene *CXCR4*. Mas, eles demonstraram que a superexpressão do gene *CXCR4* foi transiente, uma vez que, após 72 h do tratamento observou-se uma diminuição a níveis praticamente basais do RNAm do gene *CXCR4*. O aumento da expressão da proteína *CXCR4* pelo tratamento com 5-Aza-CdR foi verificado ainda em células de adenocarcinoma endometrial Ishikawa ER+ e ER-. Neste trabalho constatou-se que a elevada expressão da proteína *CXCR4* foi devida à depleção completa da DNMT1 e à significativa depleção da DNMT3B promovida pelo 5-Aza-CdR (KUBAREK; JAGODZINSKI, 2007).

#### 4.3 ANÁLISE DA METILAÇÃO DO GENE *CXCR4* EM LINHAGENS TUMORAIS

A análise do perfil de metilação do gene *CXCR4* foi feita através do seqüenciamento e confirmado pelo método de COBRA.

Para isto, o DNA das linhagens tumorais foi extraído pelo método do fenol:clorofórmio (**item 3.4.2.1**). A qualidade dos DNAs purificados foi determinada através de eletroforese em gel de agarose 1%, em que se pode constatar ausência de degradação, de contaminação com RNA e correta diluição das amostras. Por espectrofotometria pode-se constatar que as amostras não possuíam contaminação com proteínas e fenol, uma vez que os valores da razão 260nm/280nm variaram de 1,89 a 1,94. Pelos valores estimados de concentração (entre 57,7 e 361,8 ng/ $\mu$ L) pode-se supor que havia quantidade suficiente de DNA para efetuar a próxima etapa deste trabalho, relacionada ao tratamento com bissulfito de sódio.

Uma vez quantificado, 1 $\mu$ g de DNA extraído das linhagens foi submetido ao tratamento com o agente deaminante bissulfito de sódio (**item 3.4.3**). Para verificar a eficiência deste procedimento foi feita uma reação de *nested* PCR com o gene *SATR1*, o qual se encontra hipometilado em mama. Após corrida eletroforética em gel de agarose 1%, verificou-se a amplificação do fragmento de 690 pb esperado em todas as linhagens, indicando que o tratamento com bissulfito foi eficiente, pois os DNAs tratados não estavam muito degradados e apresentavam quantidade suficiente para amplificação dos fragmentos das ilhas de CpG do gene *CXCR4*.

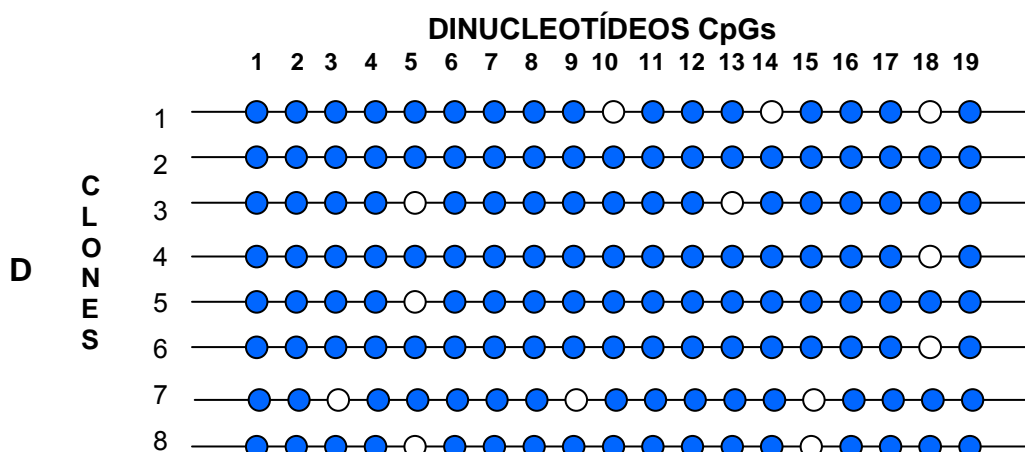
Após amplificação dos fragmentos 1, de 184 pb, e 2, de 280 pb, do gene *CXCR4*, por *nested* PCR (**item 3.4.4**) constatou-se a ausência de bandas expúrias e a presença de quantidade suficiente de DNA para digestão com a enzima *Bst*U1 e para efetuar a reação de ligação do inserto (fragmento 1) ao vetor de clonagem.

Assim, após amplificação do fragmento 1, este foi ligado ao vetor pGEM®-T Easy e o produto de ligação foi eletroporado em DH10B eletrocompetente tratada com glicerol 15%. Em seguida, através de PCR de colônia foram detectados os clones que continham o vetor recombinante desejado (**item 3.4.5**).

Após tal triagem, os clones de interesse foram cultivados para posterior extração de DNA plasmidial através do método da lise alcalina (**item 3.4.5**). Em géis de agarose 1% foi possível observar que a técnica de minipreparação plasmidial foi eficiente, pois parecia haver quantidade adequada de amostra para efetuar a reação de seqüenciamento. A presença de várias bandas era um indicativo de que a amostra não estava muito limpa, mas isso não afetou a etapa seguinte.

A reação de seqüenciamento foi feita com pelo menos oito clones de cada linhagem, utilizando o protocolo do *Big Dye® Terminator Kit* e o seqüenciador ABI





**ESQUEMA 4 - PERFIL DE METILAÇÃO OBTIDO PARA O FRAGMENTO DE 184 pb DA ILHA DE CpG-2 DO GENE *CXCR4*, PARA AS LINHAGENS MDA-MB-436 (A), MCF-7 (B), PMC-42 (C) E MDA-MB-435 (D).**

**NOTA:** Na vertical estão representados os 19 dinucleotídeos CpGs presentes neste fragmento, e na horizontal estão indicados os clones analisados. Azul- CpG metilado; Branco- CpG desmetilado.

A partir dos esquemas acima foi possível constatar uma variação no perfil de metilação do fragmento de 184 pb entre as linhagens analisadas. Em todas as linhagens constatou-se que o perfil de metilação teve correlação com a expressão gênica.

A linhagem MDA-MB-435 apresentou o fragmento da ilha de CpG-2 densamente metilado, com 91,4% de metilação. Nesta linhagem constatou-se que a maioria dos dinucleotídeos CpGs presentes no fragmento analisado encontraram-se metilados, pois os resíduos de citosinas foram mantidos após tratamento com bissulfito de sódio. A elevada densidade de metilação das citosinas justifica a inativação do *CXCR4* na linhagem MDA-MB-435, conforme visto por RT-PCR e confirma o resultado obtido pelo tratamento com 5-Aza-CdR.

As demais linhagens tumorais apresentaram menor densidade de metilação, visto que grande parte das citosinas foi convertida em timinas após o tratamento com bissulfito de sódio. A MCF-7 e PMC-42 apresentaram semelhante porcentagem de metilação (20,3% e 17%, respectivamente). A linhagem MDA-MB-436 apresentou o menor nível de metilação (9%). A presença de um maior número de dinucleotídeos CpGs desmetilados pode explicar a superexpressão do gene *CXCR4* nestas células, conforme verificado por RT-PCR, e pela ausência de digestão pela *BstU1*, detalhado adiante.

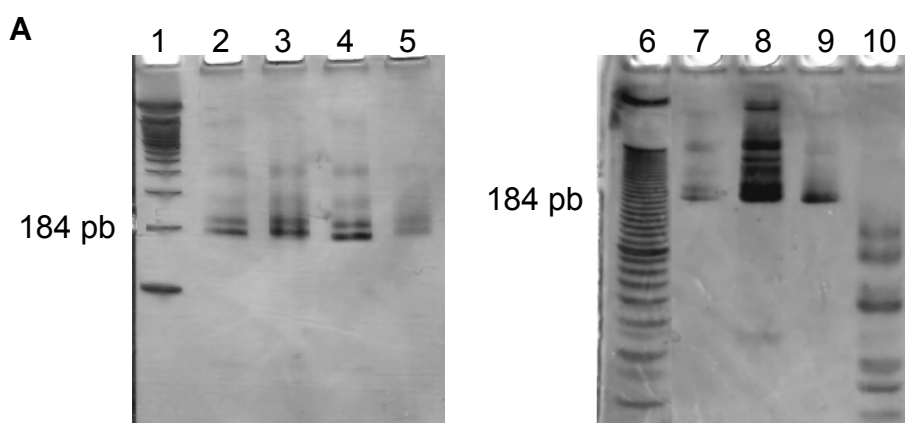
Pelo perfil de metilação obtido e comparando-se as linhagens que expressam (MCF-7, PMC-42 e MDA-MB-436) e não expressam (MDA-MB-435) o gene *CXCR4* pode-se observar que os principais dinucleotídeos que são diferencialmente metilados e que provavelmente regulam o silenciamento do gene são: 1, 2, 3, 4, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16.

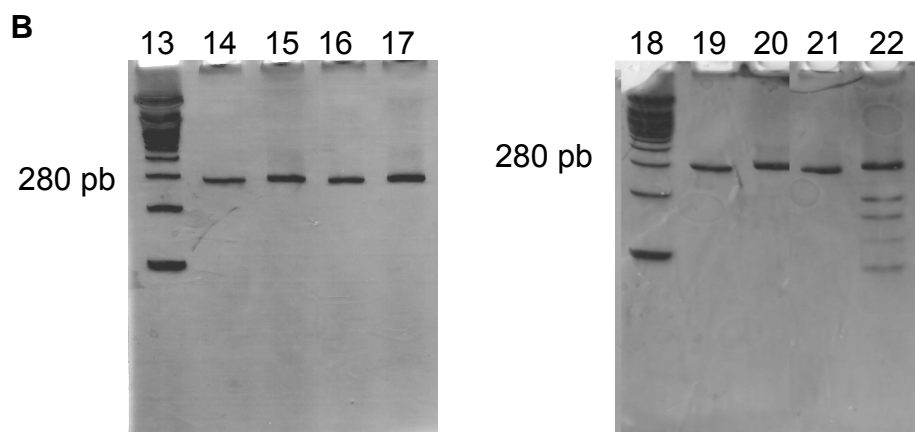
No trabalho desenvolvido por Sato *et al.* (2005) com linhagens tumorais de pâncreas, um fragmento da ilha de CpG-1 (-1143 a -797, considerando o nucleotídeo +1 descrito por Wegner *et al.*, 1998) foi amplificado, tratado com bissulfito e seqüenciado. Nesta pesquisa também foi observado que as linhagens tumorais apresentaram variado perfil de metilação, sendo que algumas linhagens, como a Capan2 e CFPAC1, apresentaram todos os dinucleotídeos desmetilados, enquanto outras se apresentaram parcialmente metiladas (AsPC1 e BxPC3), predominantemente ou completamente metiladas (Capan1, PL3 e PL12). Essa região estudada parece ter sido utilizada para estudo de MSP com tumores primários de pâncreas.

#### 4.3.1 Análise da metilação pelo método de COBRA

A fim de confirmar os dados de metilação obtidos pelo seqüenciamento foi utilizado o método COBRA (**item 3.4.6**). A partir do DNA modificado pelo tratamento com bissulfito, foram amplificados os fragmentos das diferentes ilhas de CpG (2;3/4) do gene *CXCR4* por *nested* PCR. Em seguida, os produtos foram purificados e digeridos com 2 U da enzima *Bst*U1, a qual reconhece o sítio CGCG.

O perfil de digestão obtido para os fragmentos das ilhas 1 e 2 segue exposto na figura 9A,B, respectivamente.





**FIGURA 9 - RESULTADO DA ANÁLISE POR COBRA OBTIDO PARA OS FRAGMENTOS 1 (ILHA DE CpG-2) E 2 (ILHA DE CpG-3/4) DO GENE *CXCR4*.**

**NOTA:** Gel de poliacrilamida 12% representando o perfil de digestão da enzima *Bst*U1 no fragmento de 184 pb (A) e 280 pb (B).

**LEGENDA:** 1,13,18. 100 bp; 2, 14. MCF-7 SEM DIGERIR; 3,15. MCF-7 APÓS DIGESTÃO; 4,16. PMC-42 SEM DIGERIR; 5,17. PMC-42 APÓS DIGESTÃO; 6. 10 bp; 7,19. MDA-MB-436 SEM DIGERIR; 8,20. MDA-MB-436 APÓS DIGESTÃO; 9,21. MDA-MB-435 SEM DIGERIR; 102,22. MDA-MB-435 APÓS DIGESTÃO.

Por tal metodologia, pôde-se observar que a digestão somente ocorreu na linhagem MDA-MB-435. Este resultado era esperado, pois, a partir do perfil de metilação obtido pelo seqüenciamento foi constatado que os dinucleotídeos 1/2, 6/7, 13/14 e 18/19, que correspondem aos sítios de restrição CGCG desta enzima, encontraram-se densamente metilados. O mesmo foi observado para o outro fragmento, o que sugere a presença de metilação dos dinucleotídeos 8/9 e 14/15. Este dado corrobora os resultados obtidos por RT-PCR, em que foi verificado silenciamento do *CXCR4*, e também os dados de seqüenciamento.

