



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JÚLIA MENEZES TATSCH

ESTUDO DO EFEITO ANTITUMORAL E DOS MECANISMOS EPIGENÉTICOS  
INDUZIDOS PELA DULAGLUTIDA NA TERAPIA DO CÂNCER DE MAMA

CURITIBA

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JÚLIA MENEZES TATSCH

ESTUDO DO EFEITO ANTITUMORAL E DOS MECANISMOS EPIGENÉTICOS  
INDUZIDOS PELA DULAGLUTIDA NA TERAPIA DO CÂNCER DE MAMA

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giseli Klassen  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edneia Amancio de  
Souza Ramos Cavalieri

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Tatsch, Júlia Menezes

Estudo do efeito antitumoral e dos mecanismos epigenéticos induzidos pela dulaglutida na terapia do câncer de mama. / Júlia Menezes Tatsch. – Curitiba, 2020.

81 p.: il.

Orientador: Giseli Klassen.

Coorientadora: Edneia Amancio de Souza Ramos Cavalieri.

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

1. Mamas - Câncer. 2. Ensaio de seleção de medicamentos antitumorais. 3. Dulaglutida. I. Título. II. Klassen, Giseli, 1966-. III. Cavalieri, Edneia Amancio de Souza Ramos, 1981-. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (22. ed.) 614.5999449



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,  
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JÚLIA MENEZES TATSCH** intitulada: **ESTUDO DO EFEITO ANTITUMORAL E DOS MECANISMOS EPIGENÉTICOS INDUZIDOS PELA DULAGLUTIDA NA TERAPIA DO CÂNCER DE MAMA**, sob orientação da Profa. Dra. GISELI KLASSEN, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 26 de Novembro de 2020.

Assinatura Eletrônica

27/11/2020 14:10:22.0

GISELI KLASSEN

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

27/11/2020 13:40:56.0

VIVIAN ROTUNO MOURE VALDAMERI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/11/2020 21:54:12.0

ADRIANA FROHLICH MERCADANTE

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela oportunidade de concluir mais uma etapa da minha vida, pelo aprendizado, por me guiar nos momentos difíceis e por sempre me encorajar a correr atrás dos meus objetivos.

Agradeço minha mãe e meu pai pelo amor, pela minha educação e oportunidades de estudo, por apoiarem as minhas escolhas, ao meu irmão por ser um exemplo de determinação. Aos meus avós Alcides e Ilva pelo carinho e dedicação.

À minha companheira de vida, Vanessa, pelo amor e carinho. Obrigada pelo aconchego e apoio constantes, por ser essa pessoa maravilhosa, íntegra e iluminada que me completa e inspira todos os dias.

À minha segunda família de Curitiba, Gabriel, Karolinne, Raquel e Vanir pelo carinho, conselhos, pelo ombro amigo em todas as circunstâncias, por estarem sempre presentes e alegrando a minha vida.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Giseli Klassen e co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Edneia A. R. S. Cavalieri, pela oportunidade e ensinamentos que me proporcionaram no laboratório de Epigenética da UFPR ao longo desse período.

Aos colegas de laboratório: Lucas, Verônica, Cláudia, Guilherme, Felipe, Fernando, Michelle, Leonardo por tornarem a rotina do laboratório mais alegre, dinâmica e agradável.

## RESUMO

O câncer de mama é o câncer que apresenta os maiores índices mundiais de incidência e mortalidade entre mulheres. Os tumores de mama mais agressivos e com grande probabilidade de formarem metástases são os do tipo triplo negativo (TNG), um subtipo específico definido pela falta de expressão do receptor de estrógeno (gene *ESR1*), receptor de progesterona (gene *PGR*) e pela ausência da superexpressão do receptor de crescimento epidermal 2 (gene *ERBB2*). Alterações epigenéticas interferem diretamente na expressão dos genes *ESR1* e *PGR*, bem como, do gene *ADAM33* que já foi sugerido como supressor de tumor. Os inibidores de metilação do DNA têm demonstrado grande valor na tentativa de reversão do perfil anormal de metilação evidenciado no câncer, sendo capazes de reativar a expressão de genes que podem controlar o crescimento tumoral. Estudos recentes em nosso laboratório utilizando liraglutida demonstraram efeito antitumoral em linhagens tumorais de mama e em modelos de câncer mamário murino através do seu efeito desmetilante do DNA. De forma semelhante à liraglutida, a dulaglutida é um análogo do peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1A) empregado no tratamento do *diabetes mellitus* tipo 2. No presente trabalho, nossos resultados mostraram que a dulaglutida promoveu desmetilação do promotor de gene *ADAM33*, o qual encontra-se hipermetilado e silenciado em tumores agressivos de mama. A desmetilação desse gene e o conseqüente aumento da proteína ADAM33 estão relacionados a um melhor prognóstico e ao aumento da sobrevida no câncer de mama. Além disso, a dulaglutida ineditamente demonstrou atividade antitumoral em modelos de tumor de Ehrlich murino, bem como promoveu um maior processo de necrose e infiltrado inflamatório nos tumores tratados. Esses resultados demonstram que a dulaglutida é um potencial fármaco adjuvante na terapia do câncer de mama e, a sua associação a outros quimioterápicos e à imunoterapia, torna-se uma boa estratégia para futuros estudos e tratamentos no câncer de mama do subtipo TNG.

**Palavras-chave:** Câncer de mama. Análogos GLP-1. Dulaglutida. DNMT.

## ABSTRACT

Breast cancer is the cancer that has the highest worldwide rates of incidence and mortality among women. The most aggressive breast tumors with a high probability of metastasis are the triple negative type (TNG), a specific subtype due to the lack of expression of the estrogen receptor (*ESR1* gene), progesterone receptor (*PGR* gene) and the loss of overexpression of the epidermal growth receptor 2 (*ERBB2* gene). Epigenetic changes directly interfere in the expression of *ESR1* and *PGR* genes, as well as in the *ADAM33* gene that has already been suggested as a tumor suppressor. The use of DNA methylation inhibitors has shown great value in the attempt to reverse the abnormal methylation profile shown in cancer, being able to reactivate the expression of genes that can control tumor growth. Recent studies in our laboratory using liraglutide have demonstrated an antitumor effect in breast tumor cell line and in murine breast cancer models through their DNA demethylating effect. Similarly to liraglutide, dulaglutide is an analog of the glucagon-1-like peptide used to treat type 2 diabetes mellitus. In the present study, our results showed that dulaglutide promoted demethylation of the *ADAM33* gene promoter, which is normally hypermethylated and silenced in aggressive breast tumors. The demethylation of this gene and the consequent increase in the ADAM33 protein are related to a better prognosis and increased survival in breast cancer. In addition, dulaglutide has demonstrated a novel antitumor activity in murine Ehrlich tumor models, as well as promoted a higher process of necrosis and inflammatory infiltrate in the treated tumors. These results demonstrate that dulaglutide is a potential adjuvant drug in breast cancer therapy and its association with other chemotherapy and immunotherapy becomes a good strategy for future studies and treatments of TNG breast cancer.

**Keywords:** Breast Cancer. GLP-1 analogs. Dulaglutide. DNMT.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	INCIDÊNCIA MUNDIAL DE CÂNCER ESTIMADA DE 2018 A 2040.....	14
FIGURA 2-	INCIDÊNCIA ESTIMADA DE CÂNCER NO BRASIL.....	14
FIGURA 3-	PROGRESSÃO DO DIABETES E DO CÂNCER DE MAMA.....	18
FIGURA 4-	ASPECTOS MOLECULARES DO CÂNCER E DA METÁSTASE.....	20
FIGURA 5-	ESTRUTURA DA PROTEÍNA ADAM33.....	21
FIGURA 6-	O PROCESSO DA METILAÇÃO DO DNA.....	23
FIGURA 7-	ESTRUTURA DAS DNMTS HUMANAS.....	24
FIGURA 8-	A METILAÇÃO E DESMETILAÇÃO PASSIVA DO DNA.....	25
FIGURA 9-	PERFIL DE METILAÇÃO DO GENOMA EM CÉLULAS NORMAIS E NO CÂNCER.....	26
FIGURA 10-	DESMETILAÇÃO ATIVA DO DNA.....	27
FIGURA 11-	ESTRUTURA DA CROMATINA.....	28
FIGURA 12-	ESTRUTURA QUÍMICA DO GLP-1 E SEUS ANÁLOGOS.....	40
FIGURA 13-	ESTRUTURA MOLECULAR DA DULAGLUTIDA.....	41
FIGURA 14-	TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> EM MODELO TUMORAL DE EHRLICH.....	47
FIGURA 15-	AMPLIFICAÇÃO DA ILHA-1 DO GENE <i>ADAM33</i> .....	49
FIGURA 16-	PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR.....	50
FIGURA 17-	PCR DE COLÔNIA DOS CLONES SELECIONADOS.....	50
FIGURA 18-	PERFIL DE METILAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE <i>ADAM33</i> .....	51
FIGURA 19-	AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL EM TUMORES DE EHRLICH.....	52
FIGURA 20-	EFEITO DA DULAGLUTIDA SOBRE OS ÓRGÃOS DOS CAMUNDONGOS .....	53
FIGURA 21-	GLICEMIA DOS CAMUNDONGOS.....	54
FIGURA 22-	ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO TUMORAL E HEPÁTICO.....	55



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	AGONISTAS DOS RECEPTORES GLP-1 DISPONÍVEIS NO TRATAMENTO DE <i>DIABETES MELLITUS</i> TIPO 2.....	37
TABELA 2-	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DOS CAMUNDONGOS.....	54
TABELA 3-	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SANGUÍNEOS DOS CAMUNDONGOS.....	54

## LISTA DE SIGLAS

5-Aza – 5-azacitosina  
5-Aza-dC – 5-aza-2'-deoxicitidina/decitabine  
5caC – 5-carboxilcitosina  
5fC – 5-formilcitosina  
5hmC – 5-hidroximetilcitosina  
5mC – 5-metilcitosina  
Acetil-CoA – Acetilcoenzima A  
ADAM33 – A Desintegrina e Metaloproteinase 33  
AMPK – Quinase Ativada por Adenosina Monofosfato  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
CGI1 – Ilha-1 do Gene *ADAM33*  
CpG – Citosina Adjacente à Guanina  
CTA – Antígeno Câncer-Testículo  
CTLA-4 - Proteína Associada aos Linfócitos T Citotóxicos 4  
DPP-4 – Dipeptidil Peptidase-4  
DSBH – Domínio de  $\beta$ -hélice de Fita Dupla  
DM2 – Diabetes Mellitus tipo-2  
DNMT – DNA Metiltransferase  
EAC – Ascite de Células Tumorais de Ehrlich  
EGF – Fator de Crescimento Epidérmico  
EGFR – Receptor de Fator de Crescimento Epidermal  
ERV – Retrovírus Endógeno  
FcRn - Receptor Fc Neonatal  
Fc $\gamma$ R - Receptores Fc $\gamma$  de Alta Afinidade  
GLP-1 – Peptídeo Semelhante ao Glucagon-1  
GLP-1A – Análogo do Peptídeo Semelhante ao Glucagon-1  
HAT – Histona Acetiltransferase  
HDAC – Histona Desacetilase  
HER2 – Receptor do Fator de Crescimento Epidermal 2  
HOTAIR - HOX transcript antisense intergenic RNA  
iDNMT – Inibidor da DNA metiltransferase  
IGFR – Receptor de Fator de Crescimento Insulina-Símile

INCA – Instituto Nacional do Câncer  
IFN- $\gamma$  - Interferon- $\gamma$   
IL-12 – Interleucina 12  
LMA – Leucemia Mieloide Aguda  
MHC I – Complexo de Histocompatibilidade de classe 1  
MSP – PCR Metilação Específica  
MTX - Metotrexato  
ncRNAs – RNAs não Codificadores  
PD-1 – Receptor da Proteína de Morte Programada 1  
PD-L1 - Ligante da Proteína de Morte Programada 1  
PKA – Proteína Quinase A  
RE – Receptor de Estrogênio  
RP – Receptor de Progesterona  
SAM – S-adenosilmetionina  
sdRNA – RNA dupla fita  
SMD – Síndrome mielodisplásica  
TEM – Transição Epitélio-Mesênquima  
TET – Proteínas *Ten-eleven translocation*  
TNG – Carcinomas Triplo-Negativo  
VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
2.1	CÂNCER.....	13
2.1.1	Câncer de Mama.....	15
2.1.2	Câncer de Mama e Diabetes.....	16
2.2	METÁSTASES.....	19
2.3	ADAM33.....	21
2.4	EPIGENÉTICA.....	22
2.4.1	A Metilação do DNA e as Enzimas DNA Metiltransferases.....	23
2.4.2	As Proteínas <i>Ten-eleven translocation</i> e a Desmetilação do DNA.....	27
2.4.3	Modificações Pós-traducionais das Histonas.....	28
2.4.4	RNAs Não-codificantes.....	30
2.5	ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS NO CÂNCER DE MAMA.....	31
2.5.1	Moduladores Epigenéticos.....	31
2.5.2	Imunoterapia.....	33
2.5.3	Associação da Imunoterapia aos Moduladores Epigenéticos.....	35
2.6	PEPTÍDEO SEMELHANTE AO GLUCAGON-1 (GLP-1).....	36
2.6.1	Análogos GLP-1.....	37
2.6.2	Dulaglutida.....	40
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	44
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
5.1	ENSAIO <i>IN VITRO</i> .....	44
5.1.1	Ensaio Biológicos.....	44
5.1.2	Tratamento com Bissulfito de Sódio.....	45
5.1.3	Avaliação do Perfil de Metilação do Promotor do Gene <i>ADAM33</i> .....	45
5.2	ENSAIOS <i>IN VIVO</i> .....	46
5.2.1	Modelo de Tumor de Ehrlich.....	46
5.2.2	Análise dos Parâmetros Sanguíneos.....	47
5.2.3	Análise Histológica.....	48

5.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	48
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
6.1	ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE <i>ADAM33 IN VITRO</i> .....	49
6.2	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DA DULAGLUTIDA EM MODELO DE TUMOR DE EHRLICH MURINO.....	52
6.3	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS.....	53
6.4	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	55
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama apresenta os maiores índices mundiais de incidência e mortalidade entre os cânceres em mulheres, estimando mais de 2 milhões de diagnósticos e 626 mil óbitos em 2018 (BRAY et al., 2018; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020). No Brasil, estima-se que em 2020 a incidência de câncer de mama alcance 66.280 novos casos, o que representa 29,7% dos cânceres em mulheres (INCA, 2020).

Para o diagnóstico do câncer de mama são utilizados dados clínicos patológicos, bem como marcadores de imunohistoquímica, os quais permitem com que o câncer de mama seja classificado em quatro subtipos (KINSELLA et al., 2012; KOS; DABBS, 2016). Algumas terapias mais específicas no câncer de mama utilizam o análogo do estrógeno tamoxifeno e os anticorpos monoclonais trastuzumabe e/ou pertuzumabe, os quais possibilitam o direcionamento do tratamento nos subtipos tumorais que expressam os receptores hormonais e superexpressam HER2, respectivamente (HEO; SYED, 2019; ISHII; MORII; YAMASHIRO, 2019; TREMONT; LU; COLE, 2017).

Os tumores mamários conhecidos como triplo negativos (TNG) são caracterizados pela negatividade tanto na expressão de receptores hormonais RE e RP e ausência de superexpressão de HER2 e, dessa forma, não possuem esses receptores como alvos terapêuticos. Isso deixa disponível apenas poucas opções terapêuticas como a quimioterapia tradicional associada ou não a imunoterapia e, torna os tumores TNG um subtipo de intensa busca de novos tratamentos no câncer de mama (BIANCHINI et al., 2016; CHEANG et al., 2008).

Além dos genes que codificam para RE e RP, o gene *ADAM33* também pode estar silenciado em tumores agressivos de câncer de mama. Conforme já evidenciado em diversos supressores de tumor, o gene *ADAM33* apresenta regulação por mecanismos epigenéticos através da metilação do DNA na região promotora (SENISKI et al., 2009) sendo que a proteína *ADAM33* já foi evidenciada como um biomarcador de câncer de mama triplo negativo (MANICA et al., 2017).

Na literatura já foi evidenciado que mulheres diabéticas apresentam maiores riscos de desenvolverem câncer de mama, bem como, tendem ao desenvolvimento de TNG (BRONSVELD et al., 2017; STARUP-LINDE et al., 2013). Estudos recentes utilizando análogos do peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1A), que são amplamente utilizados no tratamento de *diabetes mellitus* tipo-2 (DM2), demonstraram

a ocorrência da inibição da proliferação celular e redução do risco de câncer prostático, mamário e pancreático (LI et al., 2017; LIGUMSKY et al., 2012; ZHAO et al., 2014). Há evidências que alguns compostos dessa classe, como exenatida e liraglutida, promovam alterações epigenéticas e sejam capazes de inativar a atividade das DNA metiltransferases (DNMTs), enzimas responsáveis pela metilação do DNA. Essa inativação torna-se promissora, uma vez que os níveis de DNMTs estão frequentemente elevados em diversas linhagens tumorais e diversos tipos de câncer (CHEQUIN, 2018; SUBRAMANIAM et al., 2014; YASUDA et al., 2016).

Dessa forma, os GLP-1A surgem destacando-se como possibilidade de terapia adjuvante antitumoral no câncer de mama (CHEQUIN, 2018; LIGUMSKY et al., 2012). No entanto, no tratamento da DM2 a necessidade de duas aplicações diárias de exenatida, e uma vez ao dia de liraglutida, tornou-se um desafio clínico quanto à adesão terapêutica. Por outro lado, a dulaglutida (Trulicity®, Lilly) apresenta eficácia superior no tratamento de DM2 (BASSON et al., 2018; DILLA et al., 2017). Além da excelente efetividade, o seu maior tempo de meia-vida possibilita que a sua administração subcutânea seja realizada semanalmente. Motivo pelo qual ela já foi sugerida como primeira opção injetável indicada no tratamento de DM2 (BASSON et al., 2018; DILLA et al., 2017; PATEL et al., 2019).

Diante disso, buscou-se nesse estudo verificar a potencial capacidade desmetilante da dulaglutida através da análise do perfil de metilação do promotor do gene *ADAM33* em linhagem tumoral TNG de câncer de mama, bem como, avaliar o potencial antitumoral desse fármaco através da utilização de modelo de câncer de mama murino.

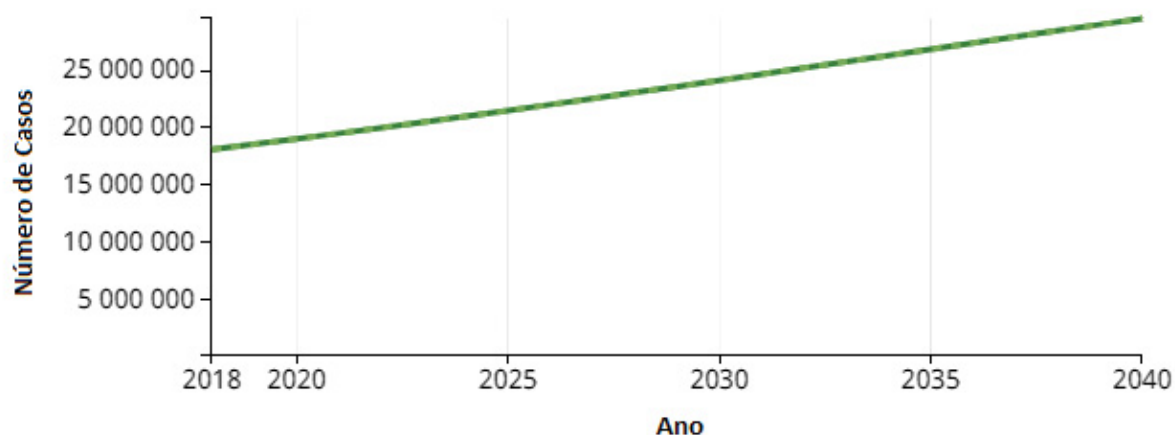
## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 CÂNCER**

O câncer é o nome dado a um grande grupo de doenças que apresenta em comum a capacidade de proliferação celular anormal (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Mundialmente, o câncer está relacionado a mais de 18 milhões de novos diagnósticos e a 9 milhões de óbitos e, dessa forma, constitui um problema grave da saúde pública mundial (BRAY et al., 2018). De acordo com dados da *International Agency for Research on Cancer*, esses números tendem a aumentar

de forma gradativa e a totalizar mais 29,5 milhões de novos diagnósticos até 2040 (FIGURA 1).

FIGURA 1 – INCIDÊNCIA MUNDIAL DE CÂNCER ESTIMADA DE 2018 A 2040



FONTE: Adaptado de *International Agency for Research on Cancer, 2020*.

NOTA: Casos de incidência mundial de câncer estimados até 2040, considerando todos os cânceres, todas as idades e ambos os sexos.

No Brasil, estima-se a ocorrência de 625 mil casos novos de câncer para cada ano do triênio 2020-2022, permanecendo 450 mil se desconsiderarmos os casos de câncer de pele não melanoma. Os tipos de câncer mais evidenciados em homens são próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%) e, nas mulheres, os cânceres de mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,4%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%) compreendem sua maior parte, à exceção do câncer de pele não melanoma em ambos os gêneros (FIGURA 2) (INCA, 2020).

FIGURA 2 – INCIDÊNCIA ESTIMADA DE CÂNCER NO BRASIL

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%



FONTE: INCA, 2020.

NOTA: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto os cânceres de pele não melanoma.

### 2.1.1 Câncer de mama

O câncer de mama apresenta os maiores índices mundiais de incidência e mortalidade entre os cânceres em mulheres, sendo a causa mais frequente de óbitos em mulheres de 11 diferentes regiões do mundo (BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2019). No Brasil, o câncer de mama é o câncer mais frequente em mulheres em todas as regiões do país, com um risco estimado maior nas regiões sudeste e sul (INCA, 2020).

A neoplasia das mamas é uma doença complexa e heterogênea que ocorre devido às alterações genéticas e epigenéticas em células dos ductos ou lóbulos mamários (FENG et al., 2018; POLYAK, 2007). As malignidades mamárias são divididas em carcinomas *in situ*, os quais apresentam proliferação neoplásica delimitada pela membrana basal, e os carcinomas invasivos que encontram-se no estroma devido à invasão da membrana basal (YODER; WILKINSON; MASSOLL, 2007). Existem alguns fatores de risco que podem conferir maior suscetibilidade ao desenvolvimento desta neoplasia, como fatores genéticos, ambientais, comportamentais e reprodutivos, sendo que, podem ser correlacionados ao avanço da idade e a exposição a hormônios como estrógeno e progesterona (DALL; BRITT, 2017; GALVÃO et al., 2011).

Para o diagnóstico do câncer de mama são utilizados os dados clínicos patológicos como tamanho, grau de diferenciação e a quantidade de linfonodos comprometidos, bem como marcadores de imunohistoquímica, tais como, receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) e do receptor de crescimento epidermal 2 (HER2) (KINSELLA et al., 2012; KOS; DABBS, 2016). Em termos moleculares, existe uma classificação do câncer de mama em quatro subtipos: luminal A, luminal B, HER-2 e o basaloide, também conhecido como *basal-like* (DAI et al., 2015; PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2001).

Os subtipos luminais são os mais comuns compreendendo cerca de 75% dos tumores mamários. O subtipo luminal A apresenta a expressão RE+ e RP+, além de ausência de superexpressão de HER2. Este subtipo apresenta melhor prognóstico porque permite a utilização da terapia hormonal, utilizando o análogo de estrógeno

chamado tamoxifeno (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2001; TREMONT; LU; COLE, 2017; WEIGEL; DOWSETT, 2010).

Os tumores do subtipo luminal B, além de apresentarem RE+ e RP+/RP- também podem superexpressar o gene que codifica para HER2. Nesse grupo também se evidenciam a expressão aumentada de outros genes relacionados à proliferação celular, tais como *MIK167*, *CCNB1*, *MYBL2* e, portanto, o conjunto dessas características tornam o subtipo B com pior prognóstico comparados aos tumores luminais A (SORLIE et al., 2001, 2003).

