

EDNEIA AMANCIO DE SOUZA RAMOS

**HIPERMETILAÇÃO DE ILHAS DE CpG DOS GENES *CXCL12* E *ESR1*:
CORRELAÇÃO COM OS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS EM CÂNCER DE
MAMA**

**CURITIBA
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

EDNEIA AMANCIO DE SOUZA RAMOS

**HIPERMETILAÇÃO DE ILHAS DE CpG DOS GENES *CXCL12* E *ESR1*:
CORRELAÇÃO COM OS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS EM CÂNCER DE
MAMA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia). Área de Concentração em Patologia do Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dra. Giseli Klassen
Co-orientador: Dr. Fabrício F. Costa

**CURITIBA
2009**

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a alguém que mesmo diante de tantas dificuldades ao longo da vida, ensinou aos seus que o respeito, a amizade, o companheirismo, o esforço, honestidade e o trabalho são fatores intrínsecos da felicidade e sucesso. Que sem sua ajuda, talvez, eu jamais teria chegado até aqui, e seus ensinamentos é que me dão o “trampolim” para se alcançar ao longe: minha mãe.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Giseli Klassen pela oportunidade ao longo destes três anos de convivência. Obrigada pela disposição, orientação, ensinamentos e por acreditar na minha capacidade.

À CAPES pelo suporte financeiro e ao REUNI pela bolsa concedida no último ano.

Ao curso de Pós Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia e sua mentora Prof. Dra. Vanete T. Soccol (e sua disponibilidade quanto ao uso de equipamentos em seu laboratório) por apoiar na continuidade deste projeto e a atual coordenadora Prof. Dra. Edilene de C. Alcântara por todo apoio.

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer pelos materiais e linhagens celulares cedidos.

Ao Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná pelo fornecimento das amostras tumorais utilizadas neste trabalho, especialmente aos responsáveis pelo laboratório Dra Enilze S. F. Ribeiro e pelo Dr Iglénir João Cavalli, pela disponibilidade de informações sobre as amostras tumorais, e seus alunos pela disponibilidade e ajuda sempre que precisamos.

Ao Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa e Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza pelo suporte financeiro através da participação no projeto Milênio. E também pelo essencial e incondicional apoio a utilização do laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio e Biologia Molecular no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Em especial aos conselhos do professor Emanuel Maltempi em darmos continuidade a este projeto.

Ao Valter A. Baura pela disponibilidade, atenção e paciência de sempre nos ajudar e sua participação efetiva ao comandar as amostras no seqüenciador. À Ana Claudia Bonatto e Michele Torres por dividirem diariamente a sala 275 com meus

intermináveis PCR. À Patrícia Castellen e ao Gustavo Couto pelas essenciais alíquotas de eletrocompetentes. À Dona Roseli, pelo preparo de reagentes, meios de cultura e pela autoclavação dos materiais sempre com sua eterna paciência sem perder a simpatia.

Às colegas de laboratório: Mariana Grochoski, Gerusa Seniski, Simone Foggiatto, Cristiane Shigueoki pela convivência e apoio no começo deste trabalho; e ao Fernando Bortolozzi e à Camila da Silva pelas tardes de companhia neste último ano. À Renata Slowik por sua indispensável ajuda na etapa final deste trabalho.

À Mariana e Gerusa pela amizade e companheirismo durante os muitos experimentos. Nos primeiros anos aprendemos muito umas com as outras e nossa amizade foi muito além dos portões da Universidade. Muito obrigada principalmente a vocês duas, por participar ativamente desta etapa da minha vida!

A minha mãe pelo apoio e incentivo, por segurar as “pontas” em casa enquanto tive que ir à faculdade ao longo destes anos. Muito obrigada pela dedicação e paciência!

Ao meu filho, pelas horas em que estive de corpo ausente, mas não de pensamento! Parte deste projeto é mercedido a você. Que tanta dedicação lhe sirva de exemplo.

À minha irmã Édna pela amizade, ajuda, compreensão e apoio de sempre.

Aos meus familiares pelo apoio e incentivo de sempre.

Ao meu noivo, Marco Antonio, pelos momentos de intensa felicidade neste último ano. Seu apoio incondicional, paciência, atenção, dedicação e presença constante me proporcionam a felicidade diária... Amo você!

**“We shall not cases from exploration
And the end of all our exploring
Will be to arrive where we started
And know the place for the first time.”**

(T.S. Eliot)

RESUMO

CXCL12 (ou Fator-1 derivado da célula do estroma) e seu receptor CXCR4 são co-expressos em diversos tecidos e dão origem a muitos processos durante o desenvolvimento embrionário. Através de uma alteração na regulação de transcrição do gene *CXCL12* ocorre uma sinalização tanto autócrina quanto parácrina em células tumorais alterando seu potencial metastático. Apesar de seus mecanismos ainda não serem totalmente elucidados, há evidências de que o gene *CXCL12* pode ser regulado pela ação do gene *ESR1*. Neste estudo avaliamos o perfil de expressão do gene *CXCL12* em linhagens tumorais de mama por RT-PCR e o padrão de metilação dos genes *CXCL12* e *ESR1* nas amostras de tumores primários provenientes do Hospital Nossa das Graças, Curitiba, utilizando a técnica de MSP (*methylation specific PCR*). Duas ilhas de CpG do gene *CXCL12* foram avaliadas e comparados com os dados clínico-patológicos dos tumores. Os dados de MSP mostraram que 13% (para ilha 2) e 44% (para ilha 4) das amostras encontram-se com a região promotora de *CXCL12* hipermetilada; enquanto 41% das amostras de tumores primários de mama apresentaram a região promotora de *ESR1* hipermetilada. A hipermetilação do gene *ESR1* contribuiu para a ausência da proteína ER α ($p < 0.0001$). Este estudo também demonstrou que a metilação de *ESR1* está significativamente correlacionada com a hipermetilação de *CXCL12* nas amostras brasileiras avaliadas ($p = 0.012$). Este é o primeiro trabalho mostrando o envolvimento da regulação epigenética dos genes *CXCL12* e *ESR1* e sua correlação com os dados clínico-patológicos de tumores primários de câncer de mama. Nossos resultados apontam valores significativos para o grau histológico avançado, a presença de metástases e morte, sendo, portanto de fundamental importância sua avaliação como fator de prognóstico e prevenção do câncer de mama.