Para as linhagens MCF-7, PMC-42 e MDA-MB-436 não foi constatada a digestão nos dois fragmentos estudados. Conforme verificado por seqüenciamento, no fragmento 1 os CpGs presentes no sítio de restrição da *Bst*U1 estiveram predominantemente desmetilados na PMC-42 e MCF-7 e totalmente desmetilados na MDA-MB-436. Da mesma forma, a análise da digestão do outro fragmento também sugere a presença de níveis reduzidos ou a ausência de metilação dos dinucleotídeos CGs presentes no sítio de restrição da enzima. Estes dados corroboram os resultados obtidos por RT-PCR, em que se verificou superexpressão do *CXCR4* nestas linhagens.

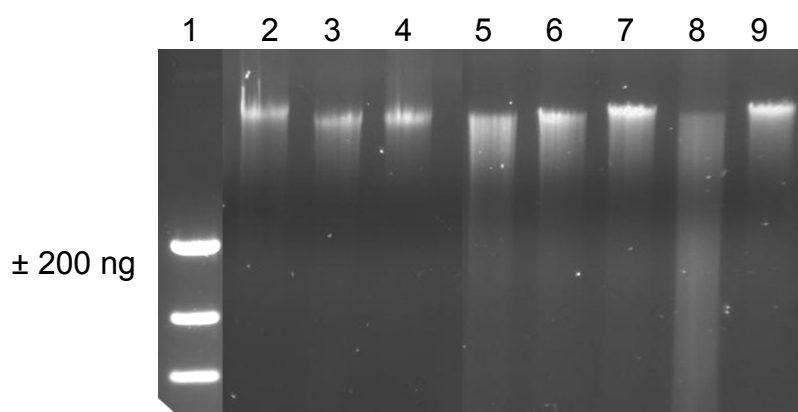
O perfil de metilação do promotor do gene *CXCR4* também foi estudado por Sato *et al.*, em 2005. Eles verificaram por COBRA com a enzima *Bsm*I, a qual

reconhece o sítio 5' GAATG↓C 3', que um fragmento da ilha de CpG-1 também se apresentava metilado em algumas linhagens tumorais de pâncreas (em nove das 20 linhagens consideradas). E, ainda avaliaram o perfil de metilação do gene *CXCR4* através da mesma técnica, em linhagens de câncer de mama. Estes constataram que dez das 21 linhagens apresentaram metilação, dentre elas, a MDA-MB-435. Estes dados são consistentes com o resultado obtido em nosso experimento e mostram que a linhagem MDA-MB-435 tem o promotor do gene *CXCR4* metilado.

#### 4.4 ANÁLISE DA METILAÇÃO EM AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS

Após a análise de seqüenciamento dos DNAs das linhagens tumorais de mama foi possível escolher os dinucleotídeos do fragmento de 184 pb da ilha de CpG-2 do gene *CXCR4*, que seriam importantes para a regulação da expressão do gene *CXCR4*. Assim, os iniciadores desenhados para as reações de MSP englobaram os dinucleotídeos 1, 2, 3, 4, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16. Apesar desses dinucleotídeos não serem totalmente metilados ou não metilados, foi a melhor região encontrada para desenhar os iniciadores.

Para verificar se o padrão de metilação obtido para linhagens tumorais de mama também era detectado em amostras de tumores primários de mama foram feitas reações de MSP. Para isso, efetuou-se a extração dos DNAs dos tumores pelo método do fenol-clorofórmio (item 3.4.2.2) (alguns deles já haviam sido extraídos pelo grupo do departamento de Genética) e, em seguida, foi feito o tratamento com bissulfito de sódio (item 3.4.3) (FIGURA 10).



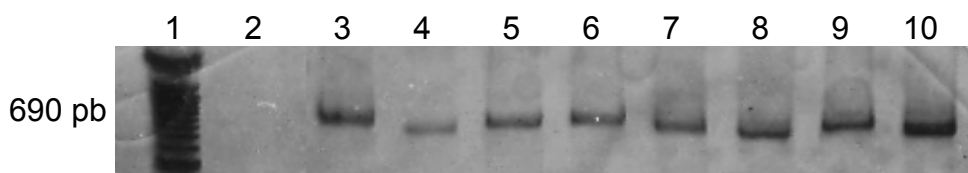
**FIGURA 10 – AMOSTRAS DE DNAs EXTRAÍDOS DOS TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.**

**NOTA:** Gel de agarose 1% mostrando o perfil de extração dos DNAs tumorais.

**LEGENDA:** 1. DNA MASS LADDER; 2-9. Amostras de DNA de tumores primários.

A figura 10 mostra o aspecto de alguns DNAs tumorais extraídos. Percebe-se que quase todas as amostras têm um arrastado abaixo da banda, indicando que os DNAs estavam um pouco degradados, ou seja, os DNAs apresentavam quebras em pontos múltiplos. A perda integridade do DNA se deve à conservação inadequada das peças tumorais. Apesar desta degradação foi possível analisar a metilação dos tumores pela técnica de MSP. Observa-se ainda neste gel, uma banda formada acima do arrastado que indica a existência de DNA genômico íntegro nas amostras.

A eficiência do tratamento com bissulfito de sódio foi comprovada após reação de *nested* PCR com o gene *SATR1* (FIGURA 11).

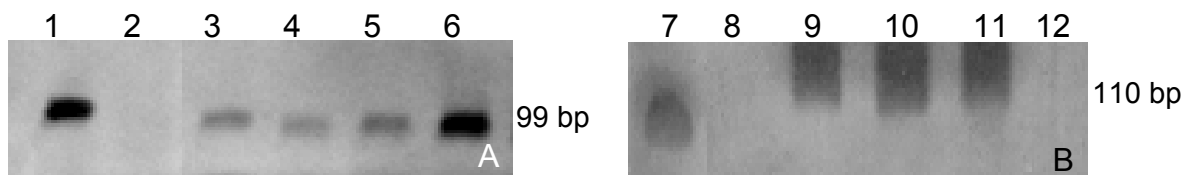


**FIGURA 11 – NESTED PCR DO GENE *SATR1* COM OS DNAs TUMORAIS.**

**NOTA:** Gel de poliacrilamida 8% mostrando a eficiência do tratamento com bissulfito de sódio.

**LEGENDA:** 1. 100 pb; 2. NO (controle interno da reação, sem DNA tumoral); 3-10. Padrão de amplificação do gene *SATR1* em diferentes amostras tumorais.

Os DNAs tumorais tratados com bissulfito de sódio que obtiveram eficácia no tratamento foram utilizados nas reações de MSP (item 3.4.7.1). Inicialmente foi efetuada a padronização das reações para a situação metilada (M) (FIGURA 12A) e não metilada (U) (FIGURA 12B) com as linhagens tumorais da mama.



**FIGURA 12 - PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO METILADA (A) E NÃO METILADA (B) COM AS LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA.**

**NOTA:** Gel de poliacrilamida 8% representando a padronização das reações de MSP.

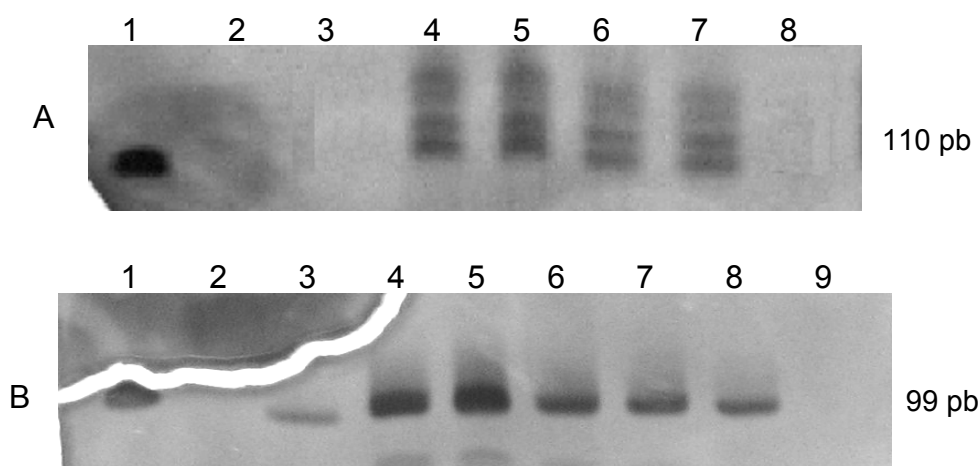
**LEGENDA:** 1. 100 pb; 2. NO M (controle interno da reação – sem DNA); 3. MCF-7 M; 4. PMC-42 M; 5. MDA-MB-436 M; 6. MDA-MB-435 M; 7. 100 pb; 8. NO U (controle interno da reação – sem DNA); 9. MCF-7 U; 10. PMC-42 U; 11. MDA-MB-436 U; 12. MDA-MB-435 U.

Foi possível observar que os resultados obtidos estão de acordo com os resultados do seqüenciamento. Nas linhagens MCF-7, PMC-42 e MDA-MB-436 constatou-se a amplificação do fragmento de 110 pb referente à situação não metilada, enquanto que para a linhagem MDA-MB-435 observou-se a amplificação



do fragmento de 99 pb referente à situação metilada. Como as linhagens MCF-7, PMC-42 e MDA-MB-436 possuem alguns dinucleotídeos metilados e, em função da alta sensibilidade desta técnica, também foi verificada a amplificação do fragmento referente à situação metilada. Devido a este resultado, em todas as reações foi utilizado, além do controle interno da reação (*no*), um controle negativo (MDA-MB-436); quando neste controle amplificava a banda referente à condição metilada a reação era repetida e, se novamente fosse verificada amplificação no controle negativo, a análise era feita a partir da comparação entre a intensidade das bandas do controle negativo com as demais amostras. A amostra era considerada positiva quando apresentava intensidade maior que o controle negativo.

Após padronizar as reações metilada e não metilada determinou-se a sensibilidade da técnica através de diluições seriadas (1:0, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000). Para a condição metilada, foi utilizado o DNA da linhagem tumoral MDA-MB-435, que apresentava os dinucleotídeos predominantemente metilados e, para a reação não metilada, foi empregado o DNA da MDA-MB-436, que apresentou CpGs predominantemente desmetilados. A sensibilidade obtida para as condições U e M segue exposta na figura 13.



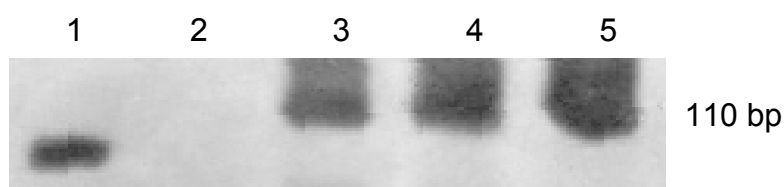
**FIGURA 13 - AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA TÉCNICA DE MSP REAÇÃO U (A) E M (B) DO GENE CXCR4.**

**NOTA:** Géis de poliacrilamida 8% mostrando as diluições utilizadas para detectar a sensibilidade deste teste.

**LEGENDA:** (A) 1. 100 bp; 2. NO U (controle interno da reação – sem DNA); 3. AMOSTRA MDA-MB-435 (controle negativo); 4. MDA-MB-436 SEM DILUIÇÃO; 5. MDA-MB-436 DILUIÇÃO 1:10; 6. MDA-MB-436 DILUIÇÃO 1:100; 7. MDA-MB-436 DILUIÇÃO 1:1000; 8. MDA-MB-436 DILUIÇÃO 1:10.000. (B) 1. 100 bp; 2. NO M (controle interno da reação – sem DNA); 3. AMOSTRA MDA-MB-436 (controle negativo); 4. MDA-MB-435 SEM DILUIÇÃO; 5. MDA-MB-435 DILUIÇÃO 1:10; 6. MDA-MB-435 DILUIÇÃO 1:100; 7. MDA-MB-435 DILUIÇÃO 1:1000; 8. MDA-MB-435 DILUIÇÃO 1:10.000; 9. MDA-MB-435 DILUIÇÃO 1:100.000.

Herman *et al.* (1996), ao descrever a técnica de MSP, relatou uma sensibilidade de 0,1%, ou seja, seu método foi capaz de detectar até 1 alelo metilado em meio a 1000 alelos não metilados. Nós também atingimos esta sensibilidade para a reação não metilada. No entanto, a reação metilada foi ainda 10 vezes mais sensível.

Em seguida, efetuou-se a análise da metilação dos DNAs tumorais. Para representar o tecido mais próximo do normal de mama foram utilizadas três amostras de fibroadenomas. Estas amostras apresentaram-se desmetiladas, pois apenas a reação não metilada foi positiva (FIGURA 14). As reações para a situação metilada foram negativas e não estão expostas.