O subtipo HER2 apresenta elevada amplificação do gene (*ERBB2*) e ausência da expressão de RE e RP (SORLIE et al., 2001, 2003). Em relação aos demais subgrupos, esse apresenta o segundo pior prognóstico, visto que a terapia hormonal não é indicada. Contudo, a terapia específica com o anticorpo anti-HER2 utilizando trastuzumabe e/ou pertuzumabe pode ser realizada (HEO; SYED, 2019; ISHII; MORII; YAMASHIRO, 2019; RAKHA; REIS-FILHO; ELLIS, 2010).

O basaloide é um subtipo particularmente agressivo de câncer de mama caracterizado pela expressão de um conjunto de proteínas na camada basal ou externa da glândula mamária adulta, como as citoqueratinas 5, 6 e 17 e, por geralmente apresentar um fenótipo triplo negativo (TNG) (RE-, RP- e HER2-) (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2001, 2003).

Apesar de nem todos os tumores *basal-like* serem TNG, sua grande parte (60% a 90%) compreendem os tumores TNG e eles estão associados a um pior prognóstico no câncer de mama porque não possuem alvo terapêutico definido como os outros subtipos (FAN et al., 2006). Dessa forma, eles não respondem a terapia hormonal com tamoxifeno e nem aos anticorpos monoclonais anti-HER2, o que deixa somente viável a quimioterapia tradicional associada ou não a imunoterapia (BIANCHINI et al., 2016; SCHMID et al., 2018; WAKS; WINER, 2019).

### 2.1.2 Câncer de mama e diabetes

O diabetes é um distúrbio metabólico crônico caracterizado pela presença de uma hiperglicemia persistente. O *diabetes mellitus tipo-1* é conhecido como diabetes juvenil ou diabetes dependente de insulina e é uma condição crônica autoimune na qual o pâncreas não tem capacidade de produzir insulina devido a perda das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas e, como o nome já sugere, ela normalmente é descoberta

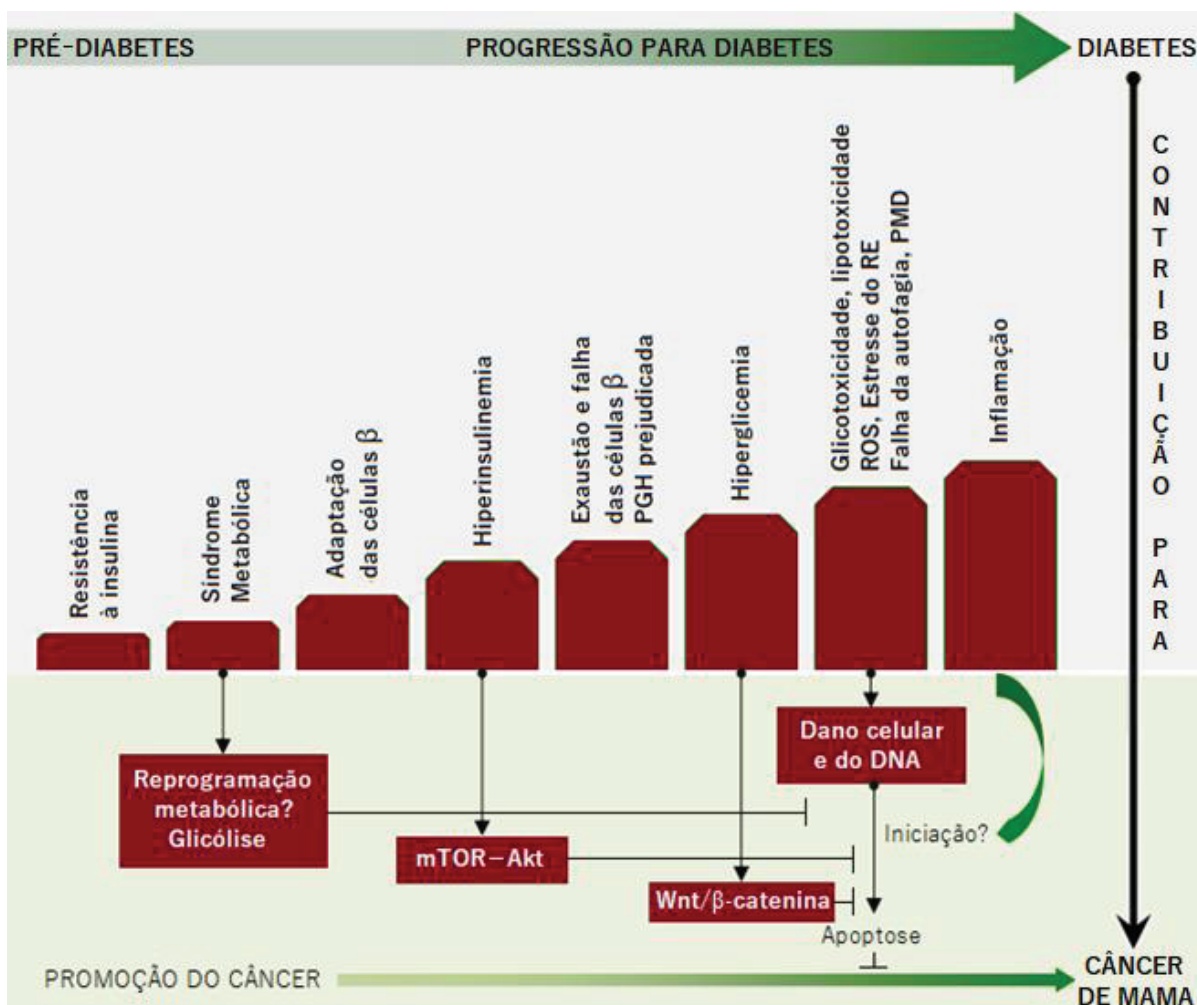
durante a infância (FLIER; UNDERHILL; EISENBARTH, 1986; GEPTS, 1965).

Já a DM2 é uma desordem que pode afetar todas as faixas etárias, visto que, sofre influência direta do estilo de vida, da alimentação e fatores genéticos (HU, 2011). A partir de dietas ricas em açúcares, as células  $\beta$ -pancreáticas vão adquirindo resistência o que pode resultar na perda da capacidade da produção insulínica. Dessa forma, ocorre um déficit no transporte da glicose do sangue aos tecidos, ela acaba se acumulando no sangue e aumentando os níveis glicêmicos (KAHN, 1994).

Estudos sugerem que a deficiência na metabolização da glicose possa ser um fator de risco independente ao desenvolvimento de vários tipos de neoplasias. O aumento no surgimento de câncer de mama em mulheres diabéticas já é bem retratado com estudos demonstrando chances superiores (20-28%) no desenvolvimento de neoplasia mamária por mulheres diabéticas (BOYLE et al., 2012; LARSSON; MANTZOROS; WOLK, 2007). Também foi relatado que mulheres diabéticas na pós-menopausa com 50 anos ou mais têm aproximadamente 20-27% mais chance de desenvolverem câncer de mama (BOYLE et al., 2012). Além disso, mulheres diabéticas com câncer de mama apresentam aproximadamente 50% a mais de chance de virem a óbito por causas diversas quando comparadas às mulheres não diabéticas (PEAIRS et al., 2011).

A sequência de desregulação metabólica que culmina na DM2 inclui resistência à insulina, disfunção das células  $\beta$  e produção insuficiente de glicose hepática que precedem o desenvolvimento de hiperglicemia por anos. A resistência à insulina é uma lesão primária, na qual as células  $\beta$  são capazes de compensar por certo período secretando quantidades suprafisiológicas de insulina (TUDZAROVA; OSMAN, 2015). Porém, em determinado momento, as células  $\beta$  se deterioram e a deficiência relativa de insulina induz a hiperglicemia em jejum. A reprogramação metabólica leva à alteração de carboidratos e do metabolismo lipídico e, em conjunto com a hiperglicemia, podem atuar como um gatilho no desenvolvimento de células cancerosas (FIGURA 3) (SAMUEL et al., 2018).

FIGURA 3 – PROGRESSÃO DO DIABETES E DO CÂNCER DE MAMA



FONTE: Adaptado de Tudzarova e Osman (2015) e de Samuel e colaboradores (2018).

NOTA: Ativação de vias que promovem a proliferação celular, bem como, o surgimento do dano celular/DNA e inibição da apoptose envolvidos na carcinogênese através da progressão da diabetes do tipo 2. PGH = produção insuficiente de glicose hepática. ROS = espécies reativas de oxigênio. RE = retículo endoplasmático. PMD = proteínas mal dobradas.

A hiperlipidemia, a hiperinsulinemia e a hiperglicemia associadas ao diabetes ativam várias vias pró-sobrevivência e inibem a apoptose (SAMUEL et al., 2018). A hiperinsulinemia pode sustentar a via mTOR-Akt ativada através da estimulação de IGFR e/ou de receptores de insulina, bem como cooperar com a via mitogênica Wnt/β-catenina (SAMUEL et al., 2018; TUDZAROVA; OSMAN, 2015). Ambas as vias estão relacionadas à progressão tumoral por estarem envolvidas na proliferação celular, sendo que, também participam do processo de modulação do sistema imune no câncer (GOLDSBERRY et al., 2019; JACKSTADT; HODDER; SANSOM, 2020; JONES; PEARCE, 2017; TIAN; LI; ZHANG, 2019).

Por sua vez, as células são danificadas por glicotoxicidade, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, estresse do retículo endoplasmático

causado pelo acúmulo de proteínas mal dobradas e autofagia aberrante. O dano celular e ao DNA, a inflamação, a falha nos mecanismos de reparo do DNA e inibição da apoptose colaboram com os mecanismos metabólicos e mitogênicos desregulados para iniciar ou promover neoplasia nas células da mama (SAMUEL et al., 2018; TUDZAROVA; OSMAN, 2015).

Além disso, estudos demonstraram que a hiperglicemia ocasionada pela DM2 impede a fosforilação das proteínas *Ten-eleven translocation* (TET) pela proteína quinase ativada por AMP (AMPK). As TETs são responsáveis pelo processo de desmetilação do DNA e sua interferência no perfil de metilação pode favorecer o desenvolvimento de tumores (WU et al., 2018).

## 2.2 METÁSTASES

As células epiteliais polarizadas e justapostas umas às outras formam camadas celulares que são conectadas por estruturas especializadas de membrana em tecidos normais. A adesão celular é necessária para formação de uma barreira permeável (membrana basal) com o intuito de manter a homeostasia celular e atuar na proteção do tecido conjuntivo adjacente (células mesenquimais) (HUANG et al., 2012; THIERY et al., 2009). A transição epitélio-mesênquima (TEM) é um processo coordenado de células e moléculas o qual permite que as células epiteliais polarizadas modifiquem sua interação com a membrana basal e sofram diversas alterações bioquímicas que culminarão na troca do seu fenótipo epitelial por um fenótipo mesenquimal. Esse processo ocorre durante o desenvolvimento embrionário normal, regeneração de tecidos, cicatrização de feridas, porém, também está relacionado a processos patológicos, como fibrose de órgãos e progressão das células tumorais com expansão metastática (KALLURI; NEILSON, 2003; KALLURI; WEINBERG, 2009; NEAGU et al., 2019).

Em torno de 90% das mortes causadas pelo câncer são decorrentes de metástase. O processo metastático é caracterizado pela formação de novas lesões tumorais em regiões distintas da que foi primeiramente evidenciada (CHAFFER; WEINBERG, 2011; FARES et al., 2020). A partir de um fenótipo invasivo, as células podem invadir a matriz circundante e irem em direção aos vasos sanguíneos ou linfáticos, entrando na circulação em direção aos órgãos distantes (CHITTY et al., 2018; WELCH; HURST, 2019). Essas células tumorais circulantes possuem

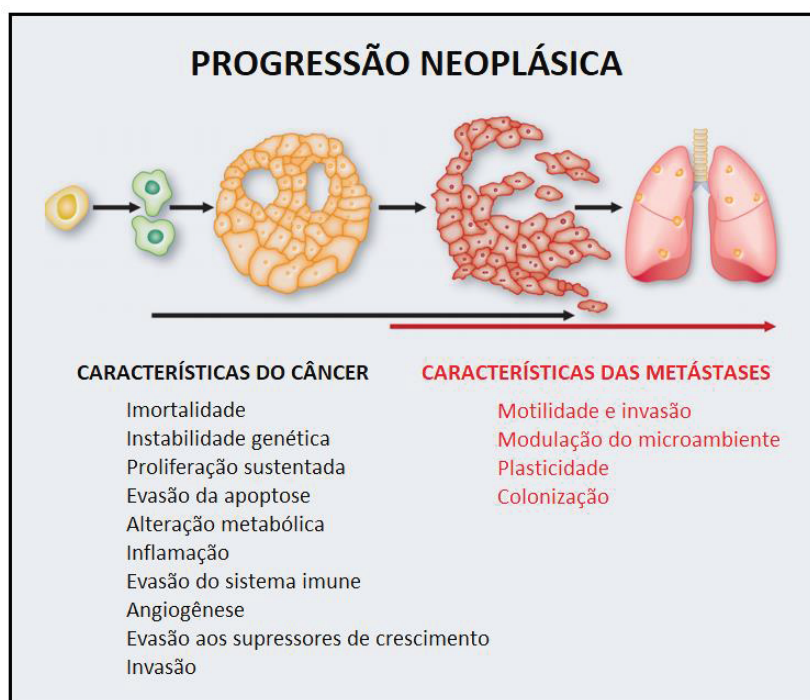
capacidade de sobreviver independente da ancoragem e em sítios distantes e, nesse local, elas necessitam escapar da resposta imune inata e se adaptarem ao microambiente para, posteriormente, darem início ao processo de proliferação celular (CHITTY et al., 2018; FARES et al., 2020; WELCH; HURST, 2019).

No câncer de mama, a colonização metastática é adiada por anos ou décadas em um processo denominado dormência. Ela é definida como um tempo longo entre a remoção do tumor primário e a recaída subsequente em um paciente clinicamente livre de doenças. As células tumorais podem entrar em dormência no seu eventual local metastático ou constituírem um reservatório na medula óssea (STEEG, 2016).

Dentre os principais sítios metastáticos frequentemente evidenciados no câncer de mama, encontram-se os ossos, os pulmões, o cérebro e o fígado, sendo que o foco metastático pode variar de acordo com o subtipo molecular do câncer de mama. Entretanto, já foi evidenciado que independentemente do subtipo, mais de 50% das pacientes podem apresentar metástases múltiplas (UDEN et al., 2019).

Assim como Hanahan e Weinberg (2011) já bem elucidaram os aspectos moleculares do câncer, Welch e Hurst (2019) descreveram as quatro propriedades celulares envolvidas no surgimento das metástases, as quais nos permitem melhor compreender a progressão tumoral e o porquê do câncer metastático apresentar piores prognósticos (FIGURA 4).

FIGURA 4 – ASPECTOS MOLECULARES DO CÂNCER E DA METÁSTASE



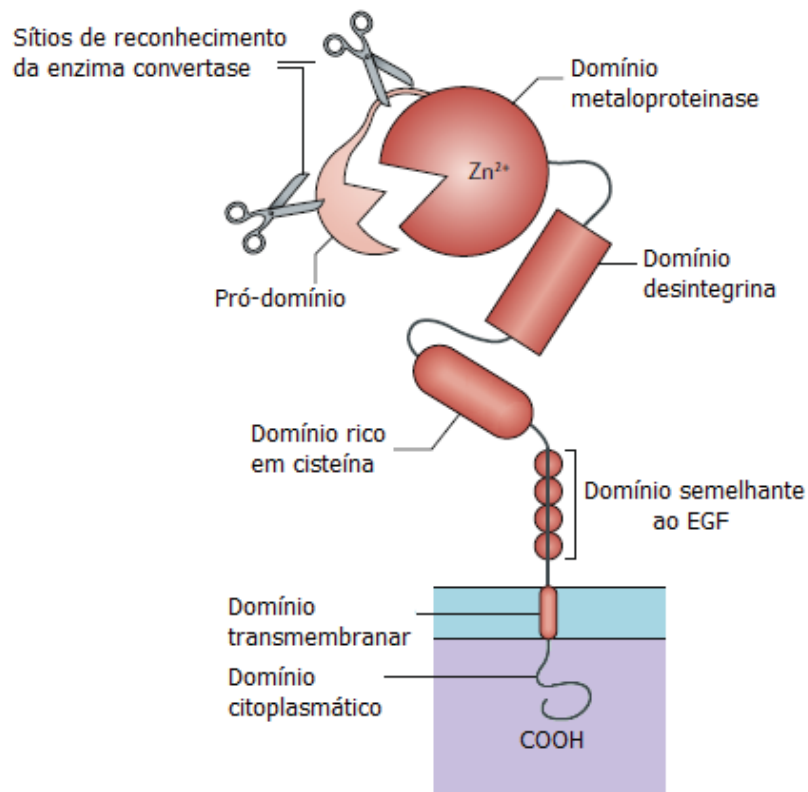
FONTE: Adaptado de Welch e Hurst (2019).

NOTA: As dez características envolvidas na patogênese dos cânceres e as quatro características adquiridas no processo metastático durante a progressão neoplásica.

### 2.3 ADAM33

A ADAM33 é uma proteína codificada pelo gene desintegrina e metaloproteinase 33 (*ADAM33*) localizado no cromossomo humano 20p13 (YOSHINAKA et al., 2002). Ela é uma metaloproteinase dependente de zinco pertencente à família ADAM de proteínas transmembranas do tipo I (SEALS; COURTNEIDGE, 2003). As proteínas dessa família contemplam uma grande complexidade quanto a sua organização estrutural que envolve diferentes domínios que desempenham papel chave não somente na resposta inflamatória, mas como também nas interações intercelulares e célula-matriz, diferenciação da proliferação, sinalização e apoptose (FIGURA 5) (PRIMAKOFF, 2000; WOLFSBERG et al., 1995a, 1995b).

FIGURA 5 – ESTRUTURA DA PROTEÍNA ADAM33



FONTE: Adaptado de Lambrecht; Vanderkerken; Hammad, 2018.

NOTA: A proteína ADAM33 e seus domínios com diferentes funções. O pró-domínio controla a atividade enzimática do domínio metaloproteinase de ligação ao zinco ( $Zn^{2+}$ ), responsável por desprender o

ectodomínio e por liberar as proteínas como citocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão e outras proteínas. O domínio desintegrina está envolvido na adesão e migração celular. O domínio rico em cisteína pode estar envolvido nas interações proteína-proteína e o domínio semelhante ao EGF pode estar envolvido na fusão da membrana. O domínio transmembranar ancora a ADAM33 na membrana celular e o domínio citoplasmático pode desempenhar um papel na transdução de sinal. A ADAM33 torna-se ativa após clivagem mediada por uma enzima convertase conhecida como furina ou por auto-catálise.

Aproximadamente 10% da ADAM33 está localizada na membrana plasmática, o restante da proteína é produzida dentro do citoplasma, onde é encontrada preferencialmente no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, sendo que, algumas isoformas também podem ser secretadas (YOSHINAKA et al., 2002).

Estruturalmente, a proteína ADAM33 apresenta todos domínios característicos da família ADAM, incluindo a sequência consenso de ligação ao zinco no sítio catalítico necessária para atividade do domínio metaloproteinase. Entretanto, assim como algumas outras ADAMs, a ADAM33 parece estar relacionada com a adesão intercelular mediada pela capacidade do seu domínio desintegrina em interagir com as integrinas  $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha 5\beta 1$  e promover inibição da migração celular (HUANG; BRIDGES; WHITE, 2005).

A ADAM33 está diretamente envolvida na asma devido a sua capacidade de promover remodelamento tecidual, o qual está associado ao espessamento das vias aéreas e consequente perda gradativa da função pulmonar (CAKEBREAD et al., 2004; HAITCHI et al., 2005). No câncer, o gene *ADAM33* já foi sugerido como um gene supressor de tumor que possui regulação mediada através de mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA na sua região promotora (SENISKI et al., 2009). Baixos níveis da proteína ADAM33 estão relacionados à redução da sobrevivência no câncer de mama e, além disso, ela já foi evidenciada como um marcador molecular de carcinoma mamário agressivo (MANICA et al., 2017).

## 2.4 EPIGENÉTICA

A epigenética é uma área de fronteira da ciência que vem trazendo perspectivas favoráveis à terapia do câncer. Ela é definida pelas alterações reversíveis e herdáveis do genoma que alteram a expressão gênica e não modificam a sequência de nucleotídeos do DNA (FEINBERG; TYCKO, 2004; NOWSHEEN et al., 2014).

Existem três mecanismos epigenéticos descritos que estão relacionados à regulação da expressão gênica em eucariontes, sendo eles, a metilação do DNA, as

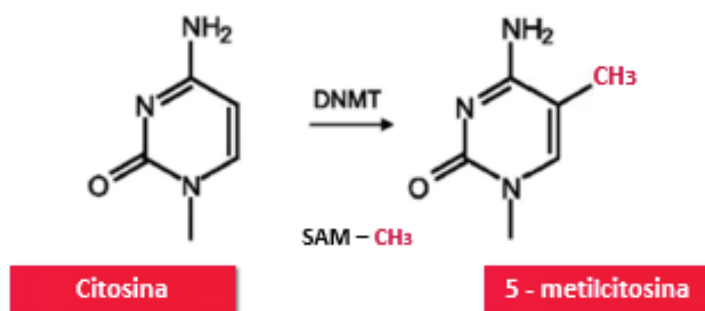


modificações pós-traducionais das histonas e os RNAs não codificadores (ncRNAs) (JONES, 2012; NOWSHEEN et al., 2014). Alterações nesses padrões podem proporcionar expressão ou silenciamento de genes envolvidos nos processos biológicos de todo o genoma, o que estaria diretamente correlacionado as desregulações fisiológicas e ao surgimento de doenças, como o câncer (ROBERTI et al., 2019; SHARMA; KELLY; JONES, 2010). Dessa forma, a correta elucidação das diversas alterações epigenéticas relacionadas aos eventos carcinogênicos é de extrema importância para saúde mundial, visto que, proporcionará o direcionamento para novas abordagens terapêuticas (CHENG et al., 2019; EGGER et al., 2004).

#### 2.4.1 A metilação do DNA e as enzimas DNA metiltransferases (DNMTs)

A metilação do DNA é um evento celular mediado pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) (FIGURA 6). Já foram identificadas oito DNMTs, porém, apenas cinco delas fazem parte do genoma humano. As DNMT1, DNMT3A e DNMT3B são enzimas canônicas que catalisam a adição de um grupamento metil ao carbono 5 de citosinas adjacentes às guaninas. Já as DNMT2 e DNMT3L são enzimas não canônicas e não apresentam atividade catalítica de DNMT. E por último, as DNMTs 4, 5 e 6 foram recentemente identificadas em algas e fungos (LYKO, 2018).

FIGURA 6 – O PROCESSO DA METILAÇÃO DO DNA



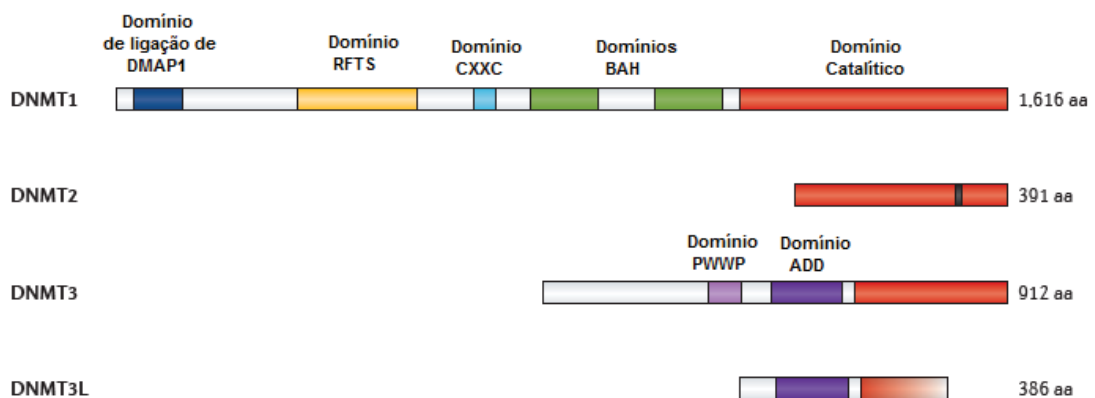
FONTE: Adaptado de Chakarov e colaboradores (2014).