Palavras chaves: câncer de mama, Fator-1 derivado da célula do estroma (SDF-1/*CXCL12*), epigenética, metilação do DNA, ER α .

ABSTRACT

CXCL12 (or Stromal cell-derived factor-1 α and its receptor CXCR4 are co-expressed in various tissues and give rise to many processes during its development. Through CXCL12 dysregulation the autocrine signalling can modulate several cancers metastatic potentials. Yet this mechanisms is unknown, it had been shown that ESR1 can act in CXCL12 regulation. In this study, we used breast cancer cell lines to verify expression of CXCL12 and ESR1 as described in the literature. Using methylation-specific PCR (MSP), we analysed the methylation status of ER α and CXCL12 genes in primary breast tumours samples. Two islands for CXCL12 methylation were analysed and the clinicopathological data compared. MSP showed hypermethylation in the CXCL12 promoter region in 13% (for island 2) and 44% (for island 4) of primary breast tumours. In analyses of ESR1 promoter 41% of breast tumour was hypermethylated. In addition, the levels of ER α protein expression diminished with the frequency of ESR1 methylation ($p < 0.0001$). The study also demonstrated that ESR1 methylation occurs in high frequency together CXCL12 island 4 ($p = 0.012$). This is the first work showing the involvement of the epigenetic regulation of the CXCL12 and ESR1 genes correlation in the primary breast tumours of Brazilian's women in agreement these patients had advanced histological degree, presence of metastasis and death, and that therefore this correlation could be used for prognosis and prevention of breast cancer disease.

Keywords: breast cancer, Stromal Cell-derived Factor 1- α (SDF-1 α /CXCL12), epigenetics, DNA methylation, ER α

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. O CÂNCER.....	15
1.1.2. A Mama Normal.....	15
1.2. CÂNCER DE MAMA.....	17
1.2.1. Tipos de Câncer de Mama.....	17
1.2.2. Fatores de Risco.....	18
1.2.3. Sinais Clínicos.....	21
1.2.4. Prognóstico.....	21
1.2.5. Diagnóstico.....	22
1.3. MARCADORES MOLECULARES NO CÂNCER DE MAMA.....	22
1.3.1. <i>ERBB2</i>	23
1.3.2. <i>ESR1</i> (gene do receptor de estrógeno).....	23
1.3.3. <i>PGR</i> (receptor de progesterona).....	26
1.4. MECANISMOS MOLECULARES DO CÂNCER.....	26
1.5. EPIGENÉTICA.....	28
1.5.1. Modificações covalentes das histonas.....	28
1.5.2. Metilação do DNA.....	30
1.5.3. Metilação e câncer.....	33
1.5.4. Terapêutica anti-tumoral e metilação.....	35
1.6. QUIMIOCINAS.....	36
1.6.1. As quimiocinas e sua classificação.....	36
1.6.3. Características estruturais das quimiocinas.....	39
1.6.4. Interação receptor-ligante e a sinalização intracelular.....	41
1.7. PRINCIPAIS FUNÇÕES.....	42
1.7.1. Quimiocinas e funções.....	43
1.7.2. <i>CXCL12</i> ou <i>SDF1α</i>	45
1.8. JUSTIFICATIVA.....	47
2. OBJETIVOS	48
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	48
2.1.2. Objetivos específicos.....	48
3. MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	49
3.2. CULTIVO DE CÉLULAS.....	51
3.3. AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE <i>CXCL12</i> EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA.....	51
3.3.1. Extração de RNA.....	52