**FIGURA 14 – REAÇÕES DE MSP PARA A SITUAÇÃO NÃO METILADA COM AMOSTRAS DE FIBROADENOMAS.**

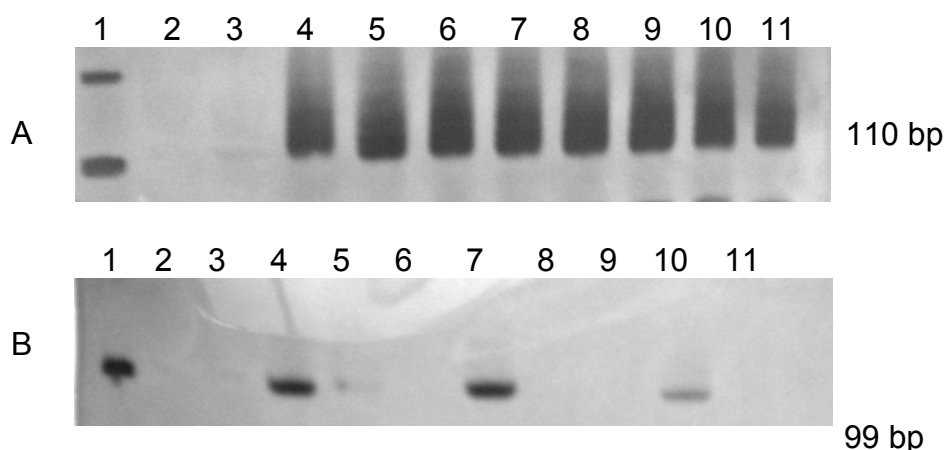
**NOTA:** Gel de poliacrilamida 8% representando o perfil de metilação em amostras de fibroadenomas.

**LEGENDA:** 1. 100 bp; 2. NO (controle interno da reação – sem DNA); 3-5. Amostras de fibroadenomas.

A presença do amplicon de 110 pb correspondente à reação não metilada em todas as amostras se deve ao fato de que lesões pré-malignas podem expressar o gene *CXCR4* (SCHIMID *et al.*, 2004). Além disso, células normais (removidas junto com o tumor, uma vez que não foi feita microdissecção) também podem expressar tal gene, mesmo que em níveis reduzidos.

Em seguida, efetuaram-se reações de MSP com as amostras de tumores primários de mama. Em todas as 76 amostras constatou-se positividade para a reação não metilada e 26 destas também foram positivas para a reação metilada.

Nas figuras abaixo estão expostos os géis de alguns tumores primários em que se pode visualizar a banda de 110 pb referente à condição metilada em todas as amostras (15A) e, em algumas amostras, pode-se constatar também a banda de 99 pb referente à situação metilada (15B).



**FIGURA 15 - REAÇÃO DE MSP COM AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.**

**NOTA:** Gel de poliacrilamida 8% mostrando o produto da reação de MSP para a situação não metilada (A) e metilada (B).

**LEGENDA:** (A) 1. 100 bp; 2. NO U (controle interno da reação – sem DNA); 3. MDA-MB-435 (controle negativo); 4-10. tumores primários não metilados. (B) 1. 100 bp; 2. NO M (controle interno da reação – sem DNA); 3. MDA-MB-436 (controle negativo); 4,7,10. tumores primários metilados.

O fato do *CXCR4* estar predominantemente expresso (seja ao nível de proteína ou de transcrito) nas células tumorais justifica a positividade para a reação não metilada observada em todos os tumores. Ou seja, esse resultado já era esperado porque esse é o padrão de expressão do receptor *CXCR4* no câncer de uma forma geral.

Vários estudos têm demonstrado que o *CXCR4* ativo é capaz de desencadear a proliferação, sobrevivência, migração, dentre outros efeitos biológicos que contribuem para a agressividade tumoral (GANJU *et al.*, 1998; MAJKA *et al.*, 2000; SORIANO *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2004; PENG *et al.*, 2005). Além disso, este receptor parece ser fundamental para o desenvolvimento metastático para órgãos onde a proteína *CXCL12* está expressa. No câncer de próstata, por exemplo, foi verificada a migração de células tumorais que expressam a proteína *CXCR4* a órgãos, como a medula óssea, que expressam seu ligante (TAICHMAN, 2002 *apud* ZLOTNIK, 2004). No câncer de mama também se justifica a metástase à órgãos-distantes, como linfonodos, medula e pulmão, em função da expressão localizada deste par (MULLER *et al.*, 2001).

Embora a proteína *CXCR4* desencadeie estes efeitos biológicos que favorecem o desenvolvimento do tumor, foi observado no nosso trabalho que cerca de 36% dos tumores analisados foram positivos para a reação metilada, corroborando outros dados da literatura. Em carcinomas primários de pâncreas verificou-se que a metilação do *CXCR4* ocorreu em 46% dos tumores, e, em

melanomas, a metilação aberrante deste gene foi detectada em aproximadamente 73% das linhagens (SATO *et al.*, 2005; MORI *et al.*, 2005).

Um dos fatores de risco bastante importante para o desenvolvimento de câncer é a metilação aberrante em função da idade. A incidência de neoplasias aumenta drasticamente com a idade. No câncer de mama, antes dos 25 anos o número de casos novos é pequeno (menos de 10 casos por 100 mil mulheres), mas aumenta em 100 vezes após os 45 anos (HULKA; MOORMAN, 2001). No nosso trabalho foi detectado que, entre as 26 amostras positivas para a reação metilada, 23 mulheres (88%) têm idade superior a 45 anos. A metilação relacionada à idade também foi observada na mucosa colorretal. Os genes *MyoD* (fator de transcrição que regula a diferenciação de células da linhagem miogênica) e *N33* (candidato à gene supressor de tumor) começam a ser metilados na mucosa normal, especialmente em indivíduos com mais de 60 anos, e se tornam hipermetilados no câncer colorretal (AHUJA *et al.*, 1998). A metilação no câncer de mama também pode ser devido à elevada expressão das DNMTs. Girault *et al.* (2003) mostraram a expressão moderada das DNMT1 e DNMT3a em algumas células tumorais e a superexpressão da DNMT3b em 39 das 130 amostras (30%) de tumor de mama.

Apesar da metilação afetar tipicamente genes supressores de tumor, tem sido constatada a inativação de outros oncogenes no câncer de mama e em outros tumores. Os proto-oncogenes *Her-1* (receptor para o fator de crescimento epidermal 1), *COX2* (ciclooxigenase 2) e *hTRT* (subunidade catalítica da transcriptase reversa da telomerase) também apresentam regulação da expressão pela metilação do DNA. O *Her-1* encontra-se hipermetilado em linhagens tumorais de mama (CAMA1, MDA-MB-453 e MDA-MB-435), de osteossarcoma (SAOS-2), de glioma (SF-539), e, em tumores sólidos primários de mama, pulmão, cabeça e pescoço e colorretal. A alta densidade de metilação do gene *COX2*, foi verificada em linhagens de próstata, mama, cólon, estômago, leucemia mielóide aguda, e, em amostras de tumor colorretal primário, e de mama. E, por fim, foi verificado em fibroblastos (SUSM-1) que o promotor do gene *hTRT* que codifica a subunidade catalítica da telomerase também se apresenta altamente metilado (DEVEREUX *et al.*, 1999; TOYOTA *et al.*, 2000; SONG *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2003; MONTERO *et al.*, 2006).

A importância da metilação dos oncogenes no câncer ainda é pouco compreendida. A inativação destes genes provavelmente deve conferir uma desvantagem seletiva para a célula tumoral, comprometendo a sobrevivência desta

célula e afetando negativamente a carcinogênese (DEVEREUX *et al.*, 1999; TOYOTA *et al.*, 2000; SONG *et al.*, 2001; MONTERO *et al.*, 2006).

Muller *et al.* (2001) mostraram que em células mamárias normais o gene *CXCR4* não é expresso ou é expresso em níveis basais. De fato, em outros tumores isso também foi confirmado. Singh *et al.* (2004) observaram que o transcrito e a proteína *CXCR4* tiveram uma expressão significativamente maior em linhagens celulares de câncer de próstata (PC3 e LNCaP) do que em células epiteliais de próstata normal (PrEC). O mesmo foi verificado por Meier *et al.* (2007), que detectaram em linhagens de neuroblastoma invasivas (IGR-N91, SH-SY5Y) elevados níveis de expressão de *CXCR4*, enquanto a célula IGR-NB8 não invasiva expressou níveis muito reduzidos deste receptor.

Esses dados podem sugerir que, em princípio, existem nas células normais mecanismos, inclusive a metilação do DNA, que reduzem a expressão do *CXCR4* e, com a progressão do câncer ocorre a desmetilação deste gene em certas células tumorais favorecendo-a seletivamente. No entanto, apesar de nem todas as células tumorais expressarem este receptor, o câncer pode ainda se desenvolver porque outras moléculas podem, através de uma reação cruzada, ativar as vias de sinalização desencadeadas pelo par *CXCR4-CXCL12*. Este é o caso da oncoproteína BCR/ABL, que é capaz de ativar as vias PI-3K bem como a via RAS-MAPK em células hematopoiéticas transformadas (PTASZNIK *et al.*, 2002). Além disso, muitos tumores expressam outros receptores de quimiocinas, os quais podem suprir a sinalização mediada pelo *CXCR4*. Em melanoma as células tumorais *CXCR4*<sup>+</sup> podem também expressar os receptores CCR7 e CCR10, os quais estão envolvidos com a ocorrência de metástase aos principais sítios deste tipo de câncer: os linfonodos e a pele (MURAKAMI; CARDONES; HWANG, 2004).

#### 4.4.1 Análise estatística dos dados clínico-patológicos correlacionados com a metilação da região promotora do gene *CXCR4*

Neste estudo foram analisadas 76 amostras de tumores de mama. Os dados clínicos das pacientes e os resultados de MSP do gene *CXCR4* estão expostas no quadro do item ANEXO 5.

Na tabela 1, abaixo, estão expostos os dados da análise estatística e a correlação entre a metilação e as variáveis clínicas. Do total de amostras tumorais,

14 (20,0%) foram diagnosticadas como estadio 0/I, 33 (47,1%) como estadio II, 13 (18,6%) como estadio III e 10 (14,3%) como estadio IV, sendo que 3 amostras não foram classificadas para esta variável. O tamanho do tumor foi avaliado em 73 amostras, das quais 20 (27,4%) foram classificadas como T1 (tumor menor ou igual a 2 cm), 38 (52,1%) foram classificadas como T2 (tumor maior que 2 cm e menor ou igual a 5 cm), 8 foram classificadas como T3 (tumor maior que 5 cm) e 7 foram classificadas como T4 (tumor de qualquer tamanho com extensão para parede torácica e/ou edema, ou ulceração da pele, ou carcinoma inflamatório). O comprometimento linfonodal foi avaliado em 71 amostras, dentre as quais 37 (52,1%) apresentaram linfonodos comprometidos. Além disso, foi verificado que 11 (16,4%) de 67 pacientes apresentaram metástases à distância com óbito. As recidivas locais foram avaliadas em 69 amostras, aparecendo em 6 (8,7%) pacientes. Quanto à expressão de receptores hormonais, 58 (82,9%) das 70 amostras foram RE+, enquanto, do total de 61 amostras, 46 (75,4%) foram RP+. A expressão de ERBB2 foi detectada em 22 (33,8%) das 65 amostras. Por fim, a última variável considerada foi o tipo de tumor. A maioria das mostras era de carcinoma ductal invasivo (70,8%).

A freqüência de metilação nas amostras analisadas foi de 26 (35,6%) em 73. Esta freqüência não variou significativamente entre os diferentes estadios (0/I= 21,4%, II= 36,4%, III/IV= 39,1%). Um leve aumento da freqüência de metilação foi observado em tumores T3 e T4, quando comparado aos tumores de tamanhos menores, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,273$ ). As freqüências de metilação obtidas para os tamanhos T1 e T2 foram 30,0% e 31,6%, respectivamente, enquanto que, para tumores T3/4 foi observada uma freqüência de metilação igual a 53,3%. Outras variáveis que apresentaram freqüência de metilação ligeiramente aumentada foram a expressão de RE, RP e ocorrência de metástase e óbito. As amostras RE+, RP+ e metástase/óbito+ apresentaram, respectivamente, uma freqüência de metilação igual a 39,7%, 39,1%, 45,5%. Quanto ao tipo de tumor, constatou-se uma freqüência de metilação igual a 41,2% nas amostras de carcinoma ductal invasivo, e igual a 23,8% nas amostras de carcinoma lobular invasivo. Também não foi constatada diferença com valor estatístico quanto ao perfil de metilação do fragmento da ilha-2 analisado e as variáveis: expressão de RE, RP, ocorrência de metástase/óbito e tipo de tumor ( $p=0,514$ ;  $p=0,539$ ;  $p=0,505$ ;  $p=0,189$ , respectivamente).

Além disso, não foram observadas em nossas amostras correlações estatisticamente significativas entre a metilação do fragmento da ilha de CpG-2 do gene *CXCR4* e o grau de diferenciação histológico (SBR) ( $p=0,267$ ), o comprometimento de linfonodos ( $p=0,793$ ), a expressão do fator de crescimento ERBB2 ( $p=0,838$ ) e a ocorrência de recidiva ( $p=1,000$ ). A frequência de metilação para todas estas variáveis ficou em torno de 27 a 47%.

**TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO CATEGÓRICA DOS DADOS CLÍNICOS DAS PACIENTES ANALISADAS E A FREQUÊNCIA DE METILAÇÃO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CXCR4* AVALIADAS PELO TESTE DO QUI-QUADRADO OU TESTE EXATO DE FISCHER.**

VARIÁVEL	PACIENTES NÚMERO (%)	METILAÇÃO		p
		SIM (%)	NÃO (%)	
<b>Estádio</b>				
0/I	14 (20,0)	3 (21,4)	11 (78,6)	0,514
II	33 (47,1)	12 (36,4)	21 (63,6)	
III/IV	23 (32,9)	9 (39,1)	14 (60,9)	
<b>Tamanho do tumor</b>				
pT1/pTis	20 (27,4)	6 (30,0)	14 (70,0)	0,273
pT2	38 (52,1)	12 (31,6)	26 (68,4)	
pT3/pT4	15 (20,5)	8 (53,3)	7 (46,7)	
<b>SBR</b>				
I	19 (27,1)	9 (47,4)	10 (52,6)	0,267
II	33 (47,1)	9 (27,3)	24 (72,7)	
III	18 (25,7)	8 (44,4)	10 (55,6)	
<b>Comprometimento de linfonodo</b>				
Negativo	34 (47,9)	13 (38,2)	21 (61,8)	0,793
Positivo	37 (52,1)	12 (32,4)	25 (67,6)	
<b>Receptor de Estrógeno (ER)</b>				
Negativo	12 (17,1)	3 (25,0)	9 (75,0)	0,514
Positivo	58 (82,9)	23 (39,7)	35 (60,3)	
<b>ERBB2</b>				
Negativo	43 (66,2)	16 (37,2)	27 (62,8)	0,838
Positivo	22 (33,8)	8 (36,4)	14 (63,6)	

VARIÁVEL	PACIENTES NÚMERO (%)	METILAÇÃO		p
		SIM (%)	NÃO (%)	
<b>Receptor de progesterona (PR)</b>				
Negativo	15 (24,6)	4 (26,7)	11 (73,3)	0,539
Positivo	46 (75,4)	18 (39,1)	28 (60,9)	
<b>Metástase/óbito</b>				
Negativo	56 (83,6)	19 (33,9)	37 (66,1)	0,505
Positivo	11 (16,4)	5 (45,5)	6 (54,5)	
<b>Recidiva</b>				
Negativo	63 (91,3)	23 (36,5)	40 (63,5)	1,000
Positivo	6 (8,7)	2 (33,3)	4 (66,7)	
<b>Tipo de tumor</b>				
Carcinoma Ductal Invasivo	51 (70,8)	21 (41,2)	30 (58,8)	0,189
Carcinoma Lobular Invasivo	21 (29,2)	5 (23,8)	16 (76,2)	

Apesar de não ter sido encontrada nenhuma diferença com valor estatístico entre o perfil metilado e não metilado do gene *CXCR4* com relação às diferentes características clínico-patológicas citadas na tabela 4, observou-se que, grande parte das 26 amostras positivas para a reação metilada estavam associadas a tumores de melhor prognóstico: 88% dos casos eram RE+, 81% eram RP+, 67% eram ERBB2-. Além disso, a metilação também esteve associada com a maioria dos casos sem recidiva (92%), sem ocorrência de metástase (76%) e de óbito (79%). Dentre os casos *CXCR4*-M+, 46% foram RE+, RP+ e ERBB2- e 38% foram RE+, RP+, ERBB2- e metástase-.

Assim como o perfil de metilação (metilado e não metilado), a expressão do receptor *CXCR4* também não parece ter correlação com muitas características clínico-patológicas. No entanto, a partir dos resultados citados no parágrafo anterior, pode-se sugerir uma relação entre a presença de metilação e tumores de melhor prognóstico.

A grande maioria dos trabalhos que estuda a relação entre a elevada expressão do gene *CXCR4* com características clínico-patológicas dos mais diversos tipos de câncer não obteve correlação estatisticamente significativa com a



maioria dos dados clínicos. E, em geral, nestes trabalhos a técnica utilizada para avaliar a expressão deste receptor foi a imunohistoquímica.

Andre *et al.* (2006) não encontraram correlação entre a expressão da proteína CXCR4 e a expressão de ERBB2 e RE, idade, grau e tamanho do tumor, número de linfonodos envolvidos, tempo de sobrevida geral e tempo de vida livre da doença em tumores de mama. Além destes parâmetros, Kato *et al.* (2003), Kang *et al.* (2005), Su *et al.* (2006), Holm *et al.* (2007) e Woo *et al.* (2008) também não constataram relação com o *status* de menopausa (pré- ou pós-menopausa), tipo e grau histológico, invasão linfovascular, expressão de RP e estadiotumoral.

Alguns poucos trabalhos descritos na literatura encontram correlação entre a expressão do CXCR4 e a ocorrência de metástase. Mas, este dado é ainda muito contraditório, visto que em outras pesquisas essa relação não é encontrada.

Por exemplo, embora André *et al.* (2006) tenham constatado que a expressão do CXCR4 se relacionou significativamente com a ocorrência de metástase ao fígado, isso não foi confirmado no trabalho de Sue e colaboradores (2006), pois, este grupo não encontrou correlação com metástases distantes. Woo *et al.* (2008), por outro lado, detectaram uma associação significativa entre a elevada expressão nuclear do CXCR4 com a ocorrência de metástase à linfonodos, e, segundo este trabalho, tumores CXCR4+/L+ estiveram associadas (de forma estatisticamente significativa) com a negatividade do RE e do RP. Kato *et al.* (2003) e Holm *et al.* (2007), por sua vez, não observaram correlação estatisticamente significativa entre a expressão do CXCR4 e a ocorrência de metástases à linfonodos ou distantes. Mas, eles observaram que tumores tipo focal (tumores com marcação heterogênea para a proteína CXCR4, possuindo desde células de carcinoma que não expressavam o CXCR4 até células positivas segregadas em algumas áreas focais) tinham maior potencial para metastatizar à linfonodos, pois apresentavam o comprometimento de maior número de linfonodos do que os tumores tipo difuso (caracterizados pela marcação homogênea com anticorpo anti-CXCR4). Kang *et al.* (2005) não encontraram correlação com sobrevida geral e tempo de vida livre da doença, mas demonstraram a associação entre elevados níveis de expressão da proteína CXCR4 em tumores linfonodo positivo, e, essa diferença atingiu relevância estatística. Apesar da expressão do CXCR4 ser maior também entre os pacientes com metástases à distância, não foi encontrada correlação estatisticamente significativa com este fator.

A inexistência de correlação entre expressão do CXCR4 em tumores metastáticos de linfonodos foi explicada por Shim *et al.* (2006). Eles observaram a elevada expressão de membrana da proteína CXCR4 em tumores primários, enquanto que, na maioria dos tumores secundários de linfonodos foi detectada a expressão citoplasmática deste receptor. A redução da expressão de CXCR4 de superfície celular pode ser justificada pela elevada expressão da proteína CXCL12 em linfonodos. Esta quimiocina estimula a internalização e posterior degradação do CXCR4 em lisossomos. Além disso, foi constatada (com valor estatístico) que a expressão do HIF-1 $\alpha$  é maior em tumores primários que em amostras de tumores metastáticos de linfonodos e, como comentado no início deste trabalho (item 1.3.1) o HIF-1 $\alpha$  aumenta a expressão do CXCR4 ao nível transcricional.

Embora o CXCR4 apareça geralmente correlacionado com a ocorrência de metástase, sugerindo seu papel como potencial fator preditivo de metástase, outros trabalhos mostraram que a expressão deste receptor não está restrita às formas mais malignas e com um estadio mais avançado e agressivo do câncer de mama. Schimid *et al.* (2004) demonstraram que a proteína CXCR4 também está expressa em células pré-malignas (de hiperplasia ductal atípica) e estes sugerem que a expressão do receptor CXCR4 pode conferir habilidade de resposta a eventuais sinais quimiotáticos desencadeados pela proteína CXCL12, contribuindo para a obtenção de um fenótipo invasivo e, portanto, mais agressivo.

Em outros tipos de tumores também foi verificado a inexistência de correlação entre a expressão do CXCR4 e grande parte das características clínicas.

A superexpressão do gene *CXCR4* em células de carcinoma renal, em carcinoma de células escamosas de esôfago e em adenocarcinoma de esôfago não teve correlação com o grau de diferenciação, estadio tumoral, idade, gênero, localização do tumor e com as categorias TNM (STALLER *et al.*, 2003; GOCKEL *et al.*, 2006). Por outro lado, Staller *et al.* (2003) observaram a associação estatisticamente relevante entre a forte expressão do gene *CXCR4* e menor sobrevida global no câncer de rim. Embora não tenha alcançado diferença com relevância estatística, em carcinoma de células escamosas foi verificado que pacientes com forte expressão do *CXCR4* tinham menor sobrevida após cirurgia do que pacientes com fraca expressão. Também foi observado que tumores graus 3 e 4 estiveram associados à fraca expressão do *CXCR4*; enquanto os tumores graus 1 e 2 estiveram relacionados com a forte expressão do *CXCR4* (GOCKEL *et al.*, 2006).

Resumidamente, nossos dados mostram, pela primeira vez, que ocorre regulação da expressão do gene *CXCR4* em tumores primários de mama pelo mecanismo de hipermetilação da região promotora do gene. A inativação do gene associado a 35,6% das amostras pode estar relacionada a um bom prognóstico. Entretanto, a confirmação dessa hipótese só poderá ser feita por análise de sobrevida global e sobrevida livre de doença. No momento, no banco de tumores não estão disponíveis os dados para se efetuar esta análise.

## 5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados deste estudo podemos chegar às seguintes conclusões:

- O gene *CXCR4* apresenta-se superexpresso nas linhagens tumorais de mama PMC-42, MCF-7 e MDA-MB-436 e está totalmente silenciado em apenas uma linhagem analisada, MDA-MB-435;
- A hipermetilação da região promotora do gene *CXCR4* promove o silenciamento gênico ao nível de RNAm, na linhagem MDA-MB-435;
- Em todas as 76 amostras de tumores primários de mama foi verificada positividade para a reação não metilada (U); e, em 26 amostras (cerca de 36%), também foi constatada a positividade para a reação metilada (M);
- Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a presença ou ausência de metilação da região promotora do gene *CXCR4* com as variáveis clínico-patológicas: grau tumoral (SBR), estadió clínico (TNM), tamanho do tumor, presença de RE, RP e ERBB2, acometimento de linfonodos, metástase e recidiva e tipo de tumor;
- A presença de metilação do gene *CXCR4* pode estar associada a tumores de melhor prognóstico. Dentre os 26 casos positivos para a reação metilada, 88% eram RE+, 81% eram RP+, 67% eram ERBB2-. Além disso, a metilação também esteve associada com a maioria dos casos sem recidiva (92%), sem ocorrência de metástase (76%) e de óbito (79%).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKLAND, M. L.; MICHALCZYK, A.; WHITEHEAD, R. H. PMC42, a novel model for the differentiated human breast. **Exp Cell Res.**, v. 263, n. 1, p. 14-22, fev. 2001.

AHUJA, N.; LI, Q.; MOHAN, A. L.; BAYLIN, S. B.; ISSA, J. P. J. Aging and DNA Methylation in Colorectal Mucosa and Cancer. **Cancer research**, v. 58, p. 5489-5494, dez. 1998.

ALBERT, P. R.; ROBILLARD, L. G protein specificity: traffic direction required. **Cell Signal**, v. 14, p. 407-418, 2002.

ALLEN, S. J.; CROWN, S. E.; HANDEL, T. M. Chemokine: receptor structure, interactions and antagonism. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 25, p. 787-820, 2007.

ANDRE F, CABIOGLU N, ASSI H, SABOURIN JC, DELALOGUE S, SAHIN A, BROGLIO K, SPANO JP, COMBADIÈRE C, BUCANA C, SORIA JC, CRISTOFANILLI M. Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer. **Ann Oncol.**, v. 17, n. 6, p. 945-951, jun. 2006.

ATCC - THE AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Disponível no site: <<http://www.atcc.org/>>. Acesso em: 28/04/2008.

BAGGIOLINI, M. Chemokine and leukocyte traffic. **Nature**, v. 392, n. 6676, p. 565-568, abr. 1998.

BAJETTO, A.; BARBIERI, F.; DORCARATTO, A.; BARBERO, S.; DAGA, A.; PORCILE, C.; RAVETTI, J. L.; ZONA, G.; SPAZIANTE, R.; CORTE, G.; SCHETTINI, G.; FLORIO, T. Expression of CXC chemokine receptors 1-5 and their ligands in human glioma tissues: role of CXCR4 and SDF1 in glioma cell proliferation and migration. **Neurochem Int.**, v. 49, n. 5, p. 423-432, out. 2006.

BAJETTO, A.; BONAVIA, R.; BARBERO, S.; FLORIO, T.; SCHETTINI, G. Chemokines and their receptors in the central nervous system. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 22, n. 3, p. 147-184, jul. 2001.

BALKWILL, F. Cancer and the chemokine network. **Nature**, v. 4, n. 7, p. 540-550, jul. 2004.

BAYLIN, S. B. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nature Clinical Practice**, v. 2, suppl. 1, p. S4-S11, dez. 2005.

BAYLIN, S. B.; HÖPPENER, J. W.; DE BUSTROS, A.; STEENBERGH, P. H.; LIPS, C. J.; NELKIN, B. D. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. **Cancer Res.**, v. 46, n. 6, p. 2917-2922, jun. 1986.

BEN-BARUCH, A. The multifaceted roles of chemokines in malignancy. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 25, n. 3, p. 357-371, set. 2006.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, v. 16, n. 1, p. 6-21, jan. 2002.