NOTA: A metilação do DNA consiste na inserção covalente de um grupamento metil (CH<sub>3</sub>) ao carbono 5 de uma citosina adjacente a uma guanina (dinucleotídeo CpG). A formação de 5-metilcitosina é a marca de metilação mais evidenciada em eucariotos e é catalisada por enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) as quais utilizam o doador do grupamento metil chamado S-adenosilmetionina (SAM) (BIRD, 1986; NAKAO, 2001).

Nos mamíferos, as DNMTs apresentam um domínio regulador N-terminal e um domínio catalítico C-terminal, porém, podem apresentar algumas distinções entre

elas (FIGURA 7). A DNMT1 é a enzima responsável pela manutenção dos padrões de metilação nas células filhas durante a replicação e está localizada próxima ao *loci* de replicação, com uma grande afinidade por CpGs hemimetilados (JELTSCH, 2006). O padrão de metilação do DNA serve como uma marca epigenética que conduz a uma repressão da expressão gênica (JELTSCH, 2002; JONES et al., 2001; ROBERTSON; WOLFFE; REGULATION, 2000) e é utilizado para memorizar decisões do desenvolvimento celular e controlar a expressão monoalélica de genes durante o *imprinting* e inativação do cromossomo X (CHAO et al., 2002; FERGUSON-SMITH et al., 2001).

FIGURA 7 – ESTRUTURAS DAS DNMTS HUMANAS



FONTE: Adaptado de Lyko (2018).

NOTA: Representação dos domínios presentes nas diferentes DNA metiltransferases. A DNMT2 apresenta somente o domínio catalítico. O domínio N-terminal da DNMT1 contém vários subdomínios menores conservados como o domínio de ligação à DMAP1, o domínio RFTS, domínio CXXC e os domínios conservados de homologia bromo-adjacente (BAH). Domínios conservados também foram descritos para enzimas DNMT3, incluindo um domínio Pro-Trp-Trp-Pro (PWWP) e um domínio ATRX – DNMT3 – DNMT3L (ADD).

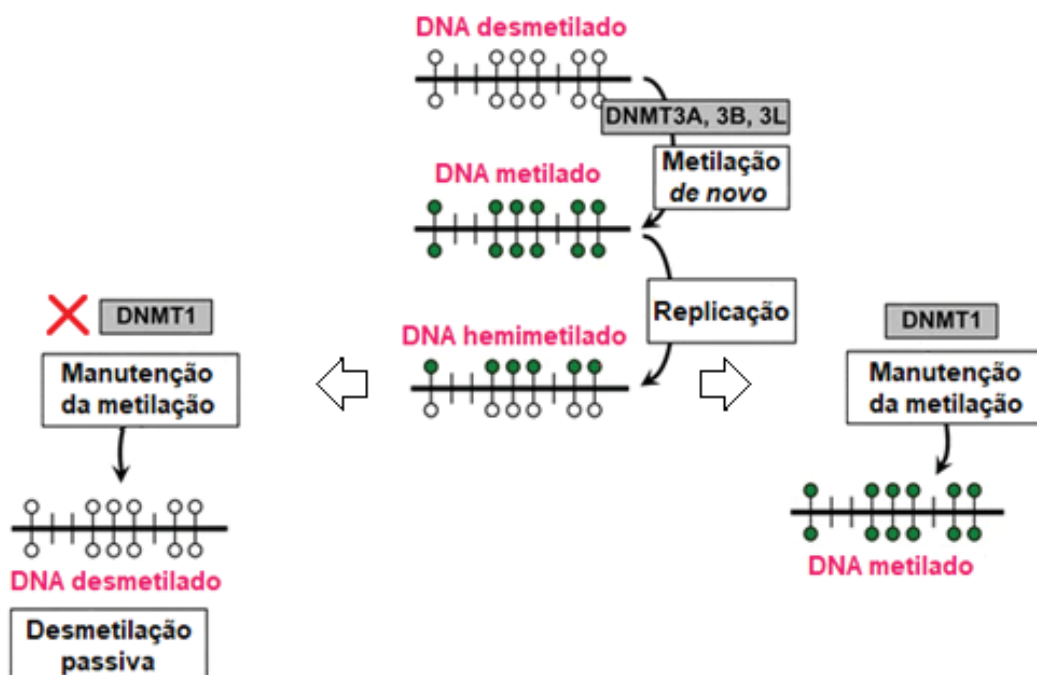
Essa enzima apresenta vários subdomínios no seu domínio N-terminal os quais são responsáveis por diversas interações moleculares. O subdomínio de ligação de DMAP-1 possibilita que a DNMT1 interaja com o repressor DMAP-1 e com a histona desacetilase (HDAC2). O subdomínio sequência de segmentação por foco de replicação (RFTS) é importante no processo de condução da DNMT1 à forquilha de replicação. O subdomínio CXXC apresenta capacidade de reconhecimento e de ligação ao DNA desmetilado e os subdomínios conservados de homologia bromo-adjacente (BAH) que ainda precisam ser melhor elucidados. Já o domínio catalítico que compreende a porção C-terminal, é responsável pela função enzimática de inserção do grupamento metil ao carbono 5 da citosina formando 5-metilcitosina

(LYKO, 2018; ROUNTREE; BACHMAN; BAYLIN, 2000; SONG et al., 2011).

Já a DNMT2, embora apresente homologia com outras DNMTs, não desempenha atividade enzimática, entretanto, há estudos que demonstraram uma atividade tRNA metiltransferase (GOLL et al., 2006) e, aparentemente, a preferência por tRNA ao DNA pode estar relacionada ao pequeno domínio contido no domínio catalítico da DNMT2 (FIGURA 7), o qual contém uma modificação CFT exclusiva (tripeptídeo Cys-Phe-Thr inserido na região catalítica) que a distingue das outras DNMTs (LYKO, 2018).

A metilação do DNA é removida quase que completamente durante a formação do zigoto e depois restabelecida pelo processo de metilação *de novo* através das enzimas DNMT3A e DNMT3B durante o desenvolvimento embrionário em regiões desmetiladas (FIGURA 8) (FATEMI et al., 2002). As DNMT3A e DNMT3B são enzimas homólogas que diferem entre si pela presença de padrões de expressão e alvos específicos distintos. Elas são compostas por domínios conservados, como o domínio Pro-Trp-Trp-Pro (PWWP) e o domínio ATRX-DNMT3-DNMT3L (ADD), que são importantes para interações da cromatina, como as ligações com histonas. Diferentemente dessas enzimas, a DNMT3L não apresenta o domínio PWWP e não apresenta atividade catalítica, servindo apenas como co-fator às enzimas DNMT3A e DNMT3B (FIGURA 7) (DU et al., 2015).

FIGURA 8 – A METILAÇÃO E A DESMETILAÇÃO PASSIVA DO DNA

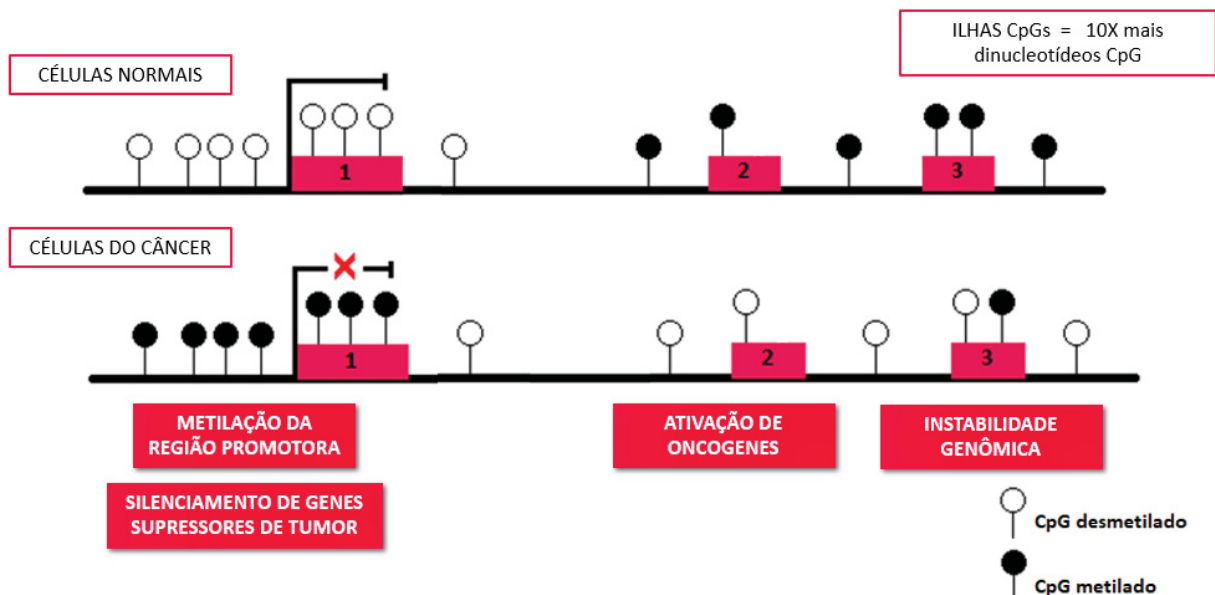


FONTE: Adaptado de Trerotola, Simeone e Alberti (2015).

NOTA: A metilação *de novo* e a metilação de manutenção ocorrem utilizando DNA não metilado e DNA hemimetilado, respectivamente. Na ausência da metilação de manutenção realizada pela DNMT1, ocorre redução progressiva da metilação durante o processo de replicação até o DNA tornar-se desmetilado. Esse processo é conhecido como desmetilação passiva do DNA.

Nos mamíferos, a metilação do DNA ocorre em cerca de 70% dos CpGs ao longo do genoma. Porém, esse padrão não ocorre em regiões ricas em CpGs (ilhas CpG). As ilhas CpGs são regiões do DNA com aproximadamente 1 kb de tamanho, elas estão presentes em média a cada 100 kb e possuem uma frequência de dinucleotídeos CpG aproximadamente 10 vezes maior que o restante do genoma (FIGURA 9) (SINGAL; GINDER, 1999).

FIGURA 9 – PERFIL DE METILAÇÃO DO GENOMA EM CÉLULAS NORMAIS E NO CÂNCER



FONTE: Adaptado de Sproul e Meehan (2013).

NOTA: A hipermetilação do promotor de genes supressores de tumor promove o silenciamento do gene no processo carcinogênico, enquanto que a hipometilação global também evidenciada no câncer pode culminar na ativação de oncogenes e promover instabilidade genômica.

As ilhas CpG localizam-se na região promotora ou acima desta, dentro de éxons ou íntrons. Se o gene associado for um supressor de tumor, a ilha será pouco metilada em células normais, entretanto, apresentará hipermetilação dos seus CpGs nas células cancerosas, o que explica o silenciamento de importantes genes evidenciados na carcinogênese (SCHÜBELER, 2015; SUBRAMANIAM et al., 2014).

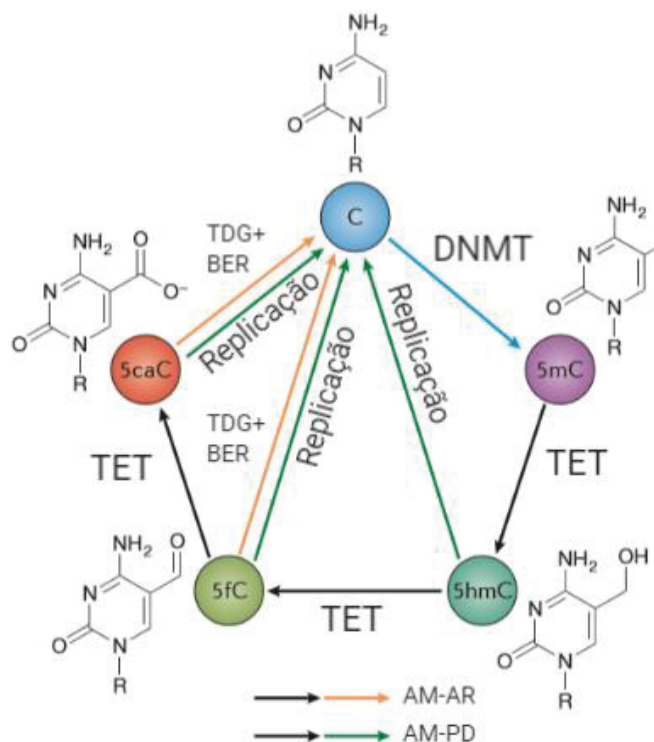
Estudos demonstram que DNMTs defeituosas estão relacionadas à transformação e progressão tumoral através de falhas epigenéticas decorrentes de

anormalidades causadas por estas enzimas (ZHANG; XU, 2017). Os níveis de DNMTs estão comumente elevados em diversas neoplasias, incluindo a de mama (GIRAULT; LIDEREAU; BIE, 2003; ROBERTSON et al., 1999; ROLL et al., 2008). Diante disso, o uso de inibidores de metilação do DNA (iDNMTs) poderia promover a reversão do perfil anormal de metilação evidenciado no câncer (YOSHINAKA et al., 2002).

#### 2.4.2 As Proteínas *Ten-eleven translocation* e a Desmetilação do DNA

A 5-metilcitosina (5mC) é a modificação do DNA mais evidenciada em mamíferos e, apesar da sua estabilidade química e genética, ela pode ser convertida à citosina por diversos mecanismos. A falta de DNMT1s funcionais levam a desmetilação passiva (FIGURA 8) (SMITH; MEISSNER, 2013; TREROTOLA et al., 2015) enquanto a ação mediada pelas TETs levam à desmetilação de forma ativa (FIGURA 10).

FIGURA 10 – DESMETILAÇÃO ATIVA DO DNA



FONTE: Adaptado de Wu e Zhang (2017).

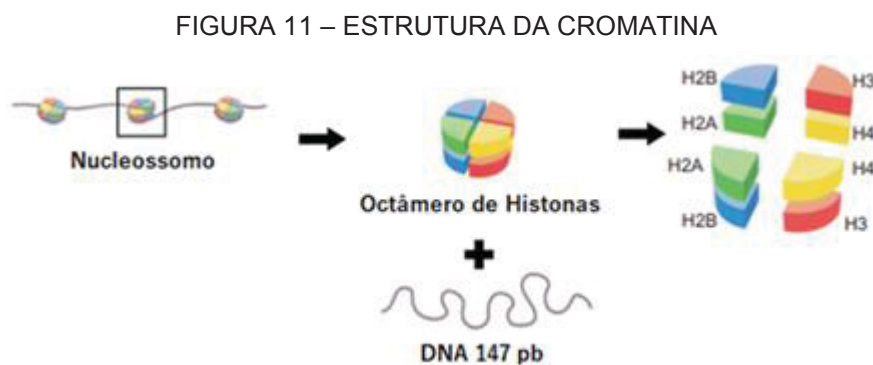
NOTA: As metiltransferases de DNA (DNMTs) promovem a metilação da citosina em 5-metilcitosina (5mC). Porém, a 5mC não consegue ser convertida diretamente a citosina. Para isso, as TETs promovem reações de oxidação que vão culminar no restabelecimento da citosina. AM-PD = Processo de modificação ativa-remoção passiva. AM-AR = Processo de modificação ativa-remoção ativa. TDG = timina DNA glicosilase. BER = Reparo por excisão de base.

Nesse processo, a 5mC é convertida a 5-hidroximetilcitosina (5hmC), podendo também sofrer sucessivas oxidações e ser convertida a 5-formilcitosina (5fC) e 5-carboxilcitosina (5caC), respectivamente. Posteriormente, a 5hmC, 5fC e 5caC podem ser convertidas a citosina pelo mecanismo de modificação ativa-remoção passiva através da replicação. Ou a 5fC ou 5caC podem sofrer o processo de modificação ativa-remoção ativa, que é mediado pela enzima timina DNA glicosilase acoplada ao reparo por excisão de base de forma independente a replicação do DNA (WU; ZHANG, 2017).

As reações de oxidação promovidas pelas TETs requerem oxigênio e  $\alpha$ -cetoglutarato como substratos e  $Fe^{2+}$  como co-fator para produção de succinato e  $CO_2$ . Essas enzimas são compostas pelo domínio catalítico principal que se encontra na região C-terminal e compreende um domínio de  $\beta$ -hélice de fita dupla (DSBH) e um domínio rico em cisteína. O DSBH é responsável por recrutar  $Fe^{2+}$ , e  $\alpha$ -cetoglutarato e 5mC no processo de oxidação, enquanto o domínio rico em cisteína envolve o núcleo DSBH e promove a estabilização da estrutura geral e da interação entre a enzima e o DNA (PASTOR; ARAVIND; RAO, 2013).

#### 2.4.3 Modificações pós-traducionais das histonas

As histonas compreendem uma família de pequenas proteínas com carga positiva denominadas H1, H2A, H2B, H3 e H4. Elas têm a capacidade de se ligarem fortemente ao DNA (carregado negativamente) e formarem complexos nucleoproteicos chamados nucleossomos, os quais são as unidades estruturais da cromatina (HOLDE; ISENBERG, 1975; VENKATESH; WORKMAN, 2015) (FIGURA 11).



FONTE: Adaptado de Takatori e colaboradores (2013).

NOTA: O DNA eucariótico é estruturado na forma de cromatina, um complexo que envolve diferentes

proteínas e algumas moléculas de RNA. A unidade estrutural deste complexo é o nucleossomo, que se constitui de aproximadamente 147 nucleotídeos arranjados em volta de um octâmero de histonas.

Estruturalmente, as histonas possuem caudas N-terminais básicas que se projetam e interagem com nucleossomos adjacentes. Essas caudas são passíveis de sofrerem diversos tipos de modificações pós-traducionais, como acetilação, fosforilação, metilação, entre outras. Essas modificações são mediadas por diversas enzimas, como as histonas acetiltransferases, desacetilases, quinases e metiltransferases (CASTILLO; LÓPEZ-RODAS; FRANCO, 2017; VENKATESH; WORKMAN, 2015).

As alterações mais bem estudadas até o momento envolvem a acetilação e a metilação de resíduos específicos de lisina nas histonas H3 e H4 (BERGER, 2007). A acetilação das histonas compreende a acetilação de lisinas e é altamente dinâmica, visto que, é regulada por duas famílias de enzimas de ação oposta, histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs) (XHEMALCE; DAWSON; BANNISTER, 2011). As HATs utilizam acetil-CoA como co-fator e catalisam a transferência de um grupo acetil ao grupo  $\epsilon$ -amino das cadeias laterais da lisina, neutralizando a sua carga positiva e enfraquecendo as interações entre as histonas e o DNA. As HDACs reverterem a acetilação da lisina e restauram a carga positiva da lisina, tornando a cromatina mais compactada e desfavorecendo a transcrição (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; DUTNALL et al., 1998).

Já a metilação das histonas não envolve a mudança na carga e ela ocorre principalmente nas cadeias laterais de lisinas (K) e argininas (R). Até agora, verificou-se que a metilação da lisina ocorre em seis locais principais, incluindo a histona H3-lisina 4 (H3K4), H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 e H4K20. As lisinas podem ser mono, di ou trimetiladas, enquanto que, a arginina pode ser monometilada ou dimetilada (LAN; SHI, 2009). De uma forma geral, essas modificações pós-traducionais das histonas alteram a cromatina, favorecendo ou bloqueando o acesso da maquinaria transcricional, a qual é composta pelos fatores de transcrição que permitem com que a RNA polimerase atue na transcrição gênica (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; CASTILLO; LÓPEZ-RODAS; FRANCO, 2017).

#### 2.4.4 RNAs não codificantes (ncRNA)

O genoma é composto por regiões codificantes compreendendo cerca de 1,5 a 2% do genoma e regiões não codificantes perfazendo sua maior parte. Ao longo dos anos, tornou-se cada vez mais evidente que a porção não codificadora do genoma apresenta um papel fundamental no desenvolvimento fisiológico (ALEXANDER et al., 2010).

Os RNAs não codificantes (ncRNAs) são divididos de acordo com o tamanho. Os RNAs não codificadores pequenos ou curtos contemplam os microRNAs (miRNAs) com 19-24 pb, os RNAs interativos da Piwi (piRNAs) com 26-31 pb e os RNAs induzidos por estresse ou derivados de tRNA (tiRNAs) com 17-18 pb. Já os RNAs não codificantes longos (lncRNAs) apresentam mais de 200 pb e estão envolvidos na regulação da expressão gênica a nível transcricional e pós-transcricional através da interação com ácidos nucléicos e proteínas (BEERMANN et al., 2016).

Nas doenças, particularmente no câncer, foi demonstrado que modificações epigenéticas e genéticas nos miRNAs e no seu processamento são uma característica comum. A principal ação dos miRNAs é a regulação negativa da expressão gênica, visto que, ao se ligarem a um RNAm alvo eles promovem degradação ou inibição da tradução e, isso possibilita com que atuem funcionalmente como oncogene ou supressor de tumor (CALIN; CROCE, 2006). Atualmente já existem diversos miRNAs descritos em processos normais como crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular, entretanto, expressões anormais de miRNAs estão intimamente atreladas ao câncer (ZHANG et al., 2007).

A família miR-200 destaca-se por desempenhar funções como supressores de tumor ao promoverem o aumento da expressão da E-caderina, proteína chave no processo da TEM que está relacionada aos piores prognósticos no câncer de mama quando em níveis reduzidos (GREGORY et al., 2008). Já o miR-21 e o miR-22 atuam com função de oncogenes, visto que, a inibição tanto de miR-21 quanto de miR-22 está relacionada à redução tanto da proliferação celular quanto da metástase em células de câncer de mama (WANG et al., 2019, 2017).

Entre os lincRNAs, o *HOTAIR* é o que apresenta a função mais bem elucidada nas neoplasias humanas. Ele encontra-se com a expressão aumentada em tumores e metástases primárias da mama e, é utilizado como poderoso preditor de possíveis metástases e morte em tumores primários através da sua utilização como biomarcador



de prognóstico de câncer (GUPTA et al., 2010; HAJJARI; SALAVATY, 2015). A expressão exacerbada de *HOTAIR* culmina na alteração global da expressão gênica e aumento no poder de invasibilidade e metástase no câncer de uma maneira dependente do complexo repressivo polycomb-2. Além disso, a perda do *HOTAIR* pode ocasionar decréscimo na capacidade de invasão, indicando que ele tem capacidade epigenética moduladora do genoma nas células cancerosas (GUPTA et al., 2010; HAJJARI; SALAVATY, 2015).

## 2.5 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS NO CÂNCER DE MAMA

Mais de 90% dos cânceres de mama não apresentam metástase no momento do diagnóstico e, dessa forma, permitem com que a ressecção do tumor e/ou linfonodos axilares, o uso da radioterapia, a administração sistêmica de quimioterápicos ou terapias hormonais neoadjuvantes sejam estratégias terapêuticas promissoras (WAKS; WINER, 2019).