3.3.2. Obtenção da primeira fita de cDNA.....	53
3.3.3. RT-PCR do gene <i>CXCL12</i>	54
3.3.4. Eletroforese em Géis de Agarose 1% e de Poliacrilamida 8%.....	54
3.3.5. Tratamento das Linhagens Tumorais com o Agente Desmetilante 5-Aza-2'-Desoxicitidina	56
3.4. CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DA ILHA DE CpG 4 DO GENE <i>CXCL12</i> EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA	56
3.4.1. Identificação das Ilhas de CpG do gene <i>CXCL12</i>	57
3.4.2. Desenho dos iniciadores.....	58
3.4.3. Extração de DNA	59
3.4.4. Tratamento de DNA com Bissulfito de Sódio.....	60
3.4.5. Reação de PCR <i>nested</i> para clonagem da Ilha de CpG 4.....	62
3.4.6. Clonagem da Ilha de CpG 4 do gene <i>CXCL12</i>	62
3.4.7. Mini-preparação de Plasmídeos.....	63
3.4.8. Reação de Sequenciamento.....	64
3.5. ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO ATRAVÉS DO MÉTODO COBRA (<i>COMBINED BISSULFITE RESTRICTION ANALYSIS</i>).....	65
3.6. ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO GENE <i>CXCL12</i> EM TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA PELA TÉCNICA DO TRATAMENTO DE DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO SEGUIDO DE PCR ESPECÍFICO PARA METILAÇÃO (MSP).....	65
3.7. Análise Estatística dos Dados.....	68
4. RESULTADOS	68
4.1. ANÁLISE <i>IN SÍLICO</i> DO GENE <i>CXCL12</i>	68
4.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>CXCL12</i> EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA	72
4.3. SEQÜENCIAMENTO DA ILHA DE CpG 4 DO GENE <i>CXCL12</i> DE LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA, ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO E SUA CORRELAÇÃO COM A EXPRESSÃO GÊNICA.....	76
4.4. ANÁLISE DA METILAÇÃO EM AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.....	86
4.4.1. <i>Methylation Specific</i> PCR (MSP).....	86
4.4.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS CORRELACIONADOS COM A METILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>CXCL12</i> PARA AS ILHAS DE CpG 2 E 4.....	94
4.4.3. CORRELAÇÃO ENTRE A HIPERMETILAÇÃO DA ILHA DE CpG 4 E A HIPERMETILAÇÃO DO GENE <i>ESR1</i> E SUAS POSSÍVEIS CONTRIBUIÇÕES AOS VALORES ESTATÍSTICOS.....	96
5. DISCUSSÃO	100
6. CONCLUSÃO	104

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
ANEXOS.....	113

SUMÁRIO TABELAS

TABELA 1 - FATORES DE RISCO DO CÂNCER DA MAMA.....	19
TABELA 2 - DADOS REFERENTES AOS VARIANTES TRANSCRICIONAIS DO <i>CXCL12</i>	45
TABELA 3 - INICIADORES PARA MSP.....	67
TABELA 4 - QUANTIFICAÇÃO DOS RNAs EXTRAÍDOS PELO ESPECTROFOTÔMETRO GENEQUANT II (<i>PHARMACIA BIOTECH</i>).....	72
TABELA 5 - QUANTIFICAÇÃO DOS DNAs EXTRAÍDOS DE LINHAGENS TUMORAIS.....	77
TABELA 6 - CORRELAÇÃO DOS GENES <i>CXCL12</i> E <i>ESR1</i> COM OS DADOS CLÍNICO- PATOLÓGICOS DOS 69 TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.....	98

SUMÁRIO FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	16
FIGURA 2 - ESQUEMA DAS PRINCIPAIS MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS.....	28
FIGURA 3 - MECANISMOS EPIGENÉTICOS IMPLICADOS NA ATIVAÇÃO OU REPRESSÃO DA TRANSCRIÇÃO EM UM PROMOTOR DE UM GENE.....	29
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO DAS FAMÍLIAS DE QUIMIOCINAS.....	37
FIGURA 5- RECEPTORES DE QUIMIOCINAS E SEUS RESPECTIVOS LIGANTES.....	38
FIGURA 6 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DAS QUIMIOCINAS.....	40
FIGURA 7 - LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>CXCL12</i> NO CROMOSSOMO.....	45
FIGURA 8 - SEQUENCIA DO FRAGMENTO DE DNA DA REGIÃO 5' TSS DO GENE <i>CXCL12</i> CONTENDO A ILHA DE CpG 4.....	59
FIGURA 9 -ILHA DE CpG 2 DO GENE <i>CXCL12</i>	66
FIGURA 10 - ANÁLISE DA ILHA DE CpG 4 DO GENE <i>CXCL12</i>	67
FIGURA 11 - RESULTADO OBTIDO PELO PROGRAMA CpGPLOT.....	69
FIGURA 12 - ANÁLISE DA REGIÃO 5'TSS DO GENE <i>CXCL12</i> E A IDENTIFICAÇÃO DE SUAS ILHAS DE CpG.....	70
FIGURA 13A - LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS ERE NA REGIÃO 5'TSS DO GENE <i>CXCL12</i>	71
FIGURA 13B - LOCALIZAÇÃO DO SÍTIO ERE NA REGIÃO 5' DA ILHA 4.....	71
FIGURA 14 - RNA TOTAL EXTRAÍDO DE LINHAGENS DE MAMA.....	72
FIGURA 15 – PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE CONSTITUTIVO <i>GAPDH</i>	73
FIGURA 16 - RT-PCR DO GENE <i>CXCL12</i> E DO GENE CONTROLE <i>GAPDH</i> EM LINHAGENS NORMAIS E TUMORAIS DE MAMA.....	74
FIGURA 17 - RE-EXPRESSÃO DO GENE <i>CXCL12</i> APÓS O TRATAMENTO DAS LINHAGENS COM O AGENTE DESMETILANTE 5-AZA-2'-DESOXICITIDINA.....	76
FIGURA 18 - DNA GENÔMICO EXTRAÍDO DAS LINHAGENS DE MAMA.....	77
FIGURA 19 - CONTROLE DA EFICIÊNCIA DO TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO - FRAGMENTO DO CONTROLE SATR-1 AMPLIFICADO POR PCR <i>NESTED</i>	78
FIGURA 20 - ILHA DE CpG 4 DO GENE <i>CXCL12</i> AMPLIFICADA POR <i>NESTED</i> -PCR....	78
FIGURA 21 - PRODUTOS DE PCR <i>NESTED</i> PURIFICADOS.....	79
FIGURA 22 - PCR DE COLÔNIA DA ILHA DE CPG 4 DO GENE <i>CXCL12</i>	79
FIGURA 23 - DNA PLASMIDIAL EXTRAÍDO DE 8 COLÔNIAS DE DH10B TRANSFORMADAS.....	80
FIGURA 24 - GRÁFICOS REPRESENTATIVOS DAS PERCENTAGENS DE METILAÇÃO DE CADA DINUCLEOTÍDEO CpG DAS LINHAGENS CELULARES.....	82
FIGURA 25 - PERFIL DE METILAÇÃO GLOBAL DAS LINHAGENS AVALIADAS PARA A ILHA DE CpG 4 DO GENE <i>CXCL12</i>	84
FIGURA 26 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS FRAGMENTOS ESPERADOS PARA A TÉCNICA DE COBRA DA ILHA DE CpG 4 DO GENE <i>CXCL12</i>	85