BURGER, J. A.; KIPPS, T. J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. **Blood**, v.107, n. 5, p.1761-1767, mar. 2006.

CABIOGLU, N.; YAZICI, M. S.; ARUN, B.; BROGLIO, K. R.; HORTOBAGYI, G. N.; PRICE, J. E.; SAHIN, A. CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, n. 16, p. 5686-5693, ago. 2005.

CARUZ, A.; SAMSOM, M.; ALONSO, J. M.; ALCAMI, J.; BALEUX, F.; VIRELIZIER, J. L.; PARMENTIER, M.; ARENZANA-SEISDEDOS, F. Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene. **FEBS Letters**, v. 426, n. 2, p. 271-278, abr. 1998.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 581-585, 2006.

CLARKE, R.; SKAAR, T.; BAUMANN, K.; LEONESSA, F.; JAMES, M.; LIPPMAN, J.; THOMPSON, E. W.; FRETER, C.; BRUNNER, N. Hormonal carcinogenesis in breast cancer: cellular and molecular studies of malignant progression. **Breast Cancer Res Treat**, v. 3, n. 2-3, p. 237-248, 1994.

COLOBRAN, R.; PUJOL\_BORRELL, R.; ARMENGOL, M. P.; JUAN, M. The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their functional complexity. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 148, n. 2, p. 208-217, maio. 2007.

COSTA, F. F.; PAIXÃO, V. A.; CAVALHER, F. P.; RIBEIRO, K. B.; CUNHA, I. W.; RINCK, J. A. JR.; 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 Genet Cytogenet.**, v. 165, n. 2, p.135-143, mar. 2006.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROLLINS, S. L. Patologia Estrutural e Funcional. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 2000, p.643-644.

CpG PLOT. Disponível no site: <<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>>. Acesso em: 25/04/2006.

CRAZZOLARA, R.; KRECZY, A.; MANN, G.; HEITGER, A.; EIBL, G.; FINK, F. M.; MÖHLE, R.; MEISTER, B. High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol.**, v. 115, n. 3, p. 545-553, dez. 2001.

DAS, P. M.; SINGAL, R. DNA methylation in cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 22, p. 4632-4642, nov. 2004.

DEVEREUX, T. R.; HORIKAWA, I.; ANNA, C. H.; ANNAB, L. A.; AFSHARI, C. A.; BARRETT, J. C. DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. **Cancer Res.**, v. 59, n. 24, p. 6087-6090, dez. 1999.

DONTU G, ABDALLAH WM, FOLEY JM, JACKSON KW, CLARKE MF, KAWAMURA MJ, WICHA MS. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. **Genes Dev.**, v. 17, n. 10, p. 1253-1270, maio 2003.

DUMITRESCU, R. G.; COTARLA, I. Understanding breast cancer risk- where do we stand in 2005? **J. Cell. Mol. Med.**, v. 9, n. 1, p. 208-221, 2005.

DWINELL, M. B.; ECKMANN, L.; LEOPARD, J. D.; VARKI, N. M.; KAGNOFF, M. F. Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 117, n. 2, p. 359-367, ago. 1999.

EBERHARTER, A.; BECKER, P. B. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. **European Molecular Biology Organization**, v. 3, n.3, p. 224-229, 2002.

EDDLESTON, J.; CHRISTIANSEN, S. C.; ZURAW, B. L. Functional expression of the C-X-C chemokine receptor CXCR4 by human bronchial epithelial cells: regulation by proinflammatory mediators. **J Immunol.**, v. 169, n. 11, p. 6445-6451, dez. 2002.

ELLISON, G.; KLINOWSKA, T.; WESTWOOD, R. F.; DOCTER, E.; FRENCH, T.; FOX, J. C. Further evidence to support the melanocytic origin of MDA-MB-435. **Mol Pathol.**, v. 55, n. 5, p. 294-299, out. 2002.

ENTREZ GENE. CXCR4 chemokine (C-X-C motif) receptor 4 [ Homo sapiens ]. Disponível no site: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=Retrieve&dopt%20=Graphics&list\\_uids=7852](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=Retrieve&dopt%20=Graphics&list_uids=7852)>. Acesso em: 15/05/2006.

EMBL - EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY. Disponível no site: <<http://www.ebi.ac.uk/>>. Acesso em: 15/04/2006.

FARIA, J. L. **Patologia especial com complicações clínicas**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

FAZZARI, M. J.; GREALLY, J. M. Epigenomics: beyond CpG islands. **Nature**, v. 5, n. 6, p. 446-445, jun. 2004.

FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nature**, v. 4, n. 2, p. 143-153, fev. 2004.

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

FERNANDEZ, E. J.; LOLIS, E. Structure, function and inhibition of chemokines. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 42, p. 469-499, 2002.

FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia**. 6. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

FURUYA, M.; SUYAMA, T.; USUI, H.; KASUYA, Y.; NISHIYAMA, M.; TANAKA, N.; ISHIWATA, I.; NAGAI, Y.; SHOZU, M.; KIMURA, S. Up-regulation of CXC chemokines and their receptors: implications for proinflammatory microenvironments of ovarian carcinomas and endometriosis. **Hum Pathol.**, v. 38, n. 11, p. 1676-1687, nov. 2007.



FUTAHASHI, Y.; KOMANO, J.; URANO, E.; AOKI, T.; HAMATAKE, M.; MIYAUCHI, K.; YOSHIDA, T.; KOYANAGI, Y.; MATSUDA, Z.; YAMAMOTO, N. Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic potentiator CXCR4. **Cancer Sci.**, v. 98, n. 3, p. 373-379, mar. 2007.

GANJU, R.K.; BRUBAKER, S. A.; MEYER, J.; DUTT, P.; YANG, Y.; QIN, S.; NEWMAN, W.; GROOPMAN, J. E. The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. **J Biol Chem.**, v. 273, n. 36, p. 23169-23175, set. 1998.

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG islands in vertebrate genomes. **J. Mol. Biol.**, v. 196, n. 2, p. 261-282, 1987.

GIRAULT, I.; TOZLU, S.; LIDEREAU, R.; BIÈCHE, I. Expression Analysis of DNA Methyltransferases 1, 3A, and 3B in Sporadic Breast Carcinomas. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 4415-4422, out. 2003.

GOCKEL, I.; SCHIMANSKI, C. C.; HEINRICH, C.; WEHLER, T.; FRERICHS, K.; DRESCHER, D.; VON LANGSDORFF, C.; DOMEYER, M.; BIESTERFELD, S.; GALLE, P. R.; JUNGINGER, T.; MOEHLER, M. Expression of chemokine receptor CXCR4 in esophageal squamous cell and adenocarcinoma. **BMC Cancer**, v. 6, dez. 2006.

GODINHO, E. R.; KOCH, H. A. Rastreamento do câncer de mama: aspectos relacionados ao médico. **Radiologia Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 91-99, 2004.

GRUVBERGER, S.; RINGNÉR, M.; CHEN, Y.; PANAVALLY, S.; SAAL, L. H.; BORG, A.; FERNÖ, M.; PETERSON, C.; MELTZER, P. S. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. **Cancer Research**, v. 61, n. 16, p. 5979-5984, ago. 2001.

HELLEBREKERS, D. M. E. I.; GRIFFIOEN, A. W.; ENGELAND, M. V. Dual targeting of epigenetic therapy in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1775, n. 1, p. 76-91, jan. 2007.

HENRY, N. L.; HAYES, D. F. Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring, and treatment of primary and metastatic breast cancer. **The oncologist**, v. 11, n. 6, p. 541-552, jun. 2006.

HERMAN, J. G.; GRAFF, J. R.; MYÖHÄNEN, S.; NELKIN, B. D.; BAYLIN, S. B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 18, p. 9821-9826, set. 1996.

HODA, R. S.; CHIU, A.; HODA, S. A. Microinvasive Carcinoma of Breast A Commonly Misdiagnosed Entity. **Arch Pathol Lab Med**, v. 125, set. 2001.

HOLLAND, J. D.; KOCHETKOVA, M.; AKEKAWATCHAI, C.; DOTTORE, M.; LOPEZ, A.; MCCOLL, S. R. Differential functional activation of chemokine receptor CXCR4 is mediated by G proteins in breast cancer cells. **Cancer Res.**, v. 66, n. 8, p. 4117-4124, abr. 2006.

HOLM, N. T.; BYRNES, K.; LI, B. D.; TURNAGE, R. H.; ABREO, F.; MATHIS, J. M.; CHU, Q. D. Elevated levels of chemokine receptor CXCR4 in HER-2 negative breast cancer specimens predict recurrence. **J Surg Res.**, v. 141, n. 1, p. 53-59, jul. 2007.

HOSPITAL DO CÂNCER AC CAMARGO. Disponível no site: <<http://www.hcanc.org.br/>>. Acesso em: 07/12/2008.

HULKA, B. S.; MOORMAN, P. G. Breast cancer: hormones and other risk factors. **Maturitas**, v. 38, p. 103-113, 1993.

HUMAN BLAT SEARCH. Disponível no site: <<http://genome.ucsc.edu>>. Acesso em: 16/05/2006.

IKEDA, K and INOUE S. Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. **Archi. Histol. Cytol.**, v. 67, n. 5, p. 435-442, dez. 2004.

INCA. BRASIL, Ministério da Saúde. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2007.

INCA. BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Câncer**. Disponível no site: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 04/11/2004.

ISSA, J. P. CpG island methylator phenotype in cancer. **Nature**, v. 4, n. 12, p. 988-993, dez. 2004.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature**, v. 33, p. 245-254, mar. 2003.

JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, HAO Y, XU J, MURRAY T, THUN MJ. Cancer Statistics, 2008. **CA Cancer J Clin**, v. 58, n. 2, p. 71-96, 2008.

JERÓNIMO, C.; USADEL, H.; HERIQUE, R.; OLIVEIRA, J.; LOPES, C.; NELSON, W.G.; SIDRANSKY, D. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 93, p. 1747-1752, 2001.

JIANG, Y. P.; WU, X. H.; XING, H. Y.; DU, X.Y. Role of CXCL12 in metastasis of human ovarian cancer. **Chinese Medical Journal**, v. 120, n. 14, p. 1251-1255, jul. 2007.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature**, v. 3, n. 6, p. 415-428, jun. 2002.

JORDAN, N. J.; KOLIOS, G.; ABBOT, S. E.; SINAI, M. A.; THOMPSON, D. A.; PETRAKI, K.; WESTWICK, J. Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 8, p. 1061-1069, out. 1999.

KANG, H.; WATKINS, G.; DOUGLAS-JONES, A.; MANSEL, R. E.; JIANG, W. G. The elevated level of CXCR4 is correlated with nodal metastasis of human breast cancer. **Breast**, v. 14, n. 5, p. 360-367, out. 2005.

KATO, M.; KITAYAMA, J.; KAZAMA, S.; NAGAWA, H. Expression pattern of CXCR4 chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma. **Breast Cancer Res.**, v. 5, n. 5, p. R1440-R1450, 2003.

KNUDSON, A. G. **Mutation** and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 68, n. 4, p. 820-823, abr. 1971.

KOPELOVICH, L.; CROWELL, J. A.; FAY, J. R. The epigenome as a target for cancer chemoprevention. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 23, p. 1747-1757, dez. 2003.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

KUBAREK, L.; JAGODZINSKI, P. P. Epigenetic up-regulation of CXCR4 and CXCL12 expression by 17 $\beta$ -estradiol and tamoxifem is associated with formation of DNA methyltransferase 3B4 splice variant in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells. **FEBS Letters**, v. 581, n. 7, p. 1441-1448, abr. 2007.

KUKREJA, P.; ABDEL-MAGEED, A. B.; MONDAL, D.; LIU, K.; AGRAWAL, K. C. Up-regulation of CXCR4 expression in PC-3 cells by stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) increases endothelial adhesion and transendothelial migration: role of MEK/ERK signaling pathway-dependent NF-kappaB activation. **Cancer Res.**, v. 65, n. 21, p. 9891-988, nov. 2005.

KULBE, H.; LEVINSON, N. R.; BALKWILL, F.; WILSON, J. L. The chemokine network in cancer – much more than directing cell movement. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 48, n. 5-6, p. 489-496, 2004.

LAIRD, P. W. Cancer epigenetics. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 1, R65-R76, 2005.

LAURENCE, A. D. J. Location, movement and survival: the role of chemokines in haematopoiesis and malignancy. **British Journal of Haematology**, v. 132, n. 3, p. 255-267, fev. 2005.

LAVI, E.; STRIZKI, J. M.; ULRICH, A. M.; ZHANG, W.; FU, L.; WANG, Q.; O'CONNOR, M.; HOXIE, J. A.; GONZÁLEZ-SCARANO, F. CXCR-4 (Fusin), a co-receptor for the type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1), is expressed in the human brain in a variety of cell types, including microglia and neurons. **Am J Pathol.**, v. 151, n. 4, p. 1035-1042, out. 1997.

LEADER, J. E.; WANG, C.; FU, M.; PESTELL, R. G. Epigenetic regulation of nuclear steroid receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 11, p.1589-1596, nov. 2006.