Antigamente, quando as pacientes apresentavam metástases, o tratamento era realizado de acordo com o subtipo do tumor diagnosticado e as pacientes eram submetidas ao tratamento paliativo. Dessa forma, as pacientes com tumores TNG eram submetidas à quimioterapia sistêmica por não responderem a terapia hormonal com tamoxifeno e nem a terapia anti-HER2 (WAKS; WINER, 2019). Atualmente já está disponível a utilização da imunoterapia com o anticorpo atezolizumabe (Tecentriq®) associado à quimioterapia para o tratamento de câncer de mama metastático triplo-negativo em pacientes cujos tumores expressem o ligante da proteína de morte programada (PD-L1) (SCHMID et al., 2018). Estudos também demonstraram que a terapia epigenética trouxe novas perspectivas à oncologia imune ao promover uma maior efetividade da imunoterapia ao associá-la com os iDNMTs (JONES, 2019; MICHALAK et al., 2019).

### 2.5.1 Moduladores Epigenéticos

Os agentes desmetilantes são fármacos análogos da citosina, conhecidos como 5-azacitosina (5-Aza) e o 5-aza-2'-deoxicitidina ou decitabine (5-Aza-dC), capazes de promover a inativação das DNMTs (STRESEMANN; LYKO, 2008).

As DNMTs se ligam aos análogos da citosina, os quais diferentemente das

citossinas, apresentam uma molécula de nitrogênio ao invés de um carbono na posição 5 do anel. A DNMT consegue metilar esse análogo, porém, o nitrogênio impossibilita a ocorrência da reação de  $\beta$ -eliminação e a enzima permanece presa a esse composto e, dessa forma, é encaminhada ao processo de degradação enzimática (STRESEMANN; LYKO, 2008). Essa abordagem terapêutica busca a reativação da expressão de genes que podem controlar o crescimento tumoral, visto que, sem DNMTs suficientes durante o processo de replicação, ocorre um processo chamado desmetilação passiva do DNA e os genes supressores de tumor podem voltar a serem expressos (YOO; JONES, 2006).

Além disso, os agentes desmetilantes promovem desmetilação dos retrovírus endógenos (ERVs) (JONES, 2019). Os ERVs compõem cerca de 8,5% do DNA humano e sua estrutura intacta compreende genes virais como *gag*, *pol* e *env* na região central e 2 LTRs nas extremidades, totalizando 7-9 kb de tamanho (LANDER et al., 2001). O gene *gag* codifica uma proteína estrutural, o *pol* codifica a enzima transcriptase reversa e o *env* codifica uma proteína envelopada (HAVECKER; GAO; VOYTAS, 2004). Os ERVs encontram-se normalmente metilados e silenciados e, dessa forma, a desmetilação na região LTR dos ERVs através dos iDNMTs poderia ativá-los. A reativação dos ERVs promove o aumento da imunogenicidade através da indução de um estado de mimetismo viral, visto que, eles ativos, promovem a transcrição dos genes virais presentes na sua estrutura e formam RNAs dupla fita (sdRNA) que são reconhecidos por receptores padrões de reconhecimento, como o MDA5 (proteína associada à diferenciação de melanoma-5), no citoplasma das células cancerosas, o que culmina no aumento da síntese, transporte e secreção de interferons do tipo I e III no microambiente tumoral (ROULOIS et al., 2015).

Os níveis aumentados de interferons culminam no aumento da expressão de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade de classe 1 (MHC I) e através disso, ocorre aumento da capacidade de processamento e apresentação de antígenos e, as células cancerosas tornam-se mais visíveis e susceptíveis ao sistema imune devido ao surgimento desse estado de mimetismo viral (JONES, 2019).

Além disso, as células tumorais de mama frequentemente expressam antígenos associados ao tumor, como os antígenos câncer-testículo (CTAs), que estimulam a resposta dos linfócitos T citotóxicos CD8+ na eliminação de células tumorais ou ativam linfócitos B, os quais induzem uma resposta humoral ao se diferenciarem em plasmócitos e produzirem anticorpos capazes de atuarem contra o

antígeno-alvo (MAHMOUD, 2018).

Os CTAs são expressos em células embrionárias e germinativas, mas geralmente silenciados em células somáticas maduras através da hipermetilação de CpGs na região promotora (JAMES; LINK; KARPF, 2006). Também já foi evidenciado que os iDNMTs são capazes de promover desmetilação e reativação dos CTAs. O aumento da expressão dos CTAs é de extrema importância, visto que, por serem antígenos altamente imunogênicos, tornam-se alvos mais fáceis ao sistema imune (JONES, 2019; MAHMOUD, 2018).

## 2.5.2 Imunoterapia

Existem vários fatores que servem para estimular ou atenuar a resposta imune frente à morte celular e de patógenos. Os pontos de verificação imune (PVI) são reguladores do sistema imunológico capazes de impedir o sistema imunológico de atacar as células indiscriminadamente (NIRSCHL; DRAKE, 2013). Esses *checkpoints* garantem que as células do sistema imunológico não destruam erroneamente células saudáveis durante uma resposta imune (reação autoimune). Entretanto, as células tumorais são capazes de atuar nos PVI e conseguem evitar com que sejam detectadas e destruídas (PARDOLL, 2012).

Os PVI apresentam dois tipos de sinais distintos, o ponto de verificação imune co-estimulatório capaz de estimular o progresso imunológico, através dos receptores CD28, ICOS (co-estimulador induzível de células T), CD137, entre outros; e o ponto de verificação imune co-inibitório, o qual inibe o progresso imune através dos receptores da proteína de morte programada (PD-1) e da proteína associada aos linfócitos T citotóxicos 4 (CTLA-4), por exemplo (DARVIN et al., 2018; MARHELAVA et al., 2019).

Em condições normais, o sistema imunológico pode desempenhar a morte das células tumorais através dos mecanismos da resposta imune inata e adaptativa. As células cancerosas produzem antígenos mutados próprios que permitem serem reconhecidas e diretamente eliminadas pelos linfócitos T CD8+, bem como, alguns antígenos podem ser liberados na corrente sanguínea ou linfática, reconhecidos e capturados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) e, posteriormente, estimularem a resposta imune adaptativa através da ativação dos linfócitos T CD4+ (PARDOLL, 2012).

A via PD-1/PD-L1 atua como um mecanismo de resistência imune que é exercido pelas células tumorais em resposta à atividade antitumoral imune endógena. O PD-L1 é superexpresso em células tumorais ou em células não transformadas no microambiente tumoral e se liga aos receptores PD-1 nas células T ativadas, inibindo a ação das células T citotóxicas através da ativação do *checkpoint* inibitório. Essas células T desativadas permanecem inibidas no microambiente tumoral e permitem com que as células cancerosas escapem da resposta imune adaptativa (JONES, 2019).

Atualmente na imunoterapia, já foram desenvolvidos anticorpos monoclonais capazes de bloquear o PD-1, o PD-L1 e o CTLA-4, e dessa forma, esses fármacos conseguem impedir com que as células cancerosas resistam às respostas imunes ao impedir a ativação do *checkpoint* inibitório (ROTTE, 2019). Sendo que, também já foi evidenciado que PD-L1 é um gene regulado por NR4A1/Sp1 em tumores TNG e que podem ser alvos de antagonistas de NR4A1 derivados do bis-indol e, dessa forma, estimularem a resposta imune (KARKI et al., 2020).

Um exemplo bem sucedido da imunoterapia, é o atezolizumab (Tecentriq®), o qual foi aprovado em março de 2019 pelo FDA em associação com o quimioterápico nab-paclitaxel (Abraxane®) no tratamento de câncer de mama triplo negativo localmente ressecável ou metastático que expresse PD-L1 (SCHMID et al., 2018). Os inibidores do CTL4-A (Ipilimumab®) atuam de forma semelhante aos inibidores de PD-1 e também já foram aprovados pelo FDA no tratamento de melanoma e carcinoma de células renais que apresentem metástases (SCHMIDT et al., 2016).

A imunoterapia tem se mostrado atrativa no tratamento de diversos tumores sólidos, porém, apresenta menor efetividade como monoterapia quando comparada a sua associação com a quimioterapia (CARRETERO-GONZÁLEZ et al., 2019). Os esforços clínicos atuais estão focados no desenvolvimento de tratamentos associados à imunoterapia que possam converter tumores que não eram capazes de responder à imunoterapia em tumores capazes promover resposta imune (EMENS, 2018).

No início da resposta contra as células tumorais da mama, há um predomínio da inflamação aguda com presença de IFN- $\gamma$ , IL-12 e estímulo das células Th1 mediado pela ativação da resposta imune inata, resultando na morte das células tumorais e na maturação das células dendríticas que iniciam a resposta das células T tumor-específicas (EMENS, 2018). A constante pressão e estímulo das células T leva à seleção de variantes de células tumorais que escapam à resposta imunológica e

que podem permanecer no local em um estágio de dormência. Além disso, ocorre a troca do processo inflamatório agudo pelo crônico e o microambiente tumoral evolui para um perfil Th2, o qual juntamente com o estímulo dos macrófagos pela via alternativa (M2), favorecem o escape imune e a progressão tumoral (COUSSENS; POLLARD, 2011; DENARDO; COUSSENS, 2007).

### 2.5.3 Associação da Imunoterapia aos Moduladores Epigenéticos

A associação da imunoterapia aos agentes iDNMTs mostra-se promissora justamente por esses agentes desmetilantes do DNA estimularem uma resposta mediada por interferon tipo I e, conseqüentemente por favorecerem o reconhecimento das células tumorais, aumentarem a infiltração das células T CD8+ na região tumoral e restaurarem a produção de citocinas de resposta Th1 (tumoricidas) e quimiocinas ao invés de manterem uma resposta Th2. Quando ocorre esse aumento do reconhecimento das células tumorais, a imunoterapia irá garantir com que o *checkpoint* inibitório não seja ativado e as células tumorais sejam eliminadas (CHIAPPINELLI et al., 2015; CURTSINGER; MESCHER, 2010; PENG et al., 2015).

Além disso, a terapia epigenética também pode promover um mecanismo de reprogramação aos linfócitos T CD8+ disfuncionais. As células T CD8+ ao se ligarem ao antígeno tumoral e ativarem o estado efetor, induzem a expressão de citocinas, INF- $\gamma$ , proteínas necessárias para migrar no tecido celular e promover a morte celular, além de, promover remodelação ao longo do genoma. Entretanto, essa estimulação contínua promove um estado disfuncional (plástico ou fixo), o qual as células T CD8+ vão parando de responder aos estímulos e adquirem um fenótipo de exaustão (GHONEIM et al., 2017; JONES, 2019). No entanto, apenas a associação da imunoterapia com os iDNMT foi capaz de reverter o estado disfuncional fixo e essa associação teve a capacidade de reverter um estado em que as células T CD8+ não respondiam ao estímulo em um estado funcional responsivo.

Esses resultados promissores demonstram cada vez mais o valioso papel da associação da imunoterapia com os agentes desmetilantes (GHONEIM et al., 2017). Entretanto, os iDNMTs atualmente disponíveis na clínica promovem considerável toxicidade aos pacientes e só são utilizados no tratamento da síndrome mielodisplásica e leucemia mieloide aguda. Isso ressalta ainda mais importância e a necessidade da descoberta de drogas desmetilantes menos tóxicas e que possam ser

utilizadas futuramente associadas à imunoterapia (ISSA; KANTARJIAN, 2009; SABA, 2007).

## 2.6 PEPTÍDEO SEMELHANTE AO GLUCAGON-1 (GLP-1)

O intestino promove a secreção de determinados hormônios intestinais para auxiliar no processo digestivo e na absorção dos alimentos. O peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) é um peptídeo produzido a partir do gene pró-glucagon e secretado pelas células L-enteroendócrinas, localizadas no íleo e no cólon do intestino, em resposta a ingestão de alimentos (EISSELE et al., 1992; MOJSOV; WEIR; HABENER, 1987).

Evidências sugerem que o GLP-1 não é produzido apenas nas células L-intestinais, mas também nas células  $\alpha$ -pancreáticas, embora em níveis muito mais baixos que o glucagon. No entanto, verificou-se que ocorre a expressão do receptor GLP-1 em vários órgãos além do pâncreas e intestino, como coração, rins, pulmões, estômago e cérebro (FAVA; DONG; WU, 2016; PYKE et al., 2014).

A ligação do GLP-1 ao seu receptor (RGLP-1) pertencente a classe dos receptores acoplados à proteína G, promove ativação da proteína adenilato ciclase, o que resulta na formação de cAMP. Assim, o aumento de cAMP ativa proteínas quinases A (PKA) e proteínas de troca diretamente associadas à cAMP (EPAC), também denominadas cAMP-GEFs (fatores de troca de nucleotídeos de guanina regulados por cAMP). A ativação das vias PKA e EPAC culmina em diversos resultados funcionais induzidos por GLP-1, dentre eles, alteração da atividade dos canais iônicos, aumento do cálcio intracelular e potencialização da exocitose de grânulos contendo insulina. Além disso, essas proteínas quinase efetoras também fosforilam polipeptídeos da família Ras e acabam estimulando a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos relacionada à divisão e crescimento celular (DYACHOK et al., 2006; HOLST et al., 2007; HOLZ, 2004).

O hormônio GLP-1 exerce efeitos na regulação da glicemia ao estimular a secreção de insulina dependente de glicose e inibir a liberação de glucagon. Além disso, retarda o esvaziamento gástrico e aumenta a sensação de saciedade, bem como, atua na expressão gênica de pró-insulina e nas vias anti-apoptóticas e de proliferação das células  $\beta$  (DRUCKER, 2006).

A inativação da incretina GLP-1 é mediada por uma serina protease

constituída de 766 aminoácidos conhecida como dipeptidil peptidase-4 (DPP-4). Sua forma enzimaticamente ativa encontra-se solúvel na circulação e é responsável pela clivagem de hormônios peptídeos que apresentem alanina ou prolina no penúltimo resíduo N terminal (DRUCKER, 2006; KIEFFER; MCINTOSH; PEDERSON, 1977; MENTLEIN; GALLWITZ; SCHMIDT, 1993). A degradação do GLP-1 pela DPP-4 ocorre em aproximadamente 2 minutos e limita os efeitos do GLP-1 na homeostase da glicose. Dessa forma, já foram desenvolvidas diversas drogas análogas ao GLP-1 que não sofrem influência da degradação mediada pela DPP-4 e, conseqüentemente, apresentam efeitos mais duradouros, dentre elas, destaca-se a dulaglutida (LEE; LEE, 2017; MENTLEIN; GALLWITZ; SCHMIDT, 1993).

### 2.6.1 Análogos GLP-1

Em resposta a hiperglicemia, os análogos GLP-1 (GLP-1A) promovem o aumento da secreção de insulina e inibem a secreção de glucagon. Entretanto, quando os níveis glicêmicos já estão baixos, eles mantêm uma resposta adequada de glucagon e isso evita picos hipoglicêmicos frequentemente relatados com outras abordagens terapêuticas, como por exemplo, com a administração de insulina (CONCEIÇÃO; SILVA, 2017; KURITZKY et al., 2014).

Atualmente, já existem diversos GLP-1A aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA), tais como exenetida e lixisenatida de curta duração, liraglutida com duração intermediária, exenetida de liberação prolongada, albiglutida, dulaglutida e, semaglutida nas formulações para via subcutânea e oral. Na tabela abaixo, podemos destacar as principais diferenças quanto a posologia e duração dos efeitos entre os GLP-1A (TABELA 1).

TABELA 1- ANÁLOGOS GLP-1 DISPONÍVEIS NA TERAPIA DE *DIABETES MELLITUS* TIPO 2

Princípio ativo; nome comercial	Frequência da dose	Duração	Dosagem recomendada
Exenetida (Byetta®); AstraZeneca	Diária	Curta duração	5 µg por via subcutânea 2 vezes ao dia 60 minutos antes das refeições; após 1 mês, pode aumentar para 10 µg com base na resposta clínica

<b>Lixisenatida</b> <b>(Lyxumia®);</b> <b>Sanofi</b>	Diária	Curta duração	10 µg por via subcutânea por dia dentro de 1 hora antes da primeira refeição; no dia 15, aumentar para 20 µg uma vez ao dia
<b>Liraglutida</b> <b>(Victoza®);</b> <b>Novo Nordisk</b>	Diária	Duração intermediária	0,6 mg por via subcutânea uma vez ao dia por 1 semana, depois aumentar para 1,2 mg uma vez ao dia; caso necessário a dose pode ser aumentada para 1,8 mg por via subcutânea uma vez ao dia
<b>Exenatida QW</b> <b>(Bydureon®);</b> <b>AstraZeneca</b>	Semanal	Longa duração	2 mg por via subcutânea a cada 7 dias com ou sem refeições
<b>Albiglutida</b> <b>(Tanzeum®);</b> <b>GlaxoSmithKline</b>	Semanal	Longa duração	30 mg por via subcutânea uma vez por semana; caso necessário aumentar para 50 mg por via subcutânea uma vez por semana
<b>Dulaglutida</b> <b>(Trulicity®);</b> <b>Eli Lilly</b>	Semanal	Longa duração	0,75 mg por via subcutânea uma vez por semana; caso necessário, aumentar para 1,5 mg por via subcutânea uma vez por semana
<b>Semaglutida</b> <b>(Ozempic®)</b> <b>Novo Nordisk</b>	Semanal	Longa duração	0,25 mg por via subcutânea uma vez por semana. Após 4 semanas, a dose deve ser aumentada para 0,5 mg. Caso necessário, pode-se ajustar para 1 mg uma vez por semana
<b>Semaglutida</b> <b>(Rybelsus®)</b> <b>Novo Nordisk</b>	Diária	Curta duração	3 mg via oral uma vez ao dia por 30 dias. Posteriormente utilizar 7 mg diariamente. Caso necessário, a dose pode ser ajustada para 14 mg ao dia

FONTE: Autora (2020).

NOTA: Os análogos GLP-1 aprovados pelo FDA. A tabela retrata as respectivas posologias, vias de administração e durações das doses. Além disso, ambos os fármacos já foram aprovados pela ANVISA,



sendo a liraglutida aprovada em 2010, exenatida aprovada em 2012, albiglutida em 2015, dulaglutida em 2016 e semaglutida aprovada em 2018.

Os análogos GLP-1 apresentam homologia semelhante ao GLP-1 endógeno e, ao se ligarem ao receptor GLP-1, eles mantêm os efeitos promovidos pelo GLP-1 independente do estímulo das refeições. A semaglutida (Rybelsus®, Novo Nordisk), aprovada recentemente pelo FDA em 2019, trouxe novas perspectivas à terapia clínica ao conseguir ser o primeiro análogo GLP-1 formulado para administração via oral no tratamento de DM2 (BUCHEIT et al., 2019; KNUDSEN; LAU, 2019).

Um estudo em nosso laboratório utilizando liraglutida (Victoza®, Novo Nordisk) evidenciou atividade antitumoral em modelo de carcinoma mamário murino e em linhagens tumorais de mama, provavelmente devido a sua atividade iDNMTs (CHEQUIN et al., 2020 – submetido).

Essa valiosa descoberta é de extrema importância clínica, visto que, atualmente, é emergente o reposicionamento de fármacos para tratar patologias diferentes das quais eles foram inicialmente propostos (PUSHPAKOM et al., 2018). Esta possibilidade vem sendo estudada na terapêutica de neoplasias malignas devido ao fato dos mecanismos moleculares de algumas patologias apresentarem vias semelhantes às das células tumorais em desenvolvimento (GUPTA et al., 2013; WURTH et al., 2016). O fato desses fármacos já estarem disponíveis na clínica, bem como, possuírem diversos ensaios farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos aprovados, possibilitaria uma disponibilização de forma muito mais rápida e segura quando comparados ao desenvolvimento de novas drogas (BARRINGTON et al., 2011; YOSHINAKA et al., 2002).

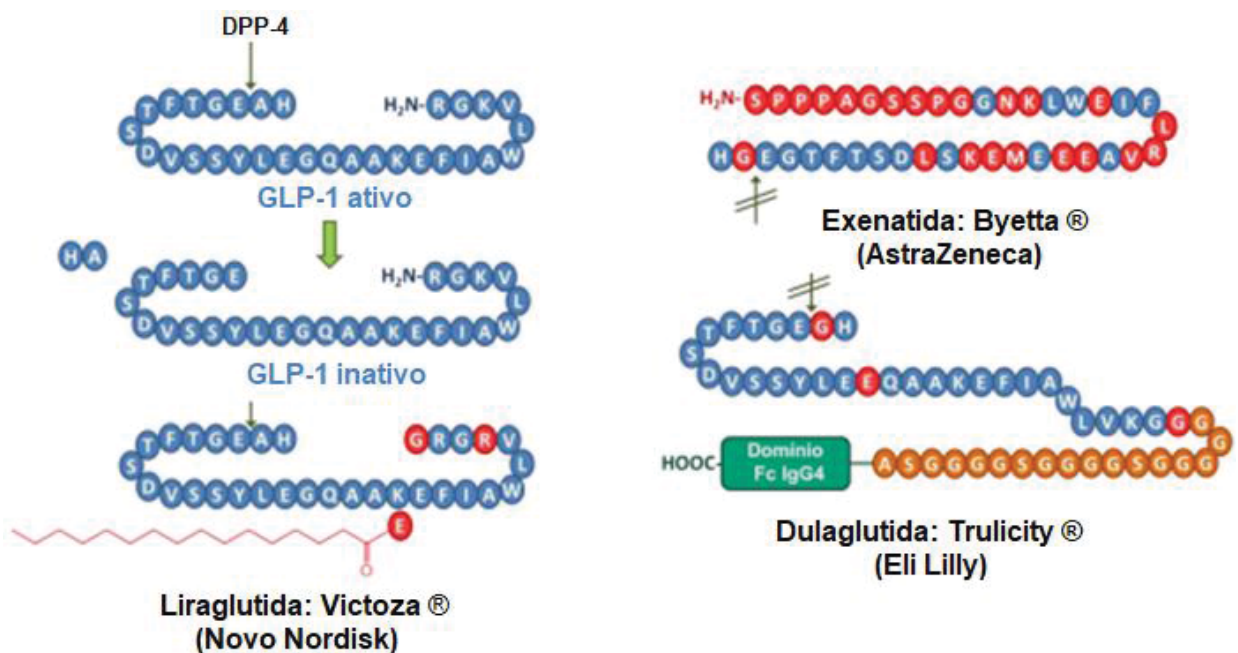
As vantagens dessa nova estratégia consistem basicamente em três etapas, tais como o baixo risco de falha na produção, curto tempo de desenvolvimento e redução no investimento financeiro. Os custos regulatórios e da fase III podem permanecer semelhantes quando comparados ao desenvolvimento de um novo medicamento na mesma indicação, mas ainda pode haver uma economia substancial nos custos pré-clínicos e nas fases I e II (PUSHPAKOM et al., 2018). Além da redução dos custos de produção de 2-3 bilhões de dólares para 300 milhões de dólares, existem diversas vantajosas ferramentas que auxiliam na formulação de novas hipóteses terapêuticas, como as abordagens computacionais que permitem correlacionar a expressão gênica, estrutura química, dados genotípicos ou proteômicos, registros eletrônicos de saúde, interações moleculares entre ligantes e

alvos, bem como, efeitos adversos entre medicamentos e fenótipos clínicos (PUSHPAKOM et al., 2018).

## 2.6.2 Dulaglutida

Devido ao sucesso evidenciado no tratamento de DM2 com análogos GLP-1 como exenatida e liraglutida, a busca por novos fármacos dessa classe, que apresentassem efeitos mais duradouros e/ou mais potentes, tornou-se foco de muitas pesquisas. Em 2010, foi desenvolvida uma proteína análoga ao GLP-1 fusionada à porção Fc da imunoglobulina G (IgG4) que apresentava características farmacocinéticas prolongadas (GLAESNER et al., 2010). Segue abaixo a estrutura do GLP-1 e de alguns dos seus análogos, dentre eles, a dulaglutida (FIGURA 12).