FIGURA 27 - COBRA DA ILHA DE CpG 4 DO GENE <i>CXCL12</i>	85
FIGURA 28 - DNAs EXTRAÍDO DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.....	87
FIGURA 29 - CONTROLE DA EFICIÊNCIA DO TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO - FRAGMENTO DA REGIÃO SATR-1 AMPLIFICADO POR <i>NESTED-PCR</i>	88
FIGURA 30 - PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA MSP REAÇÃO NÃO METILADA (U = UNMETHYLATED) NAS LINHAGENS NORMAIS E TUMORAIS.....	89
FIGURA 31 - PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA MSP REAÇÃO METILADA (M = METHYLATED) NAS LINHAGENS NORMAIS E TUMORAIS.....	90
FIGURA 32 - MSP DA REAÇÃO NÃO METILADA DA ILHA DE CpG 4 DO GENE <i>CXCL12</i> NAS AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.....	91
FIGURA 33 - MSP DO GENE <i>CXCL12</i> NAS AMOSTRAS 1 A 69 DOS TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.....	92
FIGURA 34 - SEQUENCIAMENTO DA ILHA DE CpG 4 DOS TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.....	93
FIGURA 35 - CORRELAÇÃO ENTRE A HIPERMETILAÇÃO DO GENE <i>ESR1</i> E A EXPRESSÃO DO SEU RECEPTOR POR IMUNOHISTOQUÍMICA.....	97

1. INTRODUÇÃO

1.1. O CÂNCER

O câncer corresponde à segunda causa de morte por doença no Brasil, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. Para o ano de 2020 espera-se que o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões no mundo [1]¹. Nos anos de 2008 e 2009 estimam-se cerca de 470 mil novos casos da doença em todo o mundo. A neoplasia com maior incidência na população brasileira deverá ser o câncer de pele não melanoma, com 115.010 casos novos. Em seguida, aparece o câncer de próstata, com 49.530 novos casos; o câncer de mama, com 49.400 novos casos e o câncer de pulmão, com 27.270 novos casos [2]. O câncer de mama permanece como o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o primeiro entre as mulheres sendo que seu número estimado para o ano de 2008 no Brasil foi de 48.930, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres.

1.1.2. A Mama Normal

A glândula mamária se origina a partir de uma invaginação ectodérmica embrionária, que forma um rudimento mamário, do qual se estendem ductos que colonizam a mama até a maioridade [3]. É composta por um estroma fibrogorduroso e por ductos ocos que se ramificam formando uma estrutura “arbórea” [4]. Voltada para a face luminal existe uma camada interna de células epiteliais luminiais. Ao redor delas, ocorre uma camada externa de células mioepiteliais, capazes de contrair em resposta à ocitocina, durante a lactação, e de secretar a lâmina basal que separa o parênquima mamário do estroma [3]. As células epiteliais luminiais e mioepiteliais revestem os ductos mamários e, por tal razão, são também designadas de células ductais. Em geral, grande parte dos tumores de mama são carcinomas que envolvem a linhagem epitelial luminal. O fato de a linhagem mioepitelial expressar a maioria dos genes supressores de tumor pode contribuir para que não seja facilmente transformada [5].

As células lobulares originam estruturas acinares secretórias ao final dos ductos e, durante a gravidez e a lactação, tais células são capazes de produzir as proteínas do leite [6]. A região final dos ductos que se associa à estruturas acinares

¹ As referências desta dissertação foram inseridas através do programa EndNote X1.

é designado de unidade terminal ducto-lobular (TDLU). As TDLUs são consideradas as unidades funcionais da mama [7].

Do nascimento até a puberdade, os ductos mamários crescem e se ramificam vagarosamente, sob influência das células do estroma, uma vez que, neste momento, tais células não expressam o receptor de estrógeno α (RE α).

No início da puberdade a glândula mamária sofre uma rápida proliferação e diferenciação e forma estruturas designadas de TEBs (*terminal end buds*). Os TEBs ocorrem no final dos ductos em crescimento, são altamente proliferativos e controlam o desenvolvimento e a ramificação dos ductos nesta fase. Quando os ductos estão completamente formados, os TEBs se transformam em TDLUs (ver figura 1 abaixo). Os TEBs são estruturas temporárias, formadas pelas células *cap*, consideradas células-tronco por originar células mioepiteliais e epiteliais luminais [6].

