

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA BUSATO TOLEDO

**EFEITO DA LIRAGLUTIDA SOBRE A METILAÇÃO DO DNA E A EXPRESSÃO DE
MARCADORES DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA EM LINHAGENS
TUMORAIS DE MAMA**

CURITIBA

2017

MARIANA BUSATO TOLEDO

**EFEITO DA LIRAGLUTIDA SOBRE A METILAÇÃO DO DNA E A EXPRESSÃO DE
MARCADORES DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA EM LINHAGENS
TUMORAIS DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Giseli Klassen
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Edneia A. S. R. Cavalieri

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Toledo, Mariana Busato

Efeito da liraglutida sobre a metilação do DNA e a expressão de marcadores da transição epitélio-mesênquima em linhagens tumorais de mama. / Mariana Busato Toledo. – Curitiba, 2017.

74 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Giseli Klassen

Coorientadores: Edneia A. S. R. Cavalieri

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

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

CDD (20. ed.) 616.99249



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

“Efeito da liraglutida sobre a metilação do DNA e a expressão de marcadores da transição epitélio-mesênquima em linhagens tumorais de mama”

por

Mariana Busato Toledo

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


Profa. Dra. **Gisele Klassen** – Presidente


Profa. Dra. **Sheila Maria Brochado Winnischofer**


Profa. Dra. **Jaqueline Carvalho de Oliveira**

Curitiba, 22 de março de 2017.

Dedico este trabalho aos meus pais e aos meus irmãos, que sempre estiveram ao meu lado, com todo apoio e amor incondicional. Amo vocês mais do que tudo!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus!

Agradeço à minha família, a qual eu amo imensamente! Aos meus pais e aos meus irmãos maravilhosos por todo amor, apoio, carinho e amizade.

Às minhas orientadoras, Prof.^a Dr.^a Giseli Klassen e Prof.^a Dr.^a Edneia A. S. R. Cavaliere pela oportunidade, orientação e ensinamentos nestes anos.

Às amigas e colegas do laboratório Yara, Andressa e Graci pela amizade, almoços, conversas, auxílios e uma convivência diária maravilhosa!

Aos amigos: Isa, Lili, Ana, Anna, Ísis e Luiz, que eu tive o prazer de conhecer e conviver no laboratório, além de cultivar uma amizade até hoje.

Aos amigos da Biologia que, mesmo seguindo caminhos distintos, mantivemos essa amizade tão agradável e sincera.

Às amigas da Genética, em especial à Ana, Carol, Débora e Eleonora por toda amizade e carinho!

Ao Departamento de Bioquímica da UFPR que, sem ele, com certeza não conseguiria fazer nem um terço do meu trabalho. Em especial ao Valter, pelos vários sequenciamentos, dicas e animação.

Ao “laboratório vizinho”, em especial à Regiane, por toda atenção, amizade e risadas!

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia e às colegas da Pós “MiPaPa”.

À CAPES e ao CNPQ pela bolsa de mestrado e suporte financeiro para as pesquisas.

A todos que passaram pela minha vida nesse período e que de certa forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho!

Muito obrigada de coração!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O câncer de mama é o mais diagnosticado e a principal causa de morte por câncer no mundo entre as mulheres. A propagação metastática das células tumorais é responsável por aproximadamente 90% das mortes por este câncer. A progressão dos carcinomas, que culminam nas metástases, está associada com a perda de características epiteliais e a aquisição de fenótipo mesenquimal pelas células tumorais, processo este denominado de transição epitélio-mesênquima (TEM). A identificação de fármacos já aprovados em novas indicações terapêuticas para outras doenças, como o câncer, é conhecida como reposição de fármacos. Isto é possível devido às origens moleculares comuns de diversas doenças. Estudos recentes mostram que agonistas do receptor de GLP-1, como a exenatida, apresentam efeitos pró-apoptóticos e seletivos em células tumorais, especialmente em linhagens tumorais de mama. A liraglutida é um análogo de GLP-1 mais estável que a exenatida, utilizada na terapia da diabetes mellitus do tipo 2. Diante disso, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito *in vitro* da liraglutida em células tumorais de câncer de mama. A viabilidade celular com este fármaco foi testada nas concentrações de 10, 30, 50, 70 e 100 nM tanto nas linhagens tumorais de mama, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-436, como na linhagem normal de mama HB4a. A liraglutida não apresentou efeito inibitório de viabilidade nas linhagens. A partir deste teste, foram feitos os ensaios de migração celular, análises de expressão gênica dos marcadores da TEM, como o *CDH1*, marcador epitelial, e o *VIM*, marcador mesenquimal, assim como para as análises de metilação do promotor desses genes, com a concentração de 30 nM de liraglutida. Os resultados mostraram que a liraglutida diminuiu em aproximadamente 40% a migração das linhagens mesenquimais MDA-MB-231 e MDA-MB-436. Em ambas as linhagens houve aumento significativo da expressão de *CDH1*, associada com a desmetilação do promotor deste gene. Além disso, foi feita a indução da TEM na linhagem epitelial MCF-7, após exposição com o fator de crescimento epidermal (EGF), e este ensaio apresentou aumento da migração celular, juntamente com o aumento da expressão dos genes *VIM* e *SNAIL* e diminuição de *CDH1*, alterações estas características da indução da TEM. O tratamento na linhagem MCF-7 com liraglutida, nas células tratadas com EGF, inibiu a motilidade celular e a expressão de *CDH1*, revertendo a indução da TEM causada pelo EGF. Como conclusão, os dados obtidos mostram que a liraglutida afeta o potencial migratório das linhagens tumorais de mama, pela redução de migração celular e pelo aumento da expressão de *CDH1*.

Palavras-chave: Câncer de mama; TEM; Liraglutida.

ABSTRACT

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer and the main cause of cancer death in the world among women. The propagation of metastatic tumor cells is responsible for approximately 90% of human breast cancer death. Carcinoma progression, which results in metastasis, is associated with the loss of epithelial features, and the acquisition of a mesenchymal phenotype by tumor cells, and this process is called of epithelial mesenchymal transition (EMT). Drug repurposing is the identification of new therapeutic indications for already approved drugs in others pathologies, like cancer. This is possible because of the common molecular origins of diverse diseases. Recent studies with Glucagon-like-peptide-1 (GLP-1) receptor agonists, as exenatide, has showed pro-apoptotic and selective effects in tumor cells, especially in breast cancer cell lines. Liraglutide is a human GLP-1 analogue more stable than exenatide, used in type 2 diabetes mellitus therapy. Then, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* effects of liraglutide on breast cancer cell lines. The cell viability with liraglutide was tested in the concentrations of the 0, 10, 30, 50, 70 and 100 nM both in breast cancer, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-436, and normal breast, HB4a, cell lines. Liraglutide does not affect the cell viability in the cell lines. From this assay, the following assays were done with 30 nM of liraglutide: wound healing, analyses of gene expression of EMT markers, like *CDH1* epithelial marker and *VIM* mesenchymal marker and DNA methylation of promoter from *CDH1* and *VIM*. The results showed that liraglutide decreased nearly 40% the cell migration of the mesenchymal cell lines MDA-MB-231 and MDA-MB-436. These two cell lines had up regulation of *CDH1*, associated with demethylation of this gene. Furthermore, the epithelial cell line MCF-7 was induced to EMT, after stimulation with epidermal growth factor (EGF), and it resulted in an increased cell motility and up regulation of mesenchymal markers *VIM* and *SNAIL* and decreased of *CDH1*, these alterations are characteristics of EMT. Treatment of MCF-7 cells with a combined stimulation of EGF and liraglutide inhibited the motility and decreased levels of *CDH1*, reverting EGF-induced EMT. In summary, these data showed that liraglutide affects the migratory behavior of the breast cancer cell lines by the reduction of cell migration and up regulation of *CDH1*.

Key words: Breast cancer; EMT; Liraglutide.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 12 |
| 2.1 CÂNCER DE MAMA | 12 |
| 2.1.1 Mecanismos moleculares do câncer | 14 |
| 2.1.2 Transição epitélio-mesênquima (TEM) | 15 |
| 2.1.3 Proteínas relacionadas com a TEM | 16 |
| 2.2 FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGF)..... | 19 |
| 2.2.1 Efeito do EGF no câncer | 20 |
| 2.3 Epigenética | 23 |
| 2.3.1 Metilação do DNA | 23 |
| 2.3.2 Modificações pós-traducionais das histonas | 24 |
| 2.3.3 RNA não codificadores (ncRNA)..... | 25 |
| 2.4 LIRAGLUTIDA | 26 |
| 3 OBJETIVOS | 29 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 29 |
| 3.2 Objetivos específicos | 29 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 30 |
| 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO | 30 |
| 4.2 CULTIVO CELULAR E TRATAMENTOS | 30 |
| 4.2.1 Viabilidade celular | 31 |
| 4.2.2 Tratamento com o fator de crescimento epidermal (EGF) | 31 |
| 4.2.3 Tratamento com a liraglutida | 31 |
| 4.2.4 Ensaio do potencial migratório | 32 |
| 4.3 EXTRAÇÃO DE DNA E RNA..... | 32 |
| 4.4 SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA) | 32 |
| 4.5 QUANTIFICAÇÃO GÊNICA..... | 33 |
| 4.6 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO..... | 34 |
| 4.7 SEQUENCIAMENTO | 35 |
| 4.8 MSP-PCR (<i>METHYLATION SPECIFIC PCR</i>)..... | 36 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.9 | EXTRATO PROTEICO..... | 37 |
| 4.10 | WESTERN BLOT..... | 37 |
| 4.11 | ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... | 38 |
| 5 | RESULTADOS..... | 39 |
| 5.1 | EFEITO DA LIRAGLUTIDA NA VIABILIDADE CELULAR..... | 39 |
| 5.2 | EFEITO DA LIRAGLUTIDA NA MIGRAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO GÊNICA..... | 40 |
| 5.3 | EFEITO DO EGF NA MIGRAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO GÊNICA..... | 48 |
| 5.4 | ANÁLISE DA METILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DE <i>MMP-2</i> APÓS TRATAMENTO COM EGF..... | 52 |
| 5.5 | EFEITO DO TRATAMENTO COM EGF/LIRAGLUTIDA NA MIGRAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO GÊNICA..... | 54 |
| 5.6 | ANÁLISE DA METILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DE <i>CDH1</i> E <i>VIM</i> | 56 |
| 5.7 | ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE E-CADERINA..... | 58 |
| 6 | DISCUSSÃO..... | 59 |
| 7 | CONCLUSÕES..... | 64 |
| | REFERÊNCIAS..... | 65 |

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o mais frequente e a principal causa de morte por câncer no mundo entre as mulheres (TORRE et al., 2015). A causa de morte por câncer de mama, em 90% dos casos, deve-se à ocorrência de metástases (CUMMINGS et al., 2014). A transição epitélio-mesênquima (TEM) é um dos mecanismos que contribuem para este processo, proporcionando mudanças nas células epiteliais, as quais perdem a polaridade apical-basal, e adquirem características mesenquimais. Diversos autores demonstraram que a TEM contribui para a migração destas células a órgãos distantes em relação ao tumor primário, a invasão e o estabelecimento nestes locais (KALLURI; WEINBERG, 2009; NIETO et al., 2016; THIERY, 2002).

O conhecimento dos mecanismos moleculares que ocorrem na TEM pode ajudar a entender a complexidade dessa etapa na tumorigênese e, conseqüentemente, levar ao desenvolvimento ou uso de novas terapias, com o objetivo de diminuir as taxas de mortes por câncer (MARCUCCI; STASSI; DE MARIA, 2016; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017). O uso de fármacos utilizados para determinadas doenças vem sendo testado em neoplasias malignas. Isto é possível já que os mecanismos moleculares de algumas doenças têm em comum as vias do desenvolvimento do câncer (GUPTA et al., 2013; WÜRTH et al., 2016). A principal vantagem nessa abordagem é a possibilidade de aplicação imediata do medicamento, uma vez que este já foi aprovado para uso humano em estudos clínicos. Ademais, traz a redução de tempo e, principalmente, de financiamento para o desenvolvimento de um novo fármaco. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da liraglutida (Victoza®, Novo Nordisk), um medicamento usado para o tratamento da diabetes mellitus do tipo 2, em linhagens tumorais de mama (MCF-7, MDA-MB-231 e MDA-MB-436) e avaliar sua ação na viabilidade, na capacidade migratória das células, na expressão e na metilação de genes marcadores da TEM. Além disso, o fator de crescimento epidermal (EGF) foi utilizado na linhagem MCF-7 como indutor da TEM para se avaliar o efeito da liraglutida posterior a esta indução.


2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o tipo mais diagnosticado e a principal causa de morte por câncer no mundo entre as mulheres. Em 2012, foram estimados, mundialmente, aproximadamente 1,7 milhões de novos casos e 521.900 mortes decorrentes deste câncer (TORRE et al., 2015). Nos Estados Unidos, esta neoplasia maligna é a segunda causa de morte por câncer em mulheres entre 20 a 59 anos, sendo correspondente a 29% do total de novos casos de câncer em mulheres e 14% do total de mortes (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016).

No Brasil, de acordo com a publicação *Estimativa 2016 – Incidência de Câncer no Brasil* do Instituto Nacional de Câncer (INCA), válida também para o ano de 2017, estima-se a ocorrência de 57.960 novos casos de câncer de mama, com um risco de 56 casos a cada 100 mil mulheres (Figura 1) (INCA, 2015).

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2016 E 2017 EM MULHERES, EXCETO PELE NÃO MELANOMA

| | Localização Primária | Casos | % |
|--|-----------------------------|--------|-------|
|  Mulheres | Mama feminina | 57.960 | 28,1% |
| | Cólon e Reto | 17.620 | 8,6% |
| | Colo do útero | 16.340 | 7,9% |
| | Traqueia, Brônquio e Pulmão | 10.890 | 5,3% |
| | Estômago | 7.600 | 3,7% |
| | Corpo do útero | 6.950 | 3,4% |
| | Ovário | 6.150 | 3,0% |
| | Glândula Tireoide | 5.870 | 2,9% |
| | Linfoma não Hodgkin | 5.030 | 2,4% |
| | Sistema Nervoso Central | 4.830 | 2,3% |

Estimativa da incidência em mulheres dos dez tipos de câncer mais incidentes na população brasileira, desconsiderando os tipos de câncer de pele não melanoma, prevista para os anos de 2016 e 2017.

Fonte: Adaptado de INCA, 2015.

A primeira classificação de tumores de mama foi baseada nas características morfológicas. Esta classificação foi atualizada em 2012, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), na sua quarta edição da Classificação dos Tumores de Mama. O subtipo mais frequente, aproximadamente 75%, é o carcinoma invasivo de tipo não especial, conhecido anteriormente como carcinoma ductal invasivo. O segundo subtipo mais frequente é o carcinoma lobular invasivo, representando em torno de 10% dos casos (LAKHANI et al., 2012).

A tecnologia de micro arranjos de DNA proporcionou a análise do perfil de expressão gênica dos tumores de mama e sua classificação por meio do perfil molecular. Em 2000, Perou e colaboradores publicaram o primeiro trabalho que classificou o câncer de mama em subtipos baseado na expressão gênica e, posteriormente, novas assinaturas genéticas foram incluídas, gerando os subtipos considerados mais importantes atualmente, sendo eles: luminal A e B, HER2 positivo, basalóide, mama normal e *claudin-low* (EROLES et al., 2012; PEROU et al., 2000). De uma forma geral, o subtipo luminal A apresenta receptores de estrógeno (RE) positivo e HER2 negativos; o luminal B é RE e HER2 positivos; os tumores do subtipo HER2 são negativos para RE e HER2 positivo; o subtipo mama normal possui expressão de genes de tecido adiposo e RE, receptor de progesterona (RP) e HER2 negativos; o *claudin-low* é caracterizado por uma baixa expressão de genes envolvidos com junções celulares e glicoproteínas de adesão célula-célula, como as claudinas 3, 4 e 7, as ocludinas e a E-caderina; e, os tumores basalóides são normalmente negativos para RE, RP e para HER2 e positivos para o receptor de crescimento epidermal (EGFR) e citoqueratina 5 (EROLES et al., 2012). A negatividade para RE, RP e HER2 caracteriza os tumores triplo-negativos (TN), que representam de 15% a 20% dos cânceres de mama e apresentam um dos piores prognósticos devido à falta de alvos específicos para terapia (DENT et al., 2007; EROLES et al., 2012; HSU et al., 2017).

A grande heterogeneidade intratumoral é o principal obstáculo para um tratamento efetivo no câncer de mama. O tratamento é baseado na presença de marcadores, como o RE, o RP, resultando na terapia hormonal, e HER2 positivo, que resulta no uso do anticorpo monoclonal Trastuzumabe (Herceptin®), além de radioterapia (EROLES et al., 2012).

A disseminação metastática é responsável por aproximadamente 90% das mortes de câncer de mama (CUMMINGS et al., 2014). Este processo ocorre devido à habilidade das células tumorais se propagarem, a partir do tumor primário, por meio dos vasos sanguíneos e linfáticos para órgãos distantes no corpo, tais como os ossos, pulmões, fígado e cérebro (WEIGELT; PETERSE; VAN 'T VEER, 2005).

2.1.1 Mecanismos moleculares do câncer

A carcinogênese é um processo pelo qual as células normais evoluem para um estado neoplásico com múltiplas etapas, nas quais as células se tornam geneticamente instáveis, com o acúmulo sucessivo de alterações genéticas e epigenéticas. Algumas características deste desenvolvimento são: a ativação de oncogenes, a inativação de genes supressores tumorais, mutações, que resultam na proliferação celular descontrolada do tumor primário, invasão e metástase das células tumorais para locais distantes da origem (ALBERTSON et al., 2003; BAYLIN; JONES, 2011).

Hanahan e Weinberg (2011) descreveram que a origem do câncer se baseia em um acúmulo de alterações celulares que são capazes de levar ao crescimento e à disseminação tumoral. Essas alterações se resumem em: manutenção da sinalização proliferativa, evasão de supressores de crescimento, resistência à morte celular, potencial replicativo ilimitado, indução da angiogênese, invasão tecidual e metástase, instabilidade genômica e mutação, promoção da inflamação tumoral, desregulação energética e metabólica e evasão da destruição imunológica (Figura 2). Cada uma dessas capacidades pode ser adquirida por diferentes mecanismos moleculares, resultando na ativação ou inativação de diferentes genes, assim como de vias gênicas (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

FIGURA 2 – ALTERAÇÕES CELULARES NO CÂNCER



Fonte: Adaptado de Hanahah; Weinberg, 2011

Além das alterações citadas, um importante mecanismo envolvido na progressão de carcinomas para um estágio metastático é a transição epitélio-mesênquima (TEM), no qual as células tumorais perdem a adesão com outras células e com a matriz extracelular (MEC) que possibilita sua migração e invasão para outros lugares do corpo (KALLURI; WEINBERG, 2009).

2.1.2 Transição epitélio-mesênquima (TEM)

A transição epitélio-mesênquima (TEM) é um processo biológico no qual as células epiteliais passam por mudanças moleculares e celulares para adquirir um fenótipo mesenquimal, com capacidade migratória e invasiva (KALLURI; WEINBERG, 2009). O conceito de TEM foi originalmente definido no desenvolvimento embrionário como uma conversão morfológica para originar células mesenquimais (HAY, 2005; THIERY, 2002).

A TEM é caracterizada por três eventos distintos: o tipo I, que ocorre durante a embriogênese, sendo fundamental na formação de órgãos e tecidos; tipo II, que está

associado à cicatrização e regeneração de tecidos causados por traumas e/ou lesões inflamatórias; e, o tipo III, que, diferente dos outros tipos fisiológicos, está relacionado com a adaptação patológica dos carcinomas durante os processos de invasão e metástase (KALLURI; WEINBERG, 2009).

Nos carcinomas, o processo de invasão e metástase ocorre quando as células do tumor adquirem características mesenquimais, por meio de diferentes fatores, como as moléculas de adesão, matriz extracelular (MEC), metaloproteases de matriz (MMPs) e inibidores teciduais de metaloproteases (TIMP). Inicialmente as células se dissociam de sua unidade epitelial, por meio da perda da polaridade apical-basal e os contatos célula-célula, convertendo-se em células capazes de se locomoverem. Estas células em transição precisam se desfazer do contato entre a lâmina basal e a MEC, que são mediadas por diversas proteínas. A lâmina basal é uma estrutura composta de colágeno do tipo IV, laminina e outras moléculas, assim, as células ativam programas moleculares capazes de degradar e sintetizar *de novo* a MEC, o que resulta na invasão através da membrana basal e a contínua migração (ZAVADIL; BÖTTINGER, 2005). Entretanto, essa transição é um processo reversível, sendo que após a migração celular, a célula com características mesenquimais volta ao seu fenótipo epitelial, passando a expressar novamente os genes marcadores epiteliais, em um processo denominado transição mesênquima-epitélio (MET) (KALLURI; WEINBERG, 2009).