FIGURA 12 – ESTRUTURA QUÍMICA DO GLP-1 E SEU ANÁLOGO



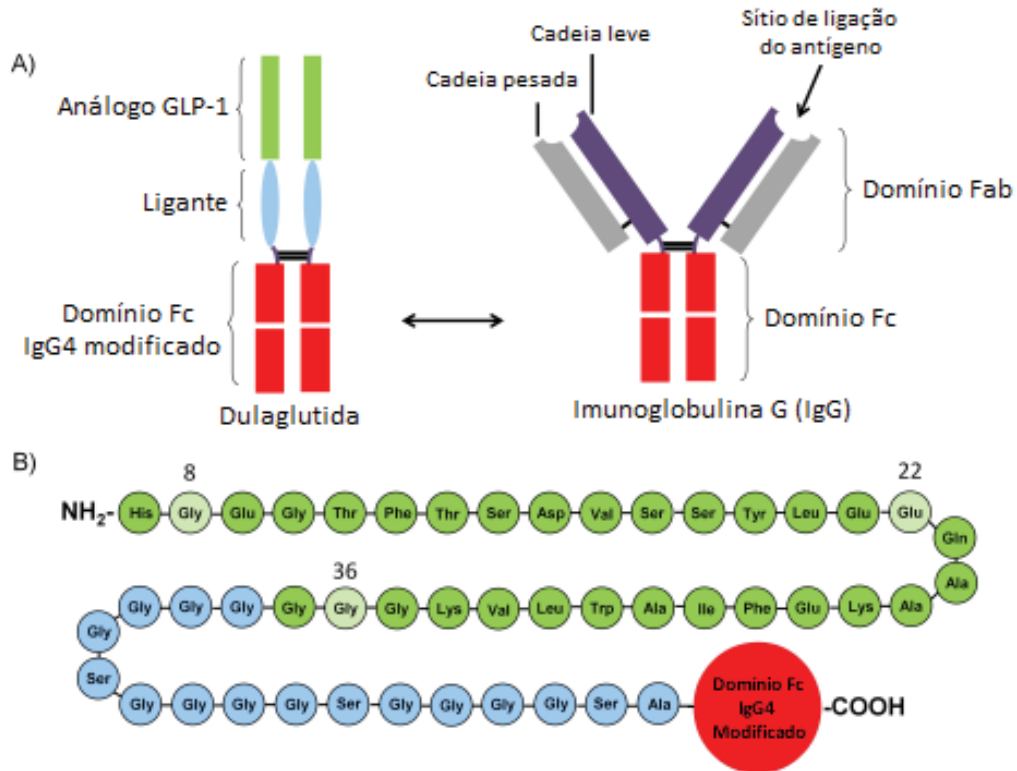
FONTE: Adaptado de Conceição (2017).

NOTA: O GLP-1 (do inglês, *glucagon like peptide-1*) é degradado e inativado pela enzima dipeptidil-peptidase-4 (DPP-4) em aproximadamente 2 minutos. Os derivados peptídicos estruturalmente análogos empregados como fármacos agonistas dos receptores GLP-1 apresentam estrutura semelhante ao GLP-1 endógeno, porém, com algumas alterações estruturais que proporcionam uma maior meia-vida, como a modificação da Alanina pela Glicina que evita a degradação pela DPP-4 (indicado pela seta preta). Obs.: Os aminoácidos em vermelho demonstram as diferenças entre o GLP-1 endógeno e seus análogos. Já os aminoácidos em laranja correspondem ao peptídeo ligante presente na dulaglutida.

A molécula LY2189265, posteriormente referenciada como dulaglutida, (Trulicity®, Lilly) foi aprovada pela ANVISA em 2016. Sua estrutura consiste em duas

cadeias idênticas ligadas por pontes dissulfeto, cada uma contendo uma sequência análoga do GLP-1 ligada covalentemente à porção Fc da IgG4 modificada por um peptídeo ligante (FIGURA 13) (ELI LILLY DO BRASIL LTDA, 2015; GLAESNER et al., 2010).

FIGURA 13 – ESTRUTURA MOLECULAR DA DULAGLUTIDA



FONTE: Adaptado de Kuritzky e colaboradores (2014).

NOTA: Estrutura da molécula dulaglutida e da imunoglobulina G. A) A região Fc na dulaglutida é alterada em 2 resíduos de aminoácidos para reduzir a ligação aos receptores celulares Fc e impedir a dimerização da molécula de dulaglutida com IgG4 endógena. Um ligante composto por dissulfeto atua para ligar as duas cadeias de dulaglutida. B) Em verde, a composição dos aminoácidos correspondentes ao análogo GLP-1 (7–37) e a região do ligante da dulaglutida (azul). As posições 8, 22 e 36 indicam aminoácidos modificados da dulaglutida comparados ao GLP-1 humano. As mesmas cores utilizadas para representar tanto o item A quanto o B correspondem as mesmas regiões da molécula.

Esse peptídeo ligante inserido entre a região C-terminal do análogo GLP-1 e a região N-terminal da IgG permitiu que a potência aumentasse 4 vezes quando comparada ao análogo GLP-1 livre. Entretanto, a IgG1 foi substituída por uma IgG4 modificada e otimizada em duas posições selecionadas (F234A e L235A) para reduzir a interação com os receptores Fcγ de alta afinidade (FcγR) (GLAESNER et al., 2010).

A IgG1 humana se liga a um receptor Fc de alta afinidade (FcγRI), enquanto que a IgG4 se liga a FcγRI com uma afinidade dez vezes menor. Sendo assim, o

isotipo IgG4 demonstrou ser incapaz de ativar o complemento, bem como, não é capaz de promover citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC) (GLAESNER et al., 2010).

Também houve preocupação quanto ao reconhecimento de epítomos estranhos pelas células T. Esses epítomos podem ser previstos com ferramentas *in silico* modernas, como o algoritmo EpiMatrix, o qual demonstrou que a substituição de um resíduo de glicina por arginina na posição 36 do GLP-1 era capaz de remover o potencial de reconhecimento de epítomo pelas células T sem afetar a atividade *in vitro* da molécula (GLAESNER et al., 2010; GROOT; MOISE, 2007).

A fusão da porção Fc da IgG4 ao análogo GLP-1 também é responsável pela redução na depuração da dulaglutida, visto que, o grupamento Fc permite que a meia-vida plasmática dela seja prolongada ao ser confundida com uma imunoglobulina IgG e reciclada pelo receptor Fc neonatal (FcRn) (PECHTNER et al., 2017; SOCKOLOSKY; SZOKA, 2015). A dulaglutida apresenta 90% de homologia quando comparada ao GLP-1 endógeno. Farmacocineticamente, ela apresenta uma concentração plasmática máxima em humanos de 114 ng/ml que é atingida em 48 horas e seu volume médio de distribuição após a administração de 1,5 mg de dulaglutida é de 17,4 litros (ELI LILLY DO BRASIL LTDA, 2015).

A estrutura molecular desse fármaco otimiza a proteção contra a degradação mediada pela DPP-4 através da modificação de um resíduo de alanina por uma glicina na posição 8 (FIGURA 13B). O seu grande tamanho molecular ( $59669,81 \text{ g.mol}^{-1}$ ) também é responsável por promover uma eliminação mais lenta (0,107 L/h), a qual é evidenciada por uma meia-vida de 4,7 dias que permite com que sua aplicação seja realizada semanalmente (ELI LILLY DO BRASIL LTDA, 2015).

Uma das necessidades clínicas mais proeminente no câncer de mama é o desenvolvimento de novas opções terapêuticas eficazes contra tumores TNG, visto que, eles não apresentam uma terapia mais direcionada como os outros subtipos (GYÖRFFY et al., 2015). Outros análogos GLP-1 apresentaram resposta antitumoral promissora no câncer de mama e despertaram o nosso interesse na análise do potencial antitumoral da dulaglutida no câncer de mama (CHEQUIN, 2018; LIGUMSKY et al., 2012).

Diferentemente dos outros GLP-1A com atividade antitumoral já avaliados, a estrutura molecular da dulaglutida permite uma aplicação semanal, o que poderia proporcionar uma maior adesão terapêutica ao reduzir o sofrimento das pacientes

submetidas ao tratamento injetável (PECHTNER et al., 2017). Além disso, essa molécula pode também desempenhar uma resposta antitumoral mais promissora que os outros GLP-1A, visto que, já foi evidenciada como opção injetável mais eficiente a uma ampla gama de pacientes com DM2 (MODY et al., 2018; PATEL et al., 2019).

### 3 JUSTIFICATIVA

O análogo GLP-1 liraglutida utilizado no tratamento de DM2 demonstrou recentemente, em estudos no nosso laboratório, capacidade de promover efeito antitumoral em modelo murino de carcinoma mamário e em linhagens de câncer de mama. Sendo que, a liraglutida demonstrou atividade desmetilante global no genoma ao atuar diretamente sobre as DNMTs, bem como, promoveu desmetilação de genes importantes relacionados à redução da malignidade celular no câncer de mama, como o *ADAM33* e o *CDH1* (CHEQUIN et al., 2020 – submetido).

Diferentemente da liraglutida que necessita aplicação subcutânea diária, sabemos que a dulaglutida pode ser administrada semanalmente por apresentar uma meia-vida mais ampla e, dessa forma, melhorar a qualidade de vida dos pacientes (ELI LILLY DO BRASIL LTDA, 2015; GLAESNER et al., 2010). Além disso, estudos *in vitro* conduzidos por Sledz (2019) em nosso grupo evidenciaram que a dulaglutida promovia redução da metilação global do DNA superior a evidenciada pela liraglutida e, inclusive, mais efetiva que o próprio decitabine, agente desmetilante utilizado como controle.

Esse mesmo estudo demonstrou, através da técnica de PCR metilação específica (MSP), capacidade da dulaglutida em promover desmetilação parcial de alguns CpGs específicos da região promotora dos genes *ADAM33*, *CDH1* e *ESR1*. Entretanto, essa técnica não tem a capacidade de demonstrar a atividade desmetilante promovida pelo fármaco na sua totalidade, visto que, avaliou a desmetilação apenas em pontos específicos nesses genes (SLEDZ, 2019). Portanto, apesar desses resultados promissores da dulaglutida já terem sido evidenciados *in vitro*, o presente estudo teve como objetivos avaliar se, de fato, ocorre redução do perfil de metilação do promotor do gene *ADAM33* e não somente análise pontual de algumas regiões conforme já descrito (SLEDZ, 2019). Da mesma forma que busca comprovar a promoção da atividade antitumoral pela dulaglutida, resultado que ainda não foi evidenciado até o presente momento utilizando modelo tumoral *in vivo*.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade do fármaco dulaglutida em promover atividade antitumoral e efeito desmetilante no gene supressor de tumor *ADAM33*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Verificar a capacidade desmetilante *in vitro* no promotor do gene *ADAM33* humano através da clonagem e sequenciamento do DNA da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com dulaglutida e compará-lo ao controle não tratado.
- ✓ Verificar se a dulaglutida promove efeito antitumoral em modelos de tumor de Ehrlich em camundongos através da comparação do efeito redutor no volume tumoral.
- ✓ Avaliar e comparar a histologia dos tumores e tecido hepático entre os grupos controle e tratado com dulaglutida *in vivo*.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ENSAIOS *IN VITRO*

#### 5.1.1 Ensaios biológicos

A linhagem tumoral de mama MDA-MB-231 utilizada neste trabalho foi adquirida da ATCC, cultivada em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 2 mM de glutamina e 40 µg/ml de gamicina e mantida sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C, conforme protocolo sugerido pela ATCC. Aproximadamente 3 x 10<sup>5</sup> células de MDA-MB-231 foram cultivadas em placa de 6 poços e submetidas a 24 horas de tratamento com dulaglutida 1,7 nM (Trulicity®, Lilly) (SLEDZ, 2019). Posteriormente, os DNAs da linhagem MDA-MB-231 controle e tratada foram extraídos com o kit *All Prep DNA/RNA* (Qiagen), conforme especificações do fabricante.

### 5.1.2 Tratamento com Bissulfito de Sódio

As amostras de DNA extraídas foram quantificadas no espectrofotômetro *Nanodrop2000* e submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio do kit *Epitect* (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante.

Este tratamento permite analisar o perfil de metilação das amostras de DNA a partir da deaminação de citosinas desmetiladas que são convertidas a uracilas, enquanto as citosinas metiladas não são afetadas. Após uma amplificação por PCR do DNA tratado, as uracilas são substituídas por timinas e as citosinas originalmente metiladas são mantidas como citosinas. Desta forma, a partir do sequenciamento foi possível avaliar perfil de metilação do promotor do gene *ADAM33*.

### 5.1.3 Avaliação do Perfil de Metilação do Promotor do Gene *ADAM33*

As amostras de DNA da linhagem MDA-MB-231 extraídas e tratadas com o composto bissulfito de sódio foram amplificadas utilizando os pares de iniciadores B33F1: 5' AGG GAG TTA TGT TTT TTG TTT TGT TAG 3' e B33R1: 5' ATT ACC TAA ACC TTC CTA TCC TTA 3' para PCR *Nested 1* e B33F2: 5' GGG TTA GTT TAA GTA TAT TTG AG 3' e B33R2: 5' ACA CCC AAT ACA AAT AAA TAA CC 3' para PCR *Nested 2* (SENISKI et al., 2009).

Os fragmentos amplificados por PCR *nested* foram purificados em gel de agarose 1% utilizando QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) com as especificações do fabricante. Para a clonagem dos fragmentos foi utilizado o plasmídeo *pGEM®-TEasy* (Promega). O produto de ligação foi transformado em bactérias *Escherichia coli* (TOP10) quimiocompetentes, obtidas previamente através da técnica utilizando  $\text{CaCl}_2$ . As bactérias transformadas foram selecionadas por  $\alpha$ -complementação em placas de petri contendo meio LB-Ágar e marcadores de seleção próprios do vetor, sendo eles, estreptomicina 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (para seleção da estirpe de *E. coli*) e ampicilina 250  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (marca de seleção do vetor); X-gal 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e IPTG 45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Pelo menos 8 colônias brancas foram selecionadas e analisadas por PCR para confirmação do inserto. Após essa etapa, os clones foram submetidos a extração do DNA plasmidial utilizando o protocolo do QIAprep spin (Qiagen) conforme especificações do fabricante. Para tanto, os clones positivos foram crescidos em meio líquido LB contendo ampicilina 250  $\text{mg}/\text{mL}$ , incubação de 37°C e agitação de 180 – 220 rpm

durante 14 a 16 horas.

Após a purificação, as amostras de DNA foram submetidas as reações de sequenciamento através da utilização do Kit Big Dye Terminator v.3.0 (Applied Biosystems) e os produtos foram submetidos a eletroforese capilar no sequenciador automático ABI 2500 XL (*Applied Biosystems*). As reações obtidas através do sequenciamento foram analisadas utilizando o software *BioEdit* e as sequências de DNA foram comparadas pelo software *ClustalW*, o qual permitiu evidenciarmos os padrões de metilação observados no controle e no tratamento com a dulaglutida.

## 5.2 ENSAIOS *IN VIVO*

### 5.2.1 Modelo Tumoral de Ehrlich

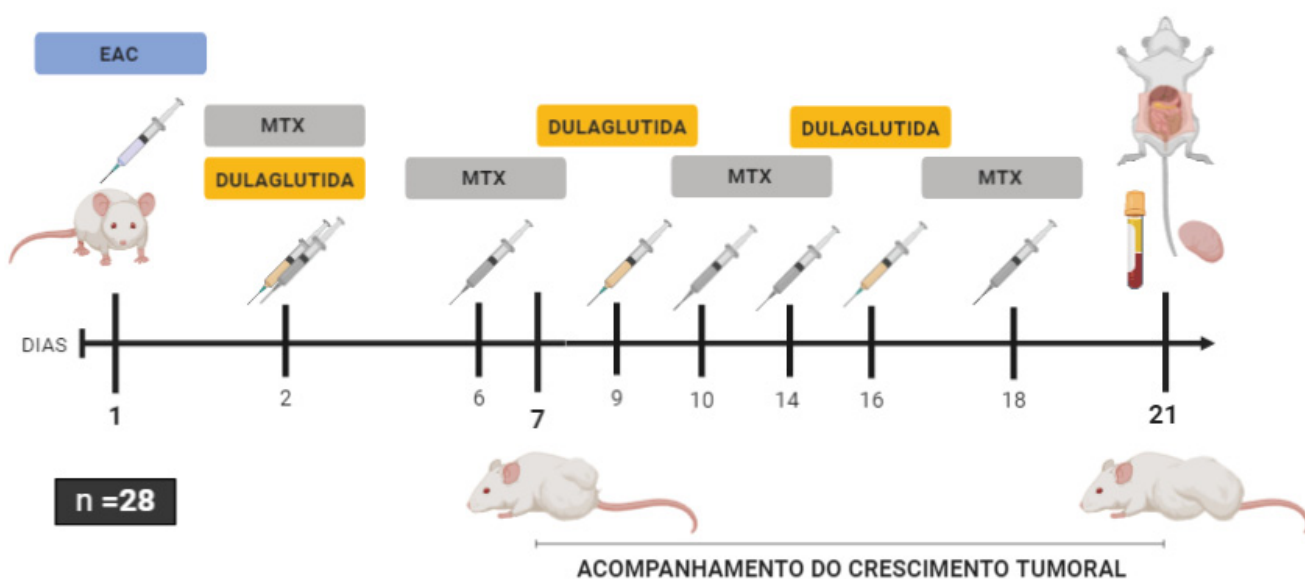
Para os ensaios *in vivo* o protocolo foi aprovado pelo comitê de ética animal do setor de ciências biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR – 1082). Dessa forma, camundongos fêmeas da espécie *Mus musculus* tipo Swiss pesando entre 25 e 30 g foram separadas em 4 grupos. O carcinoma de Ehrlich é um carcinoma maligno de origem mamária que apresenta rápida proliferação e células indiferenciadas. Inicialmente, as células tumorais de Ehrlich foram cultivadas na forma de ascite (EAC) e a viabilidade celular foi avaliada por ensaio de exclusão por azul de tripan (OZASLAN et al., 2011). Depois disso, o modelo sólido de carcinoma de Ehrlich foi induzido em todos os camundongos do estudo a partir da inoculação subcutânea de  $2,5 \times 10^6$  células viáveis de EAC, diluídas em solução salina, na região pélvica do membro inferior direito de cada animal. Os animais foram submetidos a livre demanda de água e alimento, sob controle de luz 12/12h e temperatura  $\pm 22^\circ\text{C}$ .

Os grupos contendo sete animais cada foram: 1) controles não tratados, que receberam apenas as células tumorais de Ehrlich; 2) grupo de controles tratados, que receberam injeções de metotrexato 2,5 mg/kg (MTX) a cada intervalo de 4 dias (ABDEL-RAHMAN; KABEL, 2012; SRIKANTH et al., 2002); 3) o grupo do tratamento com dulaglutida, que receberam injeções semanais da dose alométrica 0,14 mg/kg (calculada com base na dose de dulaglutida 1,5 mg/0,5ml utilizada na clínica no tratamento de DM2) (PACHALY; BRITO, 2001); 4) o grupo dos tratamentos com MTX (1,5 mg/kg) associado à dose de dulaglutida (0,07 mg/kg) que correspondente a dose de 0,75 mg/0,5ml de dulaglutida (também utilizada na clínica). Todos os tratamentos



tiveram segmento por 21 dias (FIGURA 14). Ao final do 21º dia, os animais foram sedados e eutanasiados para coleta do tumor e fígado, coleta sanguínea e pesagem dos órgãos. As medidas dos tumores dos camundongos foram aferidas desde o 7º até o 21º dia com auxílio de um paquímetro. O volume foi calculado através da fórmula  $V = L \times W^2 \times 0,52$ , onde L corresponde ao maior diâmetro e W corresponde ao menor diâmetro (MISHRA et al., 2018).

FIGURA 14 – TRATAMENTO *IN VIVO* EM MODELO TUMORAL DE EHRlich



FONTE: Autora (2020).

NOTA: Após inoculação da ascite com as células tumorais de Ehrlich (EAC) os camundongos foram tratados conforme o esquema acima. A aplicação de dulaglutida foi realizada semanalmente e a de MTX respeitou um intervalo de 4 dias entre cada aplicação.

### 5.2.2 Análise dos parâmetros sanguíneos

Amostras sanguíneas coletadas no 21º dia do experimento foram utilizadas para avaliação de alguns parâmetros bioquímicos como creatinina, albumina, globulina, proteínas totais, transaminases hepáticas (AST/ALT), bem como, hemograma e contagem de plaquetas e, os resultados foram disponibilizados pelo Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. A análise glicêmica dos camundongos foi realizada através de duas coletas, a 1ª após 10 dias da inoculação das células tumorais (EAC) e a 2ª coleta após 10 dias da 1ª coleta. Ambas as amostras sanguíneas foram coletadas das caudas dos animais do grupo controle, do grupo dulaglutida e do grupo dulaglutida associado ao metotrexato com auxílio de uma

agulha, e as glicemias foram aferidas através da utilização do aparelho Accu-Chek Active®.

### 5.2.3 Análise Histológica

Os fragmentos dos tumores e do tecido hepático foram fixados em solução de formalina 10% em temperatura ambiente por 48 horas. Posteriormente, o material foi desidratado utilizando incubações sucessivas com etanol e xilol e incluídos em blocos de parafina. As regiões dos tecidos seccionados com o auxílio de um micrótomo foram coradas com hematoxilina/eosina e analisadas por microscopia óptica. As imagens das lâminas foram obtidas em scanner de lâminas (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) no Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CTAF) da Universidade Federal do Paraná.

### 5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

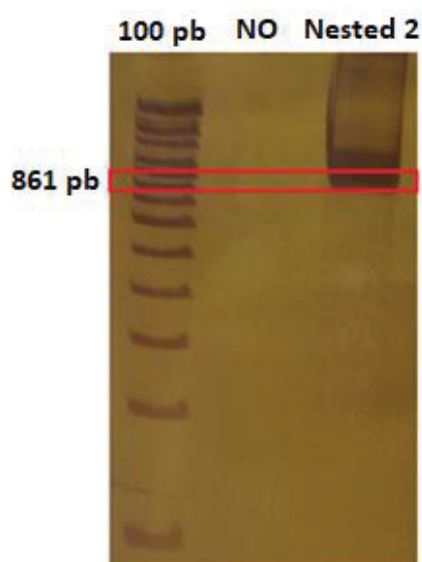
Para os experimentos realizados nesse trabalho, foram calculados a média e desvio padrão e, os dados foram avaliados usando *ANOVA* ou *t test student*, com auxílio do *software* Prisma. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE *ADAM33* *IN VITRO*

Para amplificação do fragmento desejado correspondente a ilha-1 CpG (CGI1) do gene *ADAM33* (FIGURA 15), foi utilizada a técnica de *nested* PCR. Essa técnica é empregada no intuito de promover aumento da sensibilidade e especificidade, visto que, ao tratarmos o DNA com o composto bissulfito de sódio podem ocorrer quebras no DNA do material analisado.

FIGURA 15 – AMPLIFICAÇÃO DA ILHA-1 DO GENE *ADAM33*



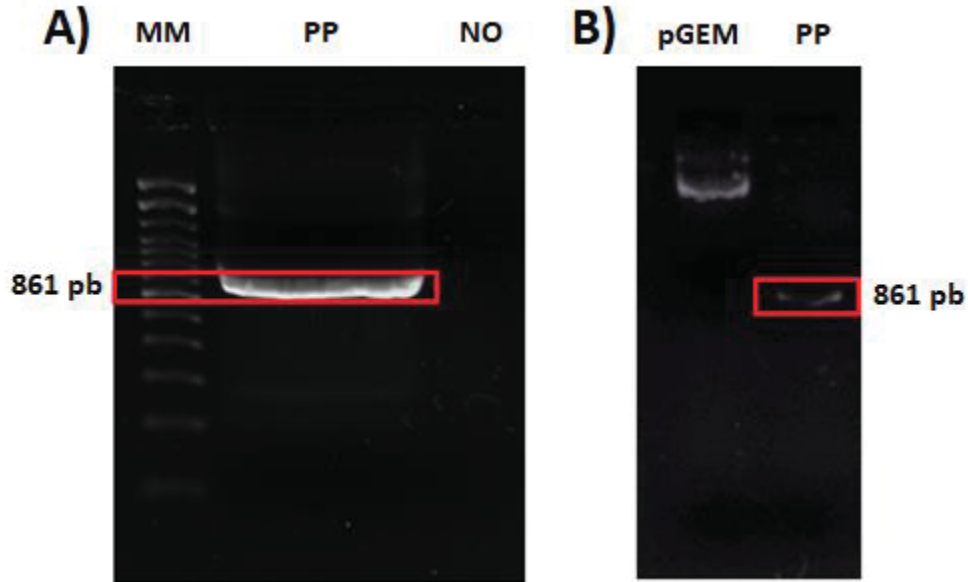
FONTE: A Autora (2020).