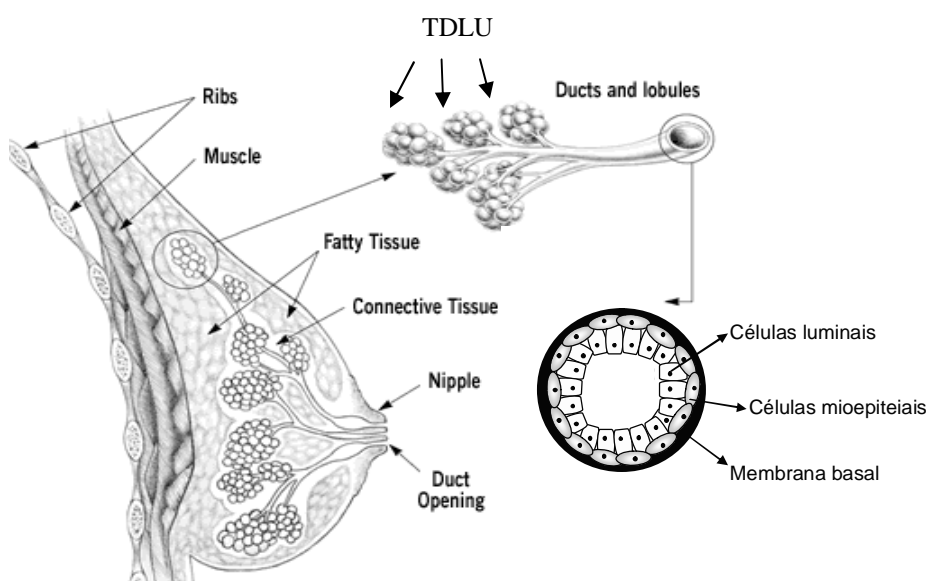


FIGURA 1: ESTRUTURA DA GLÂNDULA MAMÁRIA.

Nota: As TDLUs são compostas por células ductais e acredita-se que nestas unidades surge a maioria dos tumores de mama. O estroma é composto por tecido adiposo e fibroblastos. A mama normal é caracterizada pela presença de duas linhagens: epitelial luminal e mioepitelial.

FONTE: Adaptado de DIMRI, BAND, BAND, 2005 [8].

Os TEBs, assim como as TDLUs são as principais áreas do epitélio mamário responsivas aos hormônios [3, 7]. Além disso, supõe-se que nestas estruturas existam células-tronco que podem estar sujeitas a sofrer lesões pré-malignas e desencadear o câncer. A glândula mamária completa seu desenvolvimento na primeira gravidez, sob influência hormonal, que induz a inibição da proliferação

celular, diminuindo a expressão de *ESR1* (receptor de estrógeno) e *PGR* (receptor de progesterona) e ativando genes específicos, como os que codificam as proteínas do leite [7].

Após a fase de lactação ou amamentação ocorrem apoptose e remodelamento tecidual, de forma que a glândula mamária readquire uma morfologia semelhante à de uma mulher nulípara [7].

1.2. CÂNCER DE MAMA

A incidência desse tipo de neoplasia aumentou expressivamente nos últimos vinte anos. Isso decorre, em parte, da mudança do padrão reprodutivo feminino ocorrido nos últimos cinquenta anos; da redução da taxa de natalidade; dos hábitos alimentares da população, dentre outros [1].

Estudos prévios mostram que os fatores hormonais estão associados ao aumento do risco do câncer de mama e a ingestão tanto de anticoncepcionais orais (CO), como da terapia de reposição hormonal devem ter, sempre, a relação risco – benefício bem avaliado. Outros fatores de risco, comuns a outros tipos de câncer também estão associados ao câncer de mama como a obesidade pós – menopausa e exposição à radiação ionizante. Porém a prevenção primária deste câncer ainda não é totalmente possível, pois fatores de risco ligados à vida reprodutiva da mulher e características genéticas estão envolvidos em sua etiologia.

Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade para o câncer de mama continuam elevadas no mundo todo, muito provavelmente porque a doença ainda seja diagnosticada frequentemente em estádios avançados [1].

A progressão do câncer de mama pode ser afetada por diversos fatores expressos nas células tumorais e por fatores micro-ambientais envolvidos na sua progressão tecidual.

1.2.1. Tipos de Câncer de Mama

Os sarcomas (neoplasias de origem mesenquimal) correspondentes a menos de 1% das neoplasias malignas que comprometem as mamas, são em geral, assintomáticos, podendo atingir grandes dimensões e se originar nos tecidos conjuntivos. Habitualmente estão vinculadas à metástases via hematogênica, sendo os pulmões e os ossos os principais alvos [9].

Os carcinomas (tumores malignos de mama de origem epitelial) são classificados, quanto à sua localização e extensão, em carcinoma *in situ* e invasor e, de acordo com a origem, são classificados em ductal ou lobular [10, 11].

A principal diferença entre os carcinomas *in situ* e invasor está no fato de que o primeiro corresponde a uma proliferação epitelial maligna limitada aos ductos mamários, enquanto o último infiltra o estroma, independentemente da coexistência do componente *in situ* [9-11].

O carcinoma ductal *in situ* representa a forma inicial, não invasiva com bom prognóstico. À mamografia aparecem como microcalcificações lineares, ramificadas ou em pequenos agrupamentos heterogêneos [9-12]. Estudos apontam que aproximadamente 25 a 30% dos casos sem intervenção cirúrgica (mastectomia), que apresentam focos microscópicos deste carcinoma, podem desenvolver, em um intervalo de 15 anos, o carcinoma invasivo [13].