2.1.3 Proteínas relacionadas com a TEM

Os fatores de crescimento e citocinas, tais como a via do fator de crescimento epidermal (EGF) e da superfamília do fator de crescimento transformante (TGF), promovem a TEM por meio de vias de sinalização específicas, que conseqüentemente atuam no processo de malignidade tumoral, no desenvolvimento embrionário e durante o surgimento de diversas doenças (THIERY et al., 2009). Uma diminuição da expressão de marcadores epiteliais, como a E-caderina e citoqueratinas, e o aumento da expressão de marcadores mesenquimais, tais como a fibronectina, snail, N-caderina, vimentina e das metaloproteases de matriz, são marcadores específicos que

caracterizam a TEM (KALLURI; WEINBERG, 2009; ORLICHENKO; RADISKY, 2008; ZEISBERG; NEILSON, 2009).

2.1.3.1 E-caderina e vimentina

A E-caderina, codificada pelo gene supressor tumoral *CDH1*, é uma glicoproteína transmembrana, pertencente à família das caderinas, que promove os contatos intercelulares dependentes de cálcio. A sua função de adesão é dependente das interações de sua parte citoplasmática com a actina do citoesqueleto, através das cateninas intracelulares (VAN ROY; BERX, 2008).

A expressão de E-caderina é perdida durante o desenvolvimento da maioria dos carcinomas e esta perda é a principal característica do processo de TEM, invasão e metástase (KALLURI; WEINBERG, 2009). Consequentemente, E-caderina é referida como um supressor tumoral e a sua re-expressão forçada nas células de carcinomas pode reverter os processos de malignidade (SEMB; CHRISTOFORI, 1998).

Uma célula em TEM apresenta uma diminuição significativa nos níveis de E-caderina e um aumento considerável de vimentina, molécula relacionada com a reorganização do citoesqueleto e a migração celular (KALLURI; WEINBERG, 2009). A vimentina é uma proteína da família dos filamentos intermediários, encontrada em diferentes células de vários tecidos durante os estágios de desenvolvimento, e mantém a integridade celular e tecidual (COULOMBE; WONG, 2004). Na TEM, a vimentina tem um papel crucial na manutenção da arquitetura do citoesqueleto e na força mecânica celular, bem como na organização da polaridade dos microtúbulos e na motilidade celular, o que resulta na malignidade tumoral (LIU et al., 2015). Além disso, a vimentina está correlacionada com a agressividade tumoral (RAYMOND; LEONG, 1989) e a uma menor taxa de sobrevida em pacientes com câncer de mama (LIU et al., 2015).

Um dos principais repressores da expressão do gene *CDH1* é o snail, um fator de transcrição que se liga diretamente nos *E-boxes* da região promotora de *CDH1*, reprimindo assim sua expressão por meio do recrutamento do complexo transcricional repressor mSin3A/HDAC (BATLLE et al., 2000; CANO et al., 2000; PEINADO et al., 2004). A expressão de snail nos carcinomas de mama está associada com as

metástases e à recorrência tumoral. Sua sinalização resulta na diminuição de expressão de outras moléculas epiteliais, como as claudinas e as ocludinas; e, induz a expressão de genes associados com fenótipos mesenquimais e invasivos, como a fibronectina e a MMP-9 (PEINADO et al., 2004).

2.1.3.2 Metaloproteases de matriz (MMPs)

As metaloproteases são endopeptidases dependentes de zinco, subdivididas em 27 famílias, incluindo a família das metzincinas. Esta família compreende 23 metaloproteases de matriz (MMPs) secretadas ou ancoradas à membrana (JACKSON; NEBERT; VASILIOU, 2010). São sintetizadas como zimogênios inativos com um pro-domínio que deve ser clivado para se tornarem ativas. Quando ativas, elas podem ser inibidas pelos inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs): TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. A TIMP-2 é um forte inibidor da gelatinase MMP-2, entretanto, possui um papel duplo: em baixas concentrações é um ativador, ao lado da MMP-14 (TIMP-2-MMP-14-PROMMP-2 ou PROMMP-9); enquanto que em altas concentrações, age como um inibidor da MMP-2 (JACKSON et al., 2016).

As MMPs participam de vários processos celulares, como no desenvolvimento embrionário, cicatrização, involução do útero pós-parto (JACOB; PREKERIS, 2015), sendo também importantes na progressão de tumores, uma vez que degradam os componentes da matriz extracelular (MEC), como o colágeno, possibilitando assim a migração das células tumorais através dos vasos sanguíneos e linfáticos (NABESHIMA et al., 2002).

A metaloprotease de matriz do tipo 2, MMP-2 ou collagenase do tipo IV, pertence ao grupo das gelatinases e são caracterizadas pela presença do domínio de ligação ao colágeno localizado na porção catalítica (MORGUNOVA et al., 1999). É secretada na forma de zimogênio (PROMMP-2), sendo necessária a clivagem pós-traducional do seu pró-domínio para sua ativação, na presença das moléculas TIMP-2 e MMP-14 (MT1-MMP) na superfície celular (DERYUGINA et al., 2001). A MMP-2 é capaz de clivar diversos substratos, tais como citocinas, fatores de crescimento, receptores e fatores de ligação, além de componentes da MEC, como os colágenos do

tipo I e IV e a fibronectina (BAUVOIS, 2012). Além disso, a MMP-2 está presente em altos níveis de expressão e atividade em diferentes tumores malignos, como o de mama e o melanoma, que apresentam elevado risco de metástases (HOFMANN et al., 2000; TALVENSAARI-MATTILA et al., 1998; TÊTU et al., 2006).

O seu par cognato, a MMP-14, pertence ao grupo das metaloproteases de matriz tipo membrana (MT-MMPs) que se encontram ancoradas às membranas, também denominada como MT1-MMP (SATO et al., 1994). A MMP-14 é expressa na superfície de diferentes tipos celulares, sendo importante na locomoção celular e degradação de várias moléculas da MEC (como o colágeno do tipo I, II e III, laminina, fibronectina) e ativação de outras MMPs solúveis, como a MMP-2 (ITOH, 2006; SATO et al., 1994).

As MMP-2 e MMP-14 têm sua expressão regulada por modificações transcricionais, citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas (CLARK et al., 2008) e, também, por mecanismos epigenéticos, tais como a metilação do DNA e modificações das histonas (CHERNOV et al., 2009; PEREIRA et al., 2014). Resultados obtidos no nosso grupo de pesquisa mostraram que a região promotora do gene *MMP-2* após o cultivo das linhagens MCF-7 e MDA-MB-436 com a fibronectina, sofreu uma desmetilação de 30%, assim como ganho de marcas de cromatina ativa, mostrando diferentes mecanismos de ativação e controle da expressão de MMP-2 (PEREIRA et al., 2014).

2.2 FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGF)

O fator de crescimento epidermal (EGF – do inglês *epidermal growth factor*) foi descoberto em 1962 por Stanley Cohen (COHEN, 1962), quando estudava a abertura e o desenvolvimento precoce das pálpebras e dos dentes incisivos, respectivamente, em camundongos recém-nascidos. Estudos posteriores realizados em cultivo de células de fibroblastos mostraram o efeito direto de EGF sobre a proliferação e a diferenciação celular (COHEN, 1986).

O EGF é um peptídeo monomérico que promove a mitogênese nos tecidos da endo, meso e ectoderme (CARPENTER; COHEN, 1979). Este fator de crescimento tem um importante papel na proliferação e na migração celular (COHEN, 1986). A família do

receptor de EGF (EGFR), também conhecida como HER e ErbB, pertence à família de receptores tirosina quinase e é composta por quatro tipos: o EGFR/ErbB-1, o ErbB-2, o ErbB-3 e o ErbB-4 (HYNES; LANE, 2005). Os ligantes de EGFR são divididos em três grupos: o primeiro inclui o EGF, o fator de crescimento transformante alfa (TGF α) e a anfirregulina, os quais se ligam especificamente ao EGFR. O segundo é composto pela beta celulina, o EGF ligado à heparina (HB-EGF) e a epirregulina, que se ligam ao EGFR e ErbB-4. O terceiro é composto das neuregulinas e possui dois subgrupos baseados na sua capacidade de se ligarem ao ErbB-3 e ErbB-4 (NRG1 e NGR2) ou somente ao ErbB-4 (NRG3 e NRG4) (HYNES; LANE, 2005).

A interação do EGFR e seus ligantes causam a sua homo e heterodimerização, resultando, juntamente com outros sinais estimuladores, na ativação de duas principais vias: a RAS-RAF-MEK-MAPK e a via PI3K-Akt; que culminam na sobrevivência e progressão celular, além da invasão, metástase e angiogênese em células tumorais (MASUDA; ZHANG, 2012).

O EGFR atua em diferentes processos do desenvolvimento dos tecidos, como na morfogênese pulmonar, no qual age na sinalização das metaloproteases, como a MMP-2 e MMP-14, cruciais na formação dos alvéolos (KHERADMAND; RISHI; WERB, 2002); e no desenvolvimento da glândula mamária, o qual é influenciado por diversos fatores de crescimento, dentre eles o fator de crescimento epitelial (EGF), que são diferentemente expressos nas células epiteliais e estromais mamárias durante os estágios do desenvolvimento (CASALINI et al., 2004). Conseqüentemente, muitos destes ligantes e receptores são altamente expressos e/ou mutados no câncer de mama (HARDY et al., 2010).

2.2.1 Efeito do EGF no câncer

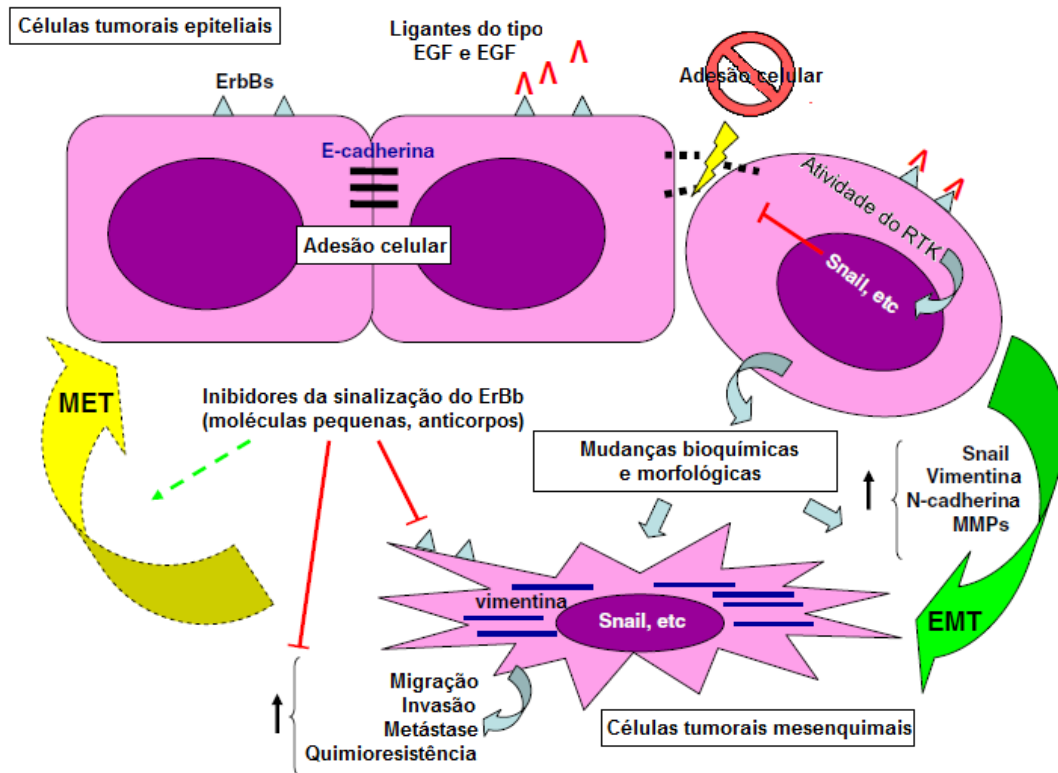
Os receptores da família de EGF são superexpressos em vários tipos de câncer, incluindo o câncer de pulmão de células não-pequenas (ETTINGER, 2006), de colo retal (BERG; SOREIDE, 2012), o cervical (HAGEMANN et al., 2007), de mama e o de ovário (SLAMON et al., 1989). No câncer de mama, a concentração de EGF presente no soro de pacientes é maior quando comparado aos indivíduos saudáveis,

estando os níveis de EGF correlacionados com a progressão da doença (KIM et al., 2009).

As proteínas superexpressas em tumores, em contrapartida com seu tecido normal, também estão relacionados com a indução pelo EGF, como é o caso da proteína quinase de adesão focal (FAK), importante para a mobilidade e metástase e que está associada com a expressão da MMP-9 após a ativação do EGFR pelo EGF (JEONG et al., 2014). A sinalização por meio da ligação do EGF ao receptor EGFR é capaz de induzir a TEM, por meio da perda de junção célula-célula pela depleção de E-caderina, tanto por sua internalização quanto por sua repressão a nível transcricional via snail (LU et al., 2003; XU et al., 2015), além do aumento da expressão de metaloproteases e invasão de células tumorais (JEONG et al., 2014; KONDAPAKA; FRIDMAN; REDDY, 1997; ROTHHUT et al., 2007).

O EGF também influencia na indução da TEM (Figura 3), como visto na linhagem tumoral de mama MCF-7 que, embora seja caracterizada como epitelial e não-invasiva, uma vez submetida ao tratamento com EGF, foi capaz de apresentar características da TEM, como a reorganização do citoesqueleto, perda de polaridade e do contato célula-célula, concomitantemente ao aumento da expressão de vimentina e snail (LACROIX; LECLERCQ, 2004; RAE et al., 2004; VERGARA et al., 2011). Essas características foram observadas nas células tumorais ovarianas (CHENG; AUERSPERG; LEUNG, 2012) e em células tumorais cervicais quando induzidas pelo EGF (LEE et al., 2008). Além disso, a sinalização mediada pela ligação da fibronectina ao receptor $\alpha 5\beta 1$ é capaz de regular a TEM estimulada pela ligação de EGF no seu receptor, diminuindo a expressão proteica de E-caderina e aumentando a de vimentina (LEE et al., 2008).

FIGURA 3 – ERBBs E SEUS LIGANTES NA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA



A sinalização dos receptores de EGF (ErbB) estimula as células tumorais epiteliais à transição epitélio-mesênquima (TEM) pela ativação de diferentes receptores tirosina quinase (RTK). Isto resulta no aumento da atividade de fatores de transcrição, como o snail, que é um repressor da E-cadherina. Consequentemente, estas células tornam-se com o formato alongado, expressam moléculas associadas ao fenótipo mesenquimal, como a vimentina, N-caderina e certas metaloproteases de matriz (MMPs), o que resulta no aumento da capacidade migratória e invasiva. Inibidores da sinalização de ErbB interferem no processo de TEM em algumas células tumorais e resultam na reversão da TEM.

Fonte: Adaptado de Hardy, 2010.

A relação de EGF com os diferentes tipos de câncer revelam um papel fundamental deste fator de crescimento na proliferação e migração celular, como no tratamento com EGF em linhagens tumorais de mama (FITZPATRICK; LACHANCE; SCHULTZ, 1984; KONDAPAKA; FRIDMAN; REDDY, 1997; OSBORNE et al., 1980), assim como a migração e invasão quando estimuladas com EGF e/ou TGF β (LI; LI, 2015).

A expressão da DNA metiltransferase (DNMT), enzima responsável pela metilação do DNA, é regulada pela via RAS e ERK/MAPK, que são vias reguladas por EGFR (PATRA, 2008). Samudio-Ruiz e Hudson (2012) mostraram que a estimulação em longo prazo de células tumorais ovarianas com EGF é capaz de levar a uma

ativação constante do EGFR e, conseqüentemente, alterar a atividade da DNMT e a taxa de metilação global do DNA. Essa reestruturação do padrão de metilação do DNA está associada com a diminuição da metilação de alguns genes e com o aumento de outros (SAMUDIO-RUIZ; HUDSON, 2012).

2.3 EPIGENÉTICA

O termo epigenética foi descrito em 1942 por Conrad Waddington para explicar os processos pelos quais os genes interagem com o ambiente para produzir determinado fenótipo (WADDINGTON, 2012). Atualmente, o termo epigenética se refere ao fenômeno que envolve a alteração herdável da expressão gênica que não implica em uma alteração da sequência de nucleotídeos e, sim, uma modificação da conformação do DNA, resultando no aumento de expressão ou no silenciamento gênico (BIRD, 2002). As três alterações epigenéticas conhecidas são a metilação do DNA, as modificações pós-traducionais das histonas e os RNAs não codificadores (ncRNAs) (GUIL; ESTELLER, 2009).

2.3.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é um mecanismo importante no silenciamento e na ativação gênica e confere estabilidade da estrutura cromossômica. Esse mecanismo tem um importante papel na embriogênese, diferenciação de células, no processo de *imprinting* genômico, na inativação do cromossomo X e na estabilidade genômica (REIK, 2007).

A metilação do DNA é uma modificação química covalente resultante da adição de um grupamento metil (-CH₃) no carbono 5 de citosinas seguidas por guaninas na sequência gênica, os chamados dinucleotídeos CpG (BIRD, 2002). A metilação do CpG é catalisada por uma família de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) e ocorre quando um grupo metil, oriundo da S-adenosilmetionina (SAM – doador universal de metil), é adicionado à posição 5 do anel pirimídico da citosina (C), gerando a 5-metilcitosina (5mC) (BESTOR, 2000).

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

As regiões que têm um elevado teor de G+C em relação à média do genoma são denominadas “ilhas de CpG” (CGIs). As ilhas CpGs se sobrepõem na região promotora de 70% dos genes em humanos, sendo tipicamente menos metilados do que os dinucleotídeos CpG encontrados fora das ilhas (SAXONOV; BERG; BRUTLAG, 2006). Gardiner-Garden e Frommer (1987) definiram as CGIs no genoma como uma região de 200 pares de bases de DNA, com uma relação de G+C superior a 50%, e a razão entre CpG observado/esperado maior ou igual a 0,6 (GARDINER-GARDEN; FROMMER, 1987).

No câncer, a metilação do DNA é profundamente alterada; nos tumores humanos há uma perda de metilação global e uma aquisição de padrões de hipermetilação em certos promotores, especialmente nos genes supressores tumorais, que levam sua inativação, uma das marcas típicas das células tumorais. Além disso, estas mudanças na metilação do DNA estão associadas com a presença de um padrão aberrante de modificações de histonas (ESTELLER, 2007).

2.3.2 Modificações pós-traducionais das histonas

Em eucariotos, o material genético é compactado em uma estrutura denominada cromatina, a qual é formada de DNA e proteínas. A unidade funcional da cromatina de eucariotos é o nucleossomo, que constitui em aproximadamente 147 nucleotídeos arranjados em volta de um octâmero de proteínas denominadas de histonas (KORNBERG; LORCH, 1999; MCGHEE; FELSENFELD, 1980). Os quatro diferentes tipos de histonas que compõem o nucleossomo (H2A, H2B, H3 e H4) possuem caudas N-terminais que são passíveis de sofrer uma variedade de modificações pós-traducionais em diversos resíduos de aminoácidos. A acetilação e

metilação de histonas foram inicialmente descritas por Allfrey que sugeriu o papel destes mecanismos na regulação da expressão gênica (ALLFREY; FAULKNER; MIRSKY, 1964; KORNBERG; LORCH, 1999). A partir disto, outras modificações foram sendo descobertas e compõem o que se denomina de “o código de histonas” (STRAHL; ALLIS, 2000).

Entre as principais modificações descritas podemos enumerar a acetilação, a metilação, a fosforilação, a ubiquitinação, a sumoilação, a deiminação, entre outras (KOUZARIDES, 2007). Estas modificações são catalisadas por diferentes enzimas, como as histonas metiltransferases (HMTs), desmetilases (HDMs), acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs) (HABERLAND; MONTGOMERY; OLSON, 2009).

2.3.3 RNA não codificadores (ncRNA)

Os RNA não codificantes (ncRNA, do inglês *noncoding RNA*) são considerados todas as moléculas de RNA que não são traduzidas em proteínas, mas são capazes de regular a expressão gênica. São divididos em diferentes grupos, sendo os pequenos (miRNAs) e os longos RNA (lncRNAs) os mais estudados no câncer (MATTICK; MAKUNIN, 2006).

Há muitos modos de ação destes RNAs, entre eles estão o recrutamento de marcas epigenéticas ligadas ao silenciamento transcricional, bloqueio da transcrição por impedimento da ligação de RNA polimerase II e diminuição de RNA mensageiro (LIZ; ESTELLER, 2016).