NOTA: Produto da amplificação da *nested 2* correspondente a ilha-1 do gene *ADAM33* que foi aplicado em gel de poliácridamida e corado com nitrato de prata. O primeiro caminho corresponde ao marcador molecular 100 pb Ladder, o segundo corresponde ao controle negativo da reação (NO) e o último contém o fragmento correspondente a CGI1 (861 pb) do gene *ADAM33*, onde está localizado o promotor do gene.

Posteriormente, esse produto foi amplificado novamente em maiores quantidades para que pudesse ser realizada a purificação do fragmento em gel de agarose 1% (FIGURA 16). Após a purificação, o produto de PCR foi ligado ao plasmídeo *pGEM®-TEasy* e essa ligação foi transformada em bactérias *Escherichia coli* quimiocompetentes (TOP10). Pelo menos 8 colônias foram selecionadas pela técnica da  $\alpha$ -complementação e foram submetidas a reação de PCR (FIGURA 17) para a verificação da presença do inserto. Posteriormente, o DNA plasmidial foi

extraído e submetido a reação de sequenciamento (FIGURA 18).

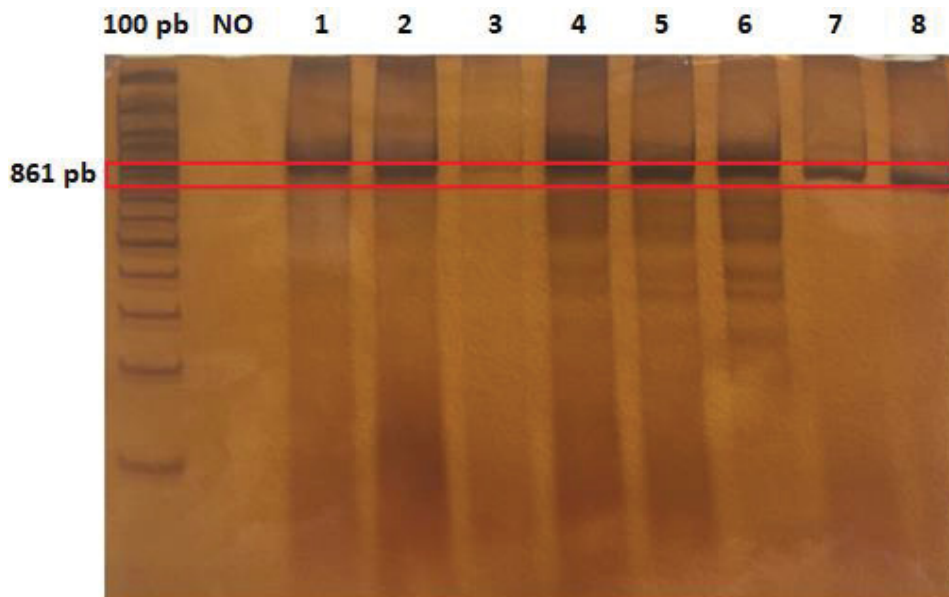
FIGURA 16 – PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR



FONTE: A Autora (2020).

NOTA: Etapas realizadas para purificação da CG11 do gene *ADAM33*. A) O produto de 5 ampliações foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, essa grande quantidade de produto de PCR permitiu a purificação do fragmento desejado através do kit QIAquick® *Gel Extraction Kit* (Qiagen). A primeira linha (MM) corresponde ao marcador molecular 100 pb, a segunda linha (PP) corresponde ao fragmento desejado de 861 pb correspondente a CG11 do gene *ADAM33*, enquanto que a última linha (NO) corresponde ao controle negativo da reação. B) Produto purificado após eletroforese em gel de agarose 0,8%. A primeira linha corresponde ao pGEM (100 ng/μL), DNA utilizado para controle da concentração do fragmento, enquanto que a segunda linha (PP) corresponde ao fragmento purificado.

FIGURA 17 – PCR DE COLÔNIA DOS CLONES SELECIONADOS

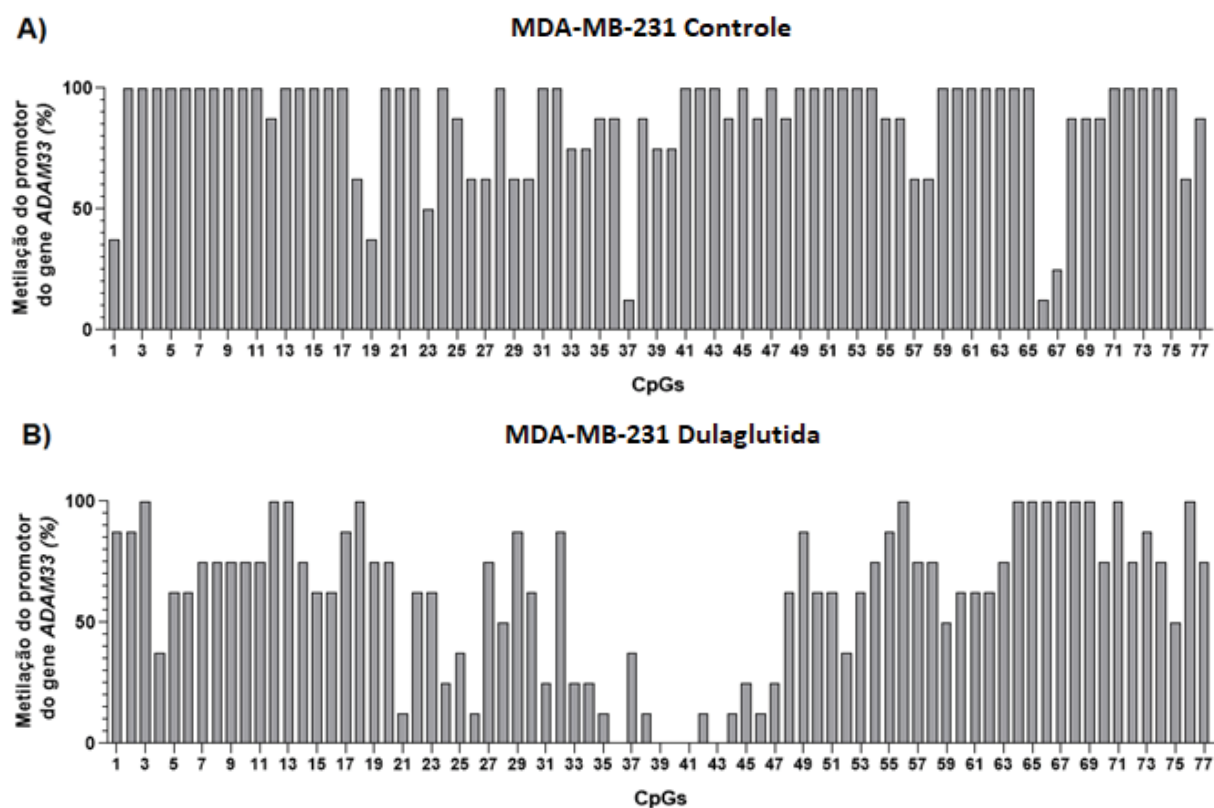


FONTE: A Autora (2020).

NOTA: PCR de colônia. A primeira linha corresponde ao marcador de massa molecular de 100 pb Ladder; a segunda linha é o controle negativo da reação (NO) e os clones de 1-8, os quais contêm o fragmento de 861 pb clonado.

A linhagem MDA-MB-231 sem tratamento, semelhante ao que já foi evidenciado por (SENISKI et al., 2009), apresentou o gene *ADAM33* densamente metilado (91,2%) com a presença dos CpGs 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 24, 28, 31, 32, 41, 42, 43, 45, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 71, 72, 73, 74 e 75 metilados 100%, resultado que totaliza 45 dos 77 CpGs presentes na CGI-1 (FIGURA 18A). Surpreendentemente, na linhagem tratada com dulaglutida, apenas 13 dos 77 CpGs presentes na ilha CpG-1 do gene *ADAM33* se apresentaram 100% metilados (FIGURA 18B), demonstrando uma redução no perfil de metilação de 91,2% para 60,9% após o tratamento de 24 horas com dulaglutida 1,7 nM, resultado que ratifica a sua capacidade desmetilante.

FIGURA 18 – PERFIL DE METILAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE *ADAM33*



FONTE: A Autora (2020).

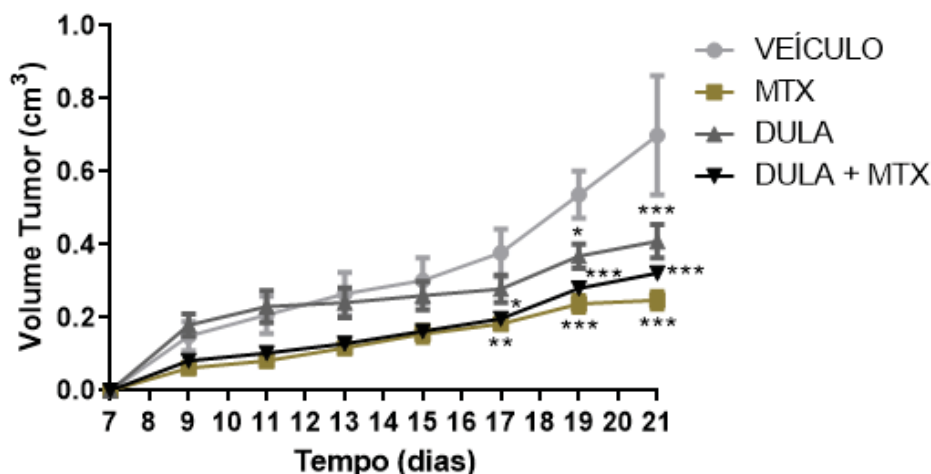
NOTA: Perfil de metilação dos 77 CpGs presentes na região promotora do gene *ADAM33*. A) Linhagem MDA-MB-231 controle. B) Linhagem MDA-MB-231 tratada com dulaglutida. O perfil de metilação foi realizado com base na metilação individual de cada CpG entre os 8 clones analisados e,

posteriormente, calculado através da média da metilação entre os 77 CpGs.

## 6.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DA DULAGLUTIDA EM MODELOS DE TUMOR DE EHRlich MURINO

Para avaliar o efeito da dulaglutida *in vivo*, foram utilizados modelos de tumor de Ehrlich. O crescimento tumoral ao longo do experimento proporcionou uma curva de crescimento bastante acentuada e, ao final do experimento, foi possível evidenciar que os animais controles que não foram submetidos aos tratamentos apresentaram um crescimento tumoral significativamente maior que os tratados (FIGURA 19).

FIGURA 19 – AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL EM TUMORES DE EHRlich



FONTE: A autora (2020).

NOTA: Efeito da dulaglutida sobre o tamanho dos tumores de Ehrlich. O gráfico representa o acompanhamento diário dos tamanhos dos tumores ao longo do experimento. O volume tumoral foi calculado, estando representados os tumores controles, tratados com dulaglutida, com o quimioterápico metotrexato e com a associação entre metotrexato e dulaglutida. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , quando comparados com aos controles.

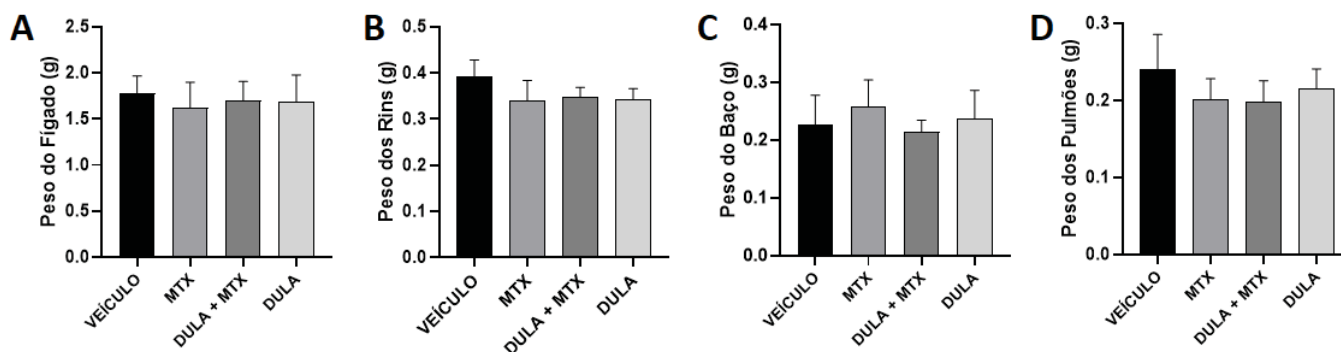
O metotrexato (MTX) é um inibidor de síntese do ácido fólico utilizado no tratamento do câncer desde 1948 (WU et al., 2010). Essa quimioterapia de ampla ação possibilita a atuação em diversos tipos de neoplasias, como leucemias, no câncer de mama, pulmão, entre outros (KOŹMIŃSKI et al., 2020). O MTX é a quimioterapia padrão utilizada em tumores de Ehrlich e foi a responsável pela maior redução tumoral evidenciada no experimento, resultado que se assemelha ao obtido nos estudos que avaliaram a atividade antitumoral da liraglutida (CHEQUIN, 2018).

Da mesma forma que o MTX, os tratamentos com dulaglutida foram capazes de reduzir significativamente o crescimento dos tumores. A combinação da dulaglutida

ao MTX promoveu a redução tumoral ainda mais pronunciada quando comparada à utilização da dulaglutida de forma isolada. Nessa associação foi utilizado a metade da dose da dulaglutida combinada à dose de 1,5 mg de metotrexato e obteve-se uma curva-resposta semelhante à evidenciada pelos camundongos do grupo MTX, os quais foram tratados com 2,5 mg de metotrexato, dose superior de 1 mg.

Além desses resultados promissores evidenciados *in vivo*, não ocorreram alterações significativas no peso do fígado (FIGURA 20A), rins (FIGURA 20B), baço (FIGURA 20C) e pulmões (FIGURA 20D), o que indica que os tratamentos não estão promovendo toxicidade a ponto de alterarem a anatomia desses órgãos macroscopicamente.

FIGURA 20 – EFEITO DA DULAGLUTIDA SOBRE OS ÓRGÃOS DOS CAMUNDONGOS



FONTE: A autora (2020).

NOTA: Efeito da dulaglutida sobre o peso dos órgãos dos camundongos ao final do experimento. A) Peso do fígado. B) Peso dos Rins. C) Peso do Baço. D) Peso dos Pulmões. Estão representados os tumores controles, tratados com dulaglutida, com o quimioterápico metotrexato e com a associação entre metotrexato e dulaglutida.

### 6.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS

Para realização da análise dos padrões bioquímicos e hematológicos, foram utilizadas as amostras sanguíneas coletadas ao final do 21º dia. Não foram identificadas alterações significativas entre os grupos nas análises de creatinina, albumina, globulina, proteínas totais, transaminases hepáticas (AST/ALT), nem evidenciados distúrbios no hemograma e na contagem de plaquetas (TABELA 2 e 3). Além disso, como já esperado, os grupos utilizando dulaglutida não foram capazes de promover alterações significativas na glicemia dos camundongos (FIGURA 21).

TABELA 2 – PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DOS CAMUNDONGOS

Parâmetro	Grupos			
	Veículo	MTX	DULA	MTX + DULA
Leucócitos ( $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	4,2 ± 3,45	5,6 ± 1,90	6,35 ± 2,59	5,00 ± 2,36
Linfócitos (%)	55,6 ± 8,71	52,2 ± 11,82	54,75 ± 13,21	63,80 ± 12,21
Monócitos (%)	6,9 ± 1,89	4,95 ± 1,67	6,95 ± 2,04	3,90 ± 1,56
Granulócitos (%)	35,6 ± 8,59	43,5 ± 11,59	37,90 ± 12,99	30,90 ± 11,24
Hemoglobina (g/dL)	12,6 ± 0,64	12,35 ± 0,78	11,80 ± 0,76	11,70 ± 1,03
Hemácias ( $\times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	8,76 ± 0,60	8,52 ± 0,33	8,26 ± 0,56	7,99 ± 1,11
Plaquetas ( $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	318,0 ± 159,68	436,0 ± 82,0	262,0 ± 114,96	419,0 ± 154,18

NOTA: Os dados representam a média ± desvio padrão com n = 7. MTX – Metotrexato; DULA – Dulaglutida. Não foram observadas diferenças significativas.

FONTE: A autora (2020).

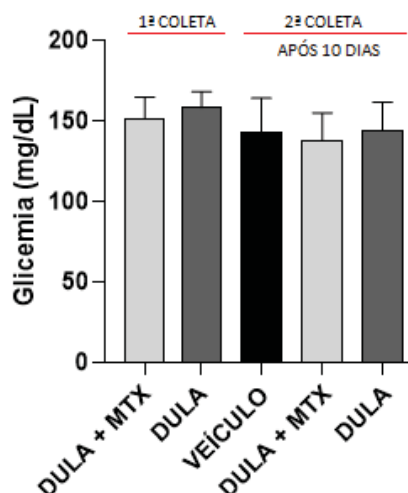
TABELA 3 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SANGUÍNEOS DOS CAMUNDONGOS

Parâmetro	Grupos			
	Veículo	MTX	DULA	MTX + DULA
ALT (U.L <sup>-1</sup> )	39,5 ± 11,47	47,00 ± 18,17	37,70 ± 21,88	28,20 ± 9,05
AST (U.L <sup>-1</sup> )	151,7 ± 67,92	282,00 ± 53,09	231,60 ± 42,33	226,90 ± 46,61
Creatinina (mg/dL)	0,50 ± 0,08	0,40 ± 0,09	0,40 ± 0,04	0,40 ± 0,08
Globulina (g/dL)	2,80 ± 0,49	2,09 ± 0,28	2,80 ± 0,98	2,30 ± 1,01
Albumina (g/dL)	2,00 ± 0,33	1,09 ± 0,27	2,00 ± 0,83	2,00 ± 0,99
Proteínas Totais (g/dL)	4,70 ± 0,44	4,80 ± 0,27	4,70 ± 0,41	4,60 ± 0,46

NOTA: Os dados representam a média ± desvio padrão com n = 7. ALT – Alanina aminotransferase; AST – Aspartato aminotransferase; MTX – Metotrexato; DULA – Dulaglutida. Não foram observadas diferenças significativas.

FONTE: A autora (2020).

FIGURA 21 – GLICEMIA DOS CAMUNDONGOS



FONTE: A autora (2020).

NOTA: A glicemia foi aferida em dois momentos distintos do ensaio *in vivo* para verificar se os grupos que estavam sob uso de dulaglutida não promoviam alteração na glicemia dos camundongos. A primeira coleta foi realizada 10 dias após a inoculação das células tumorais (EAC) e a segunda coleta



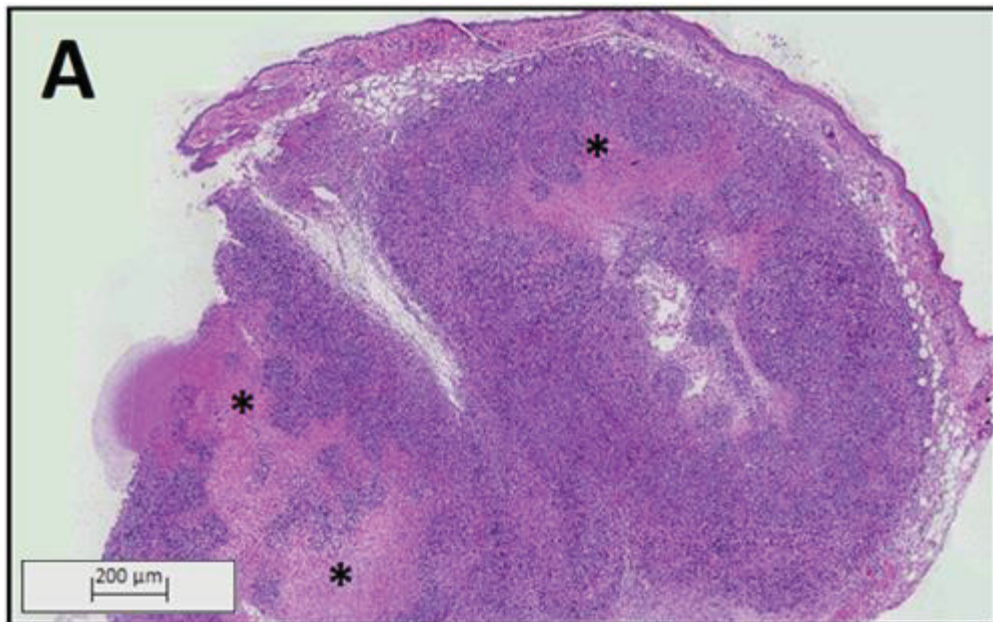
foi realizada 10 dias após a primeira coleta, sendo que análise do grupo controle foi realizada apenas na última análise para evitar sofrimento dos animais.