O carcinoma lobular *in situ* corresponde de dez a 30% dos carcinomas *in situ* e representa um fator de alto risco para o desenvolvimento do câncer invasor de mama [9, 11, 12]. Caracteriza-se pela hiperplasia lobular anormal e multicentricidade (existência de um carcinoma em um quadrante distinto daquele onde está o tumor principal). Cerca de 50% desta neoplasia se desenvolve na mama oposta à biopsiada [12].

O carcinoma ductal invasivo, correspondente a 75% dos carcinomas de mama, pode apresentar: (1) regiões de necrose, de microcalcificação, de carcinoma *in situ*; (2) estroma geralmente fibroso; (3) massa palpável endurecida, com dois a três centímetros, em média [9-12]. Em geral, cerca de dois terços dos casos já possui metástases ganglionares na ocasião do diagnóstico [12, 13].

O carcinoma lobular invasivo se origina em lóbulos, representa cerca de 10% dos casos, possui bom prognóstico e sobrevive de dez anos em 80 a 90% dos casos. Apresenta-se como uma massa palpável ou lesão mal definida e difusa, sendo, neste caso, dificilmente detectada por mamografia. Em aproximadamente 60% dos casos verifica-se associação desse carcinoma ao carcinoma lobular *in situ* [9-12].

1.2.2. Fatores de Risco

Certa proporção de pessoas pode desenvolver a moléstia quando expostas a fatores extrínsecos (fatores ambientais, hábitos de vida, radiações, agentes

químicos, tabagismo, alcoolismo entre outros) ou intrínsecos (fatores genéticos). Estes fatores são capazes de danificar a molécula de DNA das células, e se o sistema de reparo estiver comprometido, este dano persistirá [1, 13].

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama estão listados na tabela 1 que segue e descritos logo abaixo:

TABELA 1 - FATORES DE RISCO DO CÂNCER DA MAMA.

Risco Relativo	Fatores de Risco
Risco elevado (risco relativo 4 vezes maior)	Idade superior a 50 anos; história familiar: antecedentes familiares de primeiro grau e história de câncer na pré-menopausa; doenças genéticas: síndrome de Li-Fraumeni (mutações do gene <i>TP53</i> em células germinativas) e hiperplasia atípica.
Risco moderadamente elevado (risco relativo 2 a 4 vezes maior)	Qualquer antecedente familiar de câncer de mama; estimulação estrogênica prolongada: menopausa tardia (depois dos 55 anos), primeira gestação tardia (após 30 anos); história pessoal de câncer do ovário ou do endométrio; exposição à radiação ionizante e hiperplasia ductal sem atipia.
Risco baixo (risco relativo 1 a 2 vezes maior)	Menarca antes dos 12 anos; reposição hormonal na menopausa; contraceptivos hormonais; ingestão de álcool; dieta rica em gordura na adolescência e história de doença benigna da mama.

FONTE: INCA [1] e adaptado de PAGE *et al.*, 2000 [13].

A menarca precoce (antes dos doze anos) tem sido associada a um aumento de dez a 20% no risco de desenvolver câncer de mama, provavelmente em função do início precoce do ciclo menstrual, que aumenta o tempo de exposição do epitélio mamário ao estrógeno e à progesterona [2, 13]. Da mesma forma, com a menopausa tardia (última menstruação após os 54 anos) há um consequente aumento no número de ciclos ovulatórios [9, 14]. Após a menopausa os níveis de hormônios ovarianos caem, reduzindo a proliferação das células mamárias e, consequentemente, diminuindo a probabilidade destas serem transformadas por agentes carcinogênicos [14].

Mulheres que tiveram a primeira gestação tardia (após os 30 anos) ou as que não tiveram filhos (nulíparas) possuem risco duplicado em relação à mulher que

engravida mais vezes. Mulheres que engravidam pela primeira vez após os 35 anos apresentam um risco maior do que as nulíparas [14, 15].

A administração de hormônios exógenos após a menopausa também eleva o risco, assim como a terapia de reposição hormonal (HRT). Acima de cinco, dez ou 15 anos de reposição aumenta para duas, seis e 12 vezes o número de casos para cada mil mulheres, respectivamente. O uso apenas de estrógeno aumenta aproximadamente 2,2% o risco, por ano de uso [14]. A terapia combinada com estrógeno e progesterona aumenta para 30% o risco após cinco anos de uso [5, 15].

O uso de contraceptivos orais (COs) aumenta em 24% o risco de câncer, mas esse risco diminui quando o uso é descontinuado, de maneira que, após dez anos não existe um risco excessivo de desenvolver câncer de mama. Ressalta-se, no entanto, que o uso de COs por mulheres jovens, especialmente com menos de 20 anos, acarreta um aumento maior do risco do que mulheres mais velhas [14].

O consumo de álcool também eleva o risco do câncer de mama. O acetaldeído, resultante do metabolismo do álcool, é um carcinógeno que pode promover o desenvolvimento do tumor [14]. Além disso, o álcool estimula uma série de alterações, tais como o aumento à exposição de andrógenos endógenos, aumento dos níveis de estrógenos na pré e pós-menopausa, deficiências nutricionais, produção de espécies oxigênio reativas (EROS) que podem explicar o aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama [1, 14]. Mulheres na pós-menopausa, que consomem bastante álcool e possuem uma dieta pobre em folato têm risco aumentado de desenvolver tumores receptor de estrógeno negativos (RE-). O folato parece ter efeito protetivo em mulheres usuárias de álcool [16, 17].