O perfil de expressão de miRNAs é significativamente diferente entre as células normais e tumorais e muitos já foram descritos como envolvidos na invasão e metástase no câncer de mama (GUIL; ESTELLER, 2009). Os miRNAs desregulados em cânceres são denominados de “oncomiRs”, e podem ser oncogênicos ou supressores tumorais (ESQUELA-KERSCHER; SLACK, 2006). Assim como os miRNAs, os lncRNA tem envolvimento direto na expressão e repressão de genes relacionados na carcinogênese, em especial na TEM. Um exemplo de lncRNA é o hotair que está envolvido em muitos processos associados à carcinogênese, como a motilidade,

proliferação, apoptose, invasão e metástase das células tumorais (HAJJARI; SALAVATY, 2015). O lncRNA hotair liga e marca a subunidade catalítica das metiltransferases EZH2, do complexo PRC2, pelo seu domínio estrutural no terminal 5'. O terminal 3' liga e recruta a LSD1, uma desmetilase específica de lisina, a qual catalisa a desmetilação de H3K4, modificação esta associada com a repressão gênica (TSAI et al., 2010). Hotair é considerado um biomarcador de pior prognóstico em muitos tipos de câncer, como o de mama, relacionado com a repressão gênica de *CDH1* (CAO et al., 2008; HAJJARI; SALAVATY, 2015).

2.4 LIRAGLUTIDA

A identificação de fármacos específicos para uma determinada doença, como a diabetes, em novas indicações terapêuticas para outras doenças, como o câncer, é conhecida como reposição de fármacos. Isto é possível devido às origens moleculares comuns de diversas doenças, sendo estimado que aproximadamente 90% dos fármacos aprovados possuem indicações secundárias. A principal vantagem desta abordagem é que a farmacocinética, farmacodinâmica e a toxicidade são, em geral, bem definidas devido aos estudos pré-clínicos já estabelecidos (GUPTA et al., 2013).

A alta incidência, agressividade e a letalidade de muitos tipos de cânceres, juntamente com os efeitos colaterais e a resistência aos fármacos antitumorais na clínica, representam respaldos para a reposição de fármacos. Além disso, o desenvolvimento de fármacos contra o câncer é particularmente longo e de alto custo, o que torna a reposição de fármacos promissora para o desenvolvimento de novos tratamentos (WÜRTH et al., 2016).

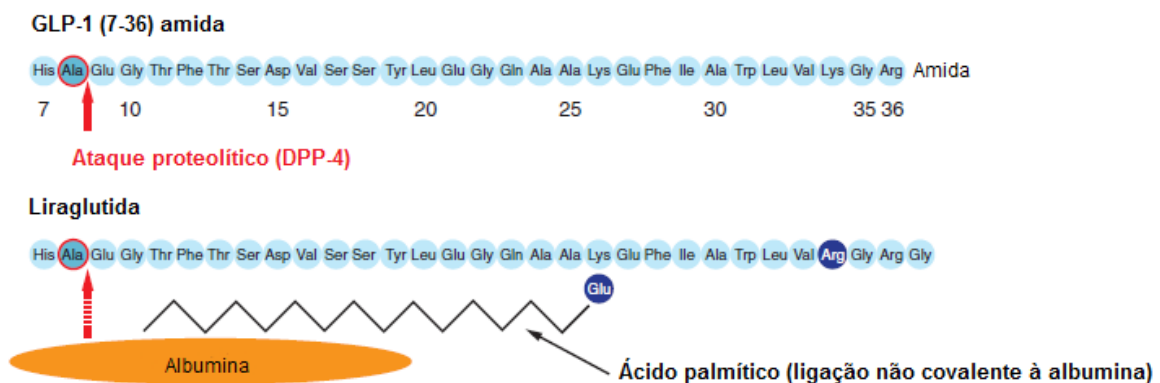
A nova classe de fármacos hipoglicemiantes agonistas do receptor do peptídeo semelhante ao glucagon (do inglês *Glucagon-like-peptide-1*, GLP-1) conferiu um imenso progresso na terapia da diabetes mellitus do tipo 2 (DMT2) (MEIER, 2012). Porém, devido o GLP-1 promover a proliferação das células beta-pancreáticas e haver receptores de GLP-1 em outros órgãos do corpo, como no fígado e na tireoide, acreditou-se que estes agonistas poderiam ocasionar o surgimento de câncer. Entretanto, o primeiro fármaco desta classe liberado no mercado, a exenatida (análoga

ao GLP-1), apresentou efeitos pró-apoptóticos e seletivos às células tumorais, especialmente em linhagens tumorais de mama (FIDAN-YAYLALI et al., 2015; LIGUMSKY et al., 2012).

Ligumsky e colaboradores (2012) utilizaram a exenatida para avaliar seus efeitos na linhagem normal de mama HB2 e nas tumorais de mama e mostraram que a exenatida não afeta a viabilidade de células normais, ao passo que a viabilidade das linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 foram afetadas em até 50%, devido ao aumento de expressão de inibidores do ciclo celular, como p21 e p53, induzidos pelo aumento do AMP cíclico. Além de ser uma inibidora de proliferação específica para células tumorais de mama, ela também sensibilizou a linhagem MCF-7 a quimioterápicos (LIGUMSKY et al., 2012).

A liraglutida (Victoza®, Novo Nordisk) é um medicamento análogo ao GLP-1, a qual foi obtida pela adição de um espaçador ácido alfa-glutâmico acoplado a um grupo de ácido graxo C16 e pela substituição do aminoácido lisina pela arginina na posição 34 (Figura 4), alcançando uma meia-vida de até 20 horas devido à ligação não covalente à albumina, e, assim, possibilitando uma dose diária deste medicamento (RUSSELL-JONES, 2009).

FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DA LIRAGLUTIDA COMPARADA AO GLP-1



Estrutura química do GLP-1 (7-36) amida e da liraglutida. Esta última possui 97% de homologia com o GLP-1, cuja diferença está na adição do ácido palmítico na lisina de posição 26, o que aumenta o tempo da liraglutida no organismo por se ligar à albumina, e pela troca da lisina pela arginina na posição 34. A DPP-4 é uma enzima responsável pela degradação da GLP-1 (flecha vermelha) e sua atividade é diminuída na liraglutida (flecha rajada vermelha) devido à ligação à albumina.

Fonte: Adaptado de Nauck, 2016.

Um estudo recente foi realizado na população do Reino Unido com o objetivo de avaliar o efeito dos fármacos análogos ao GLP-1, como a exenatida e a liraglutida, inibidores da DPP-4 e outros medicamentos que baixam os níveis de glicose, com o risco de desenvolvimento de câncer de mama em mulheres com DMT2. A avaliação foi baseada somente em pacientes que iniciaram o tratamento com estes medicamentos, sendo desconsiderado quem já havia utilizado insulina anteriormente. Não houve relação entre o uso da liraglutida com o aumento do risco de desenvolver câncer de mama em pacientes durante os anos selecionados no estudo (HICKS et al., 2016).

A DMT2 e o câncer de mama possuem pelo menos três mecanismos moleculares em comum: a via da insulina, a via dos fatores de crescimento do tipo insulina e a regulação pelos hormônios sexuais (WOLF et al., 2005); e, diferente de outros agonistas de GLP-1R, como a exenatida, ainda não se tem estudos que relatam o efeito da liraglutida sobre células tumorais de câncer de mama.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da liraglutida sobre a migração celular, metilação e expressão gênica de marcadores da transição epitélio-mesênquima nas linhagens tumorais de mama, assim como avaliar seu efeito após estímulo com o fator de crescimento epidermal (EGF).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da liraglutida no fenótipo das linhagens tumorais de mama por meio dos ensaios de migração celular.
- Avaliar o efeito da liraglutida na modulação da expressão gênica dos genes relacionados com a transição epitélio-mesênquima por meio dos ensaios de expressão gênica e metilação do DNA.
- Avaliar o efeito da liraglutida na expressão proteica de E-caderina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

As linhagens tumorais de mama utilizadas foram: MCF-7 (tipo luminal, RE positivo, PR positivo, HER2 negativo), MDA-MB-231 e a MDA-MB-436 (tipo basal e triplo-negativa) (NEVE et al., 2006; SUBIK et al., 2010) e a HB4a, uma linhagem luminal de mama normal, imortalizada com SV-40, mas não transformada (STAMPS et al., 1994). Estas linhagens foram cedidas pelo Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer – SP em 2005.

4.2 CULTIVO CELULAR E TRATAMENTOS

Os cultivos das linhagens celulares foram realizados em meio RPMI 1640 (GIBCO) suplementados com 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (GIBCO), 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO) inativado a temperatura de 55°C por 30 minutos, e incubados em estufa 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂, de acordo com o protocolo da ATCC. A linhagem HB4a foi suplementada também com hidrocortisona e insulina.

A liraglutida utilizada foi vendida pela indústria farmacêutica com o nome de Victoza®, Novo Nordisk. O fármaco é vendido em forma de caneta, similar à utilizada para insulina, na concentração de 6 mg/ml. Para uso nos tratamentos, o fármaco foi diluído a 1600 nM em PBS 1X, sendo conservada a 4°C, como recomendado pelo fabricante. Nos procedimentos em que foi necessária a contagem das células, o cultivo foi tratado com Tryple® (GIBCO) por 4 minutos, seguido de neutralização com RPMI 1640 contendo SFB e centrifugação de 4 minutos a 2500 rpm. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer.

Todos os tratamentos descritos foram realizados em triplicata experimental.

4.2.1 Viabilidade celular

A citotoxicidade celular da linhagem de mama normal, HB4a, e das linhagens tumorais de mama MCF-7, MDA-MB-231 e MDA-MB-436 tratadas com a liraglutida foram avaliadas por meio do ensaio de exclusão do azul de Trypan, nos quais as células não viáveis, ao se observar no microscópio óptico, apresentaram no seu interior a coloração azul. As seguintes concentrações de liraglutida foram testadas: 10, 30, 50, 70 e 100 nM, nos tempos de 24 e 48 horas.

Aproximadamente 70.000 células foram distribuídas em poços da placa de 24. Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS 1X, adicionados RPMI contendo 0,1% SFB e nos tratamentos foram acrescentados liraglutida nas concentrações citadas acima nos períodos de 24 e 48 horas. Ao final, as células foram tratadas com Tryple® (GIBCO) e contadas utilizando o corante azul de Trypan 0,5%.

4.2.2 Tratamento com o fator de crescimento epidermal (EGF)

Para o tratamento com o EGF (Life Technologies) cerca de 300.000 células foram passadas para cada poço de uma placa de 6 poços. Nos poços do tratamento foram acrescentados 50 ng/ml de EGF (XU et al., 2015) junto ao meio de cultivo. Foram testados os períodos de 4 e 10 dias de tratamento com EGF, sendo repostos EGF a cada 48 horas.

4.2.3 Tratamento com a liraglutida

Para o tratamento com a liraglutida (Victoza®, Novo Nordisk), cerca de 300.000 células foram transferidas para cada poço de uma placa de 6. Após 24 horas, as células foram lavadas três vezes com tampão PBS 1X, para a retirada do SFB, sendo adicionado posteriormente 2 ml de meio RPMI 0,1% SFB e, nos poços de tratamento, foi acrescentada liraglutida na concentração de 30 nM. Foram realizados os períodos de 24 e 48 horas de tratamento, sendo que a liraglutida foi repostada a cada 24 horas.

Nos tratamentos de EGF com a adição posterior de liraglutida (EGF/liraglutida) as células foram cultivadas de modo similar ao tratamento com EGF por 4 dias, sendo que no quarto dia as células foram lavadas três vezes com PBS 1X, adicionados 2 ml de RPMI 0,1% SFB e acrescentada, nos poços tratados, 30 nM de liraglutida.

4.2.4 Ensaio do potencial migratório

A capacidade de migração celular foi avaliada por meio do ensaio de migração celular, conhecido como *wound healing* (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Os tratamentos foram da linhagem MCF-7 controle, com EGF, com liraglutida ou com EGF e liraglutida; da linhagem MDA-MB-231 controle, com liraglutida ou com EGF; e da linhagem MDA-MB-436 controle ou com liraglutida. O ensaio de migração foi feito no último dia de cada tratamento, no qual foi realizada uma abertura em linha reta através da monocamada celular (“ferida”) com uma ponteira de 200 µl. Após este processo, o poço foi lavado com PBS 1X, para a retirada de células raspadas e do soro, e foi adicionado meio RPMI 0,1% SFB em todos os tratamentos. A área da abertura foi fotografada nos tempos 0, 24 e/ou 48 horas e, posteriormente, mensurada utilizando o software *Image J*.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA E RNA

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

4.4 SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

Após a quantificação do RNA total, cerca de 1000 ng deste foi submetido à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando a enzima transcriptase reversa *High Capacity* (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante. Como controle da síntese foi utilizado o gene de expressão constitutiva *HPRT* (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase-1).

4.5 QUANTIFICAÇÃO GÊNICA

As análises de expressão gênica foram realizadas por meio da RT-qPCR, usando *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems), em um sistema de detecção pelo equipamento *StepOnePlus Real Time PCR* (Applied Biosystems). Os genes avaliados estão listados no Quadro 1. O produto do gene foi monitorado com o sistema *SYBR Green* através da sua incorporação ao DNA de dupla fita formado durante a amplificação do gene. Conforme a progressão da PCR, mais amplicons são criados resultando um aumento na intensidade de fluorescência proporcional à quantidade de produto gerado pela PCR.

QUADRO 1 - SEQUÊNCIA DOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE RT-qPCR

| GENE | UNIVERSAL (5' - 3') | REVERSO (5' - 3') | REFERÊNCIA |
|---------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| <i>HPRT</i> | GAACGTCTTGCTCGA GATGTGA | TCCAGCAGGTCAGCA AAGAAT | (FIGUEIRA et al., 2009) |
| <i>MMP2</i> | AGCTCCCGGAAAAGA TTGATG | CAGGGTGCTGGCTGA GTAGAT | (FIGUEIRA et al., 2009) |
| <i>MMP14</i> | GCAGAAGTTTTACGG CTTGCA | TCGAACATTGGCCTT GATCTC | (FIGUEIRA et al., 2009) |
| <i>TIMP2</i> | CGACATTTATGGCAA CCCTATCA | GGGCCGTGTAGATAA ACTCTATATCC | (GOMES et al., 2012) |
| <i>VIM</i> | CTCGTCACCTTCGTG AATAC | GATTAGTTTCCCTCAG GTTTCAG | (BISWAS et al., 2014) |
| <i>CDH1</i> | CCCGGGACAACGTTT ATT | GTCGTTACGAGTCAC TTCAG | (BISWAS et al., 2014) |
| <i>ESR1</i> | TGGGCTTACTGACCA ACCTG | CCTGATCATGGAGGG TCAAA | (WALTON et al., 2009) |
| <i>PGR</i> | CGCGCTCTACCCTGC ACTC | TGAATCCGGCCTCAG GTAGTT | (WALTON et al., 2009) |
| <i>HOTAIR</i> | GGTAGAAAAAGCAAC CACGAAGC | ACATAAACCTCTGTCT GTGAGTGCC | (WU et al., 2014) |
| <i>SNAIL</i> | GGCCACCTCCAGAC CCACT | GCGGGGACATCCTGA GCAGC | (CHANG et al., 2016) |
| <i>EGFR</i> | CCTATGTGCAGAGGA ATTATGATCTTT | CCACTGTGTTGAGGG CAATG | (YASUDA et al., 2009) |

Fonte: o autor (2017).

A eficiência da amplificação, para analisar se o material genético é dobrado a cada novo ciclo de reação, foi realizada inicialmente pela curva de diluição dos iniciadores com as concentrações de 150, 300, 600 e 900 nM; e, posteriormente, foi realizada a curva de diluição do cDNA com as diluições de 1:2, 1:5, 1:10, 1:50 e 1:100,

com a concentração de iniciadores que tiveram o menor Ct. Após a amplificação, uma curva de regressão linear foi feita a partir dos valores de Ct e as diluições de cDNA e a análise da eficiência foi realizada. A inclinação da reta (*slope*) da curva padrão foi utilizada na fórmula $E=10^{(-1/slope)}$, para se verificar a eficiência, que deve estar entre 90 e 110% para uma boa reação. O coeficiente de correlação (R^2) é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais dos Ct de amostras, onde valores próximos a 1 indica um ajuste perfeito. Após estabelecer a eficiência dos iniciadores, as análises de expressão foram realizadas com a concentração de 600 nM e a diluição de 1:2 de cDNA.

O nível de expressão dos genes foi obtido pela quantificação relativa dos níveis de expressão determinado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ em relação ao controle (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.6 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

Para investigar alterações no padrão de metilação, as amostras de DNA obtidas das linhagens celulares foram submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio utilizando os reagentes do protocolo do kit *EpiTec Bisulfite* (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante. O bissulfito de sódio promove a deaminação de citosinas não metiladas, convertendo-as em uracila, que após a reação de PCR são convertidas em timinas. As citosinas metiladas mantêm-se como citosinas, uma vez que o grupamento metil protege contra a primeira etapa da reação de deaminação (HAYATSU, 2008).

A eficiência dessa técnica no tratamento do DNA foi verificada por meio de uma reação *nested*-PCR utilizando os iniciadores da sequência satélite SATR-1 (COSTA et al., 2006). Os iniciadores utilizados para a amplificação e as condições de amplificação estão listados no Quadro 2

QUADRO 2 - INICIADORES E CONDIÇÕES DAS REAÇÕES UTILIZADOS NA REAÇÃO NESTED-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DE SATR-1

| INICIADORES | CONDIÇÕES |
|---|---|
| HIPO2 Universal-1 5' GTT ATA TTA TTT TTT GTT TTT TTG 3' HIPO2 Reverso-1 5' ACA TTT CCT TAT AAT ATT ATT CC 3' | Reação 1 95 °C – 5' 94 °C – 3' 48 °C – 3' 72 °C – 2' 94 °C – 3' } 5x 50 °C – 3' } 72 °C – 2' } 94 °C – 1' } 35x 52 °C – 1' } 72 °C – 1' } 72 °C – 5' |
| HIPO2 Universal-2 5' TAT AGT GGT GGT GTA TAT TTG 3' HIPO2 Reverso-2 5' CAC CTA ACC TAT AAT ATT TCT TC 3' | Reação 2 95 °C – 5' 94 °C – 1' 50 °C – 3' 72 °C – 2' 94 °C – 3' } 5x 52 °C – 3' } 72 °C – 2' } 94 °C – 45" } 35x 54 °C – 40" } 72 °C – 2' } 72 °C – 5' |

Fonte: o autor (2017).

4.7 SEQUENCIAMENTO

A ilha CpG do gene *MMP2* foi amplificada de acordo com os seguintes iniciadores: universal 5' AAGGGATTGTTAGGATTTG 3' e reverso 5' CAACAACCTCACCCTACTAC 3' (CHERNOV et al., 2009). Os produtos de amplificação foram purificados a partir de um gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio, utilizando o protocolo do kit *PureLink Quick Gel Extration* (Invitrogen). Os produtos purificados foram clonados utilizando o vetor *pGEMTEasy*[®] (Promega) e transformados em estirpe de *Escherichia coli* DH10B. Os clones recombinantes foram selecionados pelo método de alfa-complementação e submetidos à reação de PCR de colônia para a confirmação da presença do inserto. Pelo menos oito clones de cada linhagem (para permitir uma abordagem suficiente de alelos na preparação) foram selecionados, e o

DNA plasmidial foi purificado utilizando o protocolo do *kit QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen). Entre 300 a 500 ng de DNA purificado foram submetidos à reação de sequenciamento, utilizando-se o protocolo *BigDye terminator* e o sequenciador *Applied Biosystems Seq 3500 XL genetic analyzer*.

4.8 MSP-PCR (METHYLATION SPECIFIC PCR)

A técnica de MSP-PCR se baseia no planejamento de iniciadores específicos para regiões do DNA desenhados sobre CGs determinados como diferencialmente metilados, condições metiladas (M - *methylated*) e não metiladas (U - *unmethylated*) (HERMAN et al., 1996). A vantagem dessa técnica é que as etapas de clonagem e sequenciamento são desnecessárias, sendo necessário somente a técnica de PCR e sua consequente aplicação em gel e eletroforese para detecção dos fragmentos metilados ou não metilados.