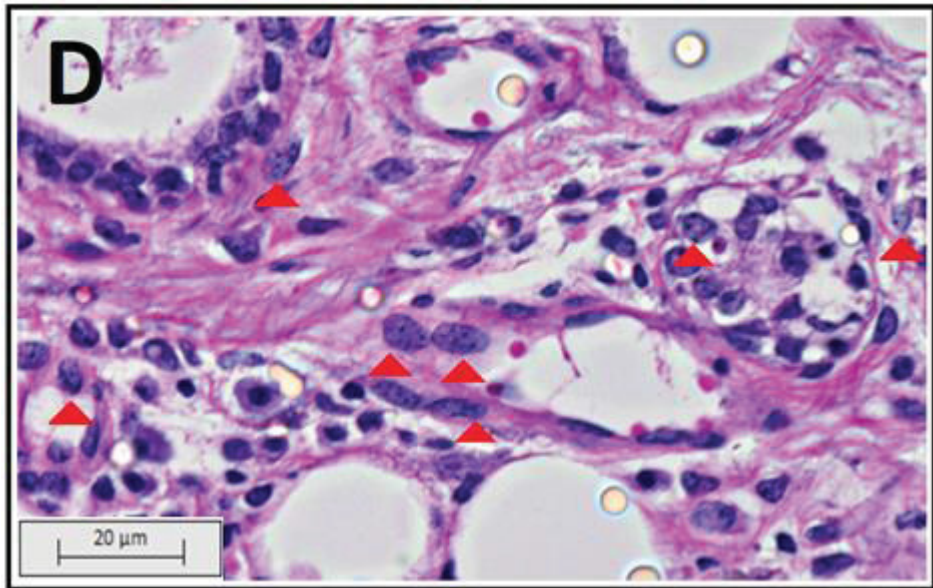
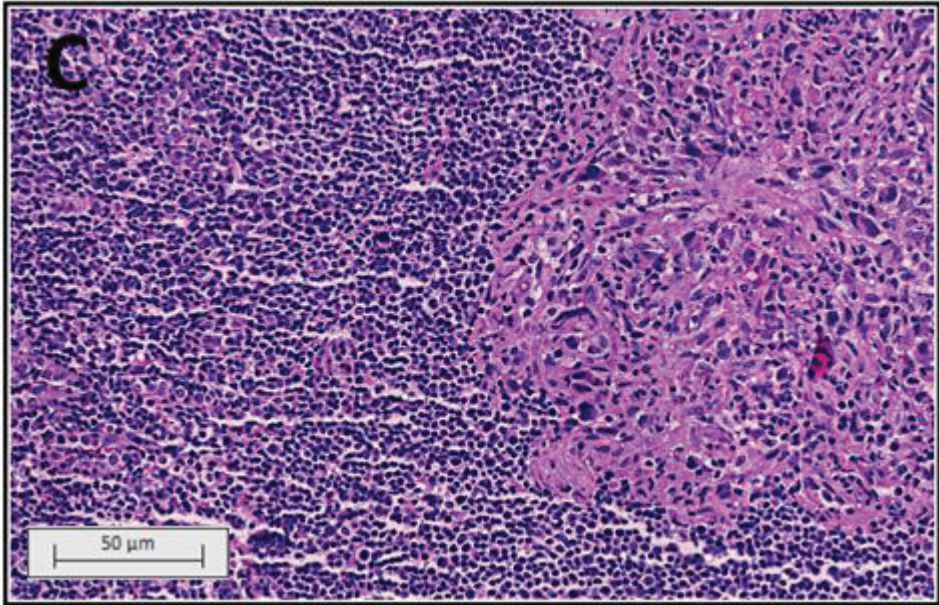
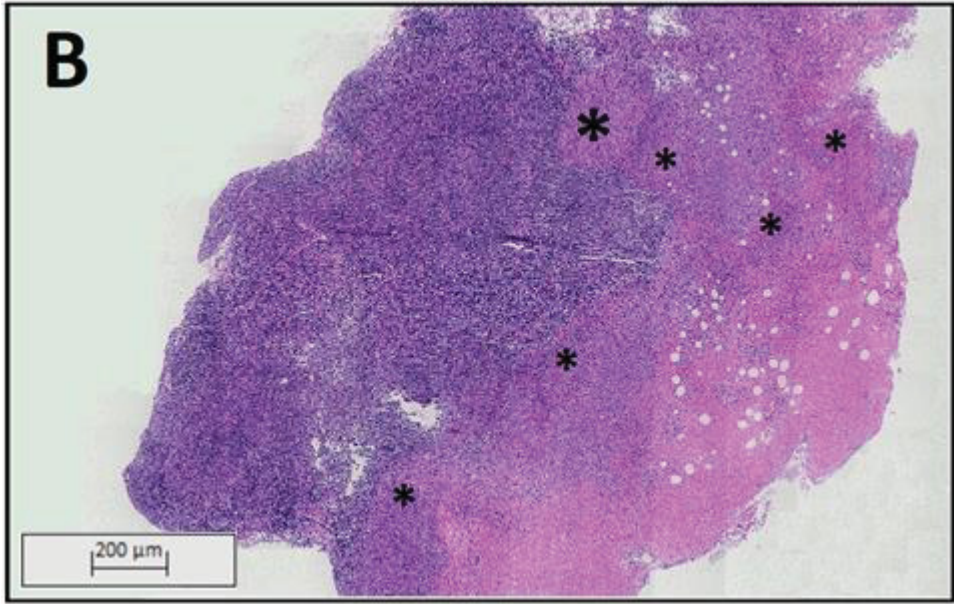
#### 6.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

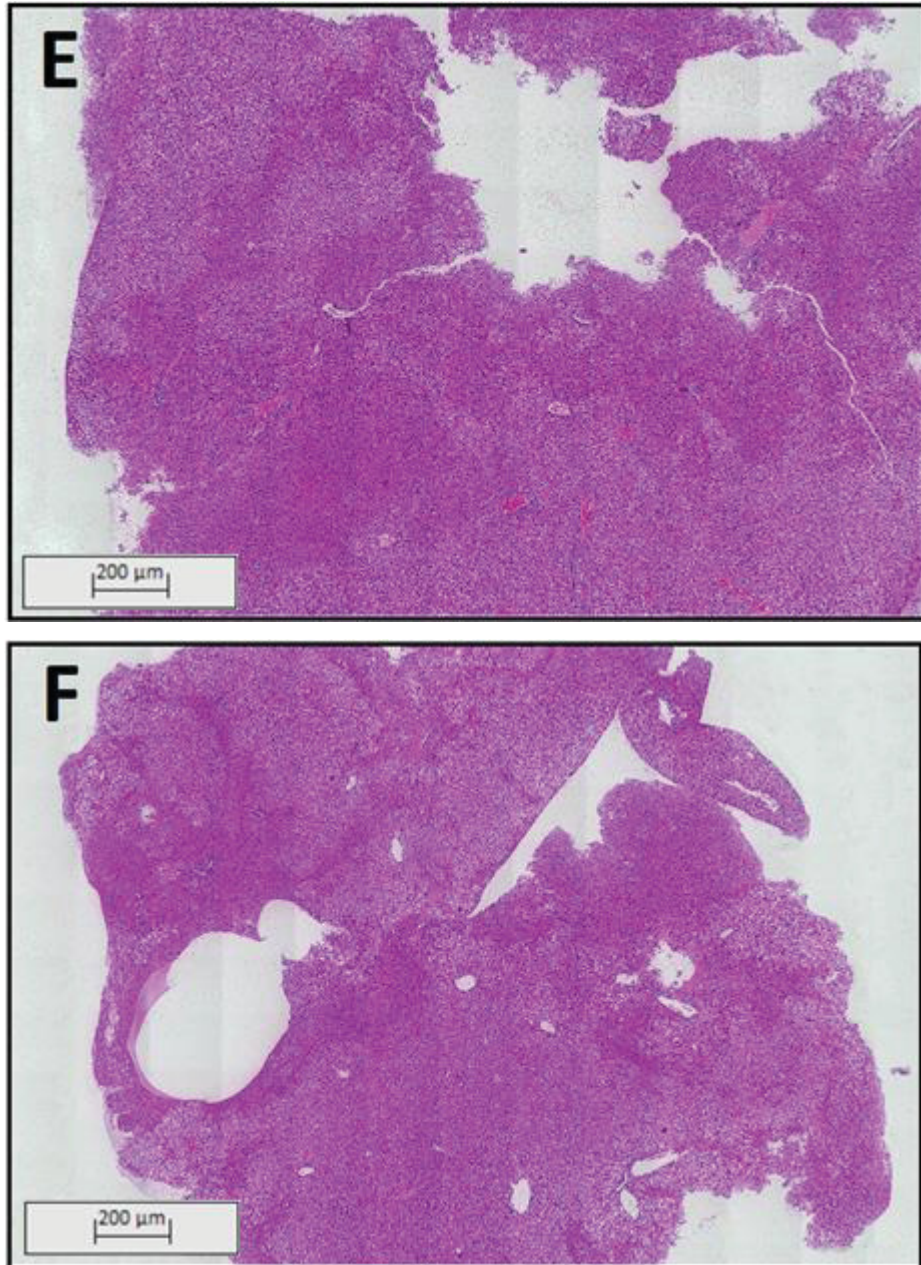
A avaliação histológica dos tumores e do tecido hepático foi realizada com o objetivo de visualizar possíveis alterações decorrentes do tratamento com dulaglutida comparado ao controle (FIGURA 22).

O tratamento com dulaglutida proporcionou maior grau de necrose coagulativa quando comparado ao grupo controle (FIGURA 22A E 22B). As regiões com necrose estavam frequentemente associadas a um grande infiltrado de células inflamatórias (FIGURA 22C), sendo que, nessas regiões também estavam presentes diversas células sofrendo o processo de cariorrexe característico da necrose tecidual (FIGURA 22D). A análise histológica do tecido hepático não demonstrou alterações morfológicas entre os grupos controle e dulaglutida, e as lâminas correspondentes à histologia normal do fígado dos camundongos estão representadas pelas FIGURAS 22E e 22F.

FIGURA 22 – ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO TUMORAL E HEPÁTICO







FONTE: A Autora (2020).

NOTA: Fotomicrografias de cortes histológicos do tumor de Ehrlich e do tecido hepático dos camundongos. Coloração com hematoxilina e eosina. A) Tumores dos animais controle, e B) Tumores dos animais tratados com dulaglutida. C) Ampliação da figura B da região em que há um grande infiltrado inflamatório com presença de tecido necrótico. D) Corte histológico do tumor tratado com dulaglutida com foco de necrose coagulativa e com diversas células em processo de cariorrexe (setas vermelhas) característico dessa morte celular. E) Tecido hepático dos camundongos do grupo controle, F) Tecido hepático dos camundongos tratados com dulaglutida. Não foram evidenciadas alterações morfológicas do tecido hepático entre os grupos. Obs.: Os asteriscos ( \* ) representam áreas de necrose coagulativa.

## 7 DISCUSSÃO

O gene *ADAM33* já foi sugerido como gene supressor de tumor e baixos níveis da *ADAM33* estão relacionados à redução da sobrevida global e de metástase. Conforme já evidenciado em diversos genes supressores de tumor, a expressão da proteína *ADAM33* está atrelada a regulação por mecanismos epigenéticos através da metilação do DNA na região promotora do gene *ADAM33* e pode ser utilizada com um biomarcador de câncer de mama agressivo, como os TNGs (MANICA et al., 2013; SENISKI et al., 2009).

Estudos recentes da dulaglutida em nosso laboratório demonstraram a capacidade do fármaco em desmetilar alguns CpGs específicos da região promotora do gene *ADAM33* (SLEDZ, 2019). Dessa forma, no presente trabalho, utilizamos uma linhagem humana de câncer da mama TNG (MDA-MB-231) para avaliar a capacidade da dulaglutida em promover redução do perfil de metilação da região promotora do gene *ADAM33*. A linhagem MDA-MB-231 possui originalmente 91,2% de metilação do gene *ADAM33* em condições normais, e passou a apresentar uma metilação de 60,9% após o tratamento de 24 horas com dulaglutida 1,7 nM (FIGURA 18). Esse dado corrobora com o que já foi evidenciado pela liraglutida, a qual demonstrou uma redução do perfil de metilação semelhante ao obtido (54,9%) (CHEQUIN et al., 2020 – submetido). Sendo que, a linhagem MDA-MB-231 também já provou ser uma linhagem com um alto perfil de metilação da região promotora do gene *ADAM33* em condições normais (85,7%) (SENISKI et al., 2009). Além disso, o resultado do nosso sequenciamento complementa o resultado da análise de MSP-PCR obtido por Sledz (2019), visto que no sequenciamento, os CpGs 47, 51 e 53 na linhagem controle encontravam-se 100% metilados, enquanto na linhagem tratada com dulaglutida, evidenciou-se uma redução da metilação para 25%, 62,5% e 62,5%, respectivamente.

Além do mais, esse mesmo estudo prévio realizado por Sledz (2019), evidenciou que após o tratamento com dulaglutida 1,7 nM, a linhagem MDA-MB-231 que não expressava *ADAM33* em condições basais, passou a expressar aproximadamente quatro vezes mais o gene *ADAM33*, sendo esse efeito promovido pelo efeito desmetilante da dulaglutida sobre o DNA. Esses dados também sugerem um efeito desmetilante global mais promissor em relação ao outro análogo, liraglutida e, inclusive, superior ao controle decitabine (iDNMT) utilizado (CHEQUIN, 2018; SLEDZ, 2019).

Ensaio prévios de viabilidade celular realizados em nosso laboratório demonstraram efeitos interessantes mediados pela dulaglutida, cuja dosagem de 1,7 nM foi capaz de reduzir a viabilidade celular nas linhagens MCF7 em 20% e MDA-MB-231 em 50%, sem afetar a viabilidade celular na linhagem normal de mama HB4a. Além disso, houve diminuição na formação de colônias em ambas as linhagens tumorais e a redução da migração celular na linhagem MDA-MB-231, bem como, aumento da expressão de outros genes supressores de tumor, como *ESR1* e *CDH1* na linhagem MDA-MB-231 (SLEDZ, 2019).

Esses resultados corroboram ao descrito para liraglutida, droga que também já demonstrou capacidade de reduzir o crescimento, a migração celular e a formação de colônias em linhagens tumorais de mama, incluindo a MDA-MB-231 (CHEQUIN, 2018). Também foi evidenciado o restabelecimento da expressão gênica por desmetilação da região promotora de genes supressores como *CDH1*, *ADAM33*, *ESR1* e *PGR*, bem como proposto, que esse efeito desmetilante é decorrente da inibição direta das enzimas DNMTs conforme avaliação feita através da análise da atividade/inibição das DNMTs (CHEQUIN et al., 2020 – submetido). Esses resultados obtidos com a liraglutida, sugerem que a dulaglutida também apresente potencial para atuar como um fármaco iDNMT e, possivelmente, como droga adjuvante na terapia do câncer de mama, entretanto, foi necessário comprovar se esse fármaco proporcionava efeito antitumoral através do ensaio *in vivo* utilizando modelo tumoral de câncer de mama.

A dulaglutida promoveu redução do volume tumoral tanto isoladamente, quanto em associação ao MTX (FIGURA 19). O MTX é um quimioterápico que atua interferindo no metabolismo do ácido fólico ao inibir a conversão de ácido diidrofólico a ácido tetraidrofólico pela enzima diidrofolato redutase, processo necessário na síntese de purinas. Seu uso apresenta diversos efeitos adversos e toxicidades a nível renal, hepático, pulmonar, hematológico, gastro-intestinal, mucocutâneo e neurológico (CHAN; CRONSTEIN, 2013; GAIES; JEBABLI, 2012).

O tratamento em associação da metade da dose de dulaglutida (0,07 mg/kg) e MTX (1,5 mg/kg) promoveu uma grande redução no volume tumoral, proporcionando quase a mesma resposta em relação ao tratamento com a dose superior e/ou isolada de MTX (2,5 mg/kg). Isso sugere que a dulaglutida pode funcionar como um agente adjuvante quando associado ao MTX ou a outros quimioterápicos, pois, além da significativa redução do volume tumoral, doses mais baixas de MTX podem reduzir os

efeitos adversos graves evidenciados na quimioterapia (HOWARD et al., 2016). Além disso, a diminuição dos níveis de tetraidrofolato e metilidrofolato pelo MTX deve ser destacada, uma vez que essas moléculas são doadoras do grupamento metil para molécula S-adenosilmetionina (SAM). A SAM é fundamental no processo de metilação do DNA mediado pelas DNMTs e, dessa forma, a associação de MTX com a dulaglutida pode estar potencializando o seu efeito desmetilante (FIGURA 6) (CHAN; CRONSTEIN, 2013).

Essa observação é de extrema importância, visto que, também já foi evidenciado que a liraglutida associada ao MTX promoveu aumento da citotoxicidade e morte celular *in vitro* nas linhagens de câncer de mama MCF7, MDA-MB-231 e MDA-MB-436 (CHEQUIN, 2018). Além disso, a liraglutida também promoveu redução do volume tumoral em modelo de tumor de Ehrlich murino e a curva do gráfico correspondente ao crescimento tumoral *in vivo* foi semelhante à obtida pela dulaglutida. Nessa análise, evidenciou-se que a liraglutida utilizada em forma isolada proporcionou excelente efeito antitumoral e que sua associação com MXT promoveu uma redução ainda mais eficiente. Entretanto, a utilização do MTX em dose isolada e superior aos demais grupos (2,5 mg/kg) foi o tratamento que proporcionou a maior redução no volume tumoral do estudo (CHEQUIN, 2018).

Ao contrário do realizado com a liraglutida, a dulaglutida apresenta uma meia-vida de 5 dias em humanos e dessa forma, foi aplicada semanalmente nos camundongos de acordo com as dosagens e frequência com que ela é difundida no tratamento de DM2 (ELI LILLY DO BRASIL LTDA, 2015). A dulaglutida apresenta uma meia-vida de 1,5 dias em camundongos e, dessa forma, é possível sugerir que uma resposta antitumoral ainda mais promissora poderia ser obtida caso fosse aumentada a dose nos modelos murinos. No entanto, no presente estudo, objetivou-se compreender os efeitos nos tumores a partir do que é preconizado na clínica humana. Além disso, da mesma forma que a liraglutida, a dulaglutida não promoveu nenhuma toxicidade que pudesse ser evidenciada através do peso dos órgãos dos animais, bem como, não alterou os parâmetros hematológicos, bioquímicos e glicêmicos dos camundongos (FIGURA 20 e 21, TABELAS 2 e 3) (CHEQUIN, 2018).

A análise histológica permitiu evidenciar maior presença de necrose coagulativa nos tumores tratados com dulaglutida comparada ao controle. O que justifica a presença de um intenso infiltrado inflamatório nessas regiões com células em processo de cariorrexe. A cariorrexe que ocorre nos tumores é uma manifestação

da morte celular favorável contra as células cancerosas e, portanto, um bom sinal prognóstico ao ocorrer de forma irreversível (MAJNO; JORIS, 1995).

O aumento da presença de necrose pode estar associada à redução da expressão do gene VEGF, o qual promove principalmente estímulo angiogênico e, dessa forma, desempenha papel chave no aporte sanguíneo necessário ao crescimento e desenvolvimento tumoral (CECI; ATZORI; LACAL, 2020; LEUNG et al., 1989; MILOSAVLJEVIC et al., 2016). Essa redução na expressão de *VEGF* também pode ser decorrente dos efeitos desmetilantes, pois o aumento de alguns miRNAs, como o miR-126, favorece a sua ligação ao RNAm do *VEGF* e o bloqueio na sua expressão, como já visto também com o miRNA-140-5p (ALHASAN, 2019; LU et al., 2017).

Os dados do tratamento da liraglutida já evidenciaram uma redução significativa da expressão gênica de *VEGF in vivo*, resultado que permite inferir que a dulaglutida também possa estar promovendo redução do volume tumoral, bem como, aumento da necrose através desse mecanismo. Adicionalmente, a liraglutida também demonstrou reduzir a expressão de genes relacionados a apoptose, necroptose e proliferação celular tais como *Bcl2*, *RIPK3* e *PIK3*, respectivamente (CHEQUIN, 2018).

Além disso, o aumento celular do infiltrado inflamatório evidenciado nos tumores tratados com dulaglutida também pode ser muito promissor, visto que, atualmente existem diversos estudos avaliando iDNMTs frente a capacidade de restaurar a capacidade de reconhecimento das células cancerosas pelo sistema imune, bem como, a associação deles com a imunoterapia (JONES, 2019; MICHALAK et al., 2019). Diferentemente dos iDNMT como o decitabine, os efeitos adversos da dulaglutida são mínimos e seu efeito desmetilante pode atuar a nível de desmetilação de genes supressores de tumor, bem como, através da desmetilação global (SLEDZ, 2019). Ao promover a redução da metilação global, sugere-se que esse fármaco também possa atuar desmetilando ERVs e CTAs e, promovendo morte das células cancerosas através de um maior reconhecimento dessas células pelo sistema imune (JONES, 2019; MICHALAK et al., 2019). Porém, ainda não existem estudos avaliando esse potencial e muitas análises utilizando essa associação ainda necessitam ser realizadas.

Dessa forma, estudos avaliando a associação da dulaglutida à imunoterapia e a outros quimioterápicos no tratamento de tumores TNG torna-se importante no

sentido de que, possivelmente, a dulaglutida possa potencializar os efeitos desses tratamentos, bem como, proporcionar uma redução da dose, reduzir os efeitos adversos e melhorar a qualidade de vida dessas pacientes.

## **8 CONCLUSÕES**

A dulaglutida provou ter a capacidade de promover desmetilação do promotor de gene *ADAM33* demonstrando seu potencial efeito como inibidor de DNMTs. Além disso, a dulaglutida demonstrou capacidade antitumoral ao proporcionar redução do volume tumoral em modelo de carcinoma mamário de camundongo.

Assim, a dulaglutida torna-se uma candidata ao tratamento adjuvante no câncer de mama. No futuro, estudos clínicos em humanos poderão avaliar se a imunoterapia associada a dulaglutida pode ser uma nova alternativa para o tratamento no câncer de mama do subtipo TNG.



## REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, M. N.; KABEL, A. M. Comparative study between the effect of methotrexate and valproic acid on solid Ehrlich tumour. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, v. 24, p. 161–167, 2012.

ABRAXANE, NAB-PACLITAXEL: Pó liofilizado para suspensão injetável. Responsável técnico Erika Mayumi Matsumoto. Phoenix, EUA: Abraxis BioScience, 2020. 1 bula de remédio.

ALEXANDER, R. P. et al. Annotating non-coding regions of the genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 8, p. 559–571, 2010.

ALHASAN, L. MiR-126 Modulates angiogenesis in breast cancer by targeting VEGF-A-mRNA. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 1, p. 193–197, 2019.

BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, v. 21, n. 3, p. 381–395, 2011.

BARRINGTON, P. et al. LY2189265, a long-acting glucagon-like peptide-1 analogue, showed a dose-dependent effect on insulin secretion in healthy subjects. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 13, n. 5, p. 434–438, 2011.

BASSON, M. et al. The cost-effectiveness of dulaglutide 1.5mg versus exenatide QW for the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus in France. **Diabetes Therapy**, v. 9, n. 1, p. 13–25, 2018.

BEERMANN, J. et al. Non-coding RNAs in development and disease: Background, mechanisms, and therapeutic approaches. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1297–1325, 2016.

BERGER, S. L. The complex language of chromatin regulation during transcription. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 407–412, 2007.

BIANCHINI, G. et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 13, n. 11, p. 674–690, 2016.

BIRD, A. P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. **Nature**, v. 321, n.

6067, p. 209–213, 1986.

BOYLE, P. et al. Diabetes and breast cancer risk: A meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 107, n. 9, p. 1608–1617, 2012.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BRONSVELD, H. K. et al. Diabetes and breast cancer subtypes. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2017.

BUCHHEIT, J. D. et al. Oral Semaglutide: A Review of the first oral glucagon-like peptide-1 receptor agonist. **Diabetes Technology & Therapeutics**, v. 22, n. 1, p. 10–18, 2019.

CAKEBREAD, J. A. et al. The role of ADAM33 in the pathogenesis of asthma. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 25, n. 3–4, p. 361–375, 2004.

CALIN, G. A.; CROCE, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 11, p. 857–866, 2006.

CARRETERO-GONZÁLEZ, A. et al. Comparative safety analysis of immunotherapy combined with chemotherapy versus monotherapy in solid tumors: a meta-analysis of randomized clinical trials. **Oncotarget**, v. 10, n. 35, p. 3294–3301, 2019.

CASTILLO, J.; LÓPEZ-RODAS, G.; FRANCO, L. Histone post-translational modifications and nucleosome organisation in transcriptional regulation: Some open questions. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 966, p. 65–92, 2017.

CECI, C.; ATZORI, M. G.; LACAL, P. M. Role of VEGFs/VEGFR-1 Signaling and its inhibition in modulating tumor invasion: Experimental evidence in different metastatic cancer models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1–53, 2020.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. **Science**, v. 331, n. March, p. 1559–1564, 2011.

CHAKAROV, S. et al. DNA damage and mutation. Types of DNA damage. **Biodiscovery**, v. 11, n. 1, p. 1–51, 2014.

CHAN, E. S. L.; CRONSTEIN, B. N. Mechanisms of action of methotrexate. **Bulletin of the Hospital for Joint Disease**, v. 71, n. Suppl 1, p. 5–8, 2013.

CHAO, W. et al. CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice. **Science**, v. 295, n. January, p. 345–347, 2002.

CHEANG, M. C. U. et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1368–1376, 2008.

CHENG, Y. et al. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 4, n. 62, p. 1–39, 2019.

CHEQUIN, A. **Liraglutida como um novo agente desmetilante de DNA e seu potencial como adjuvante na terapia do câncer de mama**. 125 f. Tese (Doutorado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

CHIAPPINELLI, K. B. et al. Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsRNA including endogenous retroviruses. **Cell**, v. 162, n. 5, p. 974–986, 2015.

CHITTY, J. L. et al. Recent advances in understanding the complexities of metastasis. **F1000 Research**, v. 7, n. 1169, p. 1–18, 2018.