A dieta também pode ter efeito protetivo ou pode promover o desenvolvimento do câncer. O consumo de carne bem passada tem sido associada ao aumento do risco, provavelmente em função da produção de aminas aromáticas heterocíclicas (HAAs). Os ácidos graxos insaturados ou uma dieta rica em vegetais e frutas ricos em antioxidantes, reduzem o risco [7]. A obesidade pós-menopausa aumenta o risco de câncer de mama. Isto pode decorrer do fato de que o tecido adiposo é fonte de estrógenos [14].

A atividade física possui efeito protetivo, reduzindo para 3% o risco em adolescentes para cada hora de atividade física que realizam. Isto acontece em função da atividade física adiar o início da menarca e alterar os níveis de hormônios bio-disponíveis [1, 14].

A história familiar, os altos níveis de prolactina, exposição à radiação, idade avançada, mutações nos genes *BRCA* e *TP53*², dentre outros, também aumentam o risco de desenvolvimento de câncer de mama [11].

1.2.3 Sinais Clínicos

Alguns dos sintomas verificados no câncer de mama incluem: (1) nódulo palpável na mama e/ou nas axilas; (2) secreção mamilar; (3) deformidades no formato da mama por retrações da pele; (3) alterações da coloração, superfície ou textura da pele da mama ou do mamilo; (4) mudança do tamanho ou do formato do seio; dentre outros [10].

1.2.4. Prognóstico

O acometimento dos linfonodos axilares, o tamanho do tumor, o tipo histológico, o grau histológico, o grau nuclear, os níveis de progesterona e estrógeno, a velocidade de proliferação tumoral e a competência imunológica do portador da doença constituem os principais parâmetros empregados para a determinação do prognóstico do câncer de mama [9, 11, 12].

A constatação de linfonodos axilares afetados ratifica o potencial de metastatização do tumor. A dimensão do tumor está associada, em geral, à sobrevida dos pacientes e ao nível de comprometimento axilar. Certos tipos histológicos fornecem um prognóstico favorável, como os carcinomas tubulares, colóides e papilares, ou o oposto, como o carcinoma inflamatório, considerados o tipo histológico de pior prognóstico. A partir da análise da diferenciação histológica do tumor em relação às células mamárias normais, os tumores foram divididos em grau I, bem diferenciados; grau II, moderadamente diferenciado e grau III, indiferenciado, sendo que quanto mais diferenciado, melhor o prognóstico. Tumores com receptores hormonais positivos (estrógeno e progesterona) são geralmente mais diferenciados e apresentam um melhor prognóstico. Os tumores com elevados níveis de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) são geralmente associados a uma melhor taxa de sobrevida e é um indício de que o alvo principal de metástases são os ossos; enquanto que níveis reduzidos destes receptores estão vinculados a menor sobrevida e a maior ocorrência de metástases hepáticas e

² Os genes estão citados de acordo com a nomenclatura internacional oficial. Disponível no endereço: www.genename.org/cgi-bin/hgnc_search.pl

cerebrais. A ocorrência de necrose tumoral está atrelada a tumores mais hostis e a um pior prognóstico [9, 12].

1.2.5. Diagnóstico

A avaliação adequada do câncer é fundamental para o planejamento do tratamento apropriado e para a determinação do prognóstico. Para tanto, faz-se necessário ponderar os riscos e definir os exames necessários [9].

O diagnóstico precoce do câncer de mama é fundamental para o sucesso do tratamento e a cura da doença. Quando o tumor é detectado em estádios iniciais a taxa de cura da doença é superior a 90%. No Brasil, aproximadamente 70% dos casos de câncer de mama ainda são diagnosticados tardiamente [10]. Exames de detecção precoce (como a mamografia e o auto-exame mensal das mamas) permitem avistar a doença em seus estágios iniciais, favorecendo o tratamento. Para confirmação do diagnóstico, deve-se efetuar outros exames e testes, incluindo a biópsia. Através desta técnica, determina-se o tipo específico de câncer, e, por conseguinte, os exames específicos [9].

Na atualidade, os métodos de detecção comumente usados incluem o auto-exame das mamas, a mamografia e o ultra-som. A mamografia de alta resolução (MAR) é apontada como o principal método diagnóstico do câncer de mama em estágio inicial, capaz de detectar alterações ainda não palpáveis, favorecendo, assim, o tratamento precoce, mais efetivo, menos agressivo, com melhores resultados estéticos e eventos adversos reduzidos. Recomenda-se a mamografia anual para mulheres acima de 40 anos [10]. O ultra-som apresenta baixa especificidade e altos índices de falsos positivos e de falsos negativos. É um exame que complementa a mamografia, auxiliando na caracterização dos tumores sólidos e císticos, sendo também empregada para guiar punções citológicas ou histológicas [9, 10]. A prática de auto-exame é conveniente, pois cerca de 90% das patologias mamárias são detectadas nas fases iniciais pelas próprias pacientes [1].

1.3. MARCADORES MOLECULARES NO CÂNCER DE MAMA

No câncer de mama, dentre os principais marcadores moleculares estão o oncogene *ERBB2* e os genes dos receptores de hormônios esteróides (receptor de estrógeno e receptor de progesterona).

1.3.1. *ERBB2*

O gene *ERBB2*, localizado na região 17q21, produz a proteína denominada de HER2/neu ou p185^{erb} e é super expresso em aproximadamente 20% a 25% dos carcinomas ductais de mama (podendo chegar a 40% em pacientes com linfonodo positivo). Esse oncogene codifica uma glicoproteína transmembrana contendo 185 kDa semelhante ao receptor do fator de crescimento epidérmico e possui atividade tirosina-quinase em sua porção carboxi-terminal [18]. Em geral, mulheres com carcinoma invasivo HER2 positivo possuem uma doença mais agressiva, com uma probabilidade maior de reincidência, um pior prognóstico e uma sobrevida menor, quando comparadas com as mulheres HER2 negativo [18, 19].

