

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA CHEQUIN

ESTUDO DO PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE *MMP14* EM LINHAGENS
TUMORAIS DE MAMA

CURITIBA
2014

ANDRESSA CHEQUIN

ESTUDO DO PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE *MMP14* EM LINHAGENS
TUMORAIS DE MAMA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Giseli Klassen

CURITIBA
2014



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“ESTUDO DO PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE *MMP14* EM
LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA”**

Por

ANDRESSA CHEQUIN

**Tese 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^ª. Dr^ª. Gisel Klassen (presidente)


Prof^ª. Dr^ª. Fabiane Gomes de Moraes Rego


Prof^ª. Dr^ª. Dayane Alberton

Curitiba, 18 de novembro de 2014.

Dedico este trabalho à minha mãe, porque não tenho dúvida nenhuma de que sem ela não teria chego até aqui. Sempre me incentivando, me apoiando e me colocando para cima, de um jeito que só ela é capaz. Agradeço por tudo, mãe.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Giseli Klassen, pela oportunidade de aprender pesquisa, acompanhamento, orientação e amizade.

À CAPES e CNPq pela bolsa de Mestrado e pelo suporte financeiro.

Ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade.

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio à utilização de seus laboratórios e equipamentos, em especial ao Valter pela paciência e sugestões.

Aos colegas de laboratório: Isabela, Graciele, Liliane, Ana Carolina, Anna Caroline, Mariana, Giseli, Karin e Edneia, que além de tornarem meus dias no trabalho muito felizes também se tornaram grandes e verdadeiras amigas.

À minha família, que sempre me apoiou e me deu suporte para chegar aonde cheguei, em especial meus avós, mãe e irmã.

RESUMO

As metástases são um grande problema para pacientes com câncer de mama, chegando a ser a causa de 90% dos casos de morte desta neoplasia. A proteína matriz metaloprotease 14 (MMP-14) tem uma importante contribuição no desencadeamento da migração celular nos carcinomas mamários, pela sua atividade proteolítica, e também pela ativação de outras metaloproteases solúveis capazes de degradar componentes da matriz extracelular. Sabe-se que a regulação do gene *MMP14* está intimamente relacionada com aspectos epigenéticos, através da metilação de uma ilha de CpG localizada na região promotora. Estudos têm demonstrado que o padrão de metilação ao longo do corpo do gene também pode apresentar um importante papel na regulação da transcrição gênica e, para tanto, o objetivo deste estudo foi verificar o papel da metilação do corpo do gene *MMP14* na regulação da expressão em diferentes linhagens tumorais de mama. As linhagens HB4aC3.6, HB4aC5.2, PMC42 e MCF-7 foram avaliadas quanto a expressão do gene estudado por RT-PCR e RT-qPCR. Duas regiões que continham ilhas de CpG, uma localizada na região promotora (-161 a +186) e outra no primeiro íntron do corpo do gene (+242 a +869), foram amplificadas e sequenciadas após o tratamento com bissulfato de sódio. Os resultados obtidos mostraram que as linhagens HB4aC3.6, HB4aC5.2 e PMC42 expressam o gene *MMP14* e que suas taxas de metilação global, de ambas as ilhas de CpG avaliadas, não passam de 15%. Por outro lado, a linhagem MCF7 foi a única que não expressou o gene *MMP14*, e apresentou taxas de metilação global que ultrapassam 75%, em ambas as ilhas de CpG. Assim, mostrou-se uma correlação entre a ausência de expressão e alta metilação da ilha de CpG não só da região promotora, mas também da localizada no primeiro íntron. Estes resultados também permitiram a identificação de regiões diferencialmente metiladas nas linhagens de mama para padronização da técnica de MSP-PCR. A linhagem MCF7, quando submetida ao tratamento com os compostos desmetilantes (DAC) e inibidores desacetilantes de histona (TSA), passou a expressar o gene *MMP14* e reduziu suas taxas de metilação global, indicando uma estreita relação entre epigenética e regulação deste gene incluindo a região intrônica. Nas regiões desmetiladas pelos tratamentos, foi possível identificar um sítio de ligação do fator de transcrição GLI3, que pode estar auxiliando na expressão de *MMP14*. Concluímos que a metilação da ilha de CpG localizada no íntron do gene *MMP14* parece estar atuando cooperativamente com a região promotora para promover ou silenciar a transcrição do gene. Estudos de metilação no corpo do gene são recentes e, portanto, novos dados podem contribuir para entender a importância da metilação dessas regiões de DNA nos mecanismos de tumorigênese.

Palavras-chave: Câncer de mama. MMP-14. Ilha de CpG intrônica. Metilação.

ABSTRACT

Metastasis is a major problem for patients with breast cancer, being the cause of 90% of deaths from this neoplasia. The protein matrix metalloprotease 14 (MMP-14) has a major contribution in the initiation of cell migration in breast carcinomas, due to its proteolytic activity, and also by the activation of other soluble metalloproteases capable of degrading components of the extracellular matrix. It is known that the regulation of the *MMP14* gene is closely related to epigenetic events by methylation of a CpG island located in the promoter region. Studies have shown that the methylation pattern along the body of the gene may also have a role in regulating gene transcription and, therefore, the aim of this study was to investigate the role of methylation in the body of *MMP14* in regulating the expression of this gene in different breast tumor cell lines. The expression of the gene was evaluated by RT-PCR and RT-qPCR in the HB4aC3.6, HB4aC5.2, PMC42 and MCF-7 cell lines. Two regions containing CpG islands, one located in the promoter (-161 to +186), and another region in the first intron of the gene body (+242 to +869), were amplified and sequenced after treatment with sodium bisulfite. The results showed that the HB4aC3.6, HB4aC5.2 and PMC42 lines expressed *MMP14* and their rates of global methylation of both CpG islands was no more than 15%. On the other hand, the MCF7 line was the only one that did not express the *MMP14* gene and presented global methylation rates exceeding 75% in both CpG islands. This showed a correlation between the absence of high expression and methylation of the CpG island not only of the promoter region but also of the first intron. These results also allowed the identification of different methylated regions in breast cancer cell lines for the standardization of MSP-PCR. The MCF7 line, when subjected to treatment with the demethylating compound (DAC) and the inhibitors of histone deacetylating compound (TSA), expressed *MMP14* and reduced its rates of global methylation, indicating a close relationship between epigenetics and regulation of this gene including the intronic region. In regions demethylated by the treatment it was possible to identify a binding site of the transcription factor GLI3, which may be promoting the expression of *MMP14*. We conclude that methylation of the CpG island located in the intron of the *MMP14* gene seems to be working cooperatively with the promoter region to permit or silence the transcription of the gene. Studies of methylation in the body of the gene are new, and, therefore, new data can contribute to understand the importance of DNA methylation of these regions in the mechanisms of tumorigenesis.

Keywords: Breast cancer. MMP-14. Intronic CpG island. Methylation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ASPECTOS MOLECULARES QUE CARACTERIZAM OS CÂNCERES.....	15
FIGURA 2 -	DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2014 EM MULHERES, EXCETO PELE NÃO MELANOMA.....	17
FIGURA 3 -	INSERÇÃO DO GRUPAMENTO METIL EM CITOSINA ADJACENTE A GUANINA.....	19
FIGURA 4 -	SUB REGIÕES DE UM GENE.....	21
FIGURA 5 -	ESTRUTURA DOS DOMÍNIOS DAS METALOPROTEASES.....	26
FIGURA 6 -	ESTRUTURA DOS DOMÍNIOS DA MMP-14.....	27
FIGURA 7 -	EIXO DE ATIVAÇÃO DA MMP14.....	28
FIGURA 8 -	LOCALIZAÇÃO DAS ILHAS DE CPG.....	37
FIGURA 9 -	RT-PCR DAS DIFERENTES LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA.....	39
FIGURA 10 -	QUANTIFICAÇÃO DO GENE <i>MMP14</i> DAS DIFERENTES LINHAGENS TUMORAIS.....	40
FIGURA 11 -	RT-PCR DE CÉLULAS TUMORAIS APÓS TRATAMENTO COM DAC E COM TSA DA LINHAGEM MCF7.....	42
FIGURA 12 -	GRÁFICOS DE RT-QPCR DA LINHAGEM TUMORAL TRATADA COM DAC E TSA.....	43
FIGURA 13 -	SEQUENCIA AMPLIFICADA PELOS INICIADORES A, B e C...44	
FIGURA 14 -	AMPLIFICADA PELOS INICIADORES E e I.....	46
FIGURA 15 -	GRADIENTE DE TEMPERATURA PARA PADRONIZAÇÃO DO USO DOS INICIADORES DENOMINADOS COMO E e I.....	47
FIGURA 16 -	SEQUENCIAMENTO DAS ILHAS DE CPG 1 E 2 DAS LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA NÃO TRATADAS HB4AC3.6, HB4AC5.2, PMC-42 E MCF-7.....	49
FIGURA 17 -	GRÁFICO DA PORCENTAGEM DE METILAÇÃO GLOBAL DAS DIFERENTES LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA.....	50
FIGURA 18 -	SEQUENCIAMENTO DAS ILHAS DE CPG 1 E 2 DAS LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA TRATADAS MCF-7.....	51

FIGURA 19 - GRÁFICO DA PORCENTAGEM DE METILAÇÃO GLOBAL DA LINHAGEM MCF-7 TRATADA.....	52
FIGURA 20 - LOCALIZAÇÃO DOS INICIADORES DE MSP-PCR PLANEJADOS PELO PROGRAMA <i>METHPRIMER</i>	54
FIGURA 21 - LOCALIZAÇÃO DOS INICIADORES DE MSP-PCR PLANEJADOS MANUALMENTE.....	55
FIGURA 22 - AMPLIFICAÇÃO DO MSP-PCR DO GENE MMP14.....	57

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DAS ILHAS DE CPG EXISTENTES NO GENE <i>MMP14</i>	38
QUADRO 2 - CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>MMP14</i>	47
QUADRO 3 - INICIADORES DE MSP-PCR PLANEJADOS PELO PROGRAMA <i>METHPRIMER</i>	54
QUADRO 4 - INICIADORES DE MSP-PCR PLANEJADOS MANUALMENTE.....	55
QUADRO 5 - CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DA MSP-PCR DO GENE <i>MMP14</i>	56

LISTA DE SIGLAS

ACTB – Gene Actina-Beta Citoesquelital
ATCC – Centro de pesquisa privado - *American Type Culture Collection*
cDNA – DNA complementar
CGI – Ilha de CpG
CpG – Nucleotídeo C seguido de G
DAC - 5-Aza-2'-Deoxicitidina
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfatase desidrogenase
GLI – Oncogene associado à Glioma da família dedo de Zinco
GLI3 –Oncogene associado à Glioma 3
INCA – Instituto Nacional de Câncer
MEC – Matriz extra celular
MMP – Metaloproteases
MMP-2 – Metaloprotease 2
MMP-8 – Metaloprotease 8
MMP-13 – Metaloprotease 13
MMP-14 – Metaloprotease 14
MMP14 – Gene da Metaloprotease 14
MSP-PCR – Técnica de PCR sensível à metilação
MT-MMP – Metaloprotease ancorada à membrana
MT1-MMP – Metaloprotease ancorada a membrana 1
MT6-MMP - Metaloprotease ancorada a membrana 6
OMS – Organização Mundial da Saúde
PCR – Reação de Cadeia da Polimerase
RNA – Ácido Ribonucleico
RPMI – Meio de cultura celular Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR – Técnica de PCR com Transcriptase reversa
RT-qPCR – Técnica de PCR em tempo real com Transcriptase reversa
SATR-1 – Proteína regulatória Esteroidogenica Aguda 1
TIMP-2 – Inibidor Tecidual de Metaloprotease 2
TSA – Tricostatin

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 O CÂNCER	14
2.1.1 O câncer de mama	16
2.2 EPIGENÉTICA	18
2.2.1 Metilação do DNA	18
2.2.2 Modificações Pós-traducionais de Histonas	22
2.2.3 RNAs não codificadores (ncRNA)	23
2.3 AS METÁSTASES	23
2.4 PROTEÍNAS DE MATRIZ METALOPROTEASES (MMPs)	24
2.4.1 MMP-14 ou MT1-MMP	26
3 OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVOS GERAIS	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS ILHAS CpG E PLANEJAMENTO DOS INICIADORES	30
4.2 MATERIAIS BIOLÓGICOS	30
4.3 EXTRAÇÕES DE DNA E RNA	30
4.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE <i>MMP14</i>	31
4.4.1 RT-PCR	31
4.4.2 RT-qPCR ou PCR em tempo real	32
4.5 TRATAMENTO DAS LINHAGENS COM 5-AZA-2'-DEOXCITIDINA (DAC) E TRICOSTATIN (TSA)	33
4.6 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO	34

4.7 AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DAS ILHAS CpG DO GENE <i>MMP14</i>	35
4.8 IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS FATORES TRANSCRICIONAIS.....	35
4.9 TÉCNICA MSP-PCR (<i>METHYLATION SPECIFIC PCR</i>).....	36
5 RESULTADOS	37
5.1 ILHAS DE CpG DO GENE <i>MMP14</i> E O PLANEJAMENTO DOS INICIADORES.....	37
5.2 ANÁLISES DE EXPRESSÃO DO GENE <i>MMP14</i>	38
5.2.1 Aplicação da técnica de RT-PCR.....	38
5.2.2 Aplicação da técnica de RT-qPCR.....	39
5.3 TRATAMENTO DAS LINHAGENS COM 5-AZA-2'-DEOXCITIDINA (DAC) E TRICOSTATIN (TSA).....	41
5.3.1 RT-PCR após tratamento com DAC e TSA.	41
5.3.2 RT-qPCR após tratamento com DAC e TSA	42
5.4 AMPLIFICAÇÃO DAS ILHAS CpG DO GENE <i>MMP14</i>	43
5.4.1 Amplificação da primeira ilha de CpG do gene <i>MMP14</i>	44
5.4.2 Amplificação da segunda ilha de CpG do gene <i>MMP14</i>	45
5.5 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DAS ILHAS CpG DO GENE <i>MMP14</i>	48
5.6 ANÁLISE DE SÍTIOS PARA LIGAÇÃO DE FATORES TRANSCRICIONAIS.....	52
5.7 REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MSP-PCR	53
5.7.1 Iniciadores planejados com auxílio do programa <i>Methprimer</i>	54
5.7.2 Iniciadores planejados sem uso de <i>software</i>	55
5.7.3 Padronização da técnica de MSP-PCR	56
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÕES	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. Nos Estados Unidos é estimado para o ano de 2014, 232.670 novos casos de câncer de mama (SIGEL, 2014), e, no Brasil, esse número chega a 57.120 novos casos (INCA, 2014).

Sabe-se que no câncer de mama 90% dos casos de mortes não são causados pelos tumores primários, mas sim pela disseminação de tumores para locais distantes, gerando as metástases (WEIGELT *et al.*, 2005). Ligado a este dado, sabe-se também que aproximadamente 10 a 15% dos pacientes com esta neoplasia possuem uma forma agressiva da doença, capaz de desenvolver focos metastáticos em até três anos após a detecção do tumor primário. Alguns estudos estimam que este número possa chegar a 40% dos pacientes (LIU, 2006). As metástases tornam-se assim um grande problema para a paciente com câncer de mama, resultando-lhe em um prognóstico pior e bastante limitado, mesmo diante de avanços nas áreas de detecção precoce e terapias contra neoplasias (SUVA, 2009).

Os mecanismos genéticos, epigenéticos e bioquímicos que estão envolvidos com o complexo processo metastático ainda não são completamente entendidos (HANAHAN & WEINBERG, 2011), permitindo ainda altos índices de morbidade e mortalidade associados ao câncer de mama. Fica evidente a necessidade de mais estudos que propiciem um maior entendimento da biologia desta neoplasia, bem como dos processos metastáticos com ela envolvidos.

Durante a última década, tem se solidificado a noção de que a biologia do tumor não vai ser desvendada simplesmente estudando e enumerando os traços das células tumorais, mas sim, a partir do momento em que se entender também a contribuição molecular do ambiente tumoral para a tumorigênese (HANAHAN, & WEINBERG, 2011).

No câncer, as metaloproteases de matriz (MMPs) têm uma importante contribuição na formação e no modelamento do microambiente tumoral (KESSENBROCK, 2010). Isto se deve ao fato de que os membros da família

MMP (da qual já foram descritas 25 tipos diferentes em humanos) são capazes de degradar uma grande variedade de componentes da matriz extracelular (MEC) (POINCLoux, *et al.*, 2013). A degradação da MEC é um evento essencial para o desencadeamento da invasão tecidual e metástase nos cânceres (ARTACHO-CORDÓN, *et al.*, 2012).