A metilação da região promotora dos genes das proteínas E-caderina (*CDH1*) e vimentina (*VIM*) foram definidas por esta técnica, utilizando os iniciadores: *CDH1*, condição metilada – ECAD(M) universal 5' TTA GGT TAG AGG GTT ATC GCG T 3' e reverso 5' TAA CTA AAA ATT CAC CTA CCG AC 3', e para a condição não metilada – ECAD(U) universal 5' TAA TTT TAG GTT AGA GGG TTA TTG e reverso 5' CAC AAC CAA TCA ACA ACA CA (HERMAN et al., 1996); *VIM*, condição metilada – VIM(M) universal 5' GGATTTTTTTGGTTTGTAGTTTGTAGGC 3' e reverso 5' AACATAATCCCGTTACTTCAACG 3', condição não metilada – VIM(U) universal 5' ATTTTTTTGGTTTGTAGTTTGTAGGTGG 3' e reverso 5' ACATAATCCCATTACTTCAACACT 3' (JUNG et al., 2011). Foi utilizada essa técnica para ambos os genes, pois suas regiões promotoras possuem iniciadores bem estabelecidos relacionados com o padrão de metilação e a expressão destes genes.

Os produtos das reações de PCR foram visualizados em géis poliacrilamida 8% utilizando-se uma solução de acrilamida e bis-acrilamida na proporção 29:1, TEMED a 0,1% (Life Technologies) como doador de elétrons da reação e persulfato de amônio (APS) a 0,1% como catalisador da reação. A revelação dos resultados foi feita pela

impregnação com nitrato de prata segundo o protocolo descrito (SANGUINETTI; DIAS NETO; SIMPSON, 1994).

4.9 EXTRATO PROTEICO

Os extratos proteicos foram feitos a partir dos cultivos celulares das linhagens MCF-7, utilizada como controle positivo de expressão de E-caderina, MDA-MB-231 e MDA-MB-436 controle e tratada com liraglutida realizados em placas de cultivos de 100 mm. Após alcançarem a confluência de 80%, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X gelado e adicionado tampão de lise RIPA (50 mM Tris-HCl, pH; 0,5% Deoxicolato; 150 mM NaCl, 0,1% SDS), acrescido do coquetel de protease e EDTA 1 mM: *Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail* – Thermo Fisher. Posteriormente, as células foram raspadas com um *scraper* e o lisado foi passado para um tubo de 1,5 ml, passado numa seringa 5 X, para melhor lise das células, centrifugados a 10.000 X g por 10 minutos a 4°C e recolhido o sobrenadante.

A quantificação proteica foi determinada por meio do método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. A absorbância das amostras foi lida a 595 nM em espectrofotômetro e a concentração de proteínas foi determinada a partir da curva obtida por regressão linear dos valores padrões de BSA.

4.10 WESTERN BLOT

A partir da quantificação pelo método de Bradford dos extratos de proteínas, concentrações variando de 5 a 100 microgramas foram utilizadas para a padronização da reação com os anticorpos para Beta-actina (Sigma) e E-caderina (Thermo Fisher Scientific). As amostras foram misturadas com tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol/L de Tris-HCl pH 6,8, 5% de β -mercaptoetanol) e aquecidas a 100°C durante 10 minutos antes da aplicação no gel para a eletroforese.

As eletroforeses de proteínas foram realizadas em gel de poliacrilamida desnaturante conforme protocolo descrito por Laemmli (1970). A concentração do gel separador, utilizado nas eletroforeses de proteína, foi de 12% e do gel de empilhamento foi de 4%. A voltagem da corrida foi de 150 V, utilizando o tampão Laemmli (3 g/L de Tris-base, 14 g/L de Glicina e 1 g/L de SDS). Após a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para membrana de PVDF (Hybond ECL- GE Healthcare), ativada anteriormente com metanol. A transferência foi realizada com o tampão de transferência (25 mM Tris HCl, 192 mM Glicina, 20% metanol, 0,037% SDS) na cuba *Mini Trans-Blot Cell* da BioRad a 250 mA por 1 hora. A eficiência da transferência foi avaliada utilizando um marcador de proteína pré-corado (Thermo Fisher Scientific) na membrana.

Depois da transferência, a membrana foi bloqueada com solução de 5% de leite em pó desnatado em TBST (Tris pH 7,6; 2,42g/L; NaCl 8g/L; tween 20 1mL/L) por 1 hora a temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com TBST três vezes e incubada com 5 mL de solução de leite 5% TBST com o anticorpo primário: 1:1000, para o anticorpo anti-E-caderina, e 1:5000, para o anticorpo anti- β actina, sendo mantida sob agitação durante 18 horas a 4°C. O anticorpo primário foi retirado por meio de três lavagens sucessivas com TBST, por 10 minutos para cada lavagem. O anticorpo secundário foi o *anti-mouse* IgG HRP (Sigma), de concentração 1 mg/mL, diluído 1:5000 vezes. Depois de cinco lavagens com TBST, a membrana contendo a reação antígeno-anticorpo foi revelada com o reagente *Luminata Forte Western HRP substrate* (Millipore) utilizando filme de Raio X seguido de revelação com tampões revelador e fixador.

4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

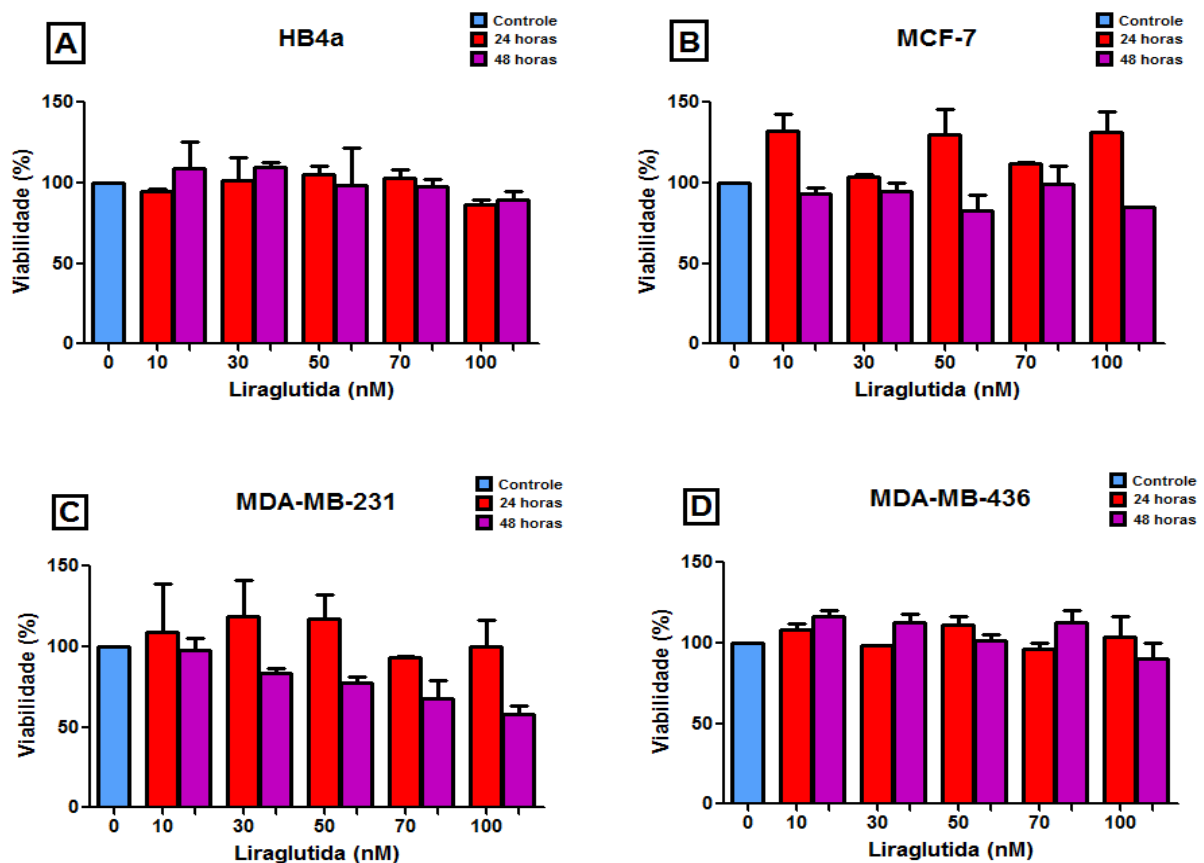
As análises estatísticas foram realizadas pelo *software* GraphPad Prism versão 5.0, GraphPad Software, San Diego California USA, utilizando o teste estatístico *t Student* nos ensaios de migração celular e o teste *two-way* ANOVA para os ensaios de viabilidade e o *one-way Tukey* para expressão gênica, sendo considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DA LIRAGLUTIDA NA VIABILIDADE CELULAR

O teste de citotoxicidade com a liraglutida nas linhagens HB4a, linhagem de mama normal utilizada como controle, e nas tumorais de mama MCF-7 (tipo luminal e fenótipo epitelial), MDA-MB-231 (tipo basal e fenótipo mesenquimal) e MDA-MB-436 (tipo basal e fenótipo mesenquimal), foi inicialmente realizado para se verificar a ação do fármaco sobre a viabilidade das células (Figura 5).

FIGURA 5 – EFEITO DA LIRAGLUTIDA NA VIABILIDADE CELULAR



Viabilidade celular após tratamento com liraglutida. A - linhagem normal de mama HB4a; B – linhagem MCF-7; C – linhagem MDA-MB-231; D – linhagem MDA-MB-436. As concentrações de liraglutida testadas foram de: 10, 30, 50, 70 e 100 nM, nos tempos de 24 e 48 horas. Os resultados foram expressos como % da viabilidade, considerando como 100% as células que não foram expostas ao fármaco (controle).

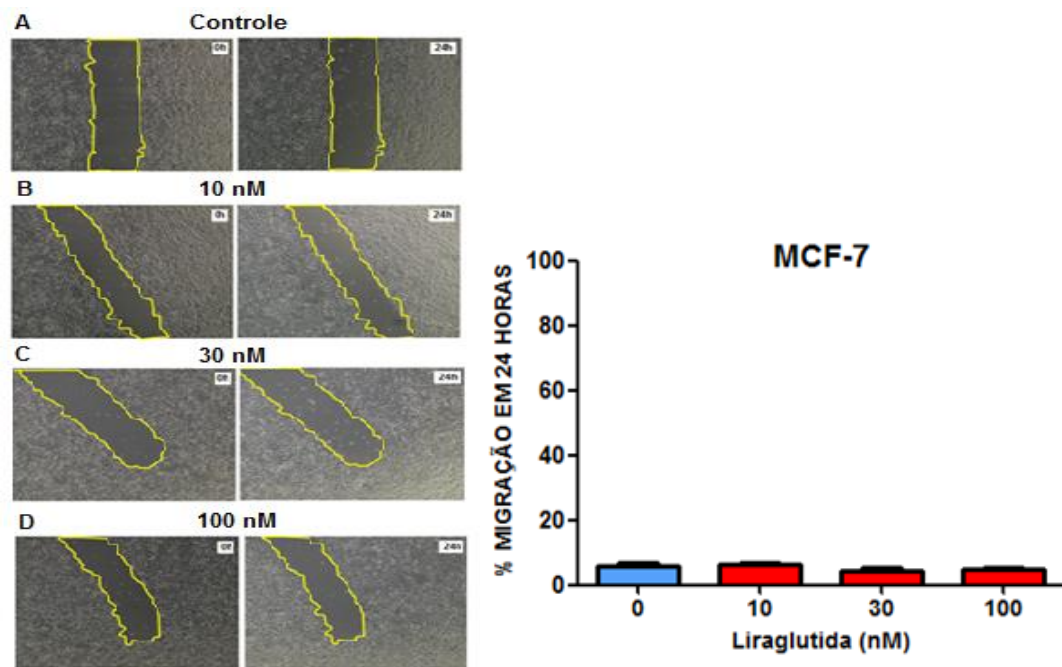
Fonte: o autor (2017).

Foram realizados os controles (sem adição do fármaco) e as concentrações de 10, 30, 50, 70 e 100 nM de liraglutida, nos tempos de 24 e 48 horas. O tratamento com não afetou a viabilidade das células não tumorais e tumorais de mama. Diante disso, foram selecionados três concentrações (10, 30 e 100 nM) para a realização do ensaio de migração celular nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 e, assim, verificar qual das concentrações seria a mais significativa no ensaio.

5.2 EFEITO DA LIRAGLUTIDA NA MIGRAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO GÊNICA

Os ensaios de migração celular foram realizados para verificar mudanças na capacidade migratória das células. A linhagem MCF-7 foi tratada com liraglutida nas concentrações de 10, 30 e 100 nM por 24 horas e, após isto, o ensaio de migração foi realizado. A linhagem MCF-7 possui características epiteliais e, em ensaios de migração celular, ela tem um baixo potencial migratório. A Figura 6 representa o ensaio na MCF-7, a qual não mostrou diferença na migração celular após o tratamento, em relação ao controle, em nenhuma das concentrações testadas de liraglutida. Isto representa que o fármaco não aumenta a migração celular dessa linhagem.

FIGURA 6 – EFEITO DA LIRAGLUTIDA SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR DA LINHAGEM MCF-7

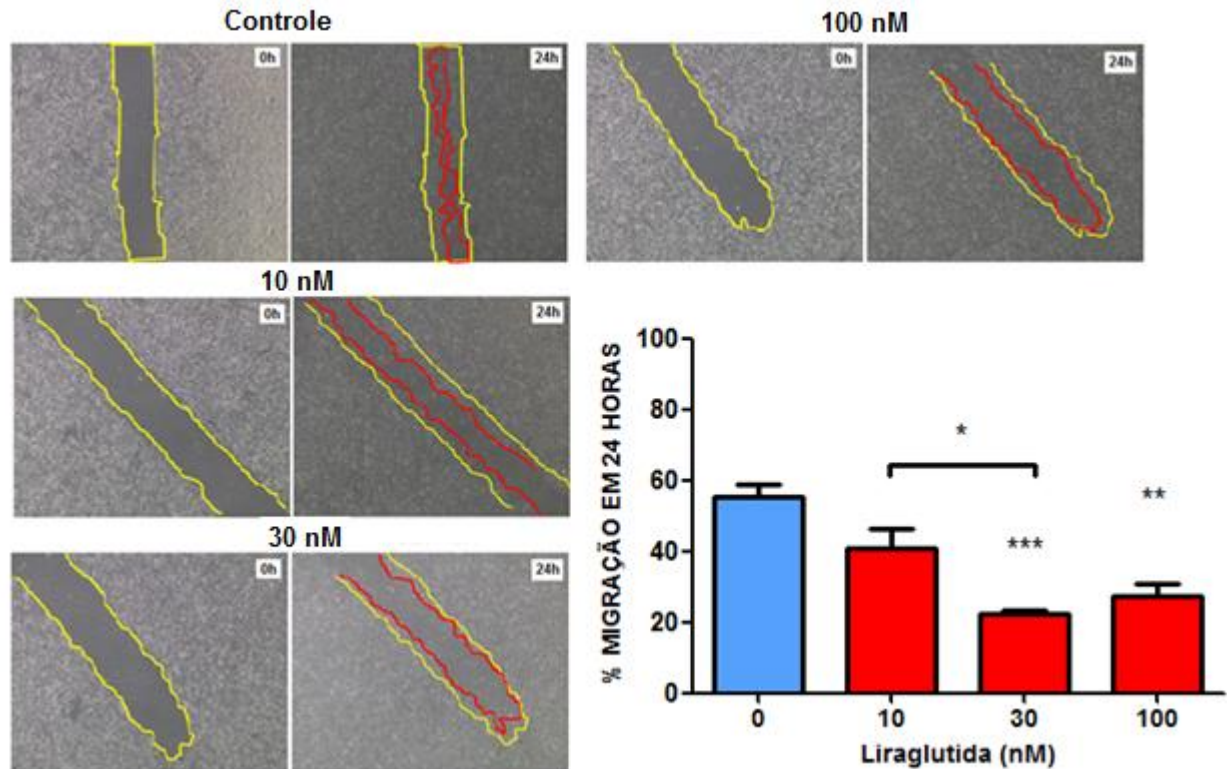


A migração celular foi monitorada por fotos em A, B, C e D, no tempo de 0 e 24 horas após o risco, da linhagem MCF-7 controle e tratada com 10, 30 e 100 nM de liraglutida por 24 horas. O gráfico representa a medição da distância das células que migraram em relação à distância das células que migraram do controle, convertidas em porcentagem. As linhas amarelas delimitam as células no momento em que foi realizado o risco.

Fonte: o autor (2017).

A linhagem MDA-MB-231 apresenta características mesenquimais e um alto potencial migratório. O ensaio de migração com as concentrações de 10 e 30 nM de liraglutida na MDA-MB-231 está representado na Figura 7.

FIGURA 7 – EFEITO DA LIRAGLUTIDA SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR DA LINHAGEM MDA-MB-231



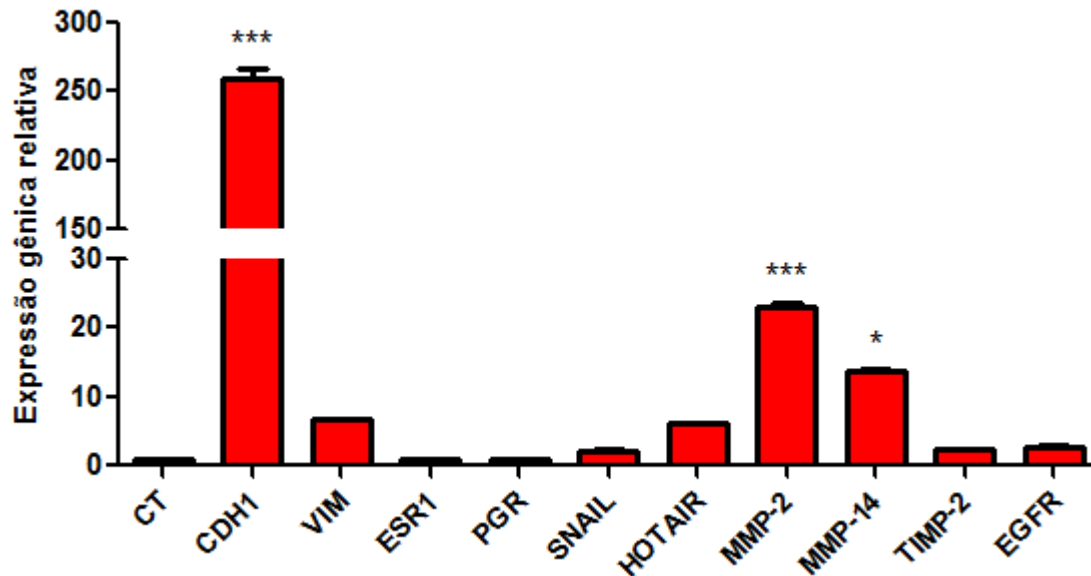
A migração celular foi monitorada por fotos no tempo de 0 e 24 horas após o risco, da linhagem MDA-MB-231 controle e tratada com 10, 30 e 100 nM de liraglutida. O gráfico representa a medição da distância das células que migraram em relação à distância das células que migraram do controle, convertidas em porcentagem. As linhas amarelas delimitam as células no momento em que foi realizado o risco e as linhas vermelhas delimitam as células que migraram. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indicam os valores significativos estatisticamente.

Fonte: o autor (2017).

Como é possível observar, a linhagem MDA-MB-231 apresentou uma redução significativa da migração celular com todas as concentrações testadas de liraglutida em relação ao seu controle. Diante desses resultados, a concentração de 30 nM foi selecionada para todos os tratamentos seguintes, para as análises de expressão dos genes relacionados com a transição epitélio-mesênquima (TEM) e da metilação dos genes *CDH1* e *VIM*, assim como para as análises de expressão proteica.

A avaliação da expressão do RNA mensageiro (mRNA) dos genes relacionados com a TEM na MDA-MB-231, tratada com 30 nM de liraglutida por 24 horas, estão representados no gráfico da Figura 8.