Em 1992, foi desenvolvido o anticorpo monoclonal Herceptin, também designado de trastuzumab, que se liga com grande afinidade ao domínio extracelular do HER-2, impedindo a sinalização de crescimento desencadeada pelo HER-2. O tratamento apenas com Herceptin produziu resposta anti-tumoral em 15-20% das pacientes com metástase de carcinoma de mama e, em associação à outros quimioterápicos (doxorrubicina, ciclofosfamida ou paclitaxel), o Herceptin aumentou a eficácia da quimioterapia, com aumento geral da sobrevida [14, 19].

1.3.2. *ESR1* (gene do receptor de estrógeno)

O gene *ESR1* está localizado na região 6q25.1 e codifica a proteína do receptor de estrógeno (RE). Sua ação molecular é mediada por duas isoformas, a alfa (RE α) e a beta (RE β) que apresentam um alto grau de homologia de aminoácidos. A análise dos efeitos específicos mediados pelo estrógeno em camundongos para RE α e RE β , juntamente com a observação de que essas duas isoformas apresentam padrões de expressão distintos e só parcialmente sobrepostos, sugerem que esses dois receptores desempenham diferentes papéis biológicos.

O estrógeno é um conjunto de hormônios esteroidais sexual que exerce importantes funções biológicas em tecidos alvos como os órgãos reprodutivos. Entre esses tecidos, o crescimento da glândula mamária, do endométrio durante a gestação e o ciclo menstrual são dependentes de estrógeno. Além dos efeitos proliferativos em células normais, o estrógeno é considerado um estimulante para a iniciação e promoção de tumores nesses órgãos [20]. Em 1896 George Beatson já mostrava que a ooforectomia bilateral resultava em remissão de tumores de mama

inoperáveis [21]. Estudos epidemiológicos mostram que a prolongada exposição ao estrógeno como o que ocorre na menarca precoce, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal, podem ser fatores de risco de câncer de mama e útero [17, 19]. A estimulação da proliferação celular mediada pela exposição prolongada aos estrógenos aumenta a probabilidade de erros espontâneos na replicação do DNA. O crescimento estimulado pelos estrógenos em células normais ou tumorais requer a presença de seus receptores. Tem sido demonstrado que aproximadamente 2/3 dos tumores de mama humanos expressam altas concentrações de REs quando comparadas com tecido normal (Early Breast Câncer Trialists' Collaborative Group 1998). O status de expressão de RE é relacionado a uma variedade de características histológicas no câncer de mama. A maioria dos tumores de baixo grau histológico são RE positivo, mas, por outro lado, tumores que apresentam evidência histológica de pouca diferenciação celular são geralmente RE negativo [22]. Tumores que apresentam pouca ou nenhuma expressão de RE tem os fenótipos mais agressivos. Existem 2 subtipos de receptores de estrógeno, RE α e RE β que pertencem à superfamília de receptores nucleares, estrutura e modo de ação similares [23]. A ligação do estrógeno envolve ativação mediada pelo ligante a receptores nucleares RE α e RE β , os quais interagem diretamente como elementos de resposta ao estrógeno (ERE) na região promotora e ou ativadora dos genes alvo e recrutam vários co-ativadores para mediar a regulação transcricional [24]. A regulação do RE não é limitada à ligação direta do seu ligante. Ela pode ser influenciada por uma série de outros fatores que incluem o fator de crescimento epidermal (EGF) e o fator 1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), vias mitogênicas e segundos mensageiros cíclicos como AMP e também a dopamina [24].

Clinicamente, a terapia endócrina com drogas anti-estrógenos ou inibidores da aromatase são utilizados nos casos em que os tumores apresentam RE positivo (70% dos casos de câncer de mama)[25]. Resumidamente existem três maneiras pelas quais os processos dependentes de estrógeno podem ser interrompidos: o primeiro método interfere com a ligação do estrógeno ao seu receptor RE ou em promotores dos genes que ele regula. Moduladores seletivos de RE como tamoxifen e raloxifeno atuam desta maneira. O segundo método é reduzir ou eliminar a expressão de RE. Isso é exemplificado pelo fulvestrant, que atua diminuindo a

expressão do gene *ERS1*. E o terceiro método reduz a quantidade de estrógeno interferindo na sua produção, seja pela retirada dos ovários nas mulheres na pré-menopausa ou seja pela utilização de inibidores da aromatase (sistema de enzimas que convertem em diversos pontos como a testosterona ou o DHEA em 17 β estradiol) [25]. Especificamente o anti-estrógeno tamoxifen liga-se ao receptor tornando-o não funcional, enquanto os inibidores de aromatase (como o anastrozol e letrozol por exemplo) reduzem os níveis de estrógenos. A maioria dos tumores RE positivo são inicialmente responsivos ao tamoxifen e quando os pacientes tornam-se resistentes a esta droga, utiliza-se os inibidores de aromatase. Entretanto existem pacientes que tornam-se resistentes a essas duas abordagens de tratamento [23, 25].

Os inibidores da aromatase interferem na habilidade do organismo em produzir estrógenos a partir de andrógenos suprimindo a atividade da enzima aromatase. Antes da menopausa a aromatase ovariana é responsável pela