A metaloprotease MMP-14 é um membro da família das MMPs com atividade diretamente relacionada à migração celular, invasão e metástase (REMACLE, *et al.*, 2013) e sua superexpressão tem sido associada a um pior prognóstico em pacientes com carcinoma mamário (TÊTU *et al.*, 2006; MYLONA *et al.*, 2007).

Sabe-se que a regulação do gene *MMP14*, através especificamente da região promotora, está relacionada com aspectos epigenéticos, estudados na linhagem de câncer de mama MCF7 (CHERNOV *et al.*, 2009).

Dentro desta realidade, pretende-se com este projeto estudar o perfil de metilação não só da região promotora do gene *MMP14*, mas também do corpo gênico (região intragênica), pois a metilação destas regiões também pode exercer um importante papel na regulação da transcrição gênica (DELPU *et al.*, 2013). Para tanto, diferentes linhagens tumorais de mama foram avaliadas e sequenciadas em regiões de DNA ricas em dinucleotídeos CpGs, buscando-se uma maior compreensão sobre os mecanismos moleculares envolvidos com o câncer de mama e seus processos metastáticos, envolvendo o gene *MMP14*. A compreensão sobre os padrões de metilação do DNA em células normais e doentes tem um grande interesse biomédico (SUZUKI e BIRD, 2008).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que apresentam um crescimento descontrolado de células anormais capazes de invadir tecidos e órgãos. Este crescimento celular desordenado tende a ser muito agressivo ao organismo quando detectado em estágio avançado, levando, comumente, o paciente a óbito. O câncer pode surgir em qualquer parte do corpo, podendo afetar diferentes órgãos com diferentes intensidades (INCA, 2014).

Os cânceres podem ser caracterizados por dinâmicas mudanças moleculares que acabam por gerar a manifestação de dez alterações celulares essenciais: autossuficiência em sinais de proliferação celular, insensibilidade aos sinais antiproliferativos, evasão a apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase, instabilidade genômica, promoção de inflamação, desregulação energética metabólica e evasão a destruição imunológica (HANAHAN e WEINBERG, 2011) (FIGURA 1). A grande maioria destas mudanças moleculares se desenvolve a partir de danos no genoma e no epigenoma que vão ocorrendo ao longo da vida, que podem ser gerados por fatores internos, como hormônios e mau funcionamento no metabolismo de nutrientes intracelulares, ou por fatores externos, como o tabaco, produtos químicos tóxicos e excessiva exposição à luz solar. Desta maneira, o risco de ser diagnosticado com um câncer aumenta com a idade, tendo em vista que as exposições aos fatores internos e externos vão gerando danos acumulativos no genoma dos indivíduos (American Cancer Society, 2011).

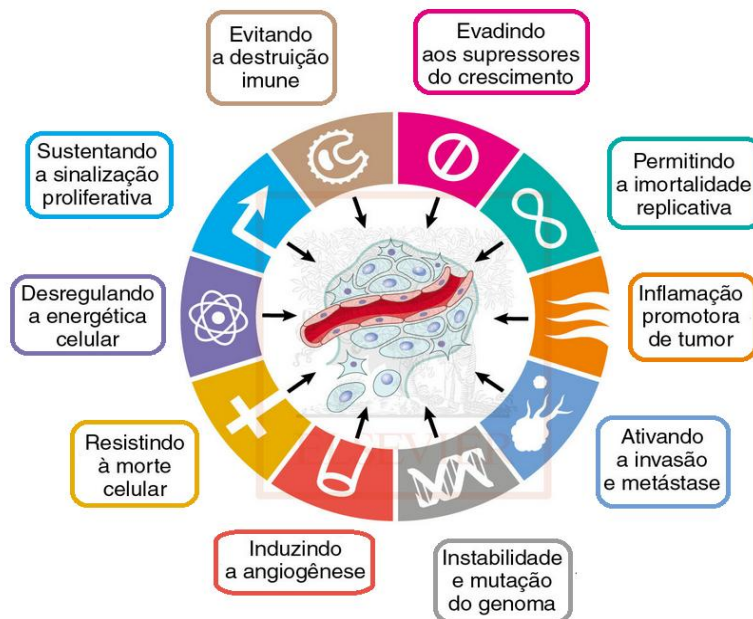


FIGURA 1 – ASPECTOS MOLECULARES QUE CARACTERIZAM OS CÂNCERES. As dez alterações celulares essenciais: autossuficiência em sinais de proliferação celular, insensibilidade aos sinais antiproliferativos, evasão a apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase, instabilidade genômica, promoção de inflamação, desregulação energética metabólica e evasão a destruição imunológica
 FONTE: adaptado de HANAHAN e WEINBERG, 2011

Segundo a Organização Mundial de Saúde, são esperados até 2030 15.5 milhões de novos casos de câncer, sendo que 11.5 milhões destes irão a óbito. Estas previsões representam um aumento de 45% nos números de casos quando comparados ao ano de 2007 (OMS, 2014). Nos Estados Unidos é estimado para o ano de 2014 1.665.540 casos de cânceres entre homens e mulheres, o que representa 4.500 novos casos de câncer por dia (SIGEL, 2014). Já no Brasil, as estimativas do ano de 2014, também válidas para o ano de 2015, publicadas pelo INCA, apontaram a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer, reforçando a magnitude do problema no país.

2.1.1 O câncer de mama

O tecido mamário é constituído pela porção glandular ou epitelial, drenada por um sistema de ductos responsáveis pelo transporte de leite, e pelos tecidos estromais e conectivos. Nas mulheres, a porção glandular apresenta de 15 a 20 lobos, dentro dos quais se encontram pequenos lóbulos, que contém de 10 a 100 alvéolos, cujas células secretoras são responsáveis pela produção do leite materno (GEDDES, 2007). Os lóbulos são interligados através de ductos que conduzem o leite ao mamilo (HONDERMARCK, 2003).

O câncer de mama é um tumor maligno derivado de alterações genéticas e epigenéticas nas células epiteliais constituintes dos ductos ou lóbulos mamários (POLIAK *et. al*, 2007). Possui alta capacidade de invadir tecidos adjacentes (invasão) e de gerar metástases. Mais de 80% dos cânceres de mama têm origem no epitélio ductal, enquanto que a minoria se origina do epitélio lobular (INCA, 2014). Esta neoplasia ocorre quase exclusivamente entre as mulheres, mas também pode acometer indivíduos do sexo masculino (American Cancer Society, 2011).

As causas precisas do câncer de mama são ainda desconhecidas. Entretanto, existem alguns fatores de risco que podem conferir maior susceptibilidade, como fatores genéticos, ambientais, comportamentais e reprodutivos (GALVÃO, *et al.*, 2011). A idade pode ser considerada também um dos mais importantes fatores de risco, pois as taxas de incidência de câncer de mama aumentam drasticamente em mulheres acima de 50 anos (INCA, 2014).

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos. Para o ano de 2013, foram estimados 232.340 novos casos de câncer de mama entre as mulheres americanas, sendo que destas, 39.620 (17%) poderiam ir a óbito em consequência a esta neoplasia (SIGEL, *et al*, 2013). Já para o ano de 2014, são esperados 232.670 novos casos e 40.000 óbitos (SIGEL, *et al.*, 2014).

As estatísticas brasileiras estimam que, no biênio de 2014/2015, aproximadamente 57.120 mulheres sejam acometidas por câncer de mama

(FIGURA 2) e destas, 13.708 (24%) venham a morrer da doença em até cinco anos após o diagnóstico. As taxas de mortalidade por este tipo de neoplasia, apesar de estarem reduzindo com o passar dos anos, continuam elevadas no país, possivelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados (INCA, 2014).

	Localização primária	casos	%
Mulheres 	Mama Feminina	57.120	20,8%
	Cólon e Reto	17.530	6,4%
	Colo do Útero	15.590	5,7%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
	Glândula Tireoide	8.050	2,9%
	Estômago	7.520	2,7%
	Corpo do Útero	5.900	2,2%
	Ovário	5.680	2,1%
	Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
	Leucemias	4.320	1,6%

FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2014 EM MULHERES, EXCETO PELE NÃO MELANOMA.

FONTE: adaptado de INCA (2014)

Em pacientes com câncer de mama, 90% dos casos de mortes são ocasionados por metástases em distantes locais do corpo, e não pelos tumores primários propriamente ditos (WEIGELT, 2005).

O câncer de mama, assim como outras neoplasias, pode ser considerado como um tecido complexo composto por células que acumularam traços moleculares que as tornaram capazes de se multiplicarem descontroladamente (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Já está bem estabelecido na literatura que os traços moleculares adquiridos por estas células são em consequência a alterações no genoma (ALBERTSON, *et al.*, 2003; KNUUTILA, *et al.*, 2000) e no epigenoma (BAYLIN e HERMAN, 2000; JONES, 2005).

2.2 EPIGENÉTICA

O termo epigenética foi introduzido por Conrad Waddington na década de 1940, para descrever as interações dos genes com seu ambiente e sua responsabilidade pela expressão do fenótipo (WADDINGTON, 1942). Mais tarde, o termo foi aperfeiçoado e pode ser empregado para descrever todas as mudanças reversíveis (FEINBERG *et al.*, 2004) e herdáveis no genoma que não alteram a sequência nucleotídica do DNA (MOMPARLER *et al.*, 2003; NOWSHEEN *et al.*, 2012).

As três principais alterações epigenéticas conhecidas são: a metilação do DNA, as modificações pós-traducionais das histonas e RNAs não codificadores (ncRNAs). Todas atuam de alguma forma na regulação e modificação da expressão gênica em eucariontes (NOWSHEEN *et al.*, 2012) por ocasionarem um aumento ou diminuição da acessibilidade de diversos fatores transcricionais ao material genético da célula (JONES, 2012).

Pelo fato de as modificações epigenéticas estarem intimamente relacionadas à expressão gênica, quando aberrantes, podem levar ao aparecimento de graves doenças, incluindo o câncer (FULLGRABE *et al.*, 2011). Porém, a plasticidade destes mecanismos permite elucidar uma nova categoria de tratamentos, onde a busca pela normalidade no perfil epigenético se torna possível (BRAIT & SIDRANSKY, 2011).

2.2.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é a modificação epigenética mais bem conhecida entre as citadas, ocorrendo em quase todos os organismos vivos, desde leveduras até vertebrados (KLOSE e BIRD, 2006). Entre os eucariontes, esta modificação ocorre quando um grupo metil é adicionado à posição 5' do carbono de uma citosina (BIRD, 1986), formando a estrutura 5-metilcitosina (5meC), conhecida como a quinta base nitrogenada do genoma (WIDSCHWENDTER, 2007). A metilação ocorre quase que exclusivamente em

citosinas seguidas de guaninas, par de nucleotídeos conhecido como dinucleotídeo CpG, unidos pela ligação fosfodiéster (p) (BIRD, 1986). O processo de metilação é realizado por enzimas denominadas DNA metiltransferases ou DNMTs (NAKAO, 2001; BIRD, 2002), que são capazes de retirar um grupamento metil da molécula S-adenosil-metionina (SAM) (molécula doadora universal de metil) e adicioná-lo à citosina (ATTWOOD, *et al.*, 2002) (FIGURA 3).

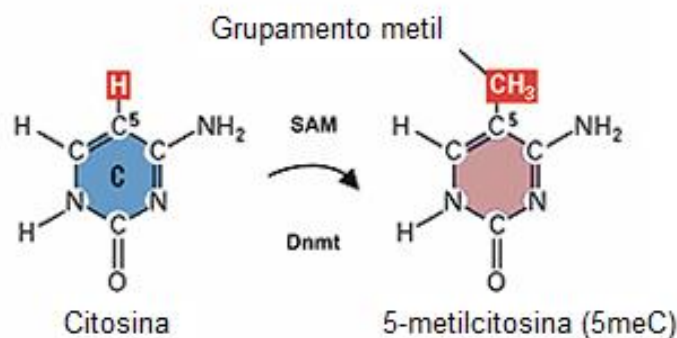


FIGURA 3 – INSERÇÃO DO GRUPAMENTO METIL EM CITOSINA ADJACENTE A GUANINA. A enzima Dnmt retira o grupamento metil da molécula SAM e o adiciona no carbono 5' da citosina, transformando-a em 5-metilcitosina.
 FONTE: adaptado de < http://www.hgu.mrc.ac.uk/people/r.meehan_researchb.html>, acessado em 29/10/2014.

Regiões do genoma que contêm uma alta concentração de dinucleotídeos CpG em relação à média do genoma são denominadas “Ilhas de CpG” (CGIs) (BIRD, 2002). Gardiner-Garden e Frommer (1987) definiram uma ilha de CpG como uma região de 200 pares de bases de DNA que contêm pelo menos 50% de dinucleotídeos CpG, e a razão entre CpGs observados/esperados maior ou igual a 0,6. A maioria das CGIs encontram-se não metiladas em todos os estágios do desenvolvimento de todos os tipos de tecidos, enquanto que os dinucleotídeos CpG presentes ao longo do genoma encontram-se globalmente metilados, auxiliando na formação da heterocromatina (SUZUKI e BIRD, 2008).

Análises computacionais mostraram que, no genoma humano, existem 27.537 ilhas de CpG (CGI) (RADEMACHER, *et al.*, 2014) distribuídas de maneira não randômica pelo genoma, localizando-se preferencialmente na

região promotora dos genes (NAKAO, 2001). Estima-se que 60% dos promotores dos genes que codificam proteínas estão associados a uma CGI (BIRD, 2002). Este fato indica um importante papel destas regiões na regulação da expressão gênica e, de modo geral, a metilação nas CGIs está associada ao silenciamento gênico, a partir da inibição da ligação dos fatores de transcrição ao DNA ou por mudança na estrutura da cromatina (BIRD, 2002).

Um perfil de metilação inadequado pode distorcer o padrão de expressão gênica de células, acarretando em diferentes consequências aos organismos em que ocorre, como o desencadeamento de cânceres (NIE, *et al.*, 2014). Os tumores humanos já são caracterizados por apresentarem uma perda de metilação global (principalmente em oncogenes) e adquirirem uma hipermetilação em promotores específicos (principalmente em genes supressores de tumor) (CHUANG e JONES, 2007). Os exatos mecanismos responsáveis por esta alteração no perfil epigenético de células tumorais ainda não é bem compreendido, mas há sugestões de que pequenas mudanças na metilação do DNA já sejam suficientes para desencadear carcinogênese (LOPEZ, *et al.*, 2009). A inibição da metilação do DNA com o composto análogo de citosinas 5-Aza-2'deoxicitidina (DAC, comercialmente conhecido por Dacogen®) tem sido aprovado no tratamento contra a síndrome mielodisplásica e, mais recentemente, contra tumores sólidos. Isto ocorre pela capacidade deste composto em ativar a expressão de genes silenciados por hipermetilações aberrantes, como supressores de tumor (NIE *et al.*, 2014).

Nos últimos cinco anos, pesquisas têm demonstrado que os padrões de metilação encontrados ao longo do gene (corpo do gene) também podem apresentar um importante papel na regulação da transcrição gênica (SHENKER e FLANAGA, 2012). Desta maneira, os dinâmicos processos de metilação e desmetilação de regiões inter e intragênicas são capazes de controlar a expressão gênica (JIANG *et al.*, 2013).

2.2.1.1 Metilação no corpo do gene

As ilhas de CpG não são exclusivamente localizadas em regiões promotoras, muitas delas podem ser encontradas nos corpos dos genes (regiões intragênicas) (DELPU *et al.*, 2013). Os seres humanos possuem distribuídas ao longo do genoma 27.537 ilhas de CpG, sendo que 62,71% destas (17.807) fazem também parte do corpo do gene (RADEMACHER *et al.*, 2014) (FIGURA 4).

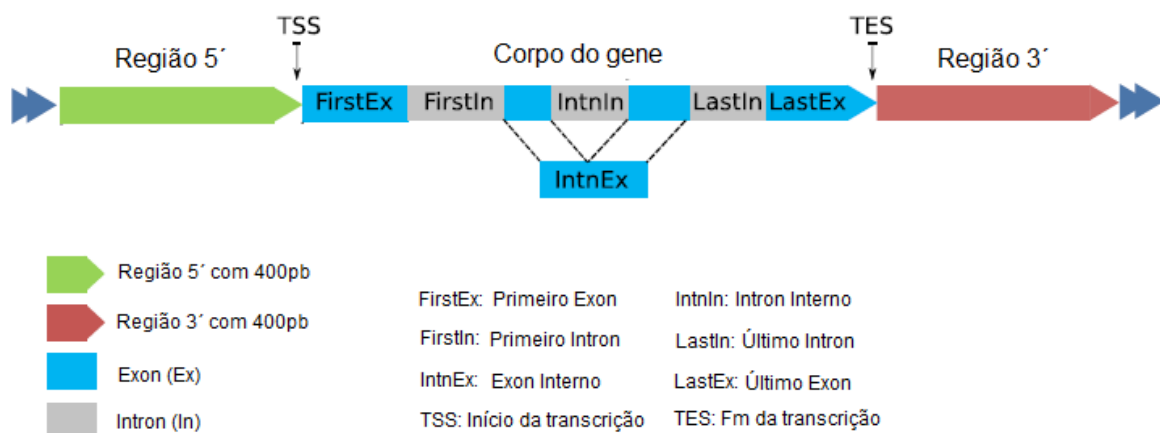


FIGURA 4 – SUB REGIÕES DE UM GENE. Na figura é possível localizar as regiões 3',5' e o corpo do gene, que também é passível de conter uma ilha de CpG.