LEE, B. C.; LEE, T. H.; AVRAHAM, S.; AVRAHAM, H. K. Involvement of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  in breast cancer cell migration through human brain microvascular endothelial cells. **Mol. Cancer Res.**, v. 2, n. 6, p. 327-338, jun. 2004.

LIU, Z. J.; ZHANG, X. B.; ZHANG, Y.; YANG, X. Progesterone receptor gene inactivation and CpG island hypermethylation in human leukemia cancer cells. **FEBS Letters**, v. 567, n. 2-3, p. 327-332, jun. 2004.

LOETSCHER, M.; GEISER, T.; O'REILLY, T.; ZWAHLENT, R.; BAGGIOLINI, M.; MOSER, B. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 1, p. 232-237, 1994.

LU, Q.; QIU, X.; HU, N.; WEN, H.; SU, Y.; RICHARDSON, B. C. Epigenetics, disease, and therapeutic interventions. **Ageing Research Reviews**, v. 5, n. 4, p. 449-467, nov. 2006.

MA, X.; YANG, Q.; WILSON, K. T.; KUNDU, N.; MELTZER, S. J.; FULTON, A. M. Promoter methylation regulates cyclooxygenase expression in breast cancer. **Breast Cancer Res.**, 2004; v. 6, n. 4, p. R316-321, 2004.

MAJKA, M.; RATAJCZAK, J.; KOWALSKA, M. A.; RATAJCZAK, M. Z. Binding of stromal derived factor 1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) to CXCR4 chemokine receptor in normal human megakaryoblasts but not in platelets induces phosphorylation of mitogen-activated protein kinase p42/44 (MAPK), ELK-1 transcription factor and serine/threonine kinase Akt. **European Journal of Haematology**, v. 64, n. 3, p. 164-172, mar. 2000.

MEIER, R.; MÜHLETHALER-MOTTET, A.; FLAHAUT, M.; COULON, A.; FUSCO, C.; LOUACHE, F.; AUDERSET, K.; BOURLOUD, K. B.; DAUDIGEOS, E.; RUEGG, C.; VASSAL, G.; GROSS, N.; JOSEPH, J. M. The chemokine receptor CXCR4 strongly promotes neuroblastoma primary tumour and metastatic growth, but not invasion. **PLoS ONE.**, v. 2, n. 10, e1016, out. 2007.

MENKE, C. H.; BIAZÚS, J. V.; XAVIER, N. L.; CAVALHEIRO, J. A.; RABIN, E. G.; BITTELBRUNN, A.; CERICATTO, R. **Rotinas em mastologia**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p. 149-155.

METHPRIMER. Disponível no site: ><http://www.urogene.org/methprimer/index1.html><. Acesso em: 12 ago. 2007.

MILLÁN, J.; RIDLEY, A. J. Rho GTPases and leucocyte-induced endothelial remodeling. **Biochem. J.**, v. 385, Pt 2, p. 329-337, jan. 2005.

MILLIS, R. R. Correlation of hormone receptors with pathological features in human breast cancer. **Cancer**, v. 46, supl. 12, p. 2869-2871, dez. 1980.

MONTEIRO, A. P. S.; ARRAES, E. P. P.; PONTES, L. B.; CAMPOS, M. S. S.; RIBEIRO, R. T.; GONÇALVES, R. E. B. Breast self-examination: frequency of

knowledge, practice and associated factors. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, n. 3, p. 201-205, abr. 2003.

MONTERO, A. J.; DÍAZ-MONTERO, C. M.; MAO, L.; YOUSSEF, E. M.; ESTECIO, M.; SHEN, L.; ISSA, J. P. Epigenetic inactivation of EGFR by CpG island hypermethylation in cancer. **Cancer Biol Ther.**, v. 5, n. 11, p. 1494-501, nov. 2006.

MORALES; O. Q.; PINEDO, R. T.; VIGIL, R.C. Autoexamen de mama em pacientes con patologia mamária. **Acta cancerologica**, v. 24, n. 4, p. 31-35, 1994.

MORI, T.; KIM, J.; YAMANO, T.; TAKEUCHI, H.; HUANG, S.; UMETANI, N.; KOYANAGI, K.; HOON, D. S. Epigenetic up-regulation of C-C chemokine receptor 7 and C-X-C chemokine receptor 4 expression in melanoma cells. **Cancer Res.**, v. 65, n. 5, p.1800-1807, mar. 2005.

MOSER, B. Chemokines: role in immune cell traffic. **Eur Cytokine Netw.**, v.14, n. 4, p. 204-210, dez. 2003.

MULLER, A.; HOMEY, B.; SOTO, H.; GE, N.; CATRON, D.; BUCHANAN, M. E.; McCLANAHAN, T.; MURPHY, E.; YUAN, W.; WAGNER, S. N.; BARRERA, J. L.; MOHAR, A.; VERÁSTEGUI, E.; ZLOTNIK, A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 50-56, mar. 2001.

MURAKAMI, T.; CARDONES, A. R.; HWANG, S. T. Chemokine receptors and melanoma metastasis. **J Dermatol Sci.**, v. 36, n. 2, p. 71-78, nov. 2004.

MURDOCH C, FINN A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**, v. 95, n. 10, p. 3032-3043, maio. 2000.

MURPHY PM, BAGGIOLINI M, CHARO IF, HÉBERT CA, HORUK R, MATSUSHIMA K, MILLER LH, OPPENHEIM JJ, POWER CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacol Rev.**, v. 52, n. 1, p.145-76, mar. 2000.

MURRELL, A.; RAKYAN, V. K.; BECK, S. From genome to epigenome. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 1, p. R3-R10, 2005.

NAKAO, M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. **Gene**, v. 278, p. 25-31, 2001.

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível no site: >[http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)<. Acesso em: 15/04/2006.

OLIGOTECH. Disponível no site: ><http://www.oligotech.com/analysis.php#TECHANALYSIS><. Acesso em: 15/03/2006.

OLIVEIRA, M. A.; SANTOS, G. C.; KANAMURA, C. T., *et al.* Imunoexpressão da proteína Her-2 em punção aspirativa com agulha fina de carcinoma de mama: correlação com os achados da peça cirúrgica. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 25, n.1, p. 23-28, fev. 2003.

OPDENAKKER, G.; DAMME, J. V. The countercurrent principle in invasion and metastasis of cancer cell. Recent insights on the roles of chemokines. **Int. J. Dev. Bio.**, v. 48, n. 5-6, p. 519-527, 2004.

ORIMO, A.; GUPTA, P. B.; SGROI, D. C.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; DELAUNAY, T.; NAEEM, R.; CAREY, V. J.; RICHARDSON, A. L.; WEINBERG, R. A. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. **Cell**, v. 121, n. 3, p. 335-348, maio 2005.

PAGE, D. L.; ANDERSON, T. J. **Diagnostic histopathology of the breast cancer.** New York: Churchill Livingstone, 1987.

PENG, S. B.; PEEK, V.; ZHAI, Y.; PAUL, D. C.; LOU, Q.; XIA, X.; EESSALU, T.; KOHN, W.; TANG, S. Akt activation but not extracellular signal-regulated kinase activation, is required for SDF-1 $\alpha$ /CXCR4- mediated migration of epitheloid carcinoma cells. **Mol. Cancer Res.**, v. 3, n.4, p. 227-236, abr. 2005.

PTASZNIK, A.; URBANOWSKA, E.; CHINTA, S.; COSTA, M. A.; KATZ, B. A.; STANISLAUS, M. A.; DEMIR, G.; LINNEKIN, D.; PAN, Z. K.; GEWIRTZ, A. M. Crosstalk between BCR/ABL oncoprotein and CXCR4 signaling through a Src family kinase in human leukemia cells. **J Exp Med.**, v. 196, n. 5, p. 667-678, set. 2002.

ROBERTSON, K. D.; JONES, P. A. DNA methylation: past, present and future directions. **Carcinogenesis**. v. 21, n. 3, p. 461-467, mar. 2000.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ**, v. 174, n. 3, p. 341-348, jan. 2006.

ROLLINS, B. J. Chemokines. **Blood**, v. 90, n. 3, p. 909-928, ago. 1997.

ROLLINS, B. J. Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. **European Journal of Cancer**, v. 42, n.6, p. 760-767, abr. 2006.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 217-242, 2000.

ROUNTREE, M. R.; BACHMAN, K. E.; HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. **Oncogene**, v. 20, n. 24, p. 3156-3165, maio. 2001.

RUBIE, C.; FRICK, V. O.; WAGNER, M.; WEBER, C.; KRUSE, B.; KEMPF, K.; KÖNING, J.; RAU, B.; CHILLING, M. Chemokine expression in hepatocellular carcinoma versus colorectal liver metastases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 41, p. 6627-6633, nov. 2006.

SALVUCCI, O.; BOUCHARD, A.; BACCARELLI, A.; DESCHENES, J.; SAUTER, G.; SIMON, R.; BIANCHI, R.; BASIK, M. The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 97, n. 3, p. 275-283, jun. 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, dez. 1977.

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

SATO, N.; MATSUBAYASHI, H.; FUKUSHIMA, N.; GOGGINS, M. The chemokine receptor CXCR4 is regulated by DNA methylation in pancreatic cancer. **Cancer Biology and Therapy**, v. 4, n. 1, p. 70-76, jan. 2005.

SCHIMID, B. C.; RUDAS, M.; REZNICZEK, G. A.; LEODOLTER, S.; ZEILLINGER, R. CXCR4 is expressed in ductal carcinoma in situ of the breast and in atypical ductal hyperplasia. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 84, n. 3, p. 247-250, abr. 2004.



SCHIOPPA, T.; URANCHIMEG, B.; SACCANI, A.; BISWAS, S. K.; DONI, A.; RAPISARDA, A.; BERNASCONI, S.; SACCANI, S.; NEBULONI, M.; VAGO, L.; MANTOVANI, A.; MELILLO, G.; SICA, A. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. **J Exp Med.**, v. 198, n. 9, p. 1391-1402, nov. 2003.

SCOTTON, C. J.; WILSON, J. L.; MILLIKEN, D.; STAMP, G.; BALKWILL, F. R. Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? **Cancer Res.**, v. 61, n. 13, p. 4961-4965, jul. 2001.

SELLAPPAN, S.; GRIJALVA, R.; ZHOU, X.; YANG, W.; ELI, M. B.; MILLS, G. B.; YU, D. Lineage infidelity of MDA-MB-435 cells: expression of melanocyte proteins in a breast cancer cell line. **Cancer Res.**, v. 64, n. 10, p. 3479-3485, maio. 2004.

SHIM, H.; LAU, S. K.; DEVI, S.; YOON, Y.; CHO, H. T.; LIANG, Z. Lower expression of CXCR4 in lymph node metastases than in primary breast cancers: potential regulation by ligand-dependent degradation and HIF-1alpha. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 346, n. 1, p. 252-258, jul. 2006.

SILVA, D. M.; SADDI, V. A.; MOMOTUK, E. G. Marcadores moleculares associados ao câncer de mama não metastático. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 1, p. 39-48, 2002.

SINGAL, R.; GINDER, G. D. DNA methylation. **Blood**, v. 93, n. 12, p. 4059-4070, jun. 1999.

SINGH, S.; SINGH, U. P.; GRIZZLE, W. E.; LILLARD, J. W. JR. CXCL12-CXCR4 interactions modulate prostate cancer cell migration, metalloproteinase expression and invasion. **Lab Invest.**, v. 84, n. 12, p. 1666-1676, dez. 2004.

SLETTENAAR, V. I. F.; WILSON, J. L. The chemokine network: a target in cancer biology? **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 8, p. 962-974, out. 2006.

SONG, S. H.; JONG, H. S.; CHOI, H. H.; INOUE, H.; TANABE, T.; KIM, N. K.; BANG, Y. J. Transcriptional silencing of Cyclooxygenase-2 by hyper-methylation of the 5' CpG island in human gastric carcinoma cells. **Cancer Res.**, v. 61, n. 11, p. 4628-4635, jun. 2001.

SORIANO, S. F.; HERNANZ-FÁLCON, P.; RODRÍGUEZ-FRADE, J. M.; ANA, A. M.; GARZÓN, R.; CARVALHO-PINTO, C.; VILA-CORO, A. J.; ZABALLOS, A.; BALOMENOS, D.; MARTÍNEZ-A, C.; MELLADO, M. Functional inactivation of CXC

chemokine receptor 4- mediated responses through SOCS3 up-regulation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 3, p. 311-321, ago. 2002.

STALLER, P.; SULITKOVA, J.; LISZTWAN, J.; MOCH, H.; OAKELEY, E. J.; KREK, W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. **Nature**, v. 425, n. 6955, p. 307-311, set. 2003.

STERNER, D. E.; BERGER, S. L. Acetylation of histones and transcription-related factors. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 2, p. 435-459, jun. 2000.

STRIETER, R. M.; BURDICK, M. D.; MESTAS, J.; GOMPERTS, B.; KEANE, M. P.; BELPERIO, J. A. Cancer CXC chemokine networks and tumor angiogenesis. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 6, p. 768-778, abr. 2006.

SU YC, WU MT, HUANG CJ, HOU MF, YANG SF, CHAI CY. Expression of CXCR4 is associated with axillary lymph node status in patients with early breast cancer. **Breast**, v. 15, n. 4, p. 533-539, ago. 2006.