CONCEIÇÃO, A.; SILVA, N. Fármacos para o tratamento do diabetes Tipo II: Uma visita ao passado e um olhar para o futuro. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 514–534, 2017.

COUSSENS, L. M.; POLLARD, J. W. Leukocytes in mammary development and cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 3, p. a003285, 2011.

CURTSINGER, J. M.; MESCHER, M. F. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 3, p. 333–340, 2010.

DAI, X. et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **American Journal of Cancer Research**, v. 5, n. 10, p. 2929–2943, 2015.

DALL, G. V.; BRITT, K. L. Estrogen effects on the mammary gland in early and late life and breast cancer risk. **Frontiers in Oncology**, v. 7, n. May, p. 1–10, 2017.

DARVIN, P. et al. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 165, p. 1–11, 2018.

DENARDO, D. G.; COUSSENS, L. M. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: Crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 4, p. 1–10, 2007.

DILLA, T. et al. The cost-effectiveness of dulaglutide versus liraglutide for the treatment of type 2 diabetes mellitus in Spain in patients with BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>. **Journal of Medical Economics**, v. 20, n. 5, p. 443–452, 2017.

DRUCKER, D. J. The biology of incretin hormones. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 3, p. 153–165, 2006.

DU, J. et al. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 9, p. 519–532, 2015.

DUTNALL, R. N. et al. Structure of the histone acetyltransferase Hat1: A paradigm for the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily. **Cell**, v. 94, n. 4, p. 427–438, 1998.

DYACHOK, O. et al. Oscillations of cyclic AMP in hormone-stimulated insulin-secreting  $\beta$ -cells. **Nature**, v. 439, n. 7074, p. 349–352, 2006.

EGGER, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, n. May, p. 457–463, 2004.

EISSELE, R. et al. Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 22, n. 4, p. 283–291, 1992.

EMENS, L. A. Breast cancer immunotherapy: Facts and hopes. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 3, p. 511–520, 2018.

FAN, C. et al. Concordance among gene-expression–based predictors for breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 6, p. 560–569, 2006.

FARES, J. et al. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 1–17, 2020.

FATEMI, M. et al. Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 20, p. 4981–4984, 2002.

FAVA, G. E.; DONG, E. W.; WU, H. Intra-islet glucagon-like peptide 1. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 30, n. 8, p. 1651–1658, 2016.

FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nature Reviews. Cancer**, v. 4, n. February, p. 143–153, 2004.

FENG, Y. et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes and Diseases**, v. 5, n. 2, p. 77–106, 2018.

FERGUSON-SMITH, A. C. et al. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. **Science**, v. 293, n. August, p. 1086–1089, 2001.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941–1953, 2019.

FLIER, J. S.; UNDERHILL, L. H.; EISENBARTH, G. S. Type I diabetes mellitus - A chronic autoimmune disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 314, n. 21, p. 1360–1368, 1986.

GAIES, E.; JEBABLI, N. Methotrexate side effects: Review article. **Journal of Drug Metabolism & Toxicology**, v. 3, n. 4, p. 1–5, 2012.

GALVÃO, E. R. C. G. N. et al. Breast cancer proteomics: A review for clinicians. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 137, p. 915–925, 2011.

GEPTS, W. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 14, n. 10, p. 619–633, 1965.

GHONEIM, H. E. et al. De novo epigenetic programs inhibit PD-1 blockade-mediated T cell rejuvenation. **Cell**, v. 170, n. 1, p. 142–157, 2017.

GIRAULT, I.; LIDEREAU, R.; BIE, I. Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 4415–4422, 2003.

GLAESNER, W. et al. Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 26, n. February, p. 287–296, 2010.

GOLDSBERRY, W. N. et al. A review of the role of wnt in cancer immunomodulation. **Cancers**, v. 11, n. 6, p. 1–19, 2019.

GOLL, M. G. et al. Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. **Science**, v. 311, n. 5759, p. 395–398, 2006.

GREGORY, P. A. et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 593–601, 2008.

GROOT, A. S. DE; MOISE, L. Prediction of immunogenicity for therapeutic proteins: State of the art. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, v. 10, n. 3, p. 332–340, 2007.

GUPTA, R. A. et al. LETTERS Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. **Nature**, v. 464, n. 7291, p. 1071–1076, 2010.

GYÖRFFY, B. et al. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 11, p. 1–7, 2015.

HAITCHI, H. M. et al. ADAM33 expression in asthmatic airways human embryonic lungs. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, n. 9, p. 958–965, 2005.

HAJJARI, M.; SALAVATY, A. REVIEW HOTAIR: An oncogenic long non-coding RNA in different cancers. **Cancer biology and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2015.

HAVECKER, E. R.; GAO, X.; VOYTAS, D. F. The diversity of LTR retrotransposons.

**Genome Biology**, v. 5, n. 6, p. 225.1-225.6, 2004.

HEO, Y. A.; SYED, Y. Y. Subcutaneous trastuzumab: A Review in HER2-positive breast cancer. **Targeted Oncology**, v. 14, n. 6, p. 749–758, 2019.

HOLDE, K. E. VAN; ISENBERG, I. Histone interactions and chromatin structure. **Accounts of Chemical Research**, v. 8, n. 10, p. 327–335, 1975.

HOLST, F. et al. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. **Nature Genetics**, v. 39, n. 5, p. 655–660, 2007.

HOLZ, G. G. Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic  $\beta$ -cell. **Diabetes**, v. 53, n. 1, p. 5–13, 2004.

HOWARD, S. C. et al. Preventing and managing toxicities of high-dose methotrexate. **The Oncologist**, v. 21, n. 12, p. 1471–1482, 2016.

HU, F. B. Globalization of diabetes: The role of diet, lifestyle, and genes. **Diabetes Care**, v. 34, n. 6, p. 1249–1257, 2011.

HUANG, J.; BRIDGES, L. C.; WHITE, J. M. Selective modulation of integrin-mediated cell migration by distinct ADAM family members. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. October, p. 4982–4991, 2005.

HUANG, R. Y. et al. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 19, p. 4417–4422, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). World Health Organization. **Global Cancer Observatory**. Curitiba, 2019 em: < <https://gco.iarc.fr/>>. Acesso: 12 abril 2020.

ISHII, K.; MORII, N.; YAMASHIRO, H. Pertuzumab in the treatment of HER2-positive breast cancer: an evidence-based review of its safety, efficacy, and place in therapy. **Core Evidence**, v. 14, p. 51–70, 2019.

ISSA, J.-P. J.; KANTARJIAN, H. M. Targeting DNA methylation. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 12, p. 3938–3946, 2009.

JACKSTADT, R.; HODDER, M. C.; SANSOM, O. J. WNT and  $\beta$ -catenin in cancer: Genes and therapy. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 4, n. 1, p. 177–196, 2020.

JAMES, S. R.; LINK, P. A.; KARPF, A. R. Epigenetic regulation of X-linked cancer/germline antigen genes by DNMT1 and DNMT3b. **Oncogene**, v. 25, n. 6, p. 6975–6985, 2006.

JELTSCH, A. Beyond watson and crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. **ChemBioChem**, v. 3, p. 274–293, 2002.

JELTSCH, A. Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 301, p. 203–225, 2006.

JONES, P. A. et al. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science**, v. 293, n. August, p. 1068–1070, 2001.

JONES, P. A. Epigenetic therapy in immune-oncology. **Nature Reviews Cancer**, v. 19, n. March, p. 151–161, 2019.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature Reviews. Genetics**, v. 13, n. 7, p. 484–92, 2012.

JONES, R. G.; PEARCE, E. J. MenTORing immunity: mTOR signaling in the development and function of tissue-resident immune cells. **Immunity**, v. 46, n. 5, p. 730–742, 2017.

KAHN, C. R. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. **Diabetes**, v. 43, n. August, p. 1066–1084, 1994.

KALLURI, R.; NEILSON, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1776–1784, 2003.

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



KARKI, K. et al. A bis-indole-derived NR4A1 antagonist induces PD-L1 degradation and enhances anti-tumor immunity. **Cancer Research**, v. January, 2020.

KIEFFER, T.; MCINTOSH, C. H. S.; PEDERSON, R. A. Degradation of glucose-dependent insulintropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV\*. **Endocrinology**, v. 136, n. 8, p. 3585–3596, 1977.

KINSELLA, M. D. et al. Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and HER2 expression pre- and post-neoadjuvant chemotherapy in primary breast carcinoma: A single institutional experience. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 5, n. 6, p. 530–536, 2012.

KNUDSEN, L. B.; LAU, J. The discovery and development of liraglutide and semaglutide. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. April, p. 1–32, 2019.

KOS, Z.; DABBS, D. J. Biomarker assessment and molecular testing for prognostication in breast cancer. **Histopathology**, v. 68, p. 70–85, 2016.

KOŹMIŃSKI, P. et al. Overview of dual-acting drug methotrexate in different neurological diseases, autoimmune pathologies and cancers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, p. 1–38, 2020.

KURITZKY, L. et al. Safety and efficacy of dulaglutide, a once weekly GLP-1 receptor agonist, for the management of type 2 diabetes. **Postgraduate Medicine**, v. 126, n. 6, p. 60–71, 2014.

LAMBRECHT, B. N.; VANDERKERKEN, M.; HAMMAD, H. The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 12, p. 745–758, 2018.

LAN, F.; SHI, Y. Epigenetic regulation: Methylation of histone and non-histone proteins. **Science in China, Series C: Life Sciences**, v. 52, n. 4, p. 311–322, 2009.

LANDER, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860–921, 2001.

LARSSON, S. C.; MANTZOROS, C. S.; WOLK, A. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: A meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 4, p. 856–862, 2007.

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

LEE, S.; LEE, D. Y. Glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes. **Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 15, 2017.

LEUNG, D. W. et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science**, v. 246, n. 4935, p. 1306–1309, 1989.

LI, X.-N. et al. Glucagon-like peptide-1 analogues inhibit proliferation and increase apoptosis of human prostate cancer cells in vitro. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 125, n. 2, p. 91–97, 2017.

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, p. 449–461, 2012.

LU, Y. et al. MicroRNA-140-5p inhibits invasion and angiogenesis through targeting VEGF-A in breast cancer patient samples. **Cancer Gene Therapy**, v. 24, n. 9, p. 386–392, 2017.

LYKO, F. The DNA methyltransferase family: A versatile toolkit for epigenetic regulation. **Nature Reviews Genetics**, v. 19, n. 2, p. 81–92, 2018.

MAHMOUD, A. M. Cancer testis antigens as immunogenic and oncogenic targets in breast cancer. **Immunotherapy**, v. 10, n. 9, p. 769–778, 2018.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: An overview of cell death. **American Journal of Pathology**, v. 146, n. 1, p. 3–15, 1995.

MANICA, G. C. M. et al. ADAM33 as a new biomarker for invasive lobular breast carcinoma. **Journal of Cancer Science and Therapy**, v. 5, n. 1, p. 14–17, 2013.

MANICA, G. C. M. et al. Down regulation of ADAM33 as a predictive biomarker of aggressive breast cancer. **Scientific Reports**, v. 7, n. 44414, p. 1–13, 2017.

MARHELAVA, K. et al. Targeting negative and positive immune checkpoints with

monoclonal antibodies in therapy of cancer. **Cancers**, v. 11, n. 1756, p. 1–21, 2019.

MENTLEIN, R.; GALLWITZ, B.; SCHMIDT, W. E. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7–36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. **European Journal of Biochemistry**, v. 214, n. 3, p. 829–835, 1993.

MICHALAK, E. M. et al. The roles of DNA, RNA and histone methylation in ageing and cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 10, p. 573–589, 2019.

MILOSAVLJEVIC, M. Z. et al. Deletion of IL-33R attenuates VEGF expression and enhances necrosis in mammary carcinoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 14, p. 18106–18115, 2016.

MISHRA, S. et al. Subcutaneous ehrlich ascites carcinoma mice model for studying cancer-induced cardiomyopathy. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

MITTENDORF, E. A. et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. **Cancer Immunology Research**, v. 2, n. 4, p. 361–370, 2014.

MODY, R. et al. Adherence, persistence, glycaemic control and costs among patients with type 2 diabetes initiating dulaglutide compared with liraglutide or exenatide once weekly at 12-month follow-up in a real-world setting in the United States. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 21, n. 4, p. 920–929, 2018.

MOJSOV, S.; WEIR, G. C.; HABENER, J. F. Insulinotropin: Glucagon-like peptide I (7–37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. **Journal of Clinical Investigation**, v. 79, n. 2, p. 616–619, 1987.

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

NEAGU, M. et al. Proteomic technology “lens” for epithelial-mesenchymal transition process identification in oncology. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2019, p. 1–17, 2019.

NIRSCHL, C. J.; DRAKE, C. G. Molecular pathways: Coexpression of immune checkpoint molecules: Signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 19, p. 4917–4924, 2013.

NOWSHEEN, S. et al. Epigenetic inactivation of DNA repair in breast cancer. **Cancer Letters**, v. 342, n. 2, p. 213–222, 2014.

OZASLAN, M. et al. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2375–2378, 2011.

PACHALY, J.; BRITO, H. Interspecific allometric scaling. **Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals**, v. 75, n. 1, p. 475–481, 2001.

PAN, Y. et al. DNA methylation profiles in cancer diagnosis and therapeutics. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2017.

PARDOLL, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. April, p. 252–264, 2012.

PASTOR, W. A.; ARAVIND, L.; RAO, A. TETonic shift: Biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 6, p. 341–356, 2013.

PATEL, H. et al. Efficacy of dulaglutide as a first injectable option for patients with type 2 diabetes: A post-hoc pooled analysis. **Diabetes Therapy**, v. 10, n. 6, p. 2321–2330, 2019.

PEAIRS, K. S. et al. Diabetes mellitus and breast cancer outcomes: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 1, p. 40–46, 2011.

PECHTNER, V. et al. A new approach to drug therapy: Fc-fusion technology. **Primary Health Care Open Access**, v. 07, n. 01, p. 1–5, 2017.

PENG, D. et al. Epigenetic silencing of Th1 type chemokines shapes tumor immunity and immunotherapy. **Nature**, v. 527, n. 7577, p. 249–253, 2015.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. May, p. 747–752, 2000.

POLYAK, K. Science in medicine breast cancer : origins and evolution. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 11, p. 3155–3163, 2007.

PRIMAKOFF, P. The ADAM gene family. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 2, p. 83–87, 2000.

PRZYBILLA, J. et al. Targeting DNA hypermethylation: Computational modeling of DNA demethylation treatment of acute myeloid leukemia. **Epigenetics**, v. 12, n. 10, p. 886–896, 2017.

PUSHPAKOM, S. et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Publishing Group**, v. 18, n. 1, p. 41–58, 2018.

PYKE, C. et al. GLP-1 receptor localization in monkey and human tissue: Novel distribution revealed with extensively validated monoclonal antibody. **Endocrinology**, v. 155, n. 4, p. 1280–1290, 2014.

RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, I. O. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 120, p. 293–308, 2010.

ROBERTI, A. et al. Epigenetics in cancer therapy and nanomedicine. **Clinical Epigenetics**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2019.

ROBERTSON, K. D. et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: Coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 11, p. 2291–2298, 1999.

ROBERTSON, K. D.; WOLFFE, A. P.; REGULATION, E. G. DNA methylation in health and disease. **Nature Reviews. Genetics**, v. 1, n. October, p. 1–9, 2000.

ROLL, J. D. et al. DNMT3b overexpression contributes to a hypermethylator phenotype in human breast cancer cell lines. **Molecular Cancer**, v. 7, n. 15, p. 1–14, 2008.

ROTTE, A. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 255, p. 1–12, 2019.

ROULOIS, D. et al. DNA-demethylating agents target colorectal cancer cells by inducing viral mimicry by endogenous transcripts. **Cell**, v. 162, n. 5, p. 961–973, 2015.

ROUNTREE, M. R.; BACHMAN, K. E.; BAYLIN, S. B. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. **Nature Genetics**, v. 25, n. 3, p. 269–277, 2000.

SABA, H. I. Decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3, n. 5, p. 807–817, 2007.

SAMUEL, S. M. et al. Challenges and perspectives in the treatment of diabetes associated breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 70, n. August, p. 98–111, 2018.

SCHMID, P. et al. Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 22, p. 2108–2121, 2018.

SCHMIDT, H. et al. Prolonged survival in stage III melanoma with ipilimumab adjuvant therapy. **The new england journal of medicine**, v. 375, n. 19, p. 1845–1855, 2016.

SCHÜBELER, D. Function and information content of DNA methylation. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 321–326, 2015.

SEALS, D. F.; COURTNEIDGE, S. A. The ADAMs family of metalloproteases: Multidomain proteins with multiple functions. **Genes and Development**, v. 17, p. 7–30, 2003.

SENISKI, G. G. et al. ADAM33 gene silencing by promoter hypermethylation as a molecular marker in breast invasive lobular carcinoma. **BMC Cancer**, v. 9, n. 80, p. 1–10, 2009.

SERRANO-GOMEZ, S. J.; MAZIVEYI, M.; ALAHARI, S. K. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. **Molecular Cancer**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2016.

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 27–36, 2010.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 70, n. 1, p. 7–30, 2020.

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

SLEDZ, L. R. **Dulaglutida como um novo provável adjuvante na terapia do câncer de mama.** 27 f. Trabalho Acadêmico (Medicina) - Setor Ciências Biológicas,

Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

SMITH, Z. D.; MEISSNER, A. DNA methylation: Roles in mammalian development. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 3, p. 204–220, 2013.

SOBRAL-LEITE, M. et al. Assessment of PD-L1 expression across breast cancer molecular subtypes, in relation to mutation rate, BRCA1-like status, tumor-infiltrating immune cells and survival. **Oncotmunology**, v. 7, n. 12, p. 1–15, 2018.

SOCKOLOSKY, J. T.; SZOKA, F. C. The neonatal Fc receptor, FcRn, as a target for drug delivery and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 30, n. 91, p. 109–124, 2015.

SONG, J. et al. Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation. **Science**, v. 331, n. 6020, p. 1036–1040, 2011.

SONG, Y. et al. Targeting E-cadherin expression with small molecules for digestive cancer treatment. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 11, n. 7, p. 3932–3944, 2019.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 2001.

SORLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8418–8423, 2003.

SPROUL, D.; MEEHAN, R. R. Genomic insights into cancer-associated aberrant CpG island hypermethylation. **Briefings in Functional Genomics**, v. 12, n. 3, p. 174–190, 2013.

SRIKANTH, K. et al. Enhanced regression of tumors in mice with combined chemotherapy and immunotherapy. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 34, p. 172–177, 2002.

STARUP-LINDE, J. et al. CARING (CAnCer Risk and INsulin analogues): The Association of diabetes mellitus and cancer risk with focus on possible determinants - A systematic review and a meta-analysis. **Current Drug Safety**, v. 8, n. 5, p. 296–332, 2013.

STEEG, P. S. Targeting metastasis. **Nature Publishing Group**, v. 16, n. 4, p. 201–218, 2016.

STRESEMANN, C.; LYKO, F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. **International Journal of Cancer**, v. 123, n. March, p. 8–13, 2008.

SUBRAMANIAM, D. et al. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. **Frontiers in oncology**, v. 4, n. 90, p. 80, 2014.

TAKATORI, E. et al. Analysis of the antitumor activity of gemcitabine and carboplatin against ovarian clear-cell carcinoma using the DNA damage marker  $\gamma$ H2AX. **OncoTargets and Therapy**, v. 6, p. 901–907, 2013.

THIERY, J. P. et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 871–890, 2009.

TIAN, T.; LI, X.; ZHANG, J. mTOR signaling in cancer and mtor inhibitors in solid tumor targeting therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 1–34, 2019.

TREMONT, A.; LU, J.; COLE, J. T. Endocrine therapy for early breast cancer: Updated review. **Ochsner Journal**, v. 17, n. 4, p. 405–411, 2017.

TREROTOLA, M. et al. Epigenetic inheritance and the missing heritability. **Human Genomics**, v. 9, n. 17, p. 1–12, 2015.

TRULICITY, DULAGLUTIDA: solução estéril. Responsável técnico Márcia A. Preda. Indianapolis, EUA: Eli Lilly and Company, 2015. 1 bula de remédio.

TUDZAROVA, S.; OSMAN, M. A. The double trouble of metabolic diseases: the diabetes – cancer link. **Molecular Biology of the Cell**, v. 26, n. 18, p. 3129–3139, 2015.

UDEN, D. J. P. VAN et al. Metastatic behavior and overall survival according to breast cancer subtypes in stage IV inflammatory breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 21, n. 113, p. 1–9, 2019.

VAN ROY, F. Beyond E-cadherin: Roles of other cadherin superfamily members in



cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 2, p. 121–134, 2014.

VAN ROY, F.; BERX, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 3756–3788, 2008.

VENKATESH, S.; WORKMAN, J. L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. **Nature Publishing Group**, v. 16, n. 3, p. 178–189, 2015.

WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast cancer treatment - A review. **Clinical Review and Education**, v. 321, n. 3, p. 288–300, 2019.

WANG, H. et al. MicroRNA-21 promotes breast cancer proliferation and metastasis by targeting LZTFL1. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2019.

WANG, J. et al. Molecular mechanisms and clinical applications of MIR-22 in regulating malignant progression in human cancer (Review). **International Journal of Oncology**, v. 50, n. 2, p. 345–355, 2017.

WEIGEL, M. T.; DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: Prognosis and prediction. **Endocrine-Related Cancer**, v. 17, p. R245–R262, 2010.

WELCH, D. R.; HURST, D. R. Defining the hallmarks of metastasis. **Cancer Research**, v. 79, n. 12, p. 3011–3027, 2019.

WOLFSBERG, T. G. et al. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: Multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. **Journal of Cell Biology**, v. 131, n. 2, p. 275–278, 1995a.

WOLFSBERG, T. G. et al. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. **Developmental Biology**, v. 169, p. 378–383, 1995b.

WOODFIELD, G. W. et al. Interaction of TFAP2C with the estrogen receptor- $\alpha$  promoter is controlled by chromatin structure. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 11, p. 3672–3679, 2009.

WU, D. et al. Glucose-regulated phosphorylation of TET2 by AMPK reveals a pathway linking diabetes to cancer. **Nature**, v. 559, n. 7715, p. 637–641, 2018.

WU, X.; ZHANG, Y. TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 9, p. 517–534, 2017.

WU, Z. et al. Development of methotrexate proline prodrug to overcome resistance by MDA-MB-231 cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 17, p. 5108–5112, 2010.

XHEMALCE, B.; DAWSON, M. A.; BANNISTER, A. J. Histone modifications. **Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine**, p. 1–45, 2011.

YANG, J.; WEINBERG, R. A. Epithelial-mesenchymal transition: At the crossroads of development and tumor metastasis. **Developmental Cell**, v. 14, n. 6, p. 818–829, 2008.

YASUDA, H. et al. Exendin-4 promotes extracellular-superoxide dismutase expression in A549 cells through DNA demethylation. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 58, n. 1, p. 34–39, 2016.

YODER, B. J.; WILKINSON, E. J.; MASSOLL, N. A. Molecular and morphologic distinctions between infiltrating ductal and lobular carcinoma of the breast. **Breast Journal**, v. 13, n. 2, p. 172–179, 2007.

YOO, C. B.; JONES, P. A. Epigenetic therapy of cancer: Past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. January, p. 37–50, 2006.

YOSHINAKA, T. et al. Identification and characterization of novel mouse and human ADAM33s with potential metalloprotease activity. **Gene**, v. 282, p. 227–236, 2002.

ZHANG, B. et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. **Developmental Biology**, v. 302, n. 1, p. 1–12, 2007.

ZHANG, W.; XU, J. DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis. **Biomarker Research**, v. 5, p. 1, 2017.

ZHAO, H. et al. Activation of glucagon-like peptide-1 receptor inhibits tumourigenicity and metastasis of human pancreatic cancer cells via PI3K/Akt pathway. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 16, p. 850–860, 2014.