FONTE: Adaptado de LOU *et al.* (2014)

O papel preciso da metilação ao longo do corpo do gene ainda não é bem compreendido (KULIS *et al.*, 2013), porém, nos últimos cinco anos, pesquisas têm demonstrado que, assim como a metilação em regiões promotoras, essas também devem exercer um importante papel na regulação da transcrição gênica (SHENKER & FLANAGAN, 2012). Entre os múltiplos processos de regulação em que podem estar envolvidas, encontram-se: controle de promotores intragênicos alternativos, controle da expressão de transcritos intragênicos, envolvimento com *splicing* alternativo e potencialização do processo de transcrição (atraindo mais fatores transcripcionais, por exemplo) (JONES, 2012; KULIS *et al.*, 2013).

Porém, até o dado momento, sabe-se bem pouco sobre a metilação de ilhas de CpG localizadas especificamente em íntrons. Das 27.537 localizadas ao longo do genoma humano, apenas algumas delas (7,66%) podem ser encontradas exclusivamente nestas regiões. Acredita-se que podem modificar a expressão de genes hospedeiros, controlar promotores alternativos ou simplesmente não apresentarem nenhuma função específica conhecida (RADEMACHER *et al.*, 2014). Entretanto, um estudo recente (RADEMACHER *et al.*, 2014) demonstrou que o genoma humano não contém apenas mais ilhas de CpG do que o genoma de rato, mas também possui uma proporção de ilhas localizadas em íntrons também maior (7,7% em humanos contra 3,5% em ratos). Estes resultados sugerem, de acordo com os autores, que ao longo da evolução humana foram surgindo novas ilhas de CpG e que, provavelmente, conferiram um acúmulo de novas funções a espécie humana.

Novas descobertas têm demonstrado que mudanças na metilação intragênica também apresentam um importante papel biológico, podendo estar inclusive associadas ao aparecimento de doenças graves como o câncer. Porém, o que se sabe hoje é provavelmente uma pequena parte de um complexo mecanismo que necessita de estudos mais aprofundados (KULIS *et al.*, 2013).

2.2.2 Modificações Pós-traducionais de Histonas

A unidade funcional da cromatina de eucariotos é o nucleossomo, que se constitui de aproximadamente 147 nucleotídeos arranjados em volta de um octâmero de proteínas histonas (MCGHEE & FELSENFELD, 1980). Os quatro diferentes tipos de histonas existentes: H2A, H2B, H3 e H4, possuem caudas N terminais que se estendem para fora dos nucleossomos e podem sofrer diversos tipos de modificações pós-traducionais, que incluem acetilação, metilação, fosforilação, biotinição e ubiquitilação entre outras (FEINBERG *et al.*, 2006). Estas modificações são coordenadas e catalisadas por diferentes enzimas, como as HMTs, desmetilases (HDMs), acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs).

Basicamente, estas modificações pós-traducionais de histonas afetam a estrutura da cromatina e dependendo do tipo, função ou localização (em qual aminoácido específico da calda da histona) da alteração geram um resultado diferente. Por exemplo, a metilação de lisinas (K) pode causar tanto a ativação como o silenciamento de genes, a partir de uma abertura ou condensação da cromatina, respectivamente (MICELI *et al.*, 2014). As alterações mais bem estudadas até o momento envolvem a acetilação e a metilação de resíduos específicos de lisina nas histonas H3 e H4 (BERGER, 2007).

2.2.3 RNAs não codificadores (ncRNA)

Os ncRNA são todas as moléculas de RNA que não são traduzidas em proteínas, mas mostram-se importantes na regulação da transcrição em mamíferos e outros organismos complexos. Estes podem ser divididos em pequenos ncRNAs ou longos ncRNAs (lncRNAs) (BARTEL, 2004). Os pequenos ncRNAs podem ser subdivididos em: RNAs ribossomais (rRNA), RNAs transportadores (tRNA), RNAs interação-piwi (piRNA), RNAs nucleolares (snoRNA), micro-RNAs (miRNA) e outros ainda não bem caracterizados, dependendo basicamente do número de pares de bases que os compõe (MATTICK & MAKUNIN, 2006). Já os longos ncRNAs formam uma classe heterogênea de transcritos de mRNAs que não codificam nenhuma proteína (LI *et al.*, 2013).

2.3 AS METÁSTASES

Durante o desenvolvimento do câncer, a massa tumoral primária gera células metastáticas que se movem, invadem tecidos adjacentes e trafegam pela corrente sanguínea ou linfática. Estas se estabelecem em distantes lugares, onde podem obter sucesso e fundar novas massas tumorais, processo esse conhecido como metástase (HUNTER *et al.*, 2008).

Para adquirir o potencial metastático, as células precisam acumular certas características que as permitam escapar do tumor primário e estabelecer novos focos tumorais (DERYUGINA, *et. al.*, 2006). Entre as principais características iniciais encontra-se a perda ou a diminuição da expressão de genes que promovem a aderência entre células adjacentes ou entre células e a matriz extracelular (HANAHAN, *et. al.*, 2011). A distribuição de células tumorais pelo organismo não é um processo aleatório, onde a quimioatração entre moléculas expressas pelo tumor e por moléculas expressas em diferentes locais do corpo, se torna um evento importante no desencadeamento das metástases. No câncer de mama os órgãos mais atingidos por células tumorais metastáticas são os ossos, pulmões, fígado, cérebro e linfonodos (SUN, *et al.*, 2010).

A perda de adesão celular caracteriza o evento de transição epitelial-mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*), processo biológico que permite que uma célula epitelial polarizada, que normalmente interage com a membrana basal por meio de sua superfície basal, sofra modificações bioquímicas, moleculares e morfológicas, as quais resultam na aquisição de um fenótipo de célula mesenquimal, cuja capacidade de migração, invasão e resistência a apoptose aumenta (KALLURI & WEINBERG, 2009). Assim, a EMT está intimamente relacionada com a promoção de metástase, bem documentada em diferentes tipos de carcinomas, incluindo o mamário (TAM & WEINBERG, 2013).

Sabe-se que as mudanças bioquímicas associadas à EMT são reguladas por alterações epigenéticas (TAM & WEINBERG, 2013), capazes de aumentar a expressão e a atividade das MMPs e, como consequência, aumentar a capacidade de invasão das células tumorais (OKUBO *et al.*, 2001).

2.4 PROTEÍNAS DE MATRIZ METALOPROTEASES (MMPs)

Um processo essencial na formação de metástases é a degradação da matriz extracelular (MEC), que permite às células tumorais invadirem o tecido local e extravasar para os vasos sanguíneos (ARTACHO-CORDÓN, *et al.*,

2012). Este processo é principalmente influenciado pela atividade de proteínas de matriz metaloproteases (MMPs), proteinases zinco-dependentes com capacidade de degradar uma grande variedade de componentes da MEC, incluindo colágeno, elastinas, gelatinas, glicoproteínas de matriz e proteoglicanos (POINCLOUX, *et al.*, 2013). Dada a ampla variedade de proteínas que as MMPs são capazes de modificar, tais enzimas influenciam diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo aspectos do desenvolvimento embrionário, morfogênese tecidual, processo de reparo, doenças inflamatórias e câncer (STERNLICHT, 2001). Já existem descritos 25 tipos diferentes de MMPs em humanos, classificadas com base na afinidade por determinado substrato. Quase todas elas são secretadas para o meio extracelular, com exceção de seis metaloproteases ancoradas a membrana (MT-MMP), da MT1-MMP a MT6-MMP (POINCLOUX, *et al.*, 2013).

Os membros da família das metaloproteases apresentam domínios conservados em sua estrutura, conhecidos como peptídeo de sinal, que direciona o produto para a secreção; domínio pró-peptídeo, essencial para a manutenção da latência enzimática; e domínio catalítico dependente de zinco (Zn^{2+}). Algumas MMPs também contêm o domínio hemopexina (HPX), que contribui para tanto para o reconhecimento e degradação de substratos como para interações proteína/proteína, o domínio transmembrana e o domínio citoplasmático, que auxiliam no ancoramento à membrana plasmática (FIGURA 5) (LI, *et al.*, 2008).

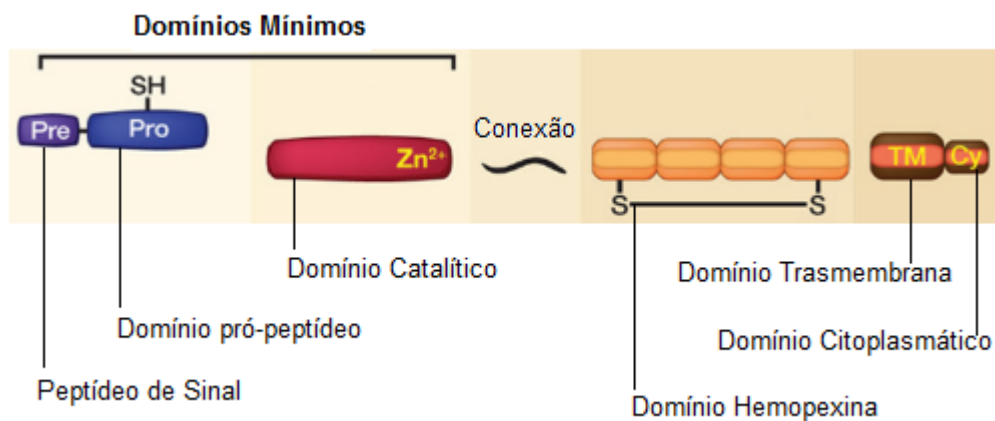


FIGURA 5 – ESTRUTURA DOS DOMÍNIOS DAS METALOPROTEASES. Domínios básicos dos membros a família de MMPs (Peptídeo sinal, Domínio pró-peptídeo e Domínio catalítico) e os restritos à algumas MMPs específicas (Domínio hemopexina, Domínio transmembrana e Domínio Citoplasmático).
 FONTE: Adaptado de KESSENBROCK *et al.* (2010)

A metaloproteases formam assim uma importante família de endopeptidases, conhecidas por estarem também envolvidas na progressão do câncer através do aumento da motilidade celular, invasão e metástase linfática (LEE *et al.*, 2004). As MMPs são superexpressas em quase todos os tipos de câncer e esta característica é muitas vezes associada a um pior prognóstico para os pacientes (CURRAN, *et al.*, 2004). Este fato se deve à produção de MMPs tanto pelo epitélio maligno quanto pelo estroma adjacente, que facilitam a degradação da matriz extracelular e consequente metástase (DECLERCK *et al.*, 2004).

2.4.1 MMP-14 ou MT1-MMP

A metaloprotease MMP-14 é um membro da família das MMPs que tem como característica pertencer ao grupo das MT-MMPs, determinadas como proteínas ancoradas a membrana. Por ter sido a primeira enzima identificada pertencente a este grupo, também pode ser denominada como MT1-MMP (CAO, *et al.*, 1995). A proteína MMP-14 é expressa na superfície de múltiplos tipos celulares (PAHWA, *et al.*, 2014) e mostra-se importante na locomoção celular e degradação da matriz extracelular a partir de sua capacidade

proteolítica e também a partir da ativação de outras MMPs solúveis, tais como a MMP-2, MMP-8 e MMP-13 (BARBOLINA, *et al.*, 2008). Muitos componentes da MEC podem ser substrato da proteína MMP-14, como: colágeno I, II e III, fibronectina, vitronectina, fibrina e proteoglicanos (SEIKI, 2003). Esta grande diversidade de substratos degradados por MMP-14 permite regulações de múltiplas funções celulares. Sua estrutura e domínios estão representados na figura 6 (FIGURA 6).

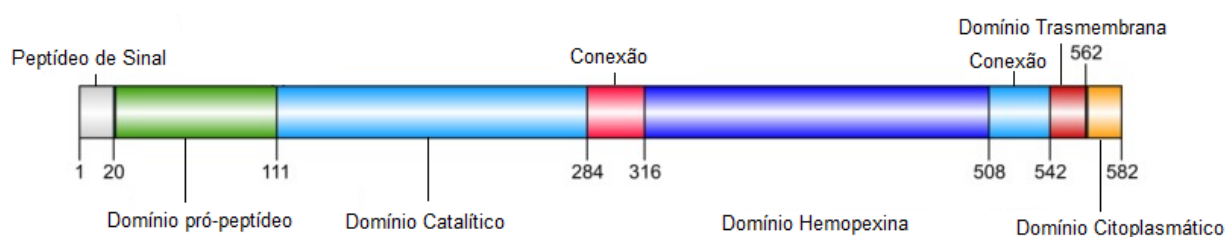


FIGURA 6 – ESTRUTURA DOS DOMÍNIOS DA MMP-14. Estrutura composta pelos domínios peptídeo de sinal, domínio pró-peptídeo, domínio catalítico, conexão, domínio hemopexina, conexão, domínio transmembrana e domínio citoplasmático.

FONTE: Adaptado de PAHWA, *et al.* (2014)

A atividade proteolítica desta enzima de superfície está diretamente relacionada à migração celular, invasão e metástase (REMACLE, *et al.*, 2013) e, portanto, quando desregulada, tem sido relacionada com um pior prognóstico em pacientes com carcinoma mamário (TÊTU *et al.*, 2006; MYLONA *et al.*, 2007).

A atividade da MMP-14 nos tecidos é regulada, naturalmente, por um inibidor tecidual de metaloprotease 2 (TIMP-2) (HU, *et al.*, 2007). Esta regulação ocorre a partir do envolvimento de três moléculas distintas, a MMP-14, TIMP-2 e a MMP-2, e, portanto, é chamada de eixo de ativação. A TIMP-2 inibe a forma ativa de MMP-2, ao mesmo tempo que a ativa na presença de MMP-14 (FIGURA 7) (BERNARDO, *et al.*, 2003). Um desequilíbrio entre produção de MMP-14 e TIMP-2 pode permitir uma destruição tecidual (LIU, *et al.*, 2003).

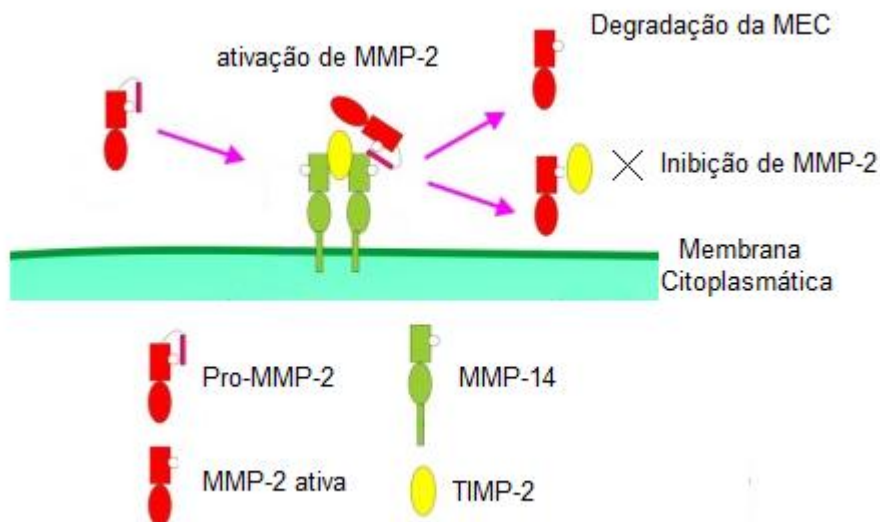


FIGURA 7 – EIXO DE ATIVAÇÃO DA MMP14. Na figura estão representadas as moléculas pro-MMP-2, MMP-2 ativa, MMP-14 e TIMP-2. Quando ocorre a união de duas moléculas de MMP-14 com a TIMP-2, fica possível a aproximação da pro-MMP-2 e sua subsequente ativação. A MMP-2 ativa liberada é capaz de degradar a MEC. A molécula TIMP-2, em altas concentrações é capaz de inibir a atividade da MMP-2. Logo, dependendo da concentração da molécula TIMP-2, a MMP-2 liberada poderá degradar a MEC (baixas concentrações de TIMP-2) ou ser inibida (altas concentrações de TIMP-2).
 FONTE: Adaptado de PAHWA, *et al.* (2014)

A MMP-14 é regulada a nível transcricional por uma variedade de fatores de transcrição, citocinas e quimiocinas, como por exemplo o $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (CLARK *et al.*, 2008). Além disso, observou-se que a regulação do gene *MMP14* ocorre também por mecanismos epigenéticos. Em um estudo sobre metaloprotease, foi visto que a metilação deste gene, na linhagem tumoral de mama MCF-7, poderia estar relacionada com a diminuição de sua expressão (CHERNOV *et al.*, 2009). No estudo de Chernov, em 2009, foi avaliada uma ilha CpG presente na região promotora do gene *MMP14*, porém é possível identificar a presença de mais uma ilha CpG no corpo do gene. Pesquisas recentes têm demonstrado que o padrão de metilação, não só na região promotora, mas também ao longo do gene, pode apresentar um importante papel na regulação da transcrição (SHENKER e FLANAGA, 2012), evidenciando a necessidade de se conhecer o perfil de metilação de todo o gene.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Estudar o perfil de metilação do promotor e do corpo do gene *MMP14* em linhagens tumorais de mama

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar e sequenciar as ilhas de CpG presentes no promotor e no corpo do gene *MMP14* em diferentes linhagens tumorais de mama, tratadas ou não com 5-aza-2'-deoxicitidina e Tricostatina A.
- Planejar iniciadores específicos para a amplificação de regiões diferencialmente metiladas para estudo de metilação em tumores primários de mama (MSP-PCR).
- Padronizar a reação de MSP-PCR utilizando as linhagens tumorais de mama.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS ILHAS CpG E PLANEJAMENTO DOS INICIADORES

As regiões do gene *MMP14* com alta densidade de dinucleotídeos CpG foram identificadas com auxílio do *software online* BLAT (disponível em <<https://genome.ucsc.edu/FAQ/FAQblat.html>>). Após a identificação destas regiões, determinadas como ilhas de CpG, foi possível submetê-las ao programa *Methprimer* (disponível em <<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>>), capaz de facilitar a identificação de sítios adequados para o planejamento de iniciadores. Também foram utilizados neste projeto os iniciadores sugeridos por Chernov e colaboradores (2009).

4.2 MATERIAIS BIOLÓGICOS

As diferentes linhagens celulares utilizadas neste projeto foram cedidas pelo Instituto Ludwig – LMBG, e são derivadas de tumores e células normais de mama: HB4aC3.6, HB4aC5.2 (STAMPS *et al.*, 1994), MCF-7 e PMC42. Os cultivos destas linhagens foram realizados em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (Gibco) 10%, 0,2 mM de glutamina e gamicina 40 µg/mL, seguindo o protocolo sugerido pela ATCC (*American Type Culture Collection*).

4.3 EXTRAÇÕES DE DNA E RNA

Para realização das extrações de DNA e RNA, foi utilizado o kit All prep DNA/RNA (Qiagen), conforme especificações do fabricante, com o qual é possível isolar as duas biomoléculas de uma mesma amostra. O RNA total

purificado foi então submetido à síntese de cDNA, utilizando-se o *kit High Capacity* da *Applied Biosystem*, conforme especificações do fabricante. Para tal, foram utilizados aproximadamente 1000 ng de RNA total, 1 µl de 20X RT enzima mix e 10 µl de 2X tampão *buffer*, em um volume total de 20 µl de reação.

4.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE *MMP14*

O padrão de expressão do gene *MMP14* pelas linhagens tumorais de mama foi primeiramente avaliado por RT-PCR. Em seguida, as mesmas amostras foram submetidas à técnica de RT-qPCR, para uma quantificação mais precisa do gene *MMP14*.

4.4.1 RT-PCR

As reações de RT-PCR utilizaram 1 µl de cDNA de cada linhagem, tampão 1X de PCR (*Invitrogen*), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 1 U *Taq Platinum I* (*Invitrogen*) e 8 pmoles de iniciadores específicos, em um volume de 20 µl. Os iniciadores específicos utilizados para a amplificação do gene *MMP14* foram: universal 5'CATCAAAGTCTGGGAAG3' e reverso 5'GAAGAAGAAGACTGCAAG3'. As condições de amplificação foram: desnaturação do cDNA e ativação da *Taq polimerase* a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos; e 1 ciclo de 72°C por 5 minutos para extensão do DNA. Como controle de síntese de cDNA foi utilizado o gene de expressão constitutiva *GAPDH*, com os iniciadores universal 5'CTGCACCACCAACTGCTTA3' e reverso 5'CATGACGGCAGGTCAGGTC3', com as mesmas condições descritas acima para a reação de RT-PCR.

4.4.2 RT-qPCR ou PCR em tempo real

Os cDNAs obtidos neste trabalho também foram submetidos a técnica de RT-qPCR, que propiciou uma análise quantitativa da expressão de cada linhagem tumoral de mama estudada.

Para o desenvolvimento desta técnica foram utilizados os iniciadores referentes: ao gene normalizador *ACTB*, universal 5'GATGCAGAAGGAGATCACTGC3' e reverso 5'AGTACTTGCGCTCAGGAGGA3'; bem como ao gene alvo *MMP14*, universal 5'GCAGAAGTTTTACGGCTTGCA3' e reverso 5'TCGAACATTGGCCTTGATC TC3'.

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

Os resultados obtidos foram submetidos ao método estatístico $\Delta\Delta C_t$, um dos métodos mais utilizados para determinar as diferenças nas concentrações de amostras distintas (BUSTIN, 2009), no caso deste trabalho, as diferenças na expressão do gene *MMP14* em diferentes linhagens tumorais de mama. Os valores de $\Delta\Delta C_t$ foram posteriormente aplicados na fórmula de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, que possibilitou a construção de gráficos que facilitaram a visualização dos resultados obtidos (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Os gráficos obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o test *t* de *Student*, e apenas os dados com $p < 0,05$ foram considerados.

4.5 TRATAMENTO DAS LINHAGENS COM 5-AZA-2'-DEOXCITIDINA (DAC) E TRICOSTATIN (TSA)

As linhagens tumorais de mama que apresentaram um resultado negativo na reação de RT-PCR ou de RT-qPCR, ou seja, as linhagens que não expressaram o gene *MMP14*, foram submetidas ao tratamento com 5-aza-2'-deoxicitidina (DAC) e Tricostatina A (TSA). Estes são agentes capazes de inibir DNA-metiltransferases e histona deacetilases respectivamente e, conseqüentemente, avaliar a metilação do DNA bem como o envolvimento de HDACs.

Para este ensaio de tratamento, foram utilizadas quatro garrafas de cultivo celular de 25 cm² para cada linhagem tumoral. Uma delas foi utilizada como controle, contendo apenas a linhagem com meio RPMI, e as demais culturas foram tratadas com DAC, com TSA e com TSA + DAC respectivamente. Todas as quatro garrafas foram submetidas ao ensaio no mesmo período, sendo seus meios de cultivo trocados simultaneamente durante os dias de tratamento. Para cada garrafa foram adicionados 5×10^5 de células e incubadas por aproximadamente 16h em estufa de CO₂ 5%, 37°C. Após este período, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e iniciados seus respectivos tratamentos. No ensaio controle, apenas o meio foi trocado. O tratamento com DAC 1 µM (PRYZBYLKOWSKI, OBAJIMI *et al.*, 2007) foi realizado diariamente até 96 h. O tratamento com TSA 40 µM foi feito por 16h. O tratamento com DAC e TSA teve início com tratamento de DAC por 80 h, seguido da adição 40 µM de TSA e incubação por mais 16 h.

Ao término de cada ensaio, os cultivos foram submetidos à extração de DNA e RNA simultâneos utilizando o *AllPrep Kit* (Qiagen). A partir do RNA extraído foi sintetizado novamente cDNA, com consecutiva reação de RT-PCR, para verificação da expressão do gene *MMP14* após a desmetilação e desacetilação do DNA. Como controle da reação de RT-PCR de reexpressão após os tratamentos com DAC e TSA, foi utilizado o gene constitutivo GAPDH. Da mesma maneira, foram novamente realizadas reações de RT-qPCR, para avaliar e quantificar a expressão do gene *MMP14* após a desmetilação e desacetilação do DNA (esta reação seguiu o mesmo protocolo descrito no item

4.4.2). Realizando novamente estas reações de RT-PCR e RT-qPCR foi possível comparar a expressão do gene estudado antes e após o tratamento com DAC, TSA e DAC + TSA. O DNA, extraído destas linhagens, tratadas ou não tratadas (que expressam o gene), foi submetido a um segundo tratamento, com bissulfito de sódio, descrito a seguir.

4.6 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO

As amostras de DNA que foram extraídas das linhagens tumorais de mama (tanto das linhagens não tratadas como as tratadas com DAC e TSA) foram quantificadas no espectrofotômetro *Nanodrop 2000*. Aproximadamente 1 µg de DNA foi utilizado para o tratamento com bissulfito de sódio, utilizando os reagentes do kit *EpiTec* (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante.

O tratamento com bissulfito de sódio é usado para analisar o perfil de metilação de amostras de DNA. Este composto é capaz de transformar citosinas desmetiladas em uracilas, porém, não tem o mesmo efeito em citosinas metiladas (5-metilcitosina). Desta forma, quando o DNA tratado é amplificado através de uma reação de PCR, a uracila é amplificada como timina e as citosinas metiladas são amplificadas como citosina. A partir de reações de sequenciamento é possível ler a sequência do DNA tratado pelo bissulfito e identificar o padrão de metilação da região de DNA estudada.

Para avaliar a eficácia do tratamento do DNA com bissulfito de sódio, foram realizadas reações de PCR para amplificação da sequência satélite SATR-1, utilizando-se os iniciadores e as condições já descritas na literatura (Costa *et al.*, 2006). Esta região do DNA é hipometilada, ou seja, é rica em timinas após o tratamento com bissulfito de sódio. Os iniciadores utilizados para amplificação de SATR-1, planejados para flanquear uma região do DNA rica em timinas, irão se anelar adequadamente mediante a um bom tratamento com bissulfito de sódio.

4.7 AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DAS ILHAS CpG DO GENE *MMP14*

A partir dos iniciadores selecionados foi possível a padronização das reações de PCR para a amplificação das ilhas de CpG do gene *MMP14* (utilizando-se os DNAs tratados com bissulfito de sódio, tanto das linhagens tumorais de mama sem tratamento, como das tratadas com DAC e TSA). Estas reações foram analisadas em géis de poliacrilamida (8%) corados com nitrato de prata.

Após a padronização da reação de PCR, as ilhas de CpG do gene *MMP14* de todas as linhagens foram amplificadas e os produtos foram purificados a partir de eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando-se o protocolo do *QUIAEX II Gel Extration Kit* (Qiagen). Os produtos purificados foram em seguida clonados no vetor *pGEMT@easy* (Promega), e eletroporados em estirpe de *Escherichia coli* DH10B. Os clones recombinantes foram selecionados por α -complementação e submetidos à reação de PCR de colônia para a confirmação da presença do inserto. Pelo menos dez clones que se mostraram positivos na PCR de colônia foram submetidos à extração de DNA plasmidial, utilizando o *kit QiaPrep* (Qiagen). Em torno de 300 a 500 ng de cada preparação foram sequenciadas utilizando-se *kit Big Dye terminator* e o sequenciador XL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Após o resultado do sequenciamento, foi possível identificar o perfil de metilação do gene *MMP14* (antes e após o tratamento com DAC e TSA), bem como relacioná-lo com o padrão de expressão do gene.

4.8 IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS FATORES TRANSCRICIONAIS

Após o sequenciamento das amostras tratadas com os compostos DAC, TSA e DAC+TSA, foram avaliadas as regiões específicas (CpGs específicos) que apresentaram uma grande taxa de desmetilação. Estas regiões podem ser possíveis sítios de ligação de fatores transcrpcionais que auxiliam na expressão

do gene *MMP14*. As análises foram realizadas com o uso da ferramenta *MatInspector*, implementada no software *Genomatix*, capaz de utilizar uma grande biblioteca matriz de fatores de transcrição que podem corresponder à uma sequência de DNA escolhida (CARTHARIUS *et al.*, 2005).

4.9 TÉCNICA MSP-PCR (*METHYLATION SPECIFIC PCR*)

Após análise dos resultados de sequenciamento das linhagens tumorais de mama, foi possível identificar os dinucleotídeos CpG importantes no processo de regulação do gene, ou seja, os dinucleotídeos que se apresentaram diferencialmente metilados nas linhagens que expressaram e não expressaram o gene *MMP14*. A técnica de MSP-PCR (HERMAN *et al.*, 1996) baseia-se no planejamento de iniciadores específicos para estas regiões do DNA, em condições metiladas e não metiladas, permitindo a determinação do padrão de metilação de determinada amostra a partir de uma única reação de PCR. Os iniciadores foram planejados em dois grupos diferentes: com base nas análises manuais dos sequenciamentos obtidos das linhagens tumorais de mama; e com auxílio do *Methprimer* (disponível em <<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>>).

Estas reações de MSP-PCR foram padronizadas nos DNAs das linhagens tumorais utilizadas neste estudo, para, posteriormente, serem aplicadas nos DNAs extraídos de tumores primários de mama.

5 RESULTADOS

5.1 ILHAS DE CpG DO GENE *MMP14* E O PLANEJAMENTO DOS INICIADORES

A partir de análises realizadas nos softwares BLAT e *Methprimer*, disponíveis *online*, foi possível identificar duas ilhas CpG existentes no gene *MMP14* (FIGURA 8), que apresentam juntas um total de quase 1.000 pares de base e 100 dinucleotídeos CpG.

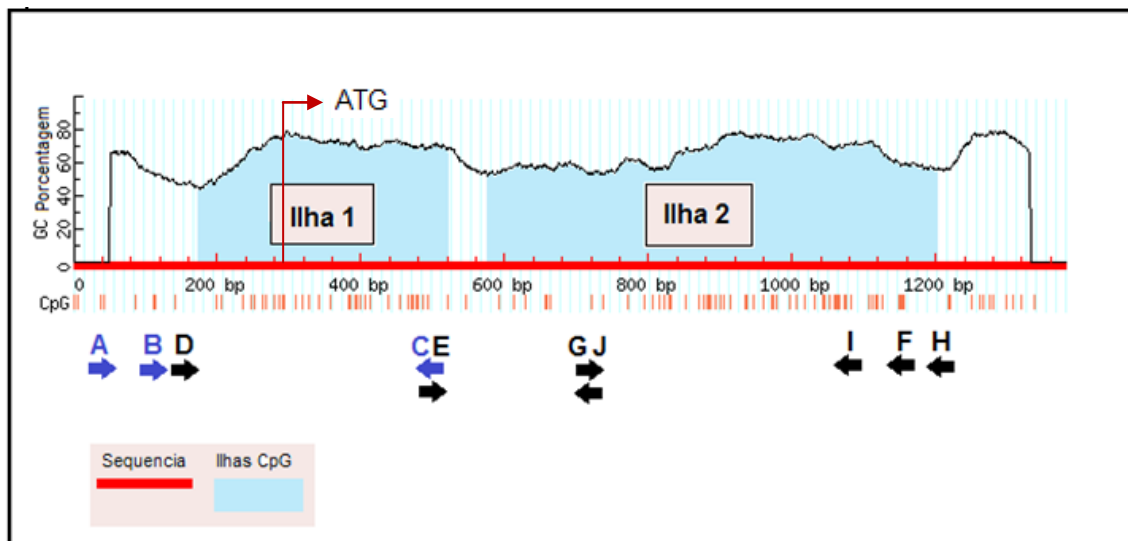


FIGURA 8 - LOCALIZAÇÃO DAS ILHAS DE CpG. Gráfico gerado pelo software online *Methprimer*, indicando a localização exata das ilhas de CpG. As setas logo abaixo do gráfico indicam os iniciadores utilizados para amplificação das regiões específicas do gene. As setas em azul representam os iniciadores sugeridos por Chernov e colaboradores (2009) Em preto estão representados os iniciadores planejados neste trabalho (Ver Quadro 1). ATG: início da tradução.

FONTE: O autor (2014)

A primeira ilha de CpG identificada possui um tamanho aproximado de 270 pb e contém parte da região promotora e parte do primeiro éxon (-161 a +186). Esta se refere à região já analisada por Chernov e colaboradores (2009). Já a segunda ilha possui um tamanho de 690 pb e localiza-se inteiramente no primeiro íntron do gene (+242 a +869).

A seguir foram planejados iniciadores específicos para a amplificação destas regiões (QUADRO 1).

Iniciador	Sequência 5´- 3´
A	GATTAAGTAGAAGAAAGATTAATAAAT
B	GGAAAAGAGGAGAGAGTAAATAGGTAT
C	TAAACAAAAAAAAACAAAAACAAC
D	TGAGGAATAATTTTTTTAATTTTAAGT
E	TGTTTTTGTTTTTTGTTTA
F	ATTAACAACAAAAAAAAACCTAAAAAC
G	TTTTGGAAGAATTTTATAATTGGG
H	CCAACTCCCTACAATTAACACAA
I	CACAAAAAAAAACTTTATATATAC
J	CCCCAATTATAAAATTCTTCCAAA

QUADRO 1- INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DAS ILHAS DE CpG EXISTENTES NO GENE *MMP14*. Iniciadores A, B e C sugeridos por Chernov e colaboradores (2009) e iniciadores D, E, F, G, H, I e J desenhados com auxílio do software *Methprimer*.
 FONTE: O autor (2014)

Os iniciadores denominados como A, B e C são capazes de amplificar parte da primeira ilha de CpG (FIGURA 8) e foram sugeridos por Chernov e colaboradores (2009). Os iniciadores denominados como D, E, F, G, H, I e J foram desenhados com auxílio do programa *Methprimer* e, combinados de diferentes maneiras, são capazes de amplificar ambas as ilhas de CpG existentes nesta região do gene (FIGURA 8).

5.2 ANÁLISES DE EXPRESSÃO DO GENE *MMP14*

5.2.1 Aplicação da técnica de RT-PCR

A expressão do gene *MMP14* foi investigada nas linhagens HB4aC3.6, HB4aC5.2, MCF-7 e PMC42 por RT-PCR. Pôde-se observar que o controle da reação, que garante a integridade e a qualidade do cDNA utilizado, o gene constitutivo GAPDH, foi amplificado (FIGURA 9).

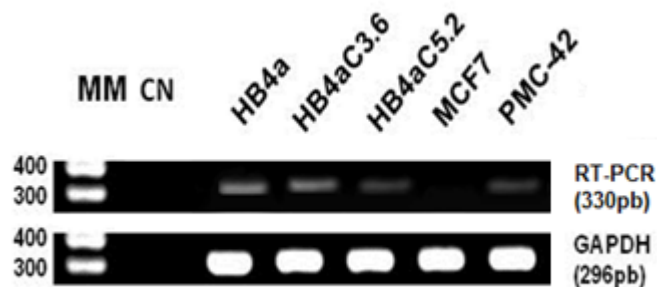


FIGURA 9. RT-PCR DAS DIFERENTES LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA. Gel de agarose que mostra a expressão de *MMP14* pelas diferentes linhagens tumorais de mama. MM, marcador de massa molecular, CN controle negativo no qual não foi adicionado cDNA.

Apenas a linhagem MCF7 não apresentou amplificação. Este resultado nos permitiu concluir que somente a linhagem MCF7 seria candidata ao estudo com o agente desmetilante e inibidor de histonas em cultura.

5.2.2 Aplicação da técnica de RT-qPCR

A seguir foi feita a quantificação do transcrito de *MMP14* utilizando RT-qPCR para confirmar os resultados anteriores.

O fator de diluição de cada par de iniciadores utilizados foi testado, apresentando o melhor resultado (ou seja, o menor Ct, que representa o ciclo em que a amostra apresenta amplificação detectável) a diluição de 900 nM para ambos os pares de iniciadores, *ACTB* e *MMP14*. O endógeno *ACTB* foi escolhido a partir de experimentos já realizados no laboratório, sendo que outros endógenos como *HPRT*, *HMBS* e *GAPDH* se mostraram menos eficientes do que o *ACTB*. Já a diluição das amostras de cDNA mais adequada para os ensaios realizados foi a de 1:10. Esta diluição passou a ser utilizada nos ensaios restantes. O resultado da eficiência dos iniciadores foi de 99,9%

para o gene endógeno *ACTB* e de 99,4% para o gene *MMP14*. O endógeno foi utilizado durante a reação de RT-qPCR, juntamente com o gene alvo *MMP14*.

A quantificação da expressão de *MMP14* pelas linhagens tumorais de mama estudadas está representada na Figura 10 (FIGURA 10). Estes gráficos foram gerados a partir da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que permite comparar expressões e indicar quantas vezes uma dada amostra está sendo mais ou menos expressa do que outra. Para que estas comparações sejam possíveis, o gene considerado controle ou basal apresenta um $2^{-\Delta\Delta Ct}$ igual a 1, que é considerado o número neutro de uma multiplicação (BUSTIN, 2009). Com os resultados prévios de RT-PCR e com os obtidos pela reação de RT-qPCR, foi possível determinar que a linhagem MCF7 não apresentava expressão do gene *MMP14* e, por tanto, poderia ser usada como base nos cálculos de comparação de expressão necessários. Logo, a linhagem MCF7 foi escolhida como basal e cada uma das outras linhagens presentes neste estudo foram comparadas a ela e utilizando o seu valor basal no gráfico igual a 1.

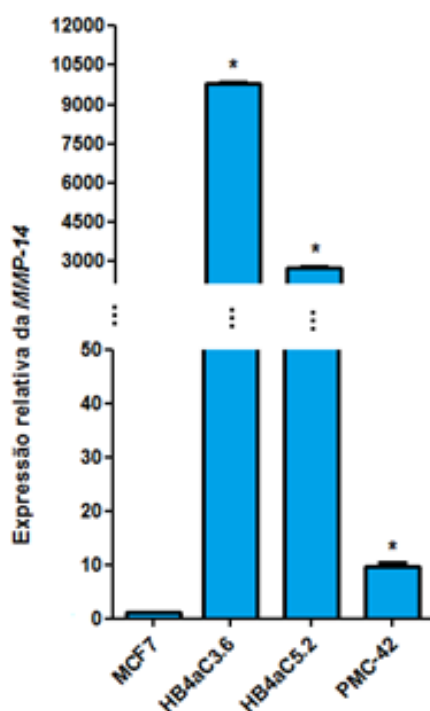


FIGURA 10. QUANTIFICAÇÃO DO GENE *MMP14* DAS DIFERENTES LINHAGENS TUMORAIS. Gráficos que mostram a expressão das diferentes linhagens comparadas a linhagem MCF7, que não apresenta expressão do gene *MMP14*. O símbolo * representa uma diferença estatística com $p < 0,05$, quando comparadas a linhagem MCF-7.

Analisando os gráficos gerados, foi possível perceber que a linhagem MCF7 não apresenta expressão do gene. Já as linhagens HB4aC3.6, HB4aC5.2 e PMC-42 apresentaram uma expressão aproximadamente 10.000, 2.700 e 10 vezes maior do que MCF7, respectivamente.

5.3 TRATAMENTO DAS LINHAGENS COM 5-AZA-2'-DEOXCITIDINA (DAC) E TRICOSTATIN (TSA)

A partir do resultado de RT-PCR e RT-qPCR observou-se que a linhagem MCF7 não expressa o gene *MMP14*, logo, esta foi tratada com os compostos desmetilante DAC, e inibidores de desacetilante de histonas TSA e também a combinação DAC+ TSA. Após os tratamentos, passou por uma extração de DNA e RNA, que serviram de molde para as reações que se pretendiam realizar.

5.3.1 RT-PCR após tratamento com 5-aza-2'-deoxicitidina (DAC) e tricostatin (TSA).

A expressão do gene *MMP14* após os tratamentos pode ser vista na FIGURA 11.

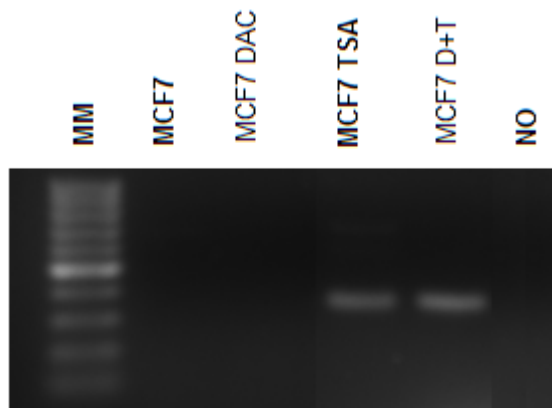


FIGURA 11. RT-PCR DE CÉLULAS TUMORAIS APÓS TRATAMENTO COM DAC E COM TSA DA LINHAGEM MCF7. MM: Marcador molecular de 100pb; MCF7: linhagem controle, sem tratamento algum; MCF7+DAC: linhagem tratada com DAC; MCF7+TSA: linhagem tratada com TSA e; MCF7D+T: linhagem tratada com DAC e com TSA; NO: controle negativo.

Diante deste resultado, foi possível perceber que, após os tratamentos com o composto DAC, a linhagem MCF7 continuou incapaz de expressar o gene *MMP14*. Por outro lado, o tratamento com TSA e com ambos compostos DAC mais TSA, permitiu que a linhagem MCF7 passasse a expressar o gene *MMP14*, reforçando a ideia de que a metilação do DNA e a acetilação de histonas pode estar intimamente ligada com a expressão deste gene.

5.3.2 RT-qPCR após tratamento com DAC e TSA

O cDNA das linhagens tratadas também foi submetido a reações de RT-qPCR (FIGURA 12).

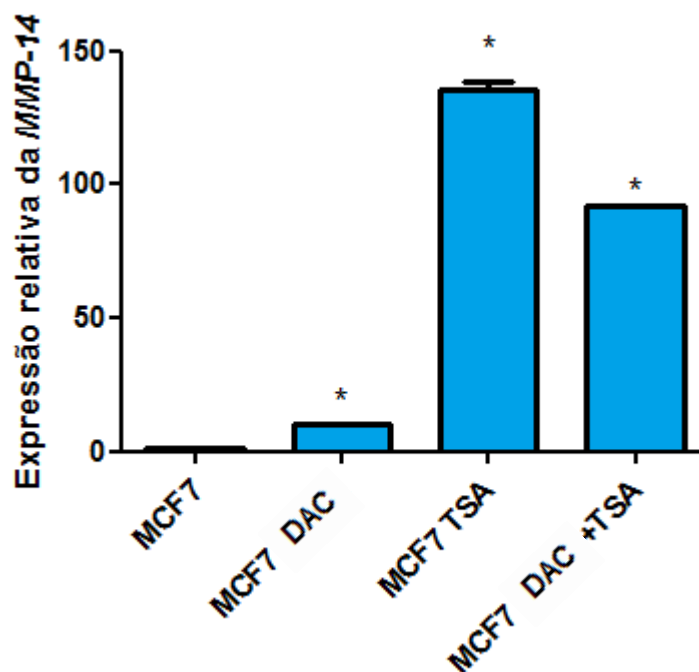


FIGURA 12. GRÁFICOS DE RT-qPCR DA LINHAGEM TUMORAL TRATADA COM DAC E TSA. Gráfico representando a expressão da linhagem MCF7 sem e com tratamento com DAC e TSA. O símbolo * representa uma diferença estatística com $p < 0,05$, quando comparadas a linhagem sem nenhum tratamento.

Diante deste resultado, é possível perceber que após o tratamento com os compostos DAC, TSA e DAC + TSA a linhagem MCF7 passou a expressar o gene *MMP14*, respectivamente em 10, 140 e 90 vezes mais do que quando comparada a MCF7 não tratada, que não apresenta expressão. Estes resultados apresentaram valor estatístico significativo, ou seja, $p < 0.05$ e corroboram com os dados já publicados (Chernov et al 2009) mostrando a associação epigenética a regulação da expressão de *MMP14*. A diferença observada na expressão do gene *MMP14*, diante do DAC, nas técnicas RT-PCR e RT-qPCR, se deve a sensibilidade entre ambas.

5.4 AMPLIFICAÇÃO DAS ILHAS CpG DO GENE *MMP14*

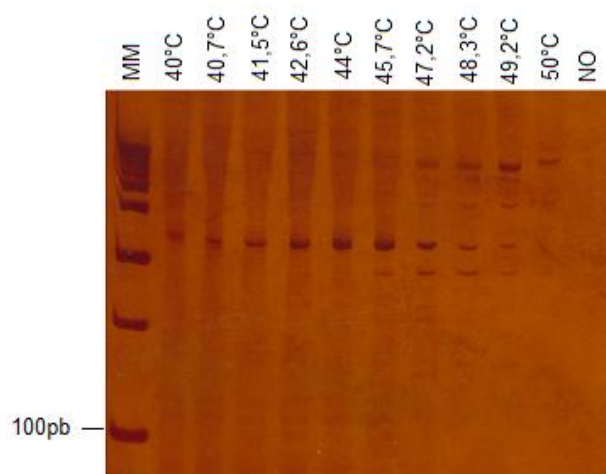


FIGURA 15. GRADIENTE DE TEMPERATURA PARA PADRONIZAÇÃO DO USO DOS INICIADORES DENOMINADOS COMO E e I. MM: marcador molecular de 100pb; NO: controle negativo da reação. Banda esperada: 745 pb (quadrado branco).
 FONTE: O autor (2014)

Diante do resultado deste experimento, foi possível determinar que a temperatura de 49,2°C seria a mais adequada para o anelamento dos iniciadores utilizados, bem como a metodologia utilizada para amplificação do gene *MMP14* (QUADRO 2).

Reagentes	Concentrações
Água mili-Q	-
Tampão Cloreto	1X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	0,2µM
Primer 5'	0,3 µM
Pimer 3'	0,3 µM
Taq. Polimerase	1U/ µl
DNA molde	200ng
Volume final	20 µl
Ciclos	95°C – 5' 94°C – 45'' 49,2°C – 45'' 72° C – 1' 72°C – 2'

QUADRO 2 – CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE *MMP14*.
 FONTE: O autor (2014)

5.5 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DAS ILHAS CpG DO GENE *MMP14*

As ilhas de CpG 1 e 2 do gene *MMP14* foram amplificadas em todas as linhagens tumorais de mama estudadas, tratadas e não tratadas com os compostos DAC, TSA e DAC+TSA. Estas ampliações permitiram a realização de purificações dos fragmentos desejados. Dez clones de cada linhagem tumoral foram selecionados e testados para a presença do fragmento estudado a partir de uma reação de PCR de colônia. Apenas os clones que apresentaram uma amplificação positiva, ou seja, uma banda referente ao fragmento clonado de 240 pb (ilha 1) ou de 745 pb (ilha 2) foram encaminhados para a reação de miniprep, onde o DNA plasmidial foi extraído e por fim sequenciado.

Os resultados do sequenciamento foram analisados e traduzidos na forma de gráficos que facilitam sua visualização. Diante dos resultados de sequenciamento obtidos, foi possível analisar o perfil de metilação das ilhas de CpG das quatro linhagens não tratadas (FIGURA 16).

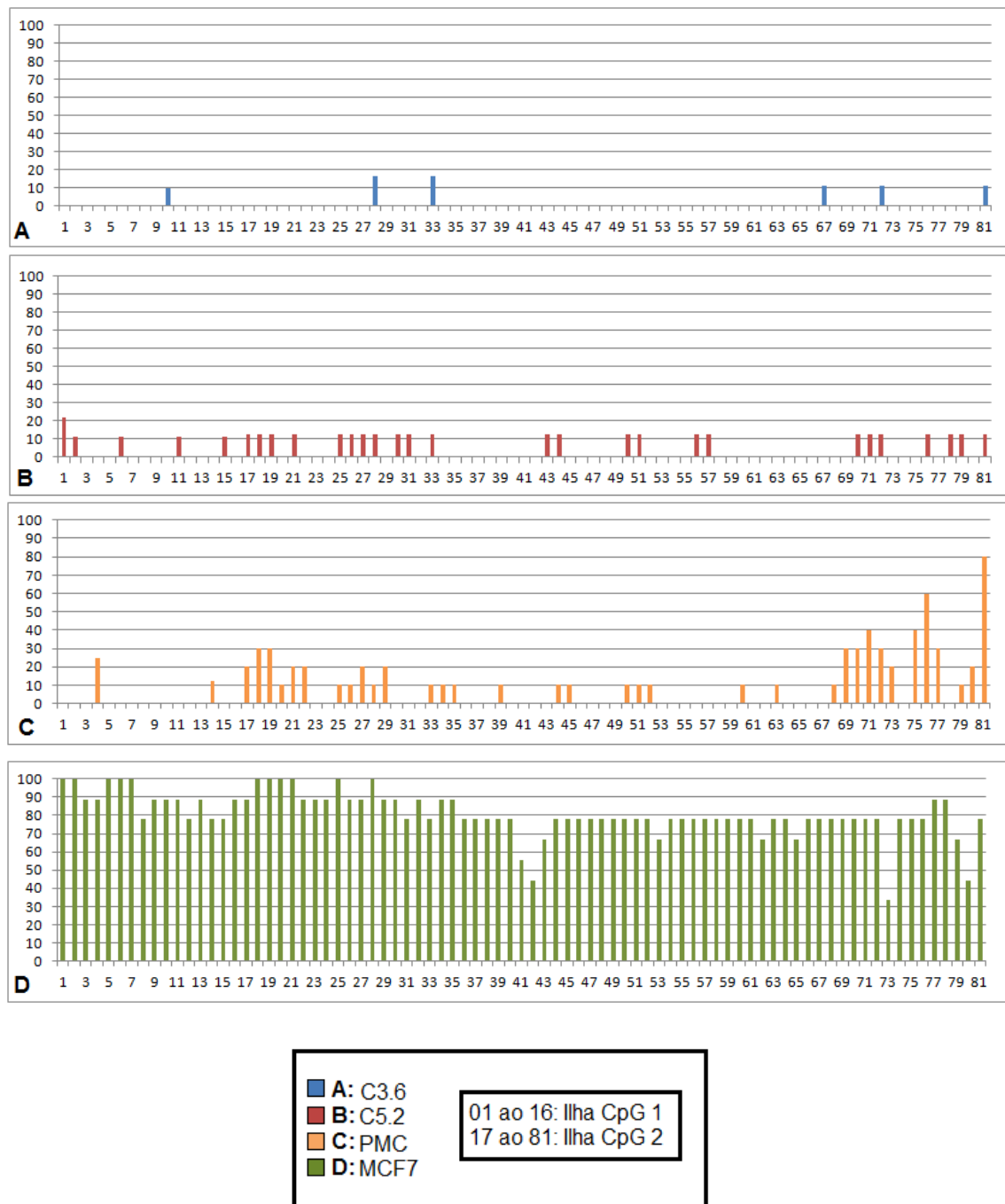


FIGURA 16. SEQUENCIAMENTO DAS ILHAS DE CPG 1 E 2 DAS LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA NÃO TRATADAS HB4AC3.6, HB4AC5.2, PMC-42 E MCF-7. O gráfico representa a metilação tanto da primeira como da segunda ilha de CpG encontrada no gene *MMP14*. Eixo X representa os diferentes dinucleotídeos CpG encontrados ao longo das duas Ilhas e o eixo Y representa a porcentagem de metilação de cada deles. Cada gráfico representa uma média de aproximadamente oito clones de cada linhagem. A) Gráfico do perfil de metilação de HB4aC3.6. B) Gráfico do perfil de metilação de HB4aC5.2. C) Gráfico do perfil de metilação de MCF-7. D) Gráfico do perfil de metilação de PMC-42.
 FONTE: O autor (2014)

As linhagens HB4aC3.6, HB4aC5.2 e PMC-42 apresentam as duas ilhas de CpG bastante desmetiladas, enquanto que a linhagem MCF-7 encontra-se intensamente metilada. Gráficos que demonstram a porcentagem global de metilação de cada linhagem também foram gerados (FIGURA 17).

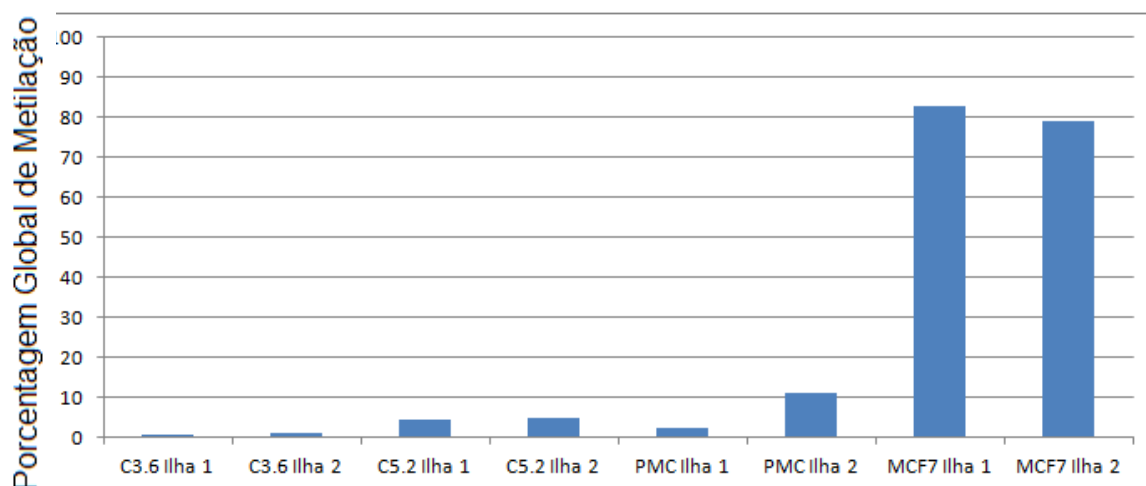


FIGURA 17. GRÁFICO DA PORCENTAGEM DE METILAÇÃO GLOBAL DAS DIFERENTES LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA. O gráfico representa as diferentes porcentagens de metilação das linhagens não tratadas, tanto da ilha de CpG 1 como da Ilha 2.

FONTE: O autor (2014)

Neste gráfico é possível perceber que as linhagens HB4aC3.6, HB4aC5.2 e PMC-42 apresentam metilação global inferior a 15%, enquanto que a linhagem MCF-7 apresenta metilação superior a 75%. Os mesmos gráficos foram também gerados para a linhagem MCF-7 após o tratamento com o composto DAC, TSA e com ambos (FIGURA 18).



FIGURA 18. SEQUENCIAMENTO DAS ILHAS DE CPG 1 E 2 DAS LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA TRATADAS MCF-7. O gráfico representa a metilação das duas ilhas de CpG encontradas no gene *MMP14*, antes e após tratamento com DAC e TSA. Cada gráfico representa uma média de aproximadamente oito clones de cada linhagem. A) Gráfico do perfil de metilação de MCF-7 sem nenhum tratamento. B) Gráfico do perfil de metilação de MCF-7 após tratamento com DAC. C) Gráfico do perfil de metilação de MCF-7 após tratamento com TSA e D) Gráfico do perfil de metilação de MCF7 após tratamento com DAC e TSA.

FONTE: O autor (2014)

Analisando os resultados obtidos pelos sequenciamentos após os tratamentos com DAC, TSA e DAC mais TSA, foi possível perceber que esta

linhagem apresentou diminuição de dinucleotídeos CpG metilados. Esta redução pode estar associada à dinucleotídeos CpG mais específicos, e não a uma metilação global das ilhas. O gráfico de metilação global da linhagem MCF-7 tratada também permite a visualização desta redução da metilação (FIGURA 19).

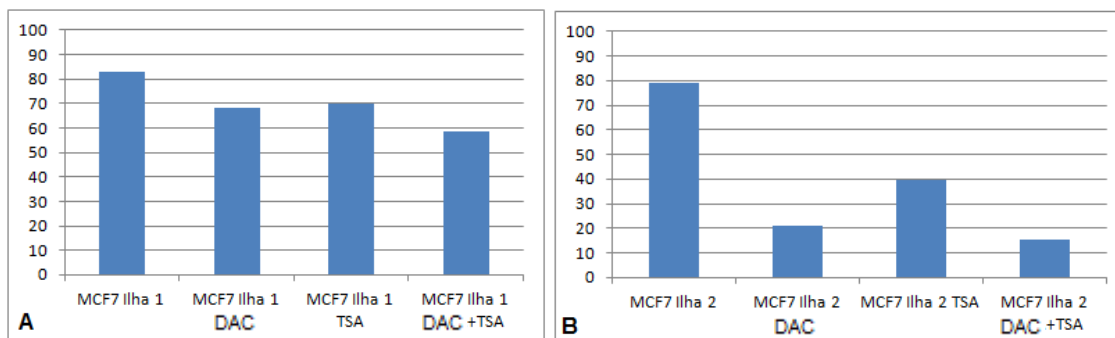


FIGURA 19. GRÁFICO DA PORCENTAGEM DE METILAÇÃO GLOBAL DA LINHAGEM MCF-7 TRATADA. A): O gráfico representa as diferentes porcentagens de metilação da ilha de CpG 1 da linhagem antes e após aos tratamentos. B): O gráfico representa as diferentes porcentagens de metilação da ilha de CpG 2 da linhagem antes e após aos tratamentos. FONTE: O autor (2014)

Analisando os resultados de metilação global da linhagem MCF-7 antes e após os tratamentos, fica mais evidente a redução da metilação. Na ilha de CpG 1, a linhagem que apresentava aproximadamente 80% de metilação, reduziu para aproximadamente 70%. Por outro lado na ilha de CpG 2, esta redução foi muito maior passando de, aproximadamente, 80% na linhagem não tratada para, aproximadamente, 40% após o tratamento. Diante disto, é possível perceber que os três diferentes tratamentos (DAC, TSA e DAC + TSA) foram mais efetivos na desmetilação da ilha de CpG 2 do gene *MMP14*.

5.6 ANÁLISE DE SÍTIOS PARA LIGAÇÃO DE FATORES TRANSCRICIONAIS

Avaliando as linhagens de mama MCF7 tratadas com os compostos DAC, TSA e DAC+TSA, foi possível identificar regiões mais específicas de

desmetilação após os tratamentos. A região de DNA determinada, encontrada entre os dinucleotídeos CpG 60° e 61°, foi confrontada na ferramenta *MatInspector* (FIGURA 18), mostrando uma possível associação com quatro diferentes fatores transcricionais. Porém, apenas um deles mostrou relevância ao estudo, o GLI3, tendo atingido valores afinidade de ligação superior a 0,9 para o alinhamento (adequados como descrito no programa). Este mesmo fator de transcrição GLI3 também possui um sítio de ligação em outra região do gene *MMP14*, entre os CpGs 40° e 53°, que também apresentou uma taxa de desmetilação após os tratamentos porém não tão evidente como os CpGs 60 e 61.

Em avaliações no *software online Methprimer*, foi possível identificar uma grande ilha de GpG na região promotora do gene *GLI3*, indicando que pode haver regulação epigenética neste gene.

5.7 REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MSP-PCR

Após análises dos resultados obtidos pelos sequenciamentos das linhagens tumorais de mama (FIGURA 16), foi possível identificar regiões específicas no DNA que poderiam flanquear iniciadores de uma reação de MSP-PCR. Estes iniciadores devem estar situados em CpGs específicos, de maneira que linhagens que não expressam o gene *MMP14* (MCF-7) devem apresentar-se metiladas e linhagens que expressam o gene *MMP14* (HB4aC3.6, HB4aC5.2 e PMC-42) devem apresentar-se desmetiladas.

As regiões que poderiam atender as necessidades de uma reação de MSP-PCR foram (Figura 7): 1) Do 3° ao 5° CG; 2) Do 7° ao 9° CG; 3) 12° ao 14° CG; 4) 30° ao 32°; 5) 36° ao 38°; 6) 46° ao 49°; 7) 53° ao 59°; e 8) 64° ao 66°. Estas regiões foram estudadas e selecionadas de maneira que propiciassem os melhores pares de iniciadores possíveis.

Os iniciadores sugeridos por este trabalho foram planejados em dois grupos diferentes: 1) planejados com auxílio do programa *online Methprimer* e; 2) planejados manualmente.

5.7.1 Iniciadores planejados com auxílio do programa *Methprimer*

Os iniciadores planejados pelo programa *Methprimer* que mais se enquadraram nas condições exigidas para uma reação de MSP-PCR estão descritos no Quadro 3.

Iniciador	Condição	Sequencia 5' - 3'	CG de abrangência
MSPMF1	Metilada	CGTTCGTTTTTTTCGGTTC	20° ao 23°
MSPMR1	Metilada	AAACTCTCGCGCATAACG	48° ao 50°
MSPUF1	Desmetilada	GTGTTTGTTTTTTTGGTTT	20° ao 23°
MSPUR1	Desmetilada	CAACAACTCTCACACATAACA	48° ao 50°

QUADRO 3- INICIADORES DE MSP-PCR PLANEJADOS PELO PROGRAMA *METHPRIMER*.

FONTE: O autor

Estes pares de iniciadores, tanto para condição metilada quanto para condição desmetilada, são capazes de amplificar um fragmento de 452 pb (FIGURA 20).

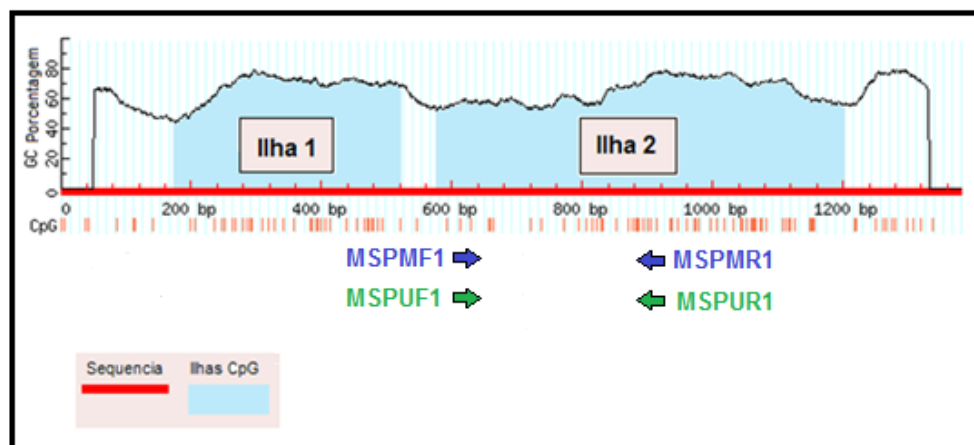


FIGURA 20 - LOCALIZAÇÃO DOS INICIADORES DE MSP-PCR PLANEJADOS PELO PROGRAMA *METHPRIMER*. As setas indicam o posicionamento dos iniciadores planejados. Em azul, esta representado o par de iniciadores referente à condição metilada, e em verde o par referente a condição desmetilada.

FONTE: O autor (2014)

5.7.2 Iniciadores planejados sem uso de *software*

Os iniciadores planejados manualmente que mais se enquadraram nas condições exigidas para uma reação de MSP-PCR estão descritos no quadro 4.

Iniciador	Condição	Sequencia 5' - 3'	CG de abrangência
MSPMF2	Metilada	TCGGTTTTTCGTTATGCG	47° ao 49°
MSPMR2	Metilada	TCGACCGTCCACCCTCGA	64° ao 66°
MSPUF2	Desmetilada	TTGGTTTTTTGTTATGTG	47° ao 49°
MSPUR2	Desmetilada	TCAACCATCCACCCTCAA	64° ao 66°

QUADRO 4- INICIADORES DE MSP-PCR PLANEJADOS MANUALMENTE
 FONTE: O autor (2014)

Estes pares de iniciadores, tanto para condição metilada quanto para condição desmetilada, são capazes de amplificar um fragmento de 164 pb (FIGURA 21).

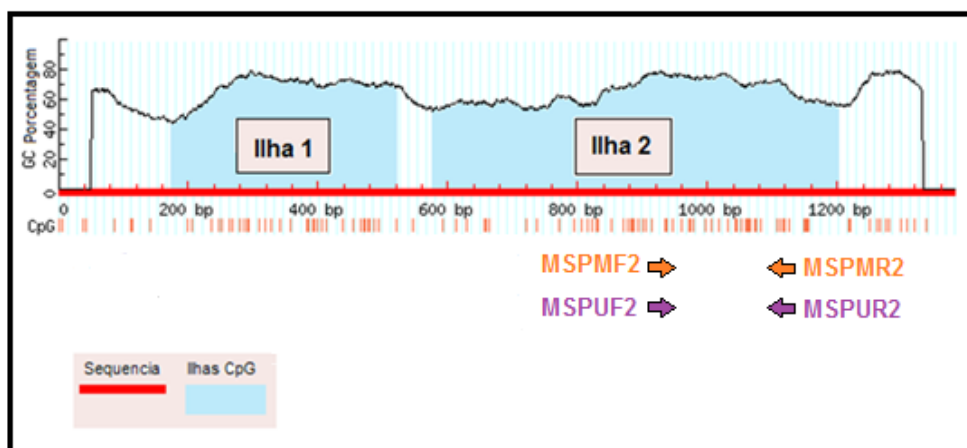


FIGURA 21. LOCALIZAÇÃO DOS INICIADORES DE MSP-PCR PLANEJADOS MANUALMENTE. As setas indicam o posicionamento dos iniciadores planejados. Em laranja, está representado o par de iniciadores referente à condição metilada, e em roxo o par referente a condição desmetilada.
 FONTE: O autor (2014)

5.7.3 Padronização da técnica de MSP-PCR

Para padronização da técnica de MSP-PCR foram utilizados os diferentes pares de iniciadores disponíveis (desenhados manualmente e sugeridos pelo programa *Methprimer*) em diferentes condições, utilizando-se dos DNA das linhagens tumorais de mama disponíveis no laboratório como molde para as reações.

Os pares de iniciadores planejados manualmente e o par planejado pelo programa *Methprimer* para condição não metilada não apresentaram bons resultados e, por isso, demos continuidade ao estudo apenas com o par do programa *Methprimer* para condição metilada (MSPMF1 e MSPMR1). Diante dos resultados encontrados, foi possível determinar que a temperatura de 58°C seria a mais adequada para o anelamento dos iniciadores utilizados. A metodologia utilizada esta descrita no quadro 5 (QUADRO 5).

Reagentes	Concentrações
Água mili-Q	-
Tampão Cloreto	1X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	0,2 μM
Primer 5´	0,3 μM
Primer 3´	0,3 μM
Taq. Polimerase	1 U/μl
Betaina	1 mM
DNA molde	200 ng
Volume final	20 μl
Ciclos	95° C – 5´ 94° C – 45´´ 58° C – 45´´ 72° C – 1´ 72° C – 2´

QUADRO 5 – CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DA MSP-PCR DO GENE *MMP14*.

FONTE: O autor (2014)

O conjunto de iniciadores utilizados foi o específico para condição metilada e, como esperado, amplificou apenas para a linhagem tumoral de mama MCF7 (FIGURA 22).

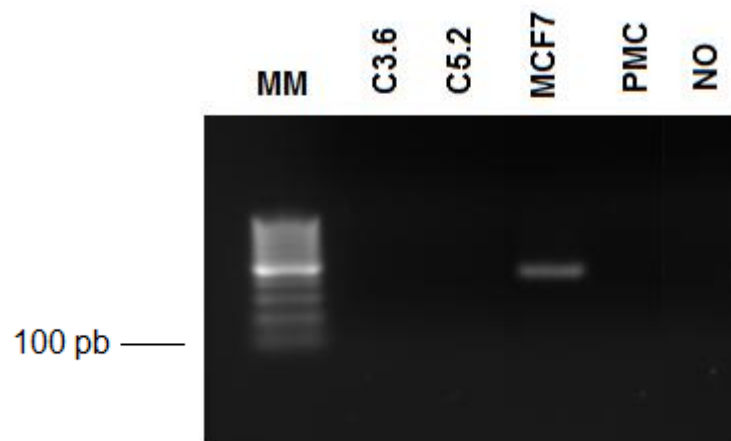


FIGURA 22. AMPLIFICAÇÃO DO MSP-PCR DO GENE MMP14. O fragmento esperado contém 452 pb. MM: Marcador molecular de massa; C3.6: linhagem C3.6; C5.2: linhagem C5.2; MCF7: linhagem MCF7; PMC: linhagem PMC; e NO: controle negativo.
FONTE: O autor (2014)

6 DISCUSSÃO

Sabe-se que cerca de 90% das causas de mortes por câncer de mama são em decorrência das metástases (SETHI e KANG, 2011) e dentre os diferentes grupos de genes que podem facilitar este processo de migração celular, encontra-se a metaloprotease MMP-14. A literatura já demonstrou que o gene *MMP14* é regulado por mecanismos epigenéticos, através de uma ilha de CpG localizada no promotor deste gene (CHERNOV *et al.*, 2009). Porém, em uma busca mais detalhada, foi possível detectar uma grande ilha de CpG localizada no primeiro íntron do gene. Recentemente tem sido destacada a provável importância destas ilhas de CpG, que não se encontram na região promotora, com os processos de regulação de expressão gênica (RADEMACHER *et al.*, 2014). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a importância das duas ilhas de CpG localizadas no gene *MMP14* na regulação da expressão gênica de linhagens tumorais de mama.

Utilizando quatro linhagens celulares de mama distintas, foram identificadas as diferenças de expressão do gene *MMP14*. Os resultados de RT-PCR (FIGURA 9) mostraram que as linhagens HB4aC3.6, HB4aC5.2 e PMC-42 expressam *MMP14*, enquanto que a linhagem MCF7 não expressa o gene. Estes resultados foram compatíveis com os encontrados na técnica de RT-qPCR, onde a linhagem MCF7 também não apresentou expressão de *MMP14* e, HB4aC3.6, HB4aC5.2 e PMC-42 apresentaram uma expressão 10.000, 2.700 e 10 vezes maior do que MCF7, respectivamente.

As análises dos sequenciamentos confirmaram os dados de expressão encontrados, onde as linhagens que expressam o gene mostraram baixa densidade de metilação ao longo das duas ilhas de CpG (FIGURA 16) e baixos índices de metilação global (FIGURA 17); já a linhagem que não expressa o gene mostrou alta densidade de metilação ao longo das duas ilhas de CpG (FIGURA 16) e altos índices de metilação global (FIGURA 17). Estes resultados reforçam a hipótese de uma relação entre metilação e a regulação de expressão do gene *MMP14*, corroborando com os resultados obtidos por Chernov e colaboradores (2009). Outras metaloproteases também já foram descritas na literatura por terem uma regulação da expressão gênica a partir da

metilação do DNA, como a MMP-2 (CHERNOV *et al.*, 2009). Recentemente, nosso grupo de pesquisa evidenciou que além da regulação epigenética de MMP2, a hipermetilação deste gene na linhagem MCF-7 pode ser revertida em desmetilação transitória, quando as células são expostas a um componente da matriz extracelular, a fibronectina (PEREIRA *et al.*, 2014). Não sabemos ainda se o mesmo processo pode ocorrer com o gene *MMP14*, porém, um estudo a respeito está sendo iniciado. Isso faria muito sentido, tendo em vista que *MMP2* e *MMP14* fazem parte do mesmo eixo de ativação de degradação da matriz extracelular (BERNARDO *et al.*, 2003)

O perfil de metilação encontrado nas diferentes linhagens de mama avaliadas mostrou-se homogêneo ao longo das duas ilhas de CpG do gene *MMP14*. Este resultado indica que, assim como a primeira ilha de CpG é importante na regulação da transcrição gênica (CHERNOV *et al.*, 2009), a segunda também parece desempenhar um importante papel de regulação deste gene.

Nos últimos sete anos, estudos têm demonstrado que os padrões de metilação ao longo do corpo do gene também desempenham um importante papel na regulação da transcrição gênica (SHENKER e FLANAGA, 2012). Em 2007, em um dos primeiros estudos envolvendo este tema, Zilberman e colaboradores correlacionaram a taxa de metilação do DNA com a taxa de transcrição ao longo de todo o genoma de *Arabidopsis*, um gênero de planta da mesma família da couve. Os autores encontraram que genes que eram muito expressos nesta planta, tinham uma tendência a apresentar altos níveis de metilação intragênica e vice-versa.

Em um estudo semelhante, realizado também em 2007, Hellman e Chess investigaram o padrão de metilação do cromossomo X, procurando entender os processos de silenciamento e ativação gênica envolvidos com este cromossomo. Contra as expectativas dos autores, o cromossomo X ativo apresentou maiores níveis de metilação do que o cromossomo X silenciado, e 49% deste perfil de metilação foi identificado em regiões intragênicas. Os autores conseguiram sugerir uma relação entre a metilação destas regiões intragênicas com os altos índices de transcrição, porque estariam possivelmente inibindo promotores alternativos. Esta hipótese de inibição de promotores alternativos ganhou mais destaque após um estudo que examinou

a metilação em regiões específicas do DNA de tecidos de cérebro humano (MAUNAKEA, *et al.*, 2010).

Em um estudo adicional sobre a importância da metilação de regiões intragênicas, realizado por Aran e colaboradores (2011), buscou-se correlacionar três parâmetros: a taxa de divisão celular, a de expressão gênica e a de metilação de regiões intragênicas em diferentes tecidos humanos. Este estudo encontrou que genes expressos ou não expressos de tecidos dormentes, como o cérebro e o pulmão, apresentaram promotores bastantes desmetilados e altas taxas de metilação intragênica. Já em tecidos com rápida proliferação celular, como a placenta e linfócitos, foi encontrado que genes expressos apresentam promotores bastantes desmetilados e altas taxas de metilação intragênica; porém, em genes não expressos, os níveis de metilação eram reduzidos na região intragênica. Mostrou-se assim, que o perfil de metilação no corpo dos genes pode estar intimamente relacionado com o tipo celular.

Os estudos citados acima demonstraram que, normalmente, a taxa de metilação da região promotora de genes muito expressos é baixa, enquanto que a do corpo gênico é alta. Isto se deve provavelmente ao fato de a metilação intragênica estar relacionada ao controle de promotores intragênicos alternativos, controle da expressão de transcritos intragênicos, envolvimento com *splicing* alternativo ou potencialização do processo de transcrição (atraindo mais fatores transcrpcionais, por exemplo) (JONES, 2012; KULIS *et al.*, 2013).

Diferentemente, nos resultados encontrados em nosso estudo, o perfil de metilação da ilha de CpG localizada no corpo do gene *MMP14* acompanhou o perfil de metilação da ilha localizada na região promotora. Isto pode ser explicado por um estudo publicado recentemente (BRENET, *et al.* 2011), onde mostrou-se que a metilação próxima a região TSS (início de transcrição) segue padrões diferentes da metilação encontrada em regiões intragênicas mais distantes. Ou seja, a metilação de éxons e íntrons ao redor da região de TSS está intimamente ligada ao silenciamento gênico, assim como na região promotora. Desta maneira, os resultados encontrados em nosso estudo estão de acordo com a literatura, tendo em vista que a ilha de CpG do corpo do gene *MMP14* está localizada no primeiro íntron, muito próxima à região TSS (+242

pb) e, portanto, deve seguir o perfil de metilação da região promotora. Pode-se então inferir que a metilação da ilha de CpG encontrada exclusivamente no primeiro íntron do gene *MMP14* está intimamente relacionada com a regulação da expressão deste gene, assim como a localizada na região promotora.

Avaliou-se o perfil de expressão e metilação do gene *MMP14*, na linhagem MCF7, após tratamentos com os compostos desmetilantes DAC e inibidores de desacetilantes de histonas TSA. Os resultados obtidos a partir da reação de RT-qPCR, mostraram que, após os tratamentos com todos os compostos, a linhagem passou a expressar significativamente mais o gene *MMP14* (DAC: 10 vezes mais, TSA: 140 vezes mais e DAC+TSA: 90 vezes mais).

Avaliando-se os resultados do perfil de metilação (FIGURA 16) e a porcentagem de metilação global (FIGURA 19) da linhagem MCF7 tratada com os diferentes compostos, fica evidente que houve uma redução de metilação. Esta pareceu mostrar-se mais significativa na ilha de CpG 2, localizada no íntron do gene, onde a taxa de metilação global caiu de 80% para quase 40% nos três diferentes tratamentos. Já na ilha de CpG 1, esta taxa global de metilação caiu de 80% para quase 70% nos três diferentes tratamentos.

Quando comparados os resultados de expressão e de perfil de metilação das linhagens MCF7 tratadas, é possível perceber novamente uma associação entre desmetilação e ativação gênica. Apesar de o tratamento com o composto desmetilante DAC ter apresentado uma redução na taxa de metilação das duas ilhas de CpG do gene estudado (de 80% para 68% na ilha 1 e de 80% para 20% na ilha 2), o aumento na sua taxa de expressão não se apresentou tão elevado quanto dos outros tratamentos (FIGURA 12). Porém, este resultado encontrado se assemelha ao publicado por Chernov e colaboradores (2009), onde o tratamento com o mesmo composto também mostrou uma desmetilação, mas não uma significativa expressão de MMP-14 e MMP-2, proteínas avaliadas no estudo.

Apesar de os tratamentos terem gerado uma desmetilação não homogênea ao longo das duas ilhas de CpGs avaliadas, ela foi suficiente para ativar a transcrição do gene *MMP14*, o que pode indicar a participação de CpGs específicos (na região da ilha 2) na transcrição deste gene. Para tanto, os CpG 60° e 61°, que mostraram-se metilados na linhagem MCF7 normal e

desmetilados após os tratamentos com DAC, TSA e DAC+TSA (FIGURA 18), foram avaliados quanto aos possíveis fatores de transcrição ancorados a estas regiões. De acordo com o programa *MatInspector*, a proteína GLI3 poderia estar agindo como um fator de transcrição na região desmetilada pelos tratamentos. Esta proteína é membro da família GLI, descrita pela primeira vez por Kinzler, em 1987. As proteínas expressas pelos genes da família GLI atuam em regiões do DNA específicas, ativando ou silenciando outros genes, trabalhando como fatores de transcrição. Nos vertebrados, contêm três membros distintos: GLI1, GLI2 e GLI3 (MATISE *et al.*, 1999), envolvidos com o modelamento de diversos tecidos durante o desenvolvimento embrionário (CHANDRAMOULI, *et al.*, 2013). Sabe-se que o gene *MMP14* está intimamente ligado ao modelamento da matriz extracelular (BARBOLINA *et al.*, 2008), podendo assim estar associado às proteínas da família GLI. Diante dos resultados obtidos, criamos a hipótese que os tratamentos com compostos desmetilantes (DAC) e inibidores de desacetilantes de histonas (TSA) na linhagem tumoral de mama MCF7, foram capazes de desmetilar a região de ancoramento do fator transcricional GLI3. Este, por sua vez, é responsável pela ativação de genes envolvidos com o modelamento tecidual, entre eles possivelmente o *MMP14*, como encontrado neste estudo. Logo, a partir da desmetilação do gene *MMP14*, ocorre a exposição do sítio de ligação do fator de transcrição GLI3, que ativa a expressão de *MMP14* e pode, por sua vez, facilitar os processos metastáticos de um câncer de mama, por exemplo. Alguns estudos bem recentes têm demonstrado uma associação entre as proteínas da família GLI com a progressão de diferentes tipos de câncer, como adenocarcinomas de pulmão (ISHIKAWA *et al.*, 2014), câncer cervical (WEN *et al.*, 2014) e câncer de mama (KWON *et al.*, 2011).

Outra região do gene *MMP14* que também apresentou uma taxa de desmetilação após os tratamentos foi entre os CpGs 40° e 53°. Nesta região também foi possível identificar um sítio de ligação do fator de transcrição GLI3. Da mesma forma, identificamos este mesmo sítio na região promotora do gene *MMP2*, localizado em uma região desmetilada após tratamento com fibronectina (PEREIRA *et al.*, 2014). Além disto, em análises no gene *GLI3*, foi possível identificar uma grande ilha de CpG localizada em sua região promotora, indicando que este gene também pode ser regulado

epigeneticamente. Estes fatos reforçam a hipótese criada neste trabalho, tendo em vista que *MMP2* participa do eixo de ativação de *MMP14*, e que *GLI3* também parece estar recebendo influências epigenéticas, como após o tratamento com o composto DAC.

Um estudo recente mostrou uma atividade dos membros da família GLI semelhante à hipótese criada em nosso estudo. A atividade do gene *MUC5AC* esta intimamente ligada ao agravamento do câncer gastro-intestinal, e possui um sítio de ligação do fator de transcrição GLI. A superexpressão de homólogos de GLI aumentam claramente a atividade do promotor de *MUC5AC* e, conseqüentemente, agravam o câncer gastro-intestinal (YAHARA *et al.*, 2014).

A terapia de tumores sólidos teve um grande avanço com o uso do agente desmetilante DAC, utilizado nesse projeto. Esse medicamento vem sendo usado, em conjunto com outros quimioterápicos, e apresentado importantes resultados no aumento da atividade imune anti-tumoral e inibição do desenvolvimento do tumor (NIE *et al.*, 2014). Porém, nosso estudo mostra que o uso do DAC foi capaz de provocar a desmetilação de uma ilha de CpG dentro de um íntron de um gene diretamente envolvido com metástase no câncer de mama. Portanto, torna-se relevante continuar estudos com essa droga e avaliar seus efeitos de modo global. Isto permitirá avaliar a verdadeira relação de custo benefício desta droga, onde não apenas oncogenes podem ser ativados, mas também genes que controlam o ciclo celular e, no conjunto final, avaliar se o efeito é benéfico.

Diante dos resultados obtidos pelo sequenciamento das ilhas de CpG, foi possível identificar áreas no gene *MMP14* passíveis de flanquear iniciadores de MSP-PCR. Após as etapas de padronização, apenas o par de iniciadores para condição metilada apresentou resultados adequados. De acordo com o esperado, apenas a linhagem MCF7 que apresentava a região a ser amplificada metilada (de acordo com resultados do sequenciamento), apresentou amplificação. Com esta técnica de MSP-PCR padronizada nas linhagens tumorais de mama, o próximo passo é uma análise rápida do perfil de metilação de tumores primários de mama, que poderá ser comparado aos dados clinico-patológico das pacientes.

7 CONCLUSÕES

A metilação da ilha de CpG localizada na região intragênica no gene *MMP14* parece estar intimamente ligada com o controle da expressão gênica, acompanhando o perfil observado na região promotora. Além disso, sob específicas condições de desmetilação, como o tratamento com agente químico DAC, este controle pode estar sendo desenvolvido pela ligação de fatores de transcrição a regiões específicas do DNA, como o GLI3, podendo supostamente ativar a expressão do gene *MMP14*.

Os resultados aqui mostrados na ilha de CpG 2 são inéditos e poderão contribuir para o esclarecimento da importância da metilação de regiões ricas em CpG dentro do corpo de um gene, tendo em vista futuras abordagens diagnósticas e terapêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSON, D. G.; COLLINS, C.; MCCORMICK, F.; GRAY, J.W. Chromosome aberrations in solid tumors. **Nat. Genet.** v. 34, p. 369–376. 2003.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer Facts and Figures 2011-2012. Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2011.

ARAN, D.; TOPEROFF, G.; ROSENBERG, M.; HELLMAN, A. Replication timing-related and gene body-specific methylation of active human genes. **Hum Mol Genet.** v. 20, 670-680, 2011.

ARTACHO-CORDÓN, F.; RÍOS-ARRABAL, S.; LARA, P. C.; ARTACHO-CORDÓN, A.; CALVENTE, I.; NÚÑEZ, M. I. Matrix metalloproteinases: Potential therapy to prevent the development of second malignancies after breast radiotherapy. **Surgical Oncology** v. 21, 143-151, 2012.

ATTWOOD, J. T.; YUNG, R. L.; *et al.* DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cell Mol Life Sci**, v. 59, n.2, 241-57, 2002.

BARBOLINA, M. V.; STACK, M. S. Membrane type 1-matrix metalloproteinase: substrate diversity in pericellular proteolysis. **Semin Cell Dev Biol**, v. 19, n.1, 24-33, 2008.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomic, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, 281-297, 2004.

BAYLIN, S.B.; HERMAN, J.G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics. **Trends Genet.** v.16, p. 168–174, 2000.

BERGER, S. L. The complex language of chromatin regulation during transcription. **Nature**, v. 447, p. 407-412, 2007.

BERNARDO, M. M; FRIDMAN R. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. **Biochem J**, v.374, n.Pt 3, Sep 15, p.739-45. 2003.

BIRD, A. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. **Nature**, v. 321, 209-213, 1986.

BIRD, A.; *et al.* DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev**, v.16, n.1, Jan 1, p.6-21. 2002.

BRAIT, M.; SIDRANSKY, D. Cancer epigenetics: above and beyond. **Toxicol**, v. 21, 275-288, 2011.

BUSTIN, S. A. ; *et al.* The MIQE guidelines : minimum information for publication of quantitative real-time pcr experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n.4, p.611-622, 2009.

CAO, J.; SATO, H.; *et al.* The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for pro-gelatinase A activation. **J Biol Chem**, v. 270, n. 2, 801-805, 1995.

CLARK, I.; SWINGLER, T. E.; SAMPIERI, C. L.; EDWARDS, D. R. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **IJBCB**, v. 40, 1362-1378, 2008.

CHANDRAMOULI, A.; HATSELL, S. J.; PINDERHUGHES, A.; KOETZ, L.; COWIN, P. Gli Activity Is Critical at Multiple Stages of Embryonic Mammary and Nipple Development. **Plos one**, v. 8, 1-17, 2013.

CHERNOV, A. V., N. E. Sounni, *et al.* Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells. **J Biol Chem**, v.284, n.19, May 8, p.12727-34, 2009.

CHUANG, J. C.; JONES, P. A. Epigenetics and microRNAs. **Pediatr Res**, v. 61, 24R–29R, 2007.

COLLINS, V. P. Breast Cancer: The influence of treatment that fails to cure. **Cancer**, v. 9, n. 6, 1177-1181, 1956.

COSTA, F.F.; PAIXÃO, V. A.; CAVALHER, F. P.; CUNHA, I. W.; *et al.* SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer. **Cancer Genet Cytogenet**. v. 165(2):135-43, 2006.

CURRAN, S.; DUNDAS, S. R.; *et al.* Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. **Clin Cancer Res**, v.10, n.24, Dec 15, 8229-34. 2004.

DECLERCK, Y. A.; MERCURIO, A. M.; *et al.* Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. **Am J Pathol**, v.164, n.4, Apr, 1131-9. 2004.

DELPY, Y. CORDELIER, P.; CHO, W. C.; TORRISANI, J. DNA methylation and cancer diagnosis. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, 15029-15058, 2013.

DERYUGINA, E. I.; QUIGLEY, J. P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. **Cancer Metastasis Reviews**. v. 25, 9-34, 2006.

DESANTIS, C.; SIEGEL, R.; BANDI, P.; JEMAL, A. Breast cancer statistics, 2011. **Cancer J. Clin.**, v. 61, 409-418, 2011.

DUFFY, M. J. The war on cancer: are we winning?. **Tumor Biol**. v. 34, 1275-1284, 2013.

FEARON, K. C.; PRESTON, B. Body composition in cancer cachexia. **Infusionstherapie**. v.17, 63-66, 1990.

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

FEINBERG, A. P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nat. Rev. Genet**. v. 7, 21-33, 2006.

FULLGRABE, J., KAVANAGH, E., JOSEPH, B. Histone onco-modifications. **Oncogene**, v. 30, 3391-3403, 2011.

GALVÃO, E.R.C.G.N.; *et al.* Breast cancer proteomics: a review for clinicians. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 137, n. 6, p. 915-25, 2011.

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG islands in vertebrate genomes. **J Mol Biol**, v. 196(2):261-82. 1987.

GEDDES, D. T. Inside the Lactating Breast: The Latest Anatomy Research. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 52, n. 6, p. 556-563, 2007.

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

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

HELLMAN, A.; CHESS, A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. **Science**, v. 315(5815), 1141 – 1143, 2007.

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

HONDERMARCK, H. Breast cancer – when proteomics challenges biological complexity. **Molecular & Cellular Proteomics**. v. 2, n. 5, p. 281-291, 2003.

HU, C. P.; DANDAPAT A., *et al.* Blockade of hypoxia-reoxygenation-mediated collagen type I expression and MMP activity by overexpression of TGF-beta1 delivered by AAV in mouse cardiomyocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.293, n.3, Sep, p.H1833-8. 2007.

HUNTER, K. W.; CRAWFORD, N. P. S.; ALSARRAJ, J. Mechanisms of metastasis. **Breast cancer research**, 2008.

INCA/MS: Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. Estimativa 2014 – Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: julho de 2014.

ISHIKAWA, M.; SONOBE, M.; IMAMURA, N.; SOWA, T.; SHIKUMA, K.; DATE, H. Expression of the GLI family genes is associated with tumor progression in advanced lung adenocarcinoma. **World Journal of Surgical Oncology**, 12:253, 2014.

JIANG, Y.; LIU, S.; CHEN, X.; CAO, Y.; TAO, Y. Genome-wide distribution of DNA methylation and DNA demethylation and related chromatin regulators in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1835, 155-163, 2013.

JONES, P.A. Overview of cancer epigenetics. **Semin. Hematol.** Vol. 42, p. S3–S8, 2005.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nat Rev Genet**, v.13, n.7, Jul, 484-92, 2012.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest**, v.119, p.1420-1428, 2009.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v. 141, 52–67, 2010.

KINZLER, K. W.; BIGNER, S. H.; BIGNER, D. D ; TRENT, J. M.; LAW, M. L.; O'BRIEN, S. J.; WONG, A. J.; VOGELSTEIN, B. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. **Science**, v. 236, 70 ± 73, 1987.

KLEIN, A.; OLENDROWITZ, C.; *et al.* Identification of brain and bone-specific breast cancer metastasis genes. **Cancer Lett.** v. 276, n. 2, 212-220, 2009.

KLOSE, R. J.; BIRD, A. P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends Biochem Sci**, Jan 3. 2006.

KNUUTILA, S.; AUTIO, K.; AALTO, Y. Online access to CGH data of DNA sequence copy number changes. **Am. J. Pathol.** 157, 689, 2000.

KULIS, M.; QUEIRÓS, A. C.; BEEKMAN, R.; MAETÍN-SUBERO, J. I. Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer. **Bioch. Et Bioph. Acta**, v. 1829, 1161-1174, 2013.

KWON, Y. J.; HURST, D. R.; STEG, A. D.; YUAN, K.; VAIDYA, K. S.; WELCH, D. R.; FROST, A. R. Gli1 enhances migration and invasion via up-regulation of MMP-11 and promotes metastasis in ERa negative breast cancer cell lines. **Clin Exp Metastasis**, v. 28, 437–449, 2011.

LEE, M.; FRIDMAN R., *et al.* Extracellular proteases as targets for treatment of cancer metastases. **Chem Soc Rev**, v.33, n.7, Sep 10, p.401-9. 2004.

LI, X. Y.; OTA, I.; YANA, I.; SABEH, F.; WEISS, S. J. Molecular dissection of the structural machinery underlying the tissue-invasive activity of Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase. **Mol. Biol. Cell**, v.19, 3221-3233, 2008.

LI, C. H.; CHEN, Y. Targeting long non-coding RNAs in cancers: progress and prospects. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 45, 1895-1910, 2013.

LIU, L. T.; CHANG, L. C.; CHIANG, L. C.; HUNG, W. C. Histone deacetylase up-regulated RECK to inhibit activation and cancer cell invasion. **Cancer Res**, v. 15, n. 63, p. 3069-3072, June 2003.

LIU, S. C.; *et al.* Relationships between the level of matrix metalloproteinase-2 and tumor size of breast cancer. **Clin Chim Acta**, v.317, 92–96, 2006.

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

LOPEZ, J.; PERCHARDE, M.; COLEY, H. M.; WEBB, A.; CROOK, T. The context and potential of epigenetics in oncology. **British Journal of Cancer**, v. 100, 571 – 577, 2009.

LOU, S.; *et al.* Whole-genome bisulfite sequencing of multiple individuals reveals complementary roles of promoter and gene body methylation in transcriptional regulation. **Genome Biology**. v.15, 1-21, 2014.

MATISE, M. P.; JOYNER, A. L. Gli genes in development and cancer. **Oncogene**, v. 18, 7852-7859, 1999,

MATTICK, J. S.; MAKUNIN, I. V. Non-coding RNA. **Hum Mol Genet**, v.15 Spec n° 1,17-29, 2006.

MAUNAKEA, A. K.; NAGARAJAN, R. P.; BILENKY, M.; *et al.* Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. **Nature**, v. 466 (7303), 253 – 257, 2010.

MCGHEE, J. D.; FELSENFELD, G. The number of charge-charge interactions stabilizing the ends of nucleosome DNA. **Nucleic Acids Res**, v.8, n.12, 2751-69, 1980.

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

MOMPARLER, R. L.; *et al.* Cancer epigenetics. **Oncogene**, v.22, n.42, Sep 29, p.6479-83. 2003.

MYLONA, E.; NOMIKOS, A.; MAGKOU, C.; *et al.* The clinicopathological and prognostic significance of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-9 according to their localization in invasive breast carcinoma. **Histopathology**, v. 50, 338-347, 2007.

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

NIE, J.; LIU, L.; LI, X.; HAN, W. Decitabine, a new star in epigenetic therapy: the clinical application and biological mechanism in solid tumors. **Cancer letters**. v. 354, 12-20, 2014.

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

OKUBO T.; *et al.* Down-regulation of promoter 1.3 activity of the human aromatase gene in breast tissue by zinc-finger protein, snail (Snai1). **Cancer Res**, v.61, p.1338-1346, 2001.

OMS: Organização Mundial De Saúde. Disponível em <<http://www.who.int/en/>> Acesso em: outubro de 2014.

PAHWA, S.; STAWIKOWSKI, M. J.; FIELDS, G. B. Monitoring and inhibiting MT1-MMP during cancer initiation and progression. **Cancers**. v. 6, 416-435, 2014.

PEREIRA, I. T.; RAMOS, E. A. S.; COSTA, E. T.; CAMARGO, A. A.; MANICA, G. C. M.; KLASSEN, L. M. B.; CHEQUIN, A.; PRADO, K. B.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; COSTA, F. F.; KLASSEN, G. Fibronectin Affects Transient *MMP2* Gene Expression through DNA Demethylation Changes in Non-Invasive Breast Cancer Cell Lines. **Plos one**. v. 9, 2014.

POINCLOUX, R.; LIZÁRRAGA, F.; CHAVRIER, P. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. **Journal of Cell Science**, v. 122, 3015-3024, 2013.

POLIAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 117, 3155-3163, 2007.

PRYZBYLKOWSKI, P.; OBAJIMI, O. *et al.* Trichostatin A and 5 Aza-2' deoxycytidine decrease estrogen receptor mRNA stability in ER positive MCF7 cells through modulation of HuR. **Breast Cancer Res Treat**, v. 111, n.1, 15-25, 2007.

RADEMACHER, K.; *et al.* Evolutionary origin and methylation status of human Intronic CpG island that are not present in mouse. **Genome Biol. Evol.**, v. 6, 1579-1588, 2014.

REMACLE, A. G.; *et al.* Non-destructive and selective imaging of the functionally active, pro-invasive membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) enzyme in cancer cells. **J. Biol. Chem.** June 3, 2013.

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

SEIKI, M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. **Cancer Lett**, v. 194, 1–11, 2003.

SETHI, N.; KANG Y. Notch signalling in cancer progression and bone metastasis. **Br J Cancer**, v.105, n.12, Dec 6, p.1805-10. 2011.

SHENKER, N.; FLANAGAN, J. M. Intragenic DNA methylation: implications of this epigenetic mechanism for cancer research. **British Journal of Cancer**. v.106, p. 248-253, 2012.

SIGEL, R.; NAISHADHAM,D.; JEMAL, A. **Cancer J. Clin.** v.63, 11-30, 2013.

SIGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JERNAL, A. Cancer Statistics, 2014. **Cancer J. Clin.** v.64, 9-29, 2014.

STAMPS, A. C.; DAVIES, S. C.; *et al.* Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalized by retroviral infection with a temperature-sensitive SV40 T-antigen construct. **Int J Cancer**, v.57, n.6, Jun 15, 865-74, 1994.

STERNLICHT, M. D.; COUSSENS, L. M.; VU, T. H.; WERB, Z. Biology and regulation of the matrix metalloproteinases. **Inhibitors in Cancer Therapy**. ed. NJ, p. 1-37, 2001.

SUN, X.; CHENG, G.; HAO, M.; ZHENG, J.; ZHOU, X.; ZHANG, J.; TAICHMAN, R. S.; PIENTA, K. J.; WANG, J. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. **Cancer metastasis reviews**, 29:709-22, 2010.

SUVA, L. J.; GRIFFIN, R. J.; MAKHOUL, I. Mechanisms of bone metastases of breast cancer. **Endocr Relat Cancer**, v. 16, 703-713, 2009.

SUZUKI, M.; BIRD, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. **Nature Reviews**, v. 9, 465-476, 2008.

TÊTU, B.; BRISSON, J.; WANG, C. S.; *et al.* The influence of MMP-14, TIMP-2 and MMP-2 expression on breast cancer prognosis. **Breast Cancer Research**, v. 8, 2006.

WADDINGTON, C. H. The epigenotype. 1942. **Int. J. Epidemiol.** v. 41, n.1, Feb, 10-13, 1942.

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; VEER, L. J. V. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature reviews**, v. 5, 591-602, 2005.

WEM, S. Y.; LIN, Y.; YU, Y. Q.; CAO, S. J.; *et al.* miR-506 acts as a tumor suppressor by directly targeting the hedgehog pathway transcription factor Gli3 in human cervical cancer. **Oncogene**, 10 march, 2014.

WIDSCHWENDTER, M. 5-methylcytosine - the fifth base of DNA: the fifth wheel on a car or a highly promising diagnostic and therapeutic target in cancer? **Dis Markers**, v.23, n.1-2,1-3. 2007.

YAHARA, N. K.; YAMAMICHI, N.; TAKAHASHI, Y.; NAKAYAMA, C.; SHIOGAMA, K.; INADA, K. I.; *et al.* Gli Regulates MUC5AC Transcription in Human Gastrointestinal Cells. **Plos One**, v. 9, 2014.

ZILBERMAN, D.; GEHRING, M.; TRAN, R. K.; BALLINGER, T.; HENIKOFF, S. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncover an interdependence between methylation and transcription. **Nature genetics**, v. 39, 61-69, 2007.