FIGURA 8 – EFEITO DA LIRAGLUTIDA NA EXPRESSÃO GÊNICA DA LINHAGEM MDA-MB-231 POR 24 HORAS



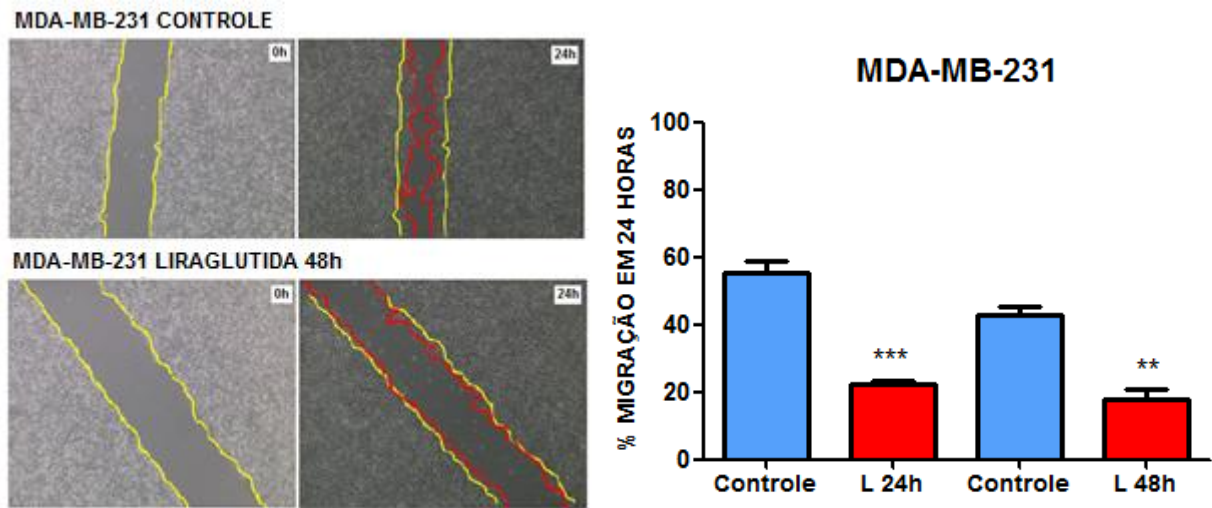
RT-qPCR da expressão dos genes que codificam para E-caderina (*CDH1*), vimentina (*VIM*), metaloprotease de matriz 2 (*MMP2*) e 14 (*MMP14*), inibidor tecidual de metaloproteases 2 (*TIMP2*), receptor de estrogênio (*ESR1*), receptor de progesterona (*PGR*), hotair (*HOTAIR*), receptor do fator de crescimento epidermal (*EGFR*) e snail (*SNAIL*) na linhagem MDA-MB-231 tratada com 30 nM de liraglutida por 24 horas. CT – controle. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$ indicam os valores significativos estatisticamente.

Fonte: o autor (2017).

Os genes *CDH1*, *MMP-2* e *MMP-14* apresentaram aumento nos níveis de expressão na MDA-MB-231 após a adição da liraglutida.

Para avaliar se o tempo de tratamento afetaria a migração celular e a expressão dos genes *CDH1*, *VIM*, *ESR1*, *SNAIL* e *EGFR* na MDA-MB-231, foi realizado o tratamento por 48 horas e 10 dias, na concentração de 30 nM de liraglutida, sendo a liraglutida adicionada a cada 24 horas. Em relação à migração celular (Figura 9), o tratamento por 48 horas não mostrou diferenças com o tratamento por 24 horas, e em ambos os tratamentos houve uma diminuição da taxa de migração comparada ao controle.

FIGURA 9 – EFEITO DA LIRAGLUTIDA SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR DA LINHAGEM MDA-MB-231 POR 48 HORAS

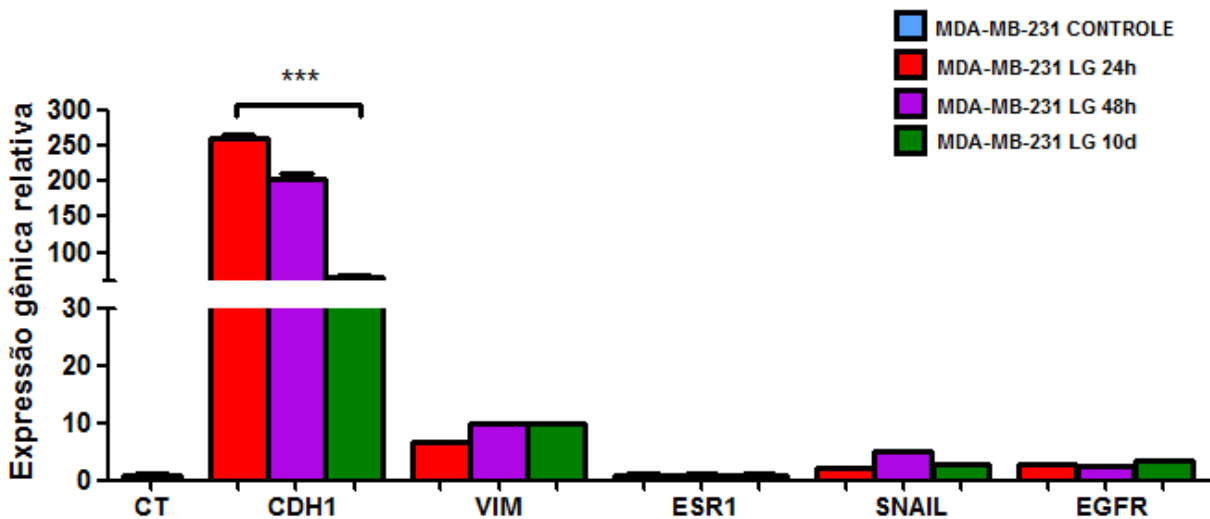


A migração celular foi monitorada por fotos no tempo de 0 e 24 horas após o risco, da linhagem MDA-MB-231 tratada com 30 nM de liraglutida por 48 horas (L 48h). O gráfico representa a medição da distância das células que migraram em relação à distância das células que migraram do controle, convertidas em porcentagem. Os dados referentes à migração do tratamento por 24 horas com liraglutida (L 24h) estão sendo mostrados para comparação com o tratamento por 48 horas. As linhas amarelas delimitam as células no momento em que foi realizado o risco e as linhas vermelhas delimitam as células que migraram. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indicam valores significativos estatisticamente.

Fonte: o autor (2017).

Os dados obtidos da expressão gênica estão representados na Figura 10, na qual também está representada a expressão após 10 dias de tratamento com 30 nM de liraglutida (reposta a cada 24 horas), a fim de observar se por mais tempo haveria uma diferença de expressão destes genes.

FIGURA 10 – EFEITO DA LIRAGLUTIDA NA EXPRESSÃO GÊNICA DA LINHAGEM MDA-MB-231 POR 48 HORAS E 10 DIAS



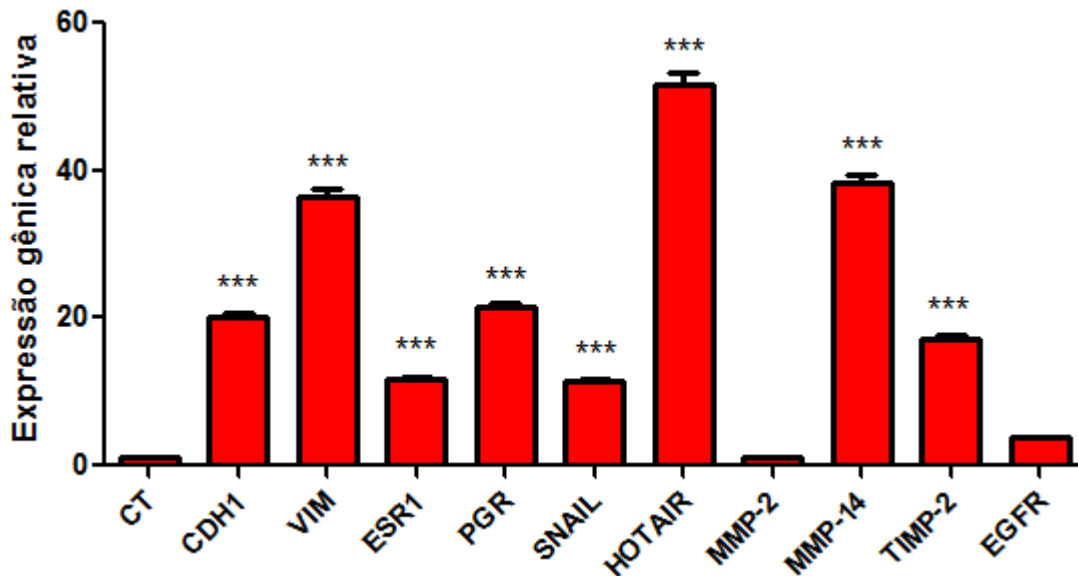
RT-qPCR da expressão gênica dos genes que codificam para E-caderina (*CDH1*), vimentina (*VIM*), receptor de estrógeno (*ESR1*), receptor de crescimento epidermal (*EGFR*) e snail (*SNAIL*) na linhagem MDA-MB-231 tratada com 30 nM de liraglutida por 24 horas, 48 horas e 10 dias. CT – controle; LG – liraglutida. *** $p < 0,0001$ indicam os valores significativos estatisticamente.

Fonte: o autor (2017).

Os resultados mostraram que, independente do tempo, as diferenças de expressão de *CDH1*, em relação ao controle, foram aumentadas significativamente (Figura 10) e os demais genes analisados não foram afetados pelos tratamentos. Esse aumento de *CDH1* é concordante com o que é visto nas células que possuem uma redução na migração celular. Diante desses resultados, o tratamento escolhido com a liraglutida nas demais linhagens foi com a concentração de 30 nM por 24 horas.

O resultado da expressão gênica da MCF-7 tratada com 30 nM de liraglutida por 24 horas está presente na Figura 11.

FIGURA 11 – EFEITO DA LIRAGLUTIDA NA EXPRESSÃO GÊNICA DA LINHAGEM MCF-7 POR 24 HORAS



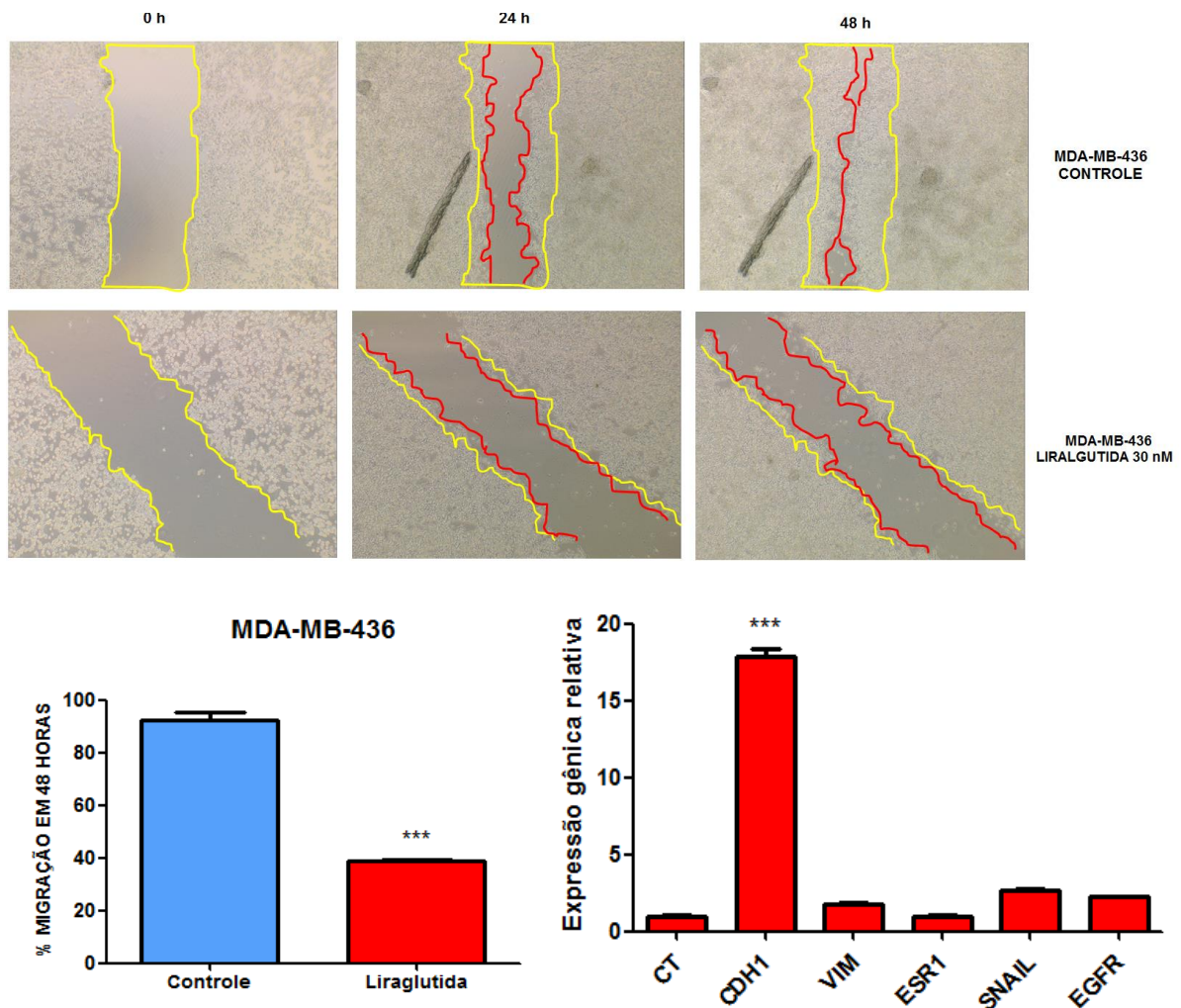
RT-qPCR da expressão dos genes que codificam para E-caderina (*CDH1*), vimentina (*VIM*), metaloprotease de matriz 2 (*MMP2*) e 14 (*MMP14*), inibidor tecidual 2 (*TIMP2*), receptor de estrógeno (*ESR1*), receptor de progesterona (*PGR*), hotair (*HOTAIR*), receptor do fator de crescimento epidermal (*EGFR*) e snail (*SNAIL*) na linhagem MCF-7 tratada com 30 nM de liraglutida por 24 horas. CT – controle. *** $p < 0,0001$ indica os valores significativos estatisticamente.

Fonte: o autor (2017).

O tratamento com 30 nM da linhagem MCF-7 por 24 horas apresentou um aumento na expressão do mRNA dos genes *CDH1*, *VIM*, *ESR1*, *PGR*, *SNAIL*, *HOTAIR*, *MMP-14* e *TIMP-2*, sendo que os genes *MMP2* e *EGFR* não foram alterados com o tratamento. Apesar de aumentar a expressão de genes relacionados com a capacidade migratória, como a vimentina e snail, estes não foram concordantes com os ensaios de migração celular, uma vez que esta linhagem não se tornou potencialmente migratória.

A fim de observar se os resultados da MDA-MB-231 com a liraglutida não eram inerentes a esta linhagem, foi realizado o tratamento com 30 nM de liraglutida por 24 horas na MDA-MB-436, que também possui características mesenquimais e é triplo-negativa, assim como a MDA-MB-231.

FIGURA 12 – EFEITO DA LIRAGLUTIDA SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO GÊNICA NA LINHAGEM MDA-MB-436



As fotos mostram a migração celular nos tempos de 0, 24 e 48 horas após o risco, da linhagem MDA-MB-436 tratada com 30 nM de liraglutida por 24 horas. O gráfico à esquerda representa a medição da distância das células que migraram em relação à distância das células que migraram do controle, convertidas em porcentagem. O gráfico à direita representa a RT-qPCR da expressão dos genes que codificam para E-caderina (*CDH1*), vimentina (*VIM*), receptor de estrógeno (*ESR1*), receptor do fator de crescimento epidermal (*EGFR*) e snail (*SNAIL*). As linhas amarelas delimitam as células no momento em que foi realizado o risco e as linhas vermelhas delimitam as células que migraram. CT – controle. *** $p < 0,001$ indica valores significativos estatisticamente.

Fonte: o autor (2017).

Os resultados da migração celular da MDA-MB-436 (Figura 12) foram concordantes com o que foi visto na MDA-MB-231, o que mostra que a liraglutida induz a uma redução da migração celular nas linhagens triplo-negativas. Além de diminuir a capacidade migratória das células, a liraglutida aumentou significativamente a

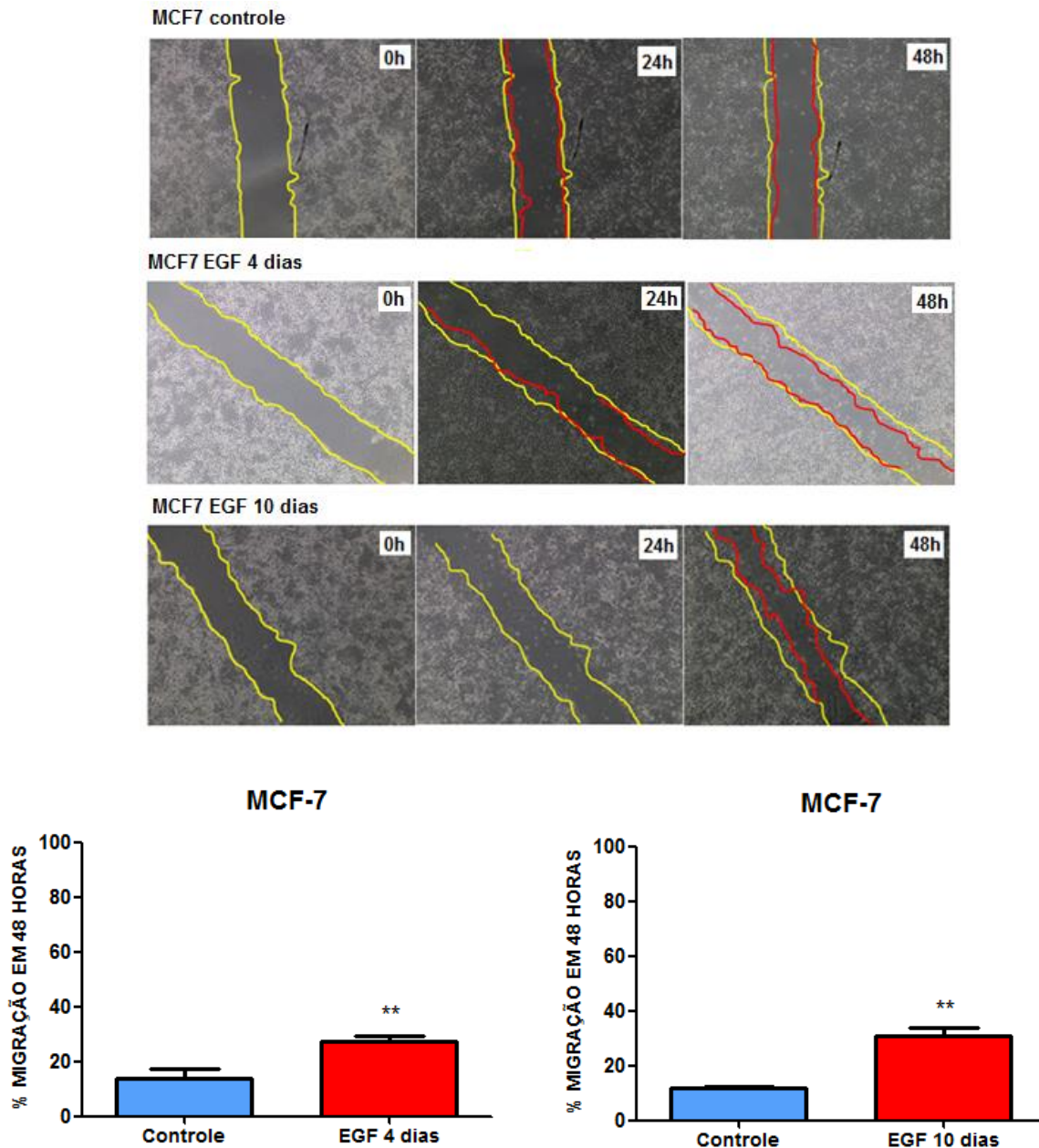
expressão de *CDH1* (Figura 12), não afetando a expressão dos demais genes analisados (*VIM*, *ESR1*, *SNAIL* e *EGFR*).

Os resultados com o tratamento com a liraglutida nas linhagens triplo-negativas mostraram que esse medicamento reduz a migração celular, juntamente com o aumento da expressão do marcador epitelial *CDH1*. A partir disso, o próximo passo foi utilizar um indutor da TEM, o fator de crescimento epidermal (EGF), na linhagem epitelial MCF-7 para verificar se a liraglutida é capaz de reverter esse processo em uma linhagem caracterizada como epitelial.

5.3 EFEITO DO EGF NA MIGRAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO GÊNICA

O EGF é capaz de reverter o fenótipo epitelial por promover o aumento da expressão de marcadores mesenquimais, como o snail e a vimentina, e diminuir a expressão de E-caderina. Para verificar o efeito do EGF na linhagem tumoral de mama MCF-7, esta foi submetida ao tratamento com o EGF, na concentração de 50 ng/ml, por 4 e 10 dias. Após o tratamento, foi realizado o ensaio de migração celular, analisando a migração nos tempos de 0, 24 e 48 horas de células tratadas e controle (Figura 13).

FIGURA 13 – EFEITO DO EGF NA MIGRAÇÃO CELULAR DA LINHAGEM MCF7



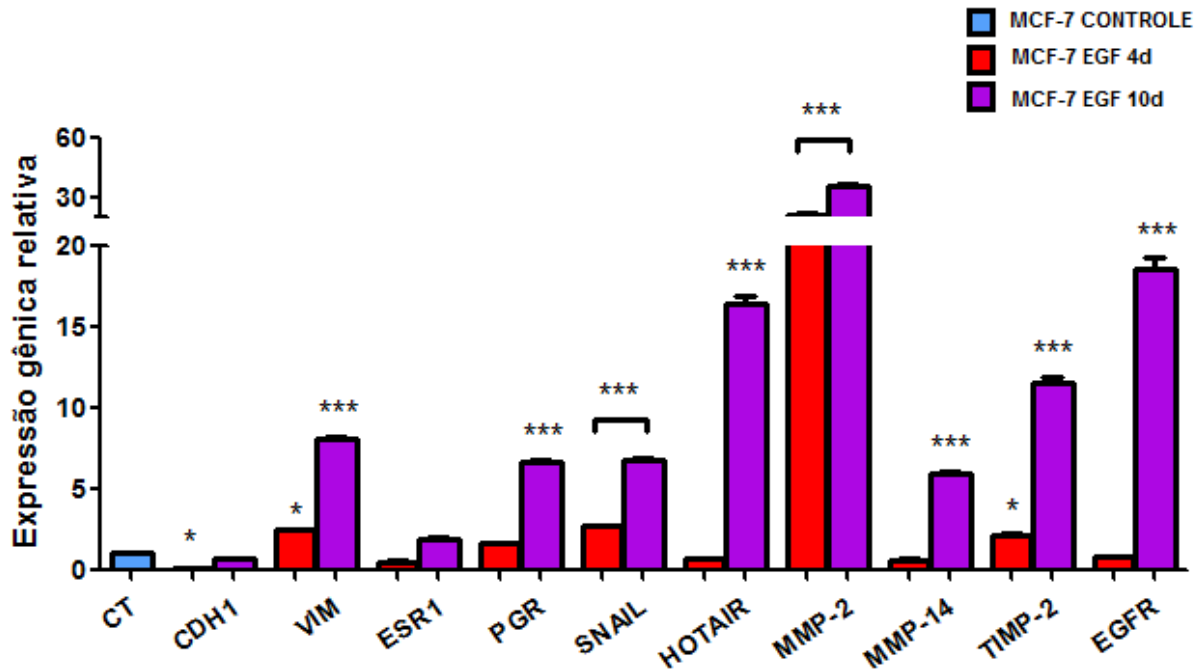
A migração celular foi monitorada por fotos, nos tempos de 0, 24 e 48 horas após o risco, da linhagem MCF-7 tratada com 50 ng/ml do fator de crescimento epidermal (EGF) por 4 e 10 dias. Os gráficos representam a medição da distância das células que migraram em relação à distância das células que migraram do controle, convertidas em porcentagem, após 48 horas da realização do risco. As linhas amarelas delimitam as células no momento em que foi realizado o risco e as linhas vermelhas delimitam as células que migraram. ** $p < 0,01$ indica os valores estatisticamente significativos. Fonte: o autor (2017).

Os resultados mostraram uma migração significativa das células tratadas em relação ao controle, e entre os tratamentos por 4 e 10 dias não houve uma diferença

significativa, pois em ambos a migração celular foi de aproximadamente 30% em relação ao seu controle.

A partir dos dados de migração celular foi avaliada a expressão dos genes relacionados com a TEM. Os resultados estão presentes na Figura 14.

FIGURA 14 – EFEITO DO EGF NA EXPRESSÃO GÊNICA DA LINHAGEM MCF-7



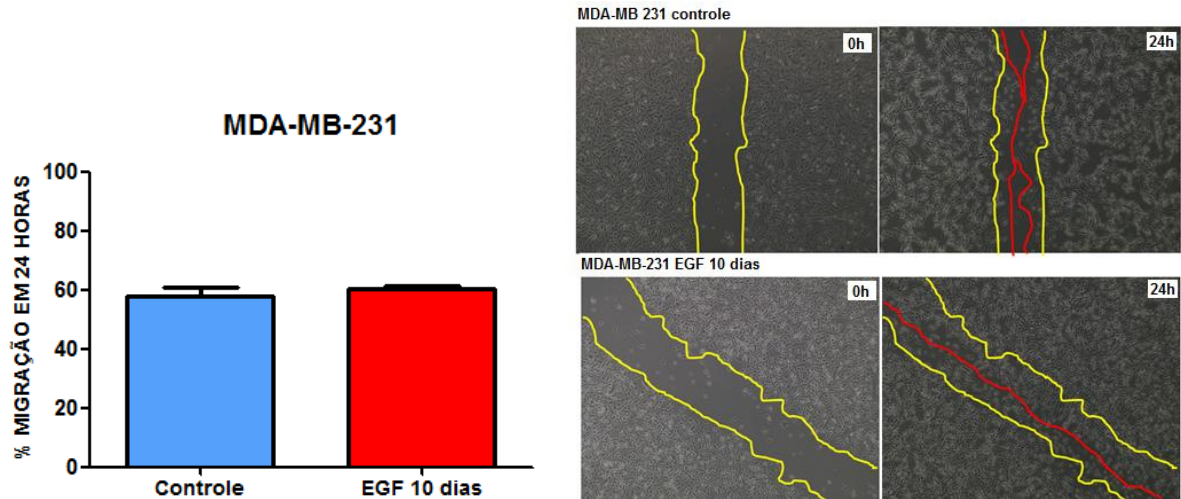
RT-qPCR da expressão dos genes que codificam para E-caderina (*CDH1*), vimentina (*VIM*), metaloprotease de matriz 2 (*MMP2*) e 14 (*MMP14*), inibidor tecidual 2 (*TIMP2*), receptor de estrógeno (*ESR1*), receptor de progesterona (*PGR*), hotair (*HOTAIR*), receptor do fator de crescimento epidermal (*EGFR*) e snail (*SNAIL*) na linhagem MCF-7 tratada com EGF por 4 (4d) e 10 dias (10d). CT – controle. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$ indicam os valores significativos estatisticamente.

Fonte: o autor (2017).

No tratamento por 4 dias com EGF ocorreu uma diminuição significativa dos níveis de *CDH1*, em relação à MCF-7 controle, e um aumento significativo dos níveis de *VIM*, *SNAIL*, *MMP-2* e *TIMP-2*. Já no tratamento por 10 dias, todos os genes analisados, com exceção de *CDH1* e *ESR1*, apresentaram um aumento significativo de expressão. Apesar do gene *CDH1* apresentar uma diminuição, esta não foi significativa, por isso o tratamento com EGF por 4 dias para indução da TEM na linhagem MCF-7 foi o escolhido para analisar o efeito da liraglutida.

O tratamento na MDA-MB-231 foi realizada para verificar se o EGF induziria a alguma mudança significativa nesta linhagem e foi somente realizado no período de 10 dias, pois em relação ao tratamento da MCF-7, este tempo apresentou mais variações de expressões nos genes relacionados à TEM.

FIGURA 15 – EFEITO DO EGF NA MIGRAÇÃO CELULAR DA MDA-MB-231

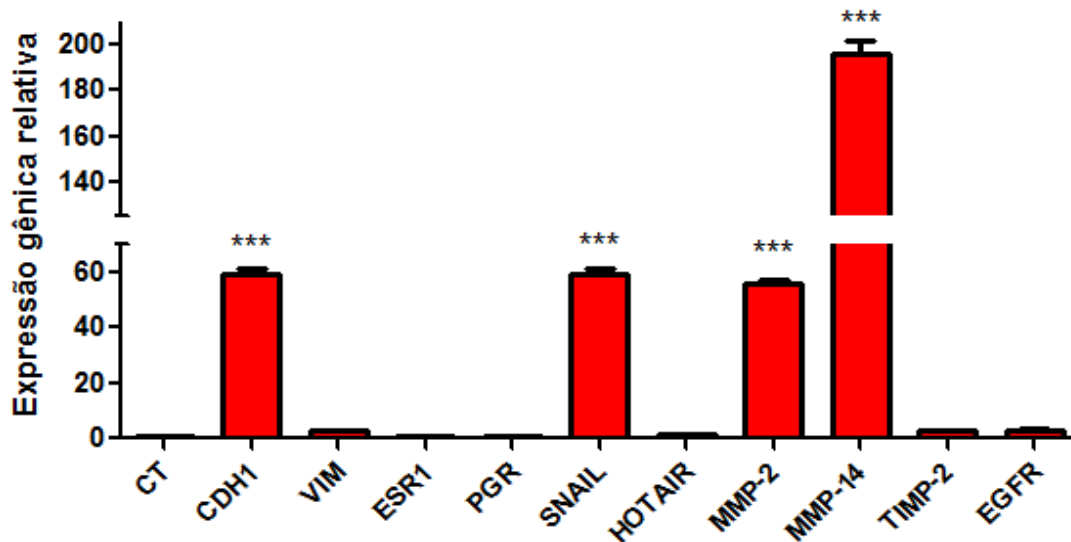


A migração celular foi monitorada por fotos (à direita), nos tempos de 0 e 24 horas após o risco, da linhagem MDA-MB-231 tratada com 50 ng/ml do fator de crescimento epidermal (EGF) por 10 dias. O gráfico representa a medição da distância das células que migraram em relação à distância das células que migraram do controle, convertidas em porcentagem. As linhas amarelas delimitam as células no momento em que foi realizado o risco e as linhas vermelhas delimitam as células que migraram.

Fonte: o autor (2017).

Como observado na Figura 15, a migração celular não foi afetada após o tratamento com EGF. A diferença na expressão dos genes relacionados com a TEM está representada pelo gráfico da Figura 16.

FIGURA 16 – EFEITO DO EGF NA EXPRESSÃO DOS GENES DA LINHAGEM MDA-MB-231



RT-qPCR da expressão dos genes que codificam para E-caderina (*CDH1*), vimentina (*VIM*), metaloprotease de matriz 2 (*MMP2*) e 14 (*MMP14*), inibidor tecidual 2 (*TIMP2*), receptor de estrógeno (*ESR1*), receptor de progesterona (*PGR*), hotair (*HOTAIR*), receptor do fator de crescimento epidermal (*EGFR*) e snail (*SNAIL*) na linhagem MDA-MB-231 tratada com EGF por 10 dias. CT – controle. *** $p < 0,0001$ indica os valores significativos estatisticamente.

Fonte: o autor (2017).

Os resultados de expressão gênica mostram um aumento na expressão de *CDH1*, *SNAIL*, *MMP-2* e *MMP-14* na MDA-MB-231 após o tratamento com EGF. Apesar de este tratamento resultar no aumento de *CDH1* na linhagem MDA-MB-231, este não afetou a capacidade migratória das células.

Como o gene da metaloprotease de matriz *MMP-2* apresentou aumento significativo na RT-qPCR e, sabe-se que este gene é regulado epigeneticamente por metilação do DNA, a ilha CpG contida na região promotora deste gene foi analisada.

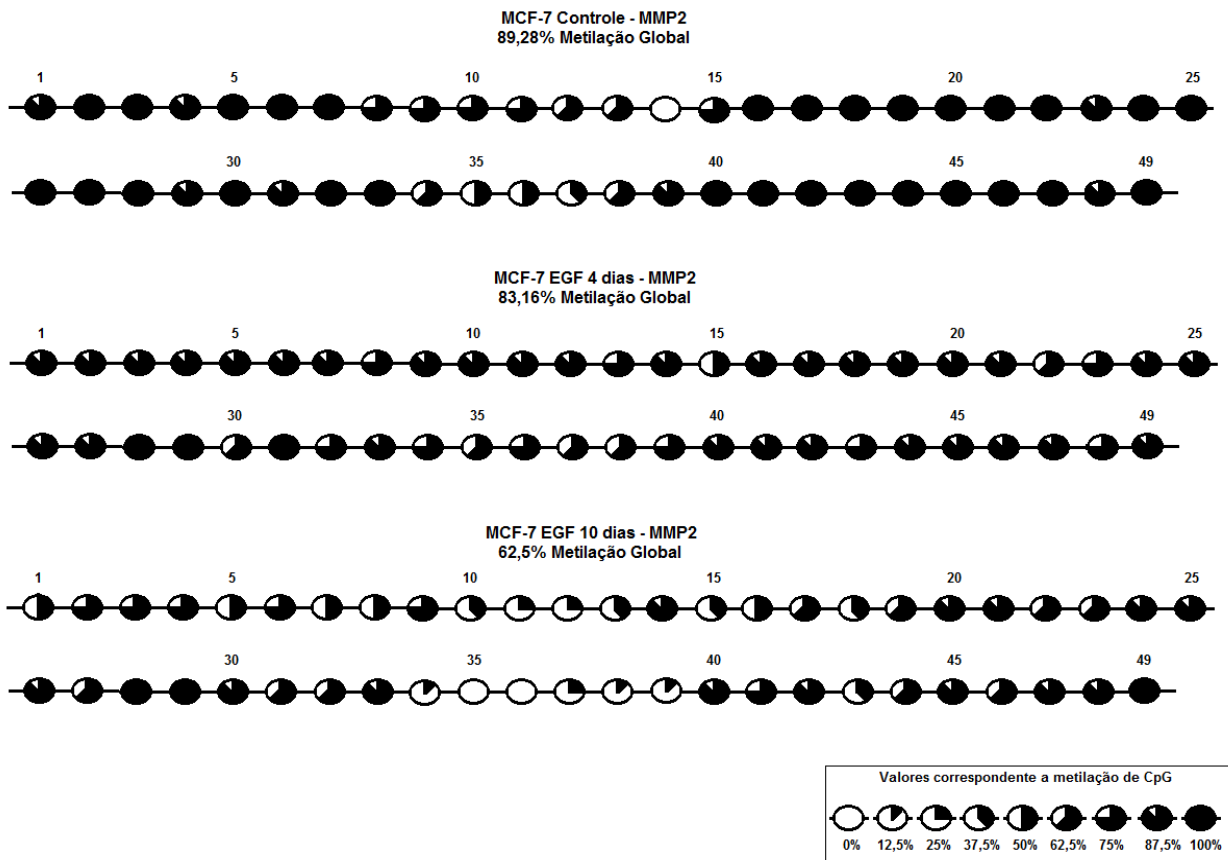
5.4 ANÁLISE DA METILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DE *MMP-2* APÓS TRATAMENTO COM EGF

A região escolhida para o sequenciamento do gene da *MMP-2* compreende uma sequência de 365 pares de bases que contém 49 dinucleotídeos CpG. Esta ilha está posicionada entre os nucleotídeos + 91 e + 456 e contém o início de tradução (códon ATG). Os iniciadores foram preconizados pelo estudo de Chernov e

colaboradores (2009), no qual a relação entre a metilação do DNA e o silenciamento gênico foi correlacionada (CHERNOV et al., 2009).

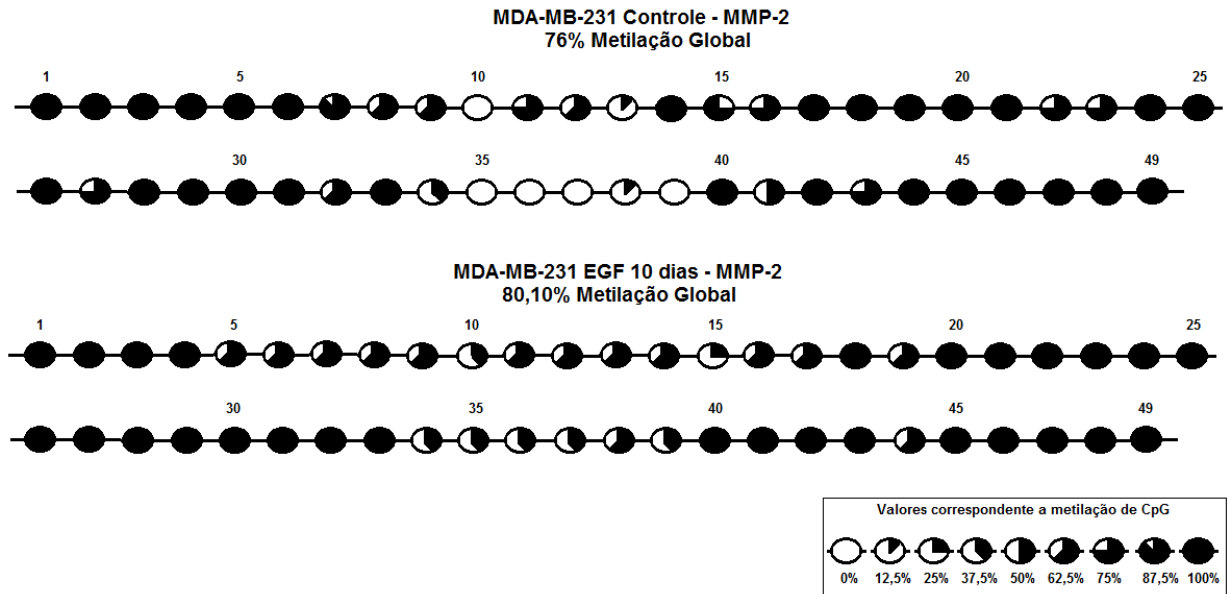
A MCF-7 possui ausência de expressão tanto do mRNA, como da proteína MMP-2, e isto está relacionado com a hipermetilação de *MMP-2* (CHERNOV et al., 2009; KOHRMANN et al., 2009). Na Figura 17, é possível observar o perfil de metilação para a região selecionada do gene *MMP-2* nos tratamentos com EGF, por 4 e 10 dias, na MCF-7, em relação ao seu controle. Enquanto que a Figura 18 representa o perfil da *MMP-2* no tratamento com EGF por 10 dias da MDA-MB-231, comparado ao seu controle.

FIGURA 17 - PERFIL DE METILAÇÃO DA ILHA DE CpG DA *MMP-2* NA MCF-7 TRATADA COM O EGF



Representação esquemática do percentual de metilação dos 8 alelos selecionados da região promotora da *MMP-2*, representada por 49 CpGs, na linhagem MCF-7 controle e tratada com o fator de crescimento epidermal (EGF) por 4 e 10 dias. Cada círculo corresponde à porcentagem de metilação, mostrada na escala, de cada CpG dos 8 clones selecionados para sequenciamento.

Fonte: o autor (2017).

FIGURA 18 - PERFIL DE METILAÇÃO DA ILHA DE CpG DA *MMP-2* NA MCF-7 TRATADA COM O EGF

Representação esquemática do percentual de metilação dos 8 alelos selecionados da região promotora da *MMP-2*, representada por 49 CpGs, na linhagem MDA-MB-231 controle e tratada com o fator de crescimento epidérmico (EGF) por 10 dias. Cada círculo corresponde à porcentagem de metilação, mostrada na escala, de cada CpG dos 8 clones selecionados para sequenciamento.

Fonte: o autor (2017).

Como visto na Figura 17, o perfil de metilação da *MMP-2* no tratamento com EGF por 4 dias não foi alterado em relação ao controle; já no tratamento por 10 dias ocorreu uma queda de aproximadamente 27% de CpGs metilados (89,28% no controle e 62,5% no tratado). Em ambos os períodos de tratamento, ocorreu aumento de expressão gênica de *MMP-2*.

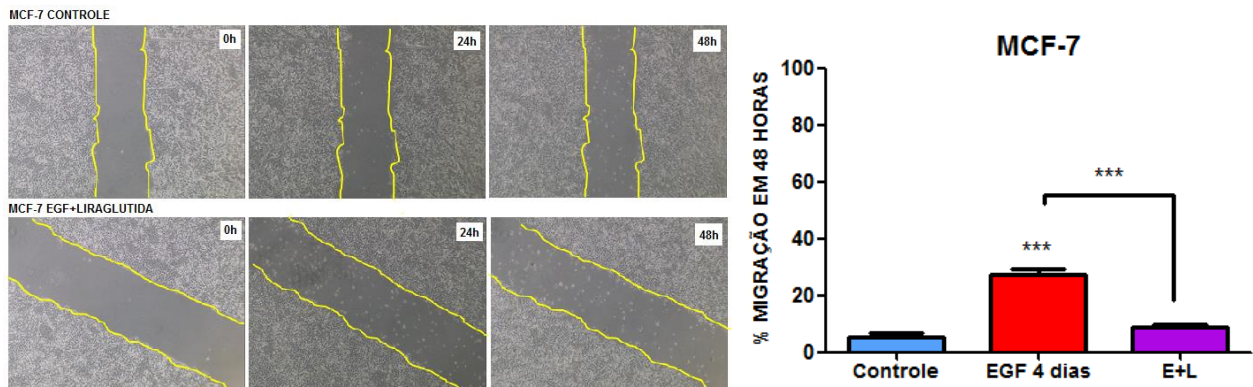
Já para a MDA-MB-231, apesar do aumento na expressão do transcrito de *MMP-2*, não houve alteração significativa na metilação em relação ao controle (76%- controle e 80,10%- tratado, Figura 18).

5.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM EGF/LIRAGLUTIDA NA MIGRAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO GÊNICA

A partir dos resultados obtidos com o tratamento com o EGF, a linhagem epitelial MCF-7 apresentou características mesenquimais, como o aumento da migração celular e da expressão de marcadores da TEM, como a *VIM* e *SNAIL*. Para

avaliar a ação da liraglutida no efeito pós tratamento com EGF, ou seja, para se observar se a liraglutida é capaz de reverter os efeitos induzidos pelo EGF, o tratamento com 50 ng/ml de EGF por 4 dias, seguido da adição de 30 nM de liraglutida por 24 horas, foi realizado na linhagem MCF-7. Os ensaios de migração mostraram que a liraglutida foi capaz de inibir a migração das células induzidas com EGF (Figura 19).

FIGURA 19 – EFEITO DA LIRAGLUTIDA SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR NA LINHAGEM MCF-7

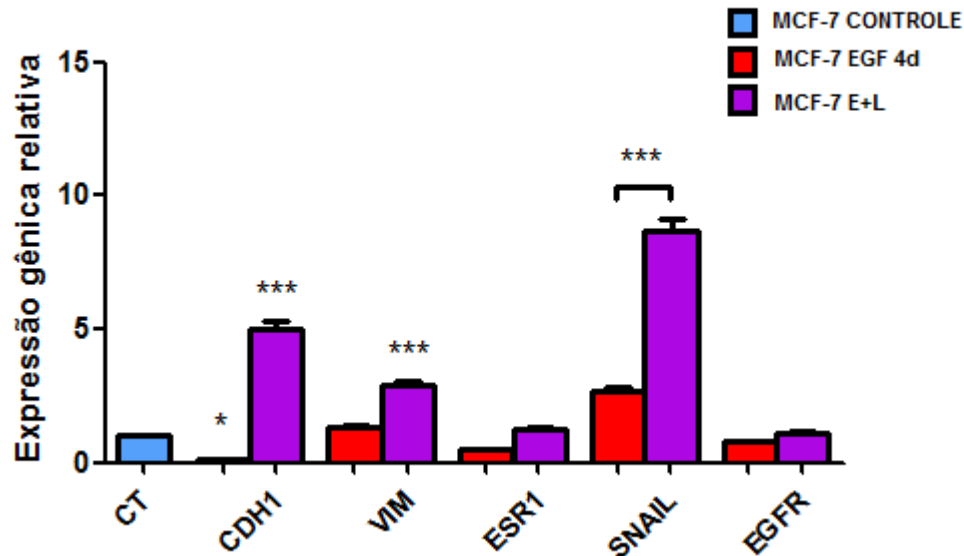


A migração celular foi monitorada por fotos, nos tempos de 0, 24 e 48 horas após o risco, da linhagem MCF-7 tratada com 50 ng/ml de EGF por 4 dias, seguido de 30 nM de liraglutida por 24 horas. O gráfico representa a medição da distância das células que migraram em relação à distância das células que migraram do controle, convertidas em porcentagem. Os dados do tratamento da MCF-7 com EGF 4 dias estão presentes no gráfico para comparação. As linhas amarelas delimitam as células no momento em que foi realizado o risco. *** $p < 0,0001$ indica valor significativo estatisticamente.

Fonte: o autor (2017).

Concomitante aos ensaios de migração, a avaliação da expressão dos genes *CDH1*, *VIM*, *ESR1*, *EGFR* e *SNAIL* foi realizada (Figura 20).

FIGURA 20 – EFEITO DO EGF/ LIRAGLUTIDA NA EXPRESSÃO GÊNICA DA LINHAGEM MCF-7



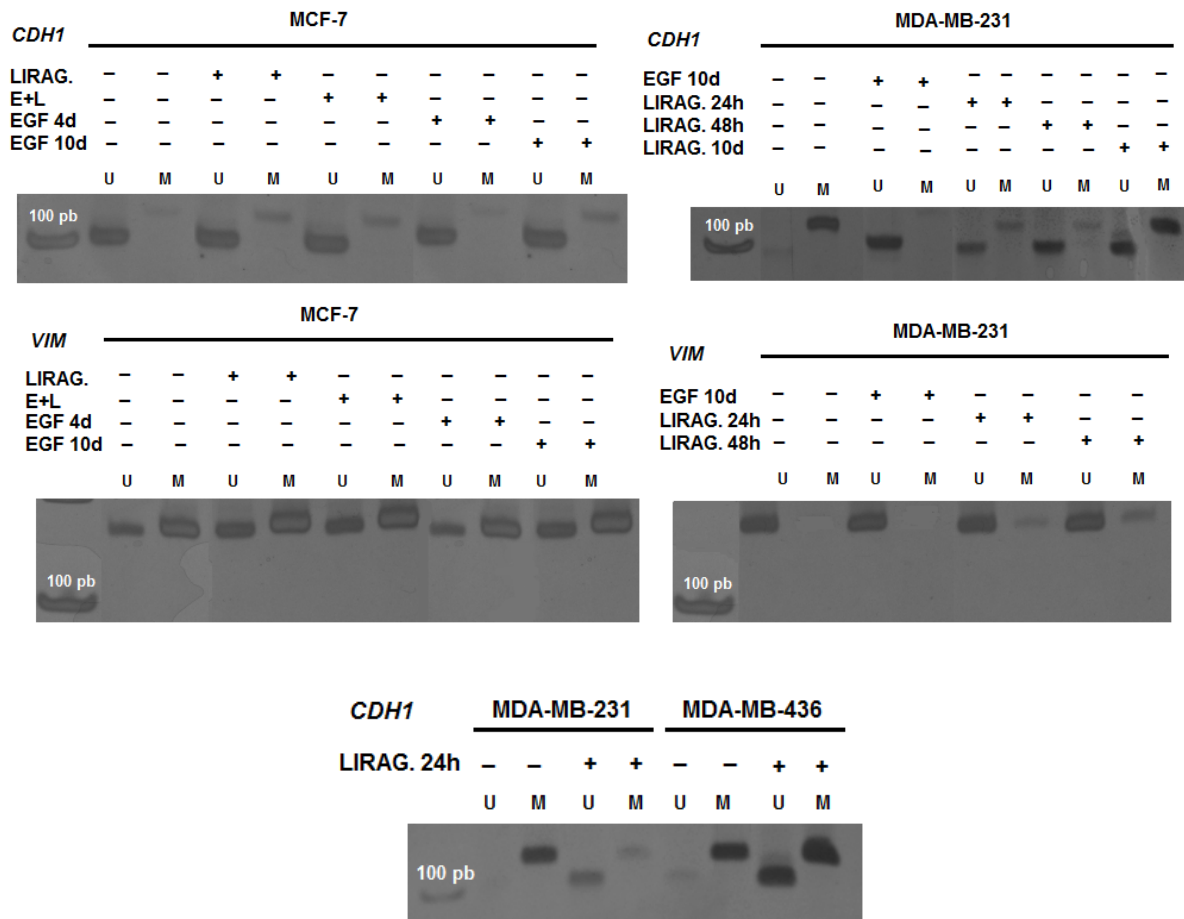
RT-qPCR da expressão dos genes que codificam para E-caderina (*CDH1*), vimentina (*VIM*), receptor de estrógeno (*ESR1*), receptor de EGF (*EGFR*) e snail (*SNAIL*) na linhagem MCF-7 tratada com 50 ng/ml de EGF por 4 dias e na MCF-7 tratada com 50 ng/ml de EGF por 4 dias, seguido de 30 nM de liraglutida por 24 horas. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ indica valores significativos estatisticamente. Fonte: o autor (2017).

Como é possível observar na Figura 20, o tratamento EGF/liraglutida apresentou o aumento na expressão de *CDH1*, correlacionado com os dados obtidos na migração, em que houve uma reversão da migração induzida por EGF após adição da liraglutida. Os genes que codificam para vimentina e snail permaneceram semelhantes ao tratamento com somente o EGF.

5.6 ANÁLISE DA METILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DE *CDH1* E *VIM*

A técnica de MSP-PCR possibilita analisar a metilação de determinada região de um gene, a partir de iniciadores desenhados tanto para a condição metilada, como para não metilada, sem a necessidade de clonar e sequenciar o gene. Os iniciadores utilizados para analisar a metilação dos genes *CDH1* e *VIM* abrangem CpGs presentes na ilha da região promotora desses genes e podem ser vistos na Figura 21.

FIGURA 21 – EFEITO DA LIRAGLUTIDA E DO EGF NA METILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DE *CDH1* E *VIM*



MSP-PCR para as condições metiladas e desmetiladas da região promotora dos genes *CDH1* (E-caderina) e *VIM* (vimentina) dos tratamentos indicados na figura. O marcador molecular está indicado pela banda de 100 pb (pares de bases); o tamanho dos fragmentos para a condição metilada (M) e desmetilada (U) de E-caderina é 115 e 96 pb, respectivamente; e, para a condição M e U de vimentina é 146 e 143 pb, respectivamente. EGF – fator de crescimento epidermal; E+L – EGF + liraglutida; L – liraglutida.

Fonte: o autor (2017).

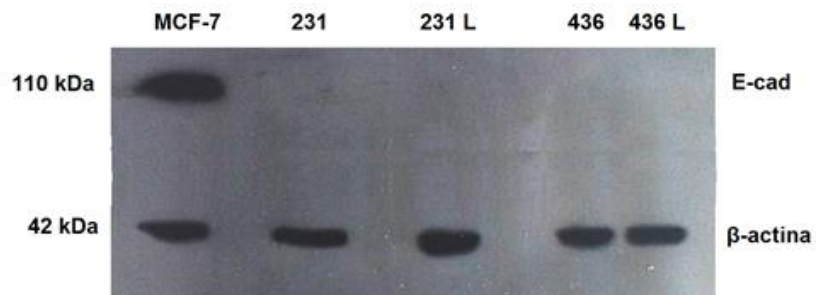
Como visto na Figura 21, não houve diferença de metilação de *CDH1* e *VIM* nos tratamentos com EGF e liraglutida na linhagem MCF-7; já para a MDA-MB-231, ocorreu uma desmetilação de *CDH1*. O mesmo ocorreu no tratamento realizado na MDA-MB-436, que apresentou um fragmento de *CDH1* na condição não metilada, o que não havia sido observado no controle. No tratamento da MCF-7 com EGF seguido de liraglutida (E+L) não foi possível observar diferenças de metilação.

Os resultados obtidos pela técnica de MSP-PCR para *CDH1* no tratamento com a liraglutida, nas linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-436, se correlacionaram com os dados da expressão gênica, no qual o aumento significativo de expressão está associado com a desmetilação gênica.

5.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE E-CADERINA

Para as análises da expressão proteica de E-caderina nos tratamentos com a liraglutida, os cultivos celulares das linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-436 com 30 nM de liraglutida por 24 horas, e também por 10 dias para a MDA-MB-231, foram realizados para a obtenção dos extratos proteicos. A partir destes, a técnica de *Western Blot* foi realizada (Figura 22).

FIGURA 22 – EFEITO DA LIRAGLUTIDA NA EXPRESSÃO DE E-CADERINA



Western Blot para análise de expressão da E-caderina (E-cad) nas linhagens MDA-MB-231 (231), MDA-MB-436 (436) após o tratamento com 30 nM de liraglutida (L) por 24 horas. A linhagem MCF-7 foi utilizada como controle positivo de expressão da E-cad.

Fonte: o autor (2017).

Como a linhagem MCF-7 apresenta uma alta expressão de E-caderina, ela foi utilizada como o controle positivo. As linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-436, apesar de apresentarem uma expressão gênica significativa de *CDH1* nos tratamentos com liraglutida, esta não foi correlacionada com a expressão proteica, sendo que não foi observado a presença da proteína. Com o objetivo de verificar se com um tratamento mais longo haveria a expressão de E-caderina, foram obtidos os extratos proteicos dos tratamentos por 48 horas e 10 dias na MDA-MB-231, porém os resultados não apresentaram expressão (dados não mostrados) em nenhum dos períodos.

6 DISCUSSÃO

A transição epitélio-mesênquima (TEM) é um processo que ocorre nos carcinomas, como o câncer de mama, que facilita a migração de células tumorais e sua disseminação para tecidos distantes do local de origem (metástase), pela ativação e repressão de genes por mecanismos genéticos e epigenéticos (THIERY et al., 2009). Por ser uma doença de grande heterogeneidade e ser dividido em diferentes subtipos, o câncer de mama tem diferentes alvos terapêuticos, desde terapias hormonais, nos subtipos com expressão de estrogênio positivo, até tratamentos com anticorpo monoclonal e radioterapias. Entretanto, a sensibilidade e a resistência aos quimioterápicos tornam necessária a contínua busca por novos medicamentos (EROLES et al., 2012; RIVENBARK; O'CONNOR; COLEMAN, 2013).

A identificação de fármacos utilizados em determinadas doenças em novas indicações terapêuticas, como na terapia do câncer, é conhecida como reposição de fármacos. Uma das vantagens desta abordagem é que os estudos pré-clínicos já foram estabelecidos (GUPTA et al., 2013). Assim, a proposta do trabalho foi analisar o efeito da liraglutida na malignidade de células tumorais de mama.

A liraglutida é um análogo ao GLP-1, utilizada no tratamento da diabetes mellitus do tipo 2 (RUSSELL-JONES, 2009). Estudos com análogos de GLP-1, como a exenatida, mostraram que esta reduz a viabilidade das células tumorais de mama (em até 50%), levando a apoptose, por aumentar os níveis de AMP cíclico (AMPC), que ativa inibidores do ciclo celular (LIGUMSKY et al., 2012). Ainda não foi relatado o efeito da liraglutida em células tumorais de mama e uma das vantagens da liraglutida sobre os outros análogos de GLP-1 é que ela apresenta um tempo de meia vida maior, o que possibilita uma dose diária do medicamento (RUSSELL-JONES, 2009).

Inicialmente, foi realizado o ensaio para testar a viabilidade das células tumorais MCF-7, que possui características epiteliais, MDA-MB-231 e MDA-MB-436, linhagens triplo-negativas e com características mesenquimais, e a linhagem normal de mama HB4a, nas quais se testaram diferentes concentrações de liraglutida por 24 e 48 horas. A liraglutida não afetou a viabilidade de nenhuma das linhagens (Figura 5). Os resultados presentes mostraram que, assim como a exenatida, a liraglutida não afetou a

viabilidade das células normais de mama. Entretanto, as linhagens tumorais também não tiveram sua viabilidade afetada. A partir disso, os testes com as concentrações de 10, 30 e 100 nM foram usadas para avaliar a migração celular e expressão gênica e relacionar com os efeitos antitumorais, uma vez que estas concentrações não influenciam na viabilidade celular.

Nos ensaios de migração celular, a MDA-MB-231 tratada com as concentrações de 10, 30 e 100 nM de liraglutida por 24 horas proporcionou uma redução significativa na migração celular (Figura 7), sendo a concentração de 30 nM mais significativa. Assim, essa concentração foi escolhida para as análises de expressão dos genes relacionados com a TEM e a metilação do DNA dos genes *CDH1* e *VIM* nas linhagens tumorais. Nas análises de expressão gênica quantitativa, observou-se o aumento da expressão de *CDH1* (Figura 8) na MDA-MB-231, correlacionado com o baixo potencial migratório, associado também com a desmetilação de *CDH1* (Figura 21). Estudos mostraram que a re-expressão de E-caderina está envolvida na reversão da transição epitélio-mesênquima (TEM) em linhagens tumorais de mama (CHAO; SHEPARD; WELLS, 2010).

Os experimentos por 48 horas e 10 dias na MDA-MB-231 foram feitos para verificar se as expressões dos genes *CDH1*, *VIM*, *ESR1*, *SNAIL* e *EGFR* alterariam conforme o tempo (Figura 10). Os resultados foram semelhantes aos encontrados pelo período de 24 horas, sendo este selecionado para as demais análises.

O ensaio de migração celular da linhagem MCF-7, que tem baixo potencial migratório, foi realizado com as mesmas concentrações de liraglutida (10, 30 e 100 nM) que a MDA-MB-231, a fim de analisar se algumas delas interferiria no potencial migratório. Como visto na Figura 6, a MCF-7 não se tornou mais migratória após o tratamento com a liraglutida. Entretanto, as análises de expressão gênica mostraram que houve um aumento de quase todos os genes analisados (*CDH1*, *VIM*, *ESR1*, *PGR*, *SNAIL*, *HOTAIR*, *MMP-14* e *TIMP-2*). Por apresentarem heterogeneidade entre si, as linhagens tumorais podem se comportar de maneiras diferentes diante de mesmos compostos adicionados, podendo a liraglutida estimular vias diferentes nas linhagens e, assim, resultar em diferentes expressões gênicas. O GLP-1 age de diferentes maneiras nos diferentes tipos de células, como por exemplo, ele é capaz de induzir a proliferação

celular das células beta-pancreáticas pela via do AMP cíclico, enquanto que nas células tumorais de mama, o GLP-1 ativa vias diferentes do AMPc, que levam à inibição da proliferação celular (LIGUMSKY et al., 2012).

A análise do efeito da liraglutida nas linhagens tumorais de mama mostrou que houve diminuição significativa na migração celular da linhagem mesenquimal MDA-MB-231, juntamente com o aumento dos níveis de *CDH1*, mostrando que a liraglutida atua na reversão da TEM; além disso, aparentemente, a liraglutida não afetou as características epiteliais da MCF-7, como mostrado na capacidade de migração desta linhagem. Diante disso, a linhagem MDA-MB-436, do tipo triplo-negativa, foi utilizada para os tratamentos para se analisar a ação da liraglutida em outra linhagem mesenquimal. A MDA-MB-436 também apresentou resultados semelhantes à MDA-MB-231, sendo que sua redução na migração foi de aproximadamente 50 % comparada ao controle, e somente o gene *CDH1* apresentou aumento significativo (Figura 11).

O fator de crescimento epidermal (EGF) é capaz de induzir a TEM em células epiteliais, como a MCF-7, por aumentar o potencial migratório das células, pelo aumento da expressão de vimentina, snail, MMP-9 e outros marcadores relacionados com células mesenquimais (HARDY et al., 2010; KIM et al., 2009; LEE et al., 2008; VERGARA et al., 2011). Por isso, o EGF foi utilizado na MCF-7 para indução da TEM e, conseqüentemente, analisar os efeitos da liraglutida após esta indução.

Os resultados apresentados com o tratamento de EGF na MCF-7 mostraram que as células estimuladas com este fator de crescimento são induzidas a TEM, caracterizada pela aquisição de um fenótipo mesenquimal, com um aumento na motilidade celular (Figura 13) e aumento da expressão de marcadores mesenquimais (Figura 14). A vimentina e o fator de transcrição snail tiveram seus níveis aumentados de expressão de mRNA e *CDH1*, uma diminuição (Figura 14). Isto pode ser explicado pela estimulação do receptor EGF, que resulta na ativação da via Ras-MAPK e conseqüente aumento de *VIM* e *SNAIL* que, por sua vez, reprime a transcrição de *CDH1* (LU et al., 2003). Além disso, os dados apresentados também corroboram com o estudo de Ackland e colaboradores (2003), no qual relataram que células tumorais de mama (PMC42-LA) tratadas com o EGF apresentam aumento da expressão proteica de

vimentina e de fibronectina, junto com a redução de E-caderina e aumento da migração celular (ACKLAND et al., 2003).

O aumento nos níveis de *EGFR* na MCF-7 após tratamento por 10 dias com o EGF (Figura 10) também está associada ao surgimento de uma característica mesenquimal. Isto já havia sido mostrado anteriormente e corrobora nossos resultados, sendo que a linhagem epitelial MCF-7 apresentou um fenótipo similar à linhagem tumoral de mama altamente invasiva MDA-MB-231, que apresenta altos níveis de *EGFR* (FITZPATRICK; LACHANCE; SCHULTZ, 1984).

As metaloproteases de matriz são responsáveis pela degradação da matriz extracelular (MEC), o que possibilita a migração e invasão das células tumorais para locais distantes em relação a sua origem (NABESHIMA et al., 2002). Após os tratamentos com EGF, houve o aumento da expressão das metaloproteases *MMP-2* e *MMP-14*, uma vez que o EGF influencia na expressão dessas metaloproteases, principalmente por estar envolvido com a morfogênese de tecidos (KHERADMAND; RISHI; WERB, 2002). Sabe-se que *MMP-2* possui ilhas CpG na sua região promotora que influenciam na expressão do gene (CHERNOV et al., 2009). A fim de analisar se o aumento da expressão da *MMP-2* no tratamento da MCF-7 com EGF por 4 e 10 dias e da MDA-MB-231 por 10 dias está relacionada com a desmetilação, foi realizado o sequenciamento da sua região promotora. A MCF-7 tratada por com EGF por 4 dias não apresentou diferença na metilação. Contudo, observou-se que no tratamento por 10 dias (Figura 17) ocorreu uma desmetilação significativa (aproximadamente 27% em relação ao controle). Esses dados são semelhantes àqueles vistos pelo nosso grupo de pesquisa no estudo de Pereira e colaboradores (2014), o qual relataram que a região promotora do gene *MMP-2*, após o cultivo das linhagens MCF-7 e MDA-MB-436 com a fibronectina, sofreu uma desmetilação de 30%, assim como ganho de marcas de cromatina ativa (PEREIRA et al., 2014). Já a MDA-MB-231 não apresentou diferença de metilação para *MMP-2*, porém a sua ativação pode estar relacionada com marcas de histonas que possibilitam a transcrição gênica.

Samudio-Ruiz e Hudson (2012), por meio de experimentos utilizando células tumorais de ovário induzidas com EGF, mostraram que este fator de crescimento leva ao aumento dos níveis da atividade das DNMTs, pela contínua ativação de *EGFR*,

porém isto não resulta no aumento da metilação do gene que codifica para E-caderina, o que pode explicar o motivo das células MCF-7 tratadas com EGF apresentarem uma diminuição de *CDH1* (Figura 14), sem a metilação deste gene (Figura 21).

A linhagem MDA-MB-231 é conhecida pela sua alta taxa migratória e potencial metastático, fatores estes que conferem um fenótipo mais agressivo (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011). O tratamento com EGF nesta linhagem foi realizado com o objetivo de verificar sua influência na malignidade desta linhagem. Os resultados mostraram o aumento da expressão de *CDH1* (Figura 16), associado com a desmetilação da região promotora deste gene (Figura 21), porém, a expressão dessa molécula de adesão celular não foi suficiente para diminuir a taxa de migração celular (Figura 15).

Quando submetida ao tratamento com o EGF e posterior adição da liraglutida, por 24 horas, a linhagem MCF-7 apresentou baixa migração, equivalente ao seu controle, e a expressão de *CDH1* permaneceu igual ao controle, o que sugere que a liraglutida reverteu a TEM induzida por EGF. Junto com os resultados obtidos com as linhagens mesenquimais, a liraglutida se mostrou capaz de inibir o potencial de migração das células, com o aumento da expressão de *CDH1* e desmetilação desse gene.

Os resultados obtidos na expressão proteica de E-caderina mostraram que, apesar de haver um aumento nos transcritos nas linhagens mesenquimais (MDA-MB-231 e MDA-MB-436), estes não foram suficientes para sua detecção no ensaio de *western blot* (Figura 22). Estudos revelaram que a alta expressão de microRNA 10b (miR-10b) está relacionada com tumores metastáticos de câncer de mama (AHMAD et al., 2014; LIU et al., 2012) e, este microRNA é um potente inibidor pós transcricional de E-caderina, por se ligar na região 3'UTR do mRNA, levando a degradação dos transcritos (LIU et al., 2012). Além disso, a inibição de miR-10b gera o aumento da expressão gênica e proteica de E-caderina, possivelmente explicando o motivo do tratamento com a liraglutida não resultar no aparecimento de E-caderina nas linhagens mesenquimais.

7 CONCLUSÕES

Os experimentos com a liraglutida resultaram numa mudança fenotípica das linhagens tumorais de mama triplo-negativa, MDA-MB-231 e MDA-MB-436, com a consequente redução da migração celular após os tratamentos com o fármaco. Esse efeito foi associado com alterações moleculares, nas quais se observou o aumento da expressão de *CDH1*, juntamente com a desmetilação deste gene.

Após a indução da linhagem MCF-7 com o fator de crescimento epidermal (EGF), as células apresentaram um fenótipo mesenquimal, com o aumento da migração celular, juntamente com a redução da expressão de *CDH1* e aumento da expressão de *SNAIL* e *VIM*, considerados genes marcadores mesenquimais. Com a adição da liraglutida na MCF-7 tratada com EGF, a linhagem não adquiriu potencial migratório e a expressão de *CDH1* se igualou ao controle, o que mostra que a liraglutida foi capaz de reverter o efeito da TEM induzido por EGF na MCF-7.

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

REFERÊNCIAS

- ACKLAND, M. L. et al. Epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 83, n. 3, p. 435–448, 2003.
- AHMAD, A. et al. Up-regulation of microRNA-10b is associated with the development of breast cancer brain metastasis. v. 6, n. 4, p. 384–390, 2014.
- ALBERTSON, D. G. et al. Chromosome aberrations in solid tumors. **Nature genetics**, v. 34, n. 4, p. 369–376, 2003.
- ALLFREY, V. G.; FAULKNER, R.; MIRSKY, A. E. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 51, n. 1938, p. 786–94, 1964.
- BATLLE, E. et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. **Nature cell biology**, v. 2, n. 2, p. 84–89, 2000.
- BAUVOIS, B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1825, n. 1, p. 29–36, 2012.
- BAYLIN, S. B.; JONES, P. A. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. **Nature reviews. Cancer**, v. 11, n. 10, p. 726–34, 2011.
- BERG, M.; SOREIDE, K. EGFR and downstream genetic alterations in KRAS/BRAF and PI3K/AKT pathways in colorectal cancer: implications for targeted therapy. **Discovery medicine**, v. 14, n. 76, p. 207–14, set. 2012.
- BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. **Human molecular genetics**, v. 9, n. 16, p. 2395–2402, 2000.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, p. 6–21, 2002.
- BISWAS, S. et al. CXCL13-CXCR5 co-expression regulates epithelial to mesenchymal transition of breast cancer cells during lymph node metastasis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 143, n. 2, p. 265–276, 2014.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–54, 7 maio 1976.
- CANO, A et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. **Nature cell biology**, v. 2, n. 2, p. 76–83, 2000.
- CAO, Q. et al. Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer.

Oncogene, v. 27, n. 58, p. 7274–7284, 11 dez. 2008.

CARPENTER, G.; COHEN, S. Epidermal Growth Factor. **Annual Review of Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 193–216, jun. 1979.

CASALINI, P. et al. Role of HER receptors family in development and differentiation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 200, n. 3, p. 343–350, 2004.

CHANG, H. et al. Synergistic action of master transcription factors controls epithelial-to-mesenchymal transition. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 6, p. 2514–2527, 2016.

CHAO, Y. L.; SHEPARD, C. R.; WELLS, A. Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. **Molecular cancer**, v. 9, p. 179, 2010.

CHERNOV, A. V. et al. Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 19, p. 12727–12734, 8 maio 2009.

CLARK, I. M. et al. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 40, n. 6-7, p. 1362–1378, 2008.

COHEN, S. Nobel lecture. Epidermal growth factor. **Bioscience reports**, v. 6, n. 12, p. 1017–28, dez. 1986.

COSTA, F. F. et al. SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 165, n. 2, p. 135–143, 2006.

COULOMBE, P. A.; WONG, P. Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. **Nature cell biology**, v. 6, n. 8, p. 699–706, 2004.

CUMMINGS, M. C. et al. Metastatic progression of breast cancer: Insights from 50 years of autopsies. **Journal of Pathology**, v. 232, n. 1, p. 23–31, 2014.

DENT, R. et al. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 15, p. 4429–4434, 2007.

DERYUGINA, E. I. et al. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin $\alpha\beta 3$ promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. **Experimental cell research**, v. 263, n. 2, p. 209–223, 2001.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161–174, mar. 2002.

EROLE, P. et al. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 6, p. 698–707, 2012.

ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 4, p. 259–69, 2006.

ESTELLER, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 4, p. 286–298, 6 abr. 2007.

ETTINGER, D. S. Lung Cancer Clinical Implications of EGFR Expression in the Development and. p. 358–373, 2006.

FIDAN-YAYLALI, G. et al. Antidiabetic exendin-4 activates apoptotic pathway and inhibits growth of breast cancer cells. **Tumor Biology**, p. 2647–2653, 2015.

FIGUEIRA, R. C. S. et al. Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential. **BMC cancer**, v. 9, p. 20, 2009.

FITZPATRICK, S. L.; LACHANCE, M. P.; SCHULTZ, G. S. Characterization of epidermal growth factor receptor and action on human breast cancer cells in culture. **Cancer Res**, v. 44, n. 8, p. 3442–3447, 1984.

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG Islands in vertebrate genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 196, n. 2, p. 261–282, 1987.

GOMES, L. R. et al. TGF- β 1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells. **BMC cancer**, v. 12, n. 1, p. 26, 2012.

GUIL, S.; ESTELLER, M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: Tying it all together. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, n. 1, p. 87–95, 2009.

GUPTA, S. C. et al. Cancer drug discovery by repurposing : teaching new tricks to old dogs. v. 34, n. 9, 2013.

HABERLAND, M.; MONTGOMERY, R. L.; OLSON, E. N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. **Nature reviews. Genetics**, v. 10, n. 1, p. 32–42, 2009.

HAGEMANN, T. et al. Molecular profiling of cervical cancer progression. **British journal of cancer**, v. 96, n. 2, p. 321–8, 2007.

HAJJARI, M.; SALAVATY, A. HOTAIR : an oncogenic long non-coding RNA in different cancers. **Cancer Biology & Medicine**, v. 12, p. 1–9, 2015.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. v. 100, p. 57–70, 2000.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARDY, K. M. et al. ErbB/EGF signaling and emt in mammary development and breast cancer. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, n. 2, p. 191–199, 2010.

HAY, E. D. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. **Developmental Dynamics**, v. 233, n. 3, p. 706–720, 2005.

HAYATSU, H. Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis — A personal account. **Proceedings of the Japan Academy, Series B, Physical and biological sciences**, v. 84, n. 8, p. 321.330, 2008.

HERMAN, J. G. et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 18, p. 9821–9826, 1996.

HICKS, B. M. et al. Glucagon-like peptide-1 analogues and risk of breast cancer in women with type 2 diabetes: population based cohort study using the UK Clinical Practice Research Datalink. **Bmj**, p. i5340, 20 out. 2016.

HOFMANN, U. B. et al. Coexpression of integrin $\alpha(v)\beta 3$ and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) coincides with MMP-2 activation: Correlation with melanoma progression. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 4, p. 625–632, 2000.

HOLLIDAY, D. L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 4, p. 215, 2011.

HSU, H.-C. et al. Stromal Fibroblasts from the Interface Zone of Triple Negative Breast Carcinomas Induced Epithelial-Mesenchymal Transition and its Inhibition by Emodin. **PLoS one**, v. 12, n. 1, p. e0164661, 2017.

HYNES, N. E.; LANE, H. A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 5, p. 341–54, 2005.

INCA. **Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil**. INCA ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

ITOH, Y. MT1-MMP: a key regulator of cell migration in tissue. **IUBMB life**, v. 58, n. 10, p. 589–96, 2006.

JACKSON, B. C.; NEBERT, D. W.; VASILIOU, V. Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. **Human genomics**, v. 4, n. 3, p. 194–201, 2010.

JACKSON, H. W. et al. TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer. **Nature Publishing Group**, 2016.

JACOB, A.; PREKERIS, R. The regulation of MMP targeting to invadopodia during cancer metastasis. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 3, n. February, p. 4, 2015.

JEONG, Y. J. et al. Melittin suppresses EGF-induced cell motility and invasion by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 218–225, 2014.

JUNG, S. et al. The role of vimentin as a methylation biomarker for early diagnosis of cervical cancer. **Molecules and Cells**, v. 31, n. 5, p. 405–411, 2011.

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

KHERADMAND, F.; RISHI, K.; WERB, Z. Signaling through the EGF receptor controls lung morphogenesis in part by regulating MT1-MMP-mediated activation of gelatinase A/MMP2. **Journal of cell science**, v. 115, n. Pt 4, p. 839–48, 2002.

KIM, S. et al. EGF-induced MMP-9 expression is mediated by the JAK3/ERK pathway, but not by the JAK3/STAT-3 pathway in a SKBR3 breast cancer cell line. **Cellular Signalling**, v. 21, n. 6, p. 892–898, 2009.

KOHRMANN, A. et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. **BMC cancer**, v. 9, p. 188, 2009.

KONDAPAKA, S. B.; FRIDMAN, R.; REDDY, K. B. Epidermal Growth Factor and Amphiregulin Up-Regulate Matrix Metalloproteinase-9 (Mmp-9) in Human Breast Cancer Cells. **Int. J. Cancer**, v. 70, n. November 1996, p. 722–726, 1997.

KORNBERG, R. D.; LORCH, Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryotic chromosome. **Cell**, v. 98, p. 285–294, 1999.

KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693–705, 2007.

LACROIX, M.; LECLERCQ, G. Relevance of Breast Cancer Cell Lines as Models for Breast Tumours: An Update. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 83, n. 3, p. 249–289, fev. 2004.

LAKHANI, S. R. et al. **WHO classification of tumours of the breast.** [s.l: s.n.].

LEE, M.-Y. et al. Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: Correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and Snail up-regulation. **Clin. Cancer Res.**, v. 14, n. 15, p. 4743–4750, 2008.

LI, L.; LI, W. Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: Comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 150, p. 33–46, 2015.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.

LIGUMSKY, H. et al. The peptide-hormone glucagon-like peptide-1 activates cAMP and inhibits growth of breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 132, n. 2, p. 449–461, 2012.

LIU, C.-Y. et al. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. **Oncotarget**, v. 6, n. 18, p. 15966–83, 2015.

LIU, Y. et al. MicroRNA-10b targets E-cadherin and modulates breast cancer metastasis. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 18, n. 8, p. BR299–308, 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LIZ, J.; ESTELLER, M. lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1859, n. 1, p. 169–176, 2016.

LU, Z. et al. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of β -catenin, and enhanced tumor cell invasion. **Cancer Cell**, v. 4, n. 6, p. 499–515, 2003.

MARCUCCI, F.; STASSI, G.; DE MARIA, R. Epithelial-mesenchymal transition: a new target in anticancer drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 5, p. 311–325, 2016.

MASUDA, H.; ZHANG, D. Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. **Breast cancer research ...**, v. 136, n. 2, p. 1–21, 2012.

MATTICK, J. S.; MAKUNIN, I. V. Non-coding RNA. **Human molecular genetics**, v. 15 Spec No, n. 1, p. 17–29, 2006.

MCGHEE, J. D.; FELSENFELD, G. The number of charge-charge interactions stabilizing the ends of nucleosome DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 12, p. 2751–2770, mar. 1980.

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

MENASHI, S. et al. Density-dependent regulation of cell-surface association of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in breast-carcinoma cells. **International Journal of Cancer**, v. 75, n. 2, p. 259–265, 1998.

MORGUNOVA, E. et al. Structure of Human Pro-Matrix Metalloproteinase-2: Activation Mechanism Revealed. **Science**, v. 284, n. 5420, p. 1667–1670, 1999.

NABESHIMA, K. et al. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: Role for cell migration. **Pathology International**, v. 52, n. 4, p. 255–264, 2002.

NEVE, R. M. et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. **Cancer Cell**, v. 10, n. 6, p. 515–527, 2006.

NIETO, M. A. et al. EMT: 2016. **Cell**, v. 166, n. 1, p. 21–45, jun. 2016.

ORLICHENKO, L. S.; RADISKY, D. C. Matrix metalloproteinases stimulate epithelial-mesenchymal transition during tumor development. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 25, n. 6, p. 593–600, 2008.

OSBORNE, C. K. et al. Epidermal Growth Factor Stimulation of Human Breast Cancer Cells in. n. JULY, 1980.

PATRA, S. K. Ras regulation of DNA-methylation and cancer. **Experimental Cell Research**, v. 314, n. 6, p. 1193–1201, 2008.

PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Targeting the Epithelial-to-Mesenchymal Transition: The Case for Differentiation-Based Therapy. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. LXXXI, p. 030957, 2017.

PEINADO, H. et al. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 1, p. 306–19, 2004.

PEREIRA, I. T. et al. Fibronectin Affects Transient MMP2 Gene Expression through DNA Demethylation Changes in Non-Invasive Breast Cancer Cell Lines. v. 9, n. 9, p. 1–7, 2014.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–52, 17 ago. 2000.

RAE, J. M. et al. EGFR and EGFRvIII expression in primary breast cancer and cell lines. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 87, n. 1, p. 87–95, 2004.

RAYMOND, W. A.; LEONG, A. S.-Y. Vimentin—a new prognostic parameter in breast carcinoma? **The Journal of Pathology**, v. 158, n. 2, p. 107–114, jun. 1989.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 425–432, 2007.

RIVENBARK, A. G.; O'CONNOR, S. M.; COLEMAN, W. B. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: Challenges for personalized medicine. **American Journal of Pathology**, v. 183, n. 4, p. 1113–1124, 2013.

ROTHHUT, B. et al. Epidermal growth factor stimulates matrix metalloproteinase-9 expression and invasion in human follicular thyroid carcinoma cells through Focal adhesion kinase. **Biochimie**, v. 89, n. 5, p. 613–624, 2007.

RUSSELL-JONES, D. Molecular, pharmacological and clinical aspects of liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 297, n. 1-2, p. 137–140, 2009.

SAMUDIO-RUIZ, S. L.; HUDSON, L. G. Increased DNA methyltransferase activity and DNA methylation following epidermal growth factor stimulation in ovarian cancer cells. **Epigenetics**, v. 7, n. 3, p. 216–224, 2012.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **BioTechniques**, v. 17, n. 5, p. 914–21, nov. 1994.

SATO, H. et al. **A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells.** *Nature*, 1994.

SAXONOV, S.; BERG, P.; BRUTLAG, D. L. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 5, p. 1412–1417, 2006.

SEMB, H.; CHRISTOFORI, G. The Tumor-Suppressor Function of E-Cadherin. **The American Journal of Human Genetics**, v. 63, n. 6, p. 1588–1593, dez. 1998.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics. v. 66, n. 1, p. 7–30, 2016.

SLAMON, D. et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. **Science**, v. 244, n. 4905, p. 707–712, 12 maio 1989.

STAMPS, A. 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. **International Journal of Cancer**, v. 57, n. 6, p. 865–874, 15 jun. 1994.

STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 41–45, 2000.

SUBIK, K. et al. The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, KI-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 4, n. 1, p. 35–41, 2010.

TALVENSAARI-MATTILA, A. et al. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: A marker of aggressiveness in breast carcinoma. **Cancer**, v. 83, n. 6, p. 1153–1162, 1998.

TÊTU, B. et al. The influence of MMP-14, TIMP-2 and MMP-2 expression on breast cancer prognosis. **Breast cancer research : BCR**, v. 8, n. 3, p. R28, 2006.

THIERY, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 6, p. 442–454, 2002.

THIERY, J. P. et al. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 871–890, 2009.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87–108, mar. 2015.

TSAI, M.-C. et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 329, n. 5992, p. 689–93, 2010.

VAN ROY, F.; BERX, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. **Cellular and**

Molecular Life Sciences, v. 65, n. 23, p. 3756–3788, 23 dez. 2008.

VERGARA, D. et al. Resveratrol inhibits the epidermal growth factor-induced epithelial mesenchymal transition in MCF-7 cells. **Cancer Letters**, v. 310, n. 1, p. 1–8, 2011.

WADDINGTON, C. H. The epigenotype. 1942. **International journal of epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 10–13, 2012.

WALTON, T. J. et al. Quantitative RT-PCR analysis of estrogen receptor gene expression in laser microdissected prostate cancer tissue. **Prostate**, v. 69, n. 8, p. 810–819, 2009.

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

WOLF, I. et al. Diabetes mellitus and breast cancer. **Lancet Oncology**, v. 6, n. 2, p. 103–111 9p, 2005.

WU, Z. E. H. et al. Long non-coding RNA HOTAIR is a powerful predictor of metastasis and poor prognosis and is associated with epithelial-mesenchymal transition in colon cancer. **Oncology Reports**, v. 32, n. 1, p. 395–402, 2014.

WÜRTH, R. et al. Drug-repositioning opportunities for cancer therapy : Novel molecular targets for known compounds Drug-repositioning opportunities for cancer therapy : novel molecular targets for known compounds. **Drug Discovery Today**, n. October 2015, 2016.

XU, R. et al. Arf6 regulates EGF-induced internalization of E-cadherin in breast cancer cells. **Cancer cell international**, v. 15, n. 1, p. 11, 2015.

YASUDA, H. et al. Elevated CD133, but not VEGF or EGFR, as a predictive marker of distant recurrence after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. **Oncology reports**, v. 22, n. 4, p. 709–17, 31 out. 2009.

ZAVADIL, J.; BÖTTINGER, E. P. TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. **Oncogene**, v. 24, n. 37, p. 5764–5774, 2005.

ZEISBERG, M.; NEILSON, E. G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1429–1437, 2009.