TAKANAMI, I. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. **Int J Cancer**, v. 105, n. 2, p.186-189, jun. 2003.

TAMAMURA, H.; HORI, A.; KANZAKI, N.; HIRAMATSU, K.; MIZUMOTO, M.; NAKASHIMA, H.; YAMAMOTO, N.; OTAKA, A.; FUJII, N. T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer. **FEBS Letters**, v. 550, n. 1-3, p. 79-83, ago. 2003.

TOYOTA, M.; SHEN, L.; OHE-TOYOTA, M.; HAMILTON, S. R.; SINICROPE, F. A.; ISSA, J. P. Aberrant methylation of the Cyclooxygenase 2 CpG island in colorectal tumors. **Cancer Res.**, v. 60, n. 15, p. 4044-4048, ago. 2000.

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

TYCKO, B. Epigenetic gene silencing in cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 4, p. 401-407, fev. 2000.

UNIGENE. Disponível no site: ><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=search&db=unigene><. Acesso em: 03/05/2006.

VERMA, M.; SRIVASTAVA, S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. **The Lancet Oncology**, v. 3, n. 12, p. 755-763, dez. 2002.

VIANA, L. C.; MARTINS, M.; GEBER, S. **Ginecologia**. 2. ed., Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

VICARI, A. P.; CAUX, C. Chemokines in cancer. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 13, n. 2, p. 143-154, abr. 2002.

WAGGONER, D. Mechanisms of disease: epigenesis. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 14, n. 1, p. 7-14, mar. 2007.

WANG, J. M.; DENG, X.; GONG, W.; SU, S. Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. **Journal of Immunological Methods**, v. 220, n. 1, p. 1-17, nov. 1998.

WEGNER, S. A.; EHRENBERG, P. K.; CHANG, G.; DAYHOFF, D. E.; SLEEKER, A. L.; MICHAEL, N. L. Genomic organization and functional characterization of the chemokine receptor CXCR4, a major entry co-receptor for human immunodeficiency virus type 1. **J Biol Chem.**, v. 273, n. 8, p. 4754-4760, fev. 1998.

WENDT, M. K.; COOPER, A. N.; DWINELL, M. B. Epigenetic silencing of CXCL12 increases the metastatic potential of mammary carcinoma cells. **Oncogene**, 2007.

WILSON, A. S.; POWER, B. E.; MOLLOY, P. L. DNA hypomethylation and human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1775, n. 1, p. 138-162, jan. 2007.

WOO, S. U.; BAE, J. W.; KIM, C. H.; LEE, J. B.; KOO, B. W. A significant correlation between nuclear CXCR4 expression and axillary lymph node metastasis in hormonal receptor negative breast cancer. **Ann Surg Oncol.**, v. 15, n. 1, p. 281-285, jan. 2008.

WORM, J.; GULDBERG, P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. **J Oral Pathol Med.**, v. 31, n. 8, p. 443-449, set. 2002.

XIONG, Z.; LAIRD, P. W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, n. 12, p. 2532-2534, jun. 1997.

YANG, X.; YAN, L.; DAVIDSON, N. E. DNA methylation in breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 8, n. 2, p. 115-127, jun. 2001.

YOO, C. B.; JONES, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present, future. **Nature**, v. 5, n. 1, p. 37-50, jan. 2006.

ZHANG, L.; YEGER, H.; DAS, B.; IRWIN, M. S.; BARUCHEL, S. Tissue microenvironment modulates CXCR4 expression and tumor metastasis in neuroblastoma. **Neoplasia**, v. 9, n. 1, p. 36-46, jan. 2007.

ZHANG, Y.; REINBERG, D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. **Genes & Development**, v. 15, p. 2343-2360, 2001.

ZLOTNIK, A. Chemokines in neoplastic progression. **Seminars in Cancer Biology**, v. 14, n. 3, p. 181-185, jun. 2004.

ZOU YR, KOTTMANN AH, KURODA M, TANIUCHI I, LITTMAN DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 595-599, jun. 1998.

## ANEXOS

### ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO

Concordo em participar livremente deste estudo, entendendo que serei entrevistado e submetido a uma avaliação laboratorial (exame de sangue). E, entendo que os riscos de minha participação nesta pesquisa são mínimos.

Entendo que minha participação é inteiramente voluntária, podendo me recusar a responder qualquer questão ou retirar o meu consentimento em participar neste estudo a qualquer hora, sem nenhum prejuízo ao meu tratamento atual ou futuro.

Eu, \_\_\_\_\_, após ter lido e entendido todas as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo, concordo voluntariamente em participar do mesmo. Atesto também o recebimento das “Informações ao doador”, necessário para a minha compreensão do estudo.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_  
Assinatura (do doador ou responsável) ou impressão datiloscópica

Eu, Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao doador.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_  
Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

## ANEXO 2 - ESTADIAMENTO CLÍNICO

Para nortear as ações de saúde no câncer da mama, uniformizando as condutas, foram criados critérios de estadiamento. Esses critérios procuram estabelecer uma relação entre a doença e o seu prognóstico e, para isso, os casos são colocados em grupos, estadiados de I a IV, formando uma hierarquia importante para o médico que trata de câncer de mama. A União Internacional Contra o Câncer (UICC), a partir dos anos 60, introduziu o sistema TNM (*Tumor, Nodes, Metastasis*, em inglês) e periodicamente o vem revisando, a fim de incorporar os avanços no prognóstico e no tratamento da neoplasia. Outras classificações foram propostas, como o ABCD de Haagensen, que foi bastante usada nas décadas de 60 e 70, e a da American Joint Committee on Cancer (AJCC). Esta última acabou se fundindo com a classificação da UICC e passou a ser padrão no mundo inteiro.

### CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA - TNM

Baseia-se no diâmetro máximo do tumor (T), na presença ou não de linfonodos metastáticos na axila (N) e nas metástases à distância, ausentes ou não (M). Para fins de orientação, transcrevemos a classificação da UICC, 6ª edição, publicada em 2003 (Tabela 17.1). Essa nova classificação trouxe em seu bojo os recentes conhecimentos adquiridos com a padronização da técnica do linfonodo sentinela, como o conceito de micrometástases e de células tumorais isoladas, incluindo, também, o modo de detecção destas, se por imuno-histoquímica ou por métodos moleculares. Considerando a classificação da UICC, são estabelecidos grupos por estadios, constituindo a classificação clínica (Tabela 17.2). Ela só se aplica a carcinomas e a tumores primários, virgens de tratamento.

### Classificação clínica (cTNM) 6ª edição (UICC), 2003

cT	Tumor primário
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> Carcinoma ductal <i>in situ</i> Carcinoma lobular <i>in situ</i> Doença de Paget da papila sem tumor associado
T1	Tumor menor ou igual a 2 cm
	T1mic Carcinoma microinvasor
	T1a Tumor maior que 0,1 cm e menor ou igual a 0,5 cm
	T1b Tumor maior que 0,5 cm e menor ou igual a 1 cm
	T1c Tumor maior que 1cm e menor ou igual a 2 cm
T2	Tumor maior que 2 cm e menor ou igual a 5 cm
T3	Tumor maior que 5 cm
T4	Tumor de qualquer tamanho com extensão para
	T4a Parede torácica
	T4b Edema ou ulceração da pele
	T4c 4a + 4b
	T4d Carcinoma inflamatório

**Obs.:** Parede torácica inclui arcos costais, músculos intercostais e músculo serrátil anterior, mas não o músculo peitoral. Doença de Paget associada a tumor é classificada de acordo com o tamanho do tumor.

### cN Linfonodos regionais

Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase para linfonodos regionais
N1	Metástase para linfonodos axilares ipsilaterais móveis
N2	
	N2a Metástase para linfonodos axilares coalescentes ou aderidos a estruturas adjacentes
	N2b Metástase clinicamente aparente na mama interna na ausência de metástase axilar

N3	N3a	Metástase para linfonodo infraclavicular
	N3b	Metástase para linfonodo da mama interna e axilar
	N3c	Metástase para linfonodo supraclavicular
<b>cM</b>	<b>Metástase à distância</b>	
	Mx	Metástase à distância não pode ser avaliada
	M0	Ausência de metástase à distância
	M1	Presença de metástase à distância

### Classificação patológica (pTNM) 6ª edição (UICC)

pT	Tumor primário
pTx	Tumor primário não pode ser avaliado
pT0	Não há evidência de tumor primário
pTis	Carcinoma <i>in situ</i> Carcinoma ductal <i>in situ</i> Carcinoma lobular <i>in situ</i> Doença de Paget do mamilo sem tumor associado*
pT1	Tumor menor ou igual a 2 cm pT1mic Carcinoma microinvasor pT1a Tumor maior que 0,1 cm e menor ou igual a 0,5 cm pT1b Tumor maior que 0,5 cm e menor ou igual a 1 cm pT1c Tumor maior que 1 cm e menor ou igual a 2 cm
pT2	Tumor maior que 2 cm e menor ou igual a 5 cm
pT3	Tumor maior que 5 cm
pT4	Tumor de qualquer tamanho com extensão para pT4a Parede torácica pT4b Edema ou ulceração da pele pT4c 4a + 4b

\*Doença de Paget associada com tumor é classificada de acordo com o tamanho da lesão.

### pN Linfonodos regionais

pNx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
pN0	Ausência de metástase para linfonodos regionais
pN0	(i -/+)**
pN0	(MOL -/+)**
pN1	pN1mi Micrometástase (maior que 0,2 mm e menor ou igual a 2 mm) em axila ou CMI pN1a 1 a 3 linfonodos axilares ipsilaterais comprometidos incluindo pelo menos uma metástase maior que 2 mm pN1b Linfonodos da mama interna com metástase microscópica identificada em linfonodo sentinela, mas não clinicamente aparente pN1c 1 a 3 linfonodos axilares comprometidos incluindo pelo menos uma metástase maior que 2 mm e linfonodos da mama interna com metástase microscópica sem linfonodos sentinela, mas não clinicamente aparente
pN2	pN2a 4 a 9 linfonodos axilares comprometidos incluindo pelo menos uma metástase maior que 2 mm pN2b Linfonodos da mama interna clinicamente aparentes na ausência de comprometimento axilar
pN3	pN3a 10 linfonodos axilares comprometidos incluindo pelo menos uma metástase maior que 2 mm ou -- Linfonodo infraclavicular ipsilateral comprometido pN3b Linfonodos da mama interna clinicamente comprometidos na presença de comprometimento de linfonodos axilares ou -- Mais de 3 linfonodos axilares comprometidos e linfonodos da mama interna com metástase microscópica identificada em linfonodo sentinela, mas não clinicamente aparente pN3c Linfonodo(s) supraclavicular ipsilateral comprometido

\*\* Casos em que a metástase linfonodal consiste em apenas células tumorais isoladas ou formando agrupamentos menores que 0,2 mm, que, em sua maioria, são detectados pela imunohistoquímica (i)

ou por biologia molecular (MOL), são classificados como pN0, pois tipicamente não mostram evidência de atividade metastática.

**pM Metástase a distância**

pMx	Metástase à distância não pode ser avaliada
pM0	Ausência de metástase à distância
pM1	Presença de metástase à distância

**Resumo**

	<i>Classificação por estadios</i>		
Estadio 0 Tis	N0 M0	Estadio IIIA	T0 N2 M0
Estadio I T1*	N0 M0		T1* N2 M0
Estadio IIA	T0 N1 M0		T2 N2 M0
	T1* N1 M0		T3 N1, N2 M0
Estadio IIB	T2 N0 M0	Estadio IIIB	T4 N0,N1, N2, M0
	T2 N1 M0	Estadio IIIC	Qualquer T N3 M0
	T3 N0 M0	Estadio IV	Qualquer T, Qualquer N M1

\*T1 inclui T1 mic.

**GRAU TUMORAL (SBR)**

O estadiamento tumoral, especialmente quando realizado por patologistas treinados, correlaciona-se bem com o prognóstico clínico. Os sistemas de estadiamento mais utilizados para o câncer de mama são a classificação de Scarff-Bloom-Richardson (SBR), o qual foi modificado pelo grupo de Nottingham.

O grau de diferenciação é avaliado de acordo com a habilidade do tumor em originar formações tubulares, glandulares ou papilares. O pleomorfismo descreve a forma do núcleo. O índice mitótico avalia o número de mitoses encontrados na amostra do tumor. A soma dos pontos dos três componentes determina os graus: 1 (bem diferenciado), 2 (moderadamente diferenciado) e 3 (fracamente diferenciado). Pacientes com um escore de SBR de 3 apresentam um risco relativo de 4,4 comparado com aquelas com um escore de SBR de 1 para tempo livre de doença por cinco anos.

O grau histológico é aplicável a todos os carcinomas mamários. Ele tende a aumentar junto com o tamanho tumoral e o acometimento linfonodal, com importante influência negativa no prognóstico.

**FONTE: MENKE *et al.*, 2007.**



### ANEXO 3 – LOCALIZAÇÃO DOS INICIADORES ESPECÍFICOS PARA RT-PCR

**A**

Genomic chr 2

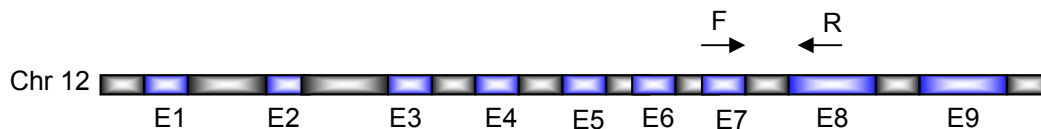
CATGCGCCGC	GCTCGGAGCG	TGTTTTTATA	AAAGTCCGGC	CGCGGCCAGA	136592196
AACTTCAGTT	TGTTGGCTGC	GGCAGCAGGT	AGCAAAGTGA	CGCCGAGGGC	136592146
CTGAGTGCTC	CAGTAGCCAC	CGCATCTGGA	GAACCAGCGG	TTACCATGGA	136592096
GGGGATCAGT	GTAAGTCCAG	TTTCAACCTG	CTTTGTCATA	AATGTACAAA	136592046
...					
GCTGAATTGG	AAGTGAATGT	CCATTCCTTT	GCCTCTTTTG	CAGATATACA	136589946
CTTCAGATAA	CTACACCGAG	GAAATGGGCT	CAGGGGACTA	TGACTCCATG	136589896
AAGGAACCCT	GTTTCCGTGA	AGAAAATGCT	AATTTCAATA	AAATCTTCCT	136589846
GCCCACCATC	TACTCCATCA	TCTTCTTAAC	TGGCATTGTG	GGCAATGGAT	136589796
TGGTCATCCT	GGTCATGGGT	TACCAGAAGA	AACTGAGAAG	CATGACGGAC	136589746
AAGTACAGGC	TGCACCTGTC	AGTGGCCGAC	CTCCTCTTTG	TCATCACGCT	136589696
TCCCTTCTGG	GCAGTTGATG	CCGTGGCAA	CTGGTACTTT	GGGAACCTCC	136589646



**B**

Genomic chr 12

AAGCGGCCAG	CCTGGCACCC	TATGGACACG	CTCCCCTGAC	TTGCGCCCCG	6516717
CTCCCTCTTT	CTTTGCAGCA	ATGCCTCCTG	CACCACCAAC	TGCTTAGCAC	6516767
CCCTGGCCAA	GGTCATCCAT	GACAACCTTG	GTATCGTGGA	AGGACTCATG	6516817
GTATGAGAGC	TGGGGAATGG	GACTGAGGCT	CCCACCTTTC	TCATCCAAGA	6516867
CTGGCTCCTC	CCTGCCGGGG	CTGCGTGCAA	CCCTGGGGTT	GGGGTTCTG	6516917
GGGACTGGCT	TTCCATAAT	TTCCTTTCAA	GGTGGGGAGG	GAGGTAGAGG	6516967
GGTGATGTGG	GGAGTACGCT	GCAGGGCCTC	ACTCCTTTTG	CAGACCACAG	6517017
TCCATGCCAT	CACTGCCACC	CAGAAGACTG	TGGATGGCCC	CTCCGGGAAA	6517067
CTGTGGCGTG	ATGGCCGCGG	GGCTCTCCAG	AACATCATCC	CTGCCTCTAC	6517117
TGGCGCTGCC	AAGGCTGTGG	GCAAGGTCAT	CCCTGAGCTG	AACGGGAAGC	6517167
TCACTGGCAT	GGCCTTCCGT	GTCCCCACTG	CCAACGTGTC	AGTGGTGAC	6517217
CTGACCTGCC	GTCTAGAAAA	ACCTGCCAAA	TATGATGACA	TCAAGAAGGT	6517267
GGTGAAGCAG	GCGTCGGAGG	GCCCCCTCAA	GGGCATCCTG	GGCTACACTG	6517317



**FIGURA 16 - LOCALIZAÇÃO DOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE RT-PCR PARA OS GENES CXCR4 (A) E GAPDH (B).**

**FONTE: HUMAN BLAT, 2008.**

**NOTA:** O exon está indicado em azul, íntron em preto e, destacado em amarelo, estão os nucleotídeos escolhidos para o desenho dos iniciadores. (E) exon, (F) iniciador universal, (R) iniciador reverso. Abaixo da seqüência de nucleotídeos, está exposto um esquema dos genes, em que é possível notar que os iniciadores foram desenhados na região 3', entre exons distintos.

**ANEXO 4 – QUADRO DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS 76 PACIENTES E DOS RESULTADOS DE MSP**

Amostra	Fibroadenoma	Idade	Tamanho	Linfonodos	RE	RP	ERBB2	Estadio	recidiva	metástase	óbito	MSP U	MSP M
1	CP163	44	12	-	nd	nd	nd	nd	-	-	-	+	-
2	CP179	18	48	nd	nd	nd	nd	nd	+	-	-	+	-
3	CP235	15	28	-	nd	nd	nd	nd	-	-	-	+	-
Amostra	CD 'in situ'	Idade	Tamanho	Linfonodos	RE	RP	ERBB2	Estadio	recidiva	metástase	óbito	MSP U	MSP M
4	CP025	79	Tis	nd	nd	nd	nd	0	nd	nd	nd	+	-
Amostra	CDI - GI	Idade	Tamanho	Linfonodos	RE	RP	ERBB2	Estadio	Recidiva	Metástase	Óbito	MSP U	MSP M
5	CP162	49	T1	-	+	+	nd	I	-	-	-	+	+
6	CP287	83	T1	-	+	+	nd	I	-	-	-	+	-
7	CP323	50	T2	-	+	nd	-	IIA	-	-	-	+	+
8	CP332	30	T2	-	+	+	+	IIA	-	-	-	+	+
9	CP402	68	T2	+	+	+	-	IIB	-	-	-	+	-
10	CP408	60	T2	-	+	+	-	IIA	-	-	-	+	+
11	CP425	72	T2	-	+	+	+	IIA	-	-	-	+	-
12	CP456	75	T1	-	+	+	+	I	-	-	-	+	-
13	CP460	66	T1	-	+	+	+	I	-	-	-	+	-
14	CP471	52	T2	+	+	+	-	IIB	-	-	-	+	+
15	CP515	63	T1	-	+	+	-	I	-	-	-	+	+
16	CP528	42	T1	-	+	+	-	I	-	-	-	+	+
Amostra	CDI - GII	Idade	Tamanho	Linfonodos	RE	RP	ERBB2	Estadio	Recidiva	Metástase	Óbito	MSP U	MSP M
17	CP172	68	T2	+	+	+	-	IV	-	+	+	+	-
18	CP174	51	T3	+	+	+	+	IV	-	+	+	+	+

**Continua...**

**ANEXO 4 – QUADRO DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS 76 PACIENTES E DOS RESULTADOS DE MSP**

19	CP197	66	T1	+	-	-	+	IIA	-	-	-	+	-
20	CP271	47	T2	+	+	nd	-	IIB	-	-	+	+	-
21	CP290	71	T1	nd	+	nd	-	pT1,pNX,pMx	-	-	-	+	+
22	CP314	74	T2	-	+	+	+	IIA	-	-	-	+	-
23	CP337	62	T2	-	+	+	-	IV	-	+	+	+	-
24	CP341	73	T2	+	+	+	-	IIB	-	-	-	+	-
25	CP365	39	T2	+	+	-	-	IIB	-	-	-	+	-
26	CP366	63	T2	-	+	-	+	IIA	-	-	-	+	-
27	CP413	83	T2	+	+	+	-	IIB	-	-	-	+	+
28	CP487	68	T1	-	+	+	-	I	-	-	-	+	-
29	CP497	45	T1	+	+	+	-	IV	-	+	-	+	-
30	CP520	71	T4	+	+	+	+	IIIC	-	-	-	+	+
31	CP527	53	T2	+	-	-	+	IIIA	-	-	-	+	-
32	CP532	56	T2	+	+	+	-	IIIC	-	-	-	+	-
33	CP536	40	T2	+	+	+	+	IIIC	-	-	-	+	-
34	CP542	40	T2	+	+	+	+	IIA	-	-	-	+	-
35	CP547	54	T2	+	+	+	-	IIIA	-	-	-	+	-
36	CP556	63	T2	-	+	+	-	IIA	-	-	-	+	+
37	CP562	49	T2	+	+	+	+	IIIA	-	-	-	+	-
38	CP427	55	T1	+	+	+	+	IV	-	+	nd	+	+
Amostra	CDI - GIII	Idade	Tamanho	Linfonodos	RE	RP	ERBB2	Estadio	Recidiva	Metástase	Óbito	MSP U	MSP M
39	CP243	48	T4	+	+	+	-	IIIB	nd	+	+	+	-

**Continua...**

**ANEXO 4 – QUADRO DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS 76 PACIENTES E DOS RESULTADOS DE MSP**

40	CP310	56	T1	+	+	+	+	IIA	-	-	-	+	+
41	CP338	44	T2	-	-	-	-	IIA	-	-	-	+	+
42	CP399	82	T2	+	+	+	-	IIB	-	-	-	+	-
43	CP422	75	T4	-	+	+	-	IV	+	+	+	+	+
44	CP424	63	T2	+	+	-	-	IIB	-	-	-	+	+
45	CP432	66	T4	+	+	+	-	IIIB	-	-	-	+	+
46	CP434	59	T2	+	-	-	-	IV	-	+	+	+	-
47	CP470	67	T2	-	+	+	-	IIA	-	-	-	+	+
48	CP505	72	T4	+	-	-	+	IV	+	+	+	+	+
49	CP525	45	T3	+	+	+	-	IIIA	-	-	-	+	-
50	CP537	69	T2	-	-	-	+	IIB	+	-	-	+	-
51	CP539	55	T1	+	-	-	+	IIA	-	-	-	+	-
52	CP545	27	T3	-	-	-	-	IIB	-	-	-	+	-
53	CP558	51	T1	-	+	+	+	I	-	-	-	+	-
54	CP559	79	T2	-	-	-	+	IV	-	+	+	+	+
55	CP430	54	T4	+	-	nd	nd	IIIB	-	-	-	+	-
<b>Amostra</b>	<b>CLI - GI</b>	<b>Idade</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Linfonodos</b>	<b>RE</b>	<b>RP</b>	<b>ERBB2</b>	<b>Estadio</b>	<b>Recidiva</b>	<b>Metástase</b>	<b>Óbito</b>	<b>MSP U</b>	<b>MSP M</b>
56	CP319	68	T2	-	+	+	-	IIA	-	-	-	+	-
57	CP389	84	T2	-	nd	nd	nd	IIA	-	-	-	+	-
58	CP476	71	T3	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+
59	CP485	59	T1	-	+	+	-	I	-	-	-	+	-

**Continua...**

**ANEXO 4 – QUADRO DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS 76 PACIENTES E DOS RESULTADOS DE MSP**

60	CP501	53	T1	-	+	+	-	I	-	-	-	+	-
61	CP300	65	T1	-	+	+	-	I	+	-	-	+	-
62	CP339	53	T2	+	+	nd	-	IIB	-	+	+	+	+
<b>Amostra</b>	<b>CLI - GII</b>	<b>Idade</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Linfonodos</b>	<b>RE</b>	<b>RP</b>	<b>ERBB2</b>	<b>Estadio</b>	<b>Recidiva</b>	<b>Metástase</b>	<b>Óbito</b>	<b>MSP U</b>	<b>MSP M</b>
63	CP256	55	T2	+	+	+	-	IIB	-	-	-	+	-
64	CP390	44	T1	-	+	+	-	I	-	-	-	+	-
65	CP420	52	T2	-	+	+	-	IIA	-	-	-	+	+
66	CP445	46	T3	+	+	+	-	IIIA	-	-	-	+	+
67	CP506	55	T3	+	+	+	-	IV	-	+	+	+	-
68	CP535	79	T1	-	+	-	-	I	-	-	-	+	-
69	CP297	76	T3	-	+	+	-	IIA	+	nd	nd	+	-
70	CP412	42	T2	-	+	nd	-	IIA	-	-	-	+	-
71	CP574	45	T2	+	-	-	-	nd	-	-	-	+	-
72	CP585	66	T2	+	+	-	-	IIB	-	-	-	+	-
73	CP529	46	T3	-	+	+	+	IIIA	-	-	-	+	+
<b>Amostra</b>	<b>CL - GIII/nd</b>	<b>Idade</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Linfonodos</b>	<b>RE</b>	<b>RP</b>	<b>ERBB2</b>	<b>Estadio</b>	<b>Recidiva</b>	<b>Metástase</b>	<b>Óbito</b>	<b>MSP U</b>	<b>MSP M</b>
74	CP202	55	T2	+	+	nd	nd	IIB	-	-	-	+	-
75	CP196/nd	77	T4	-	-	nd	+	IIIB	+	+	+	+	-
76	CP340/nd	55	T2	+	nd	nd	nd	IIB	nd	nd	nd	+	-

**Legenda:** CD: carcinoma ductal; CDI carcinoma ductal invasivo; CLI: carcinoma lobular invasivo; G: grau histológico (SBR); CP: número do cadastro da paciente no Banco de Tumores; RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; ERBB2: receptor de fator de crescimento epidermal humano; MSPM: tumor metilado; MSPU: tumor não metilado; nd: não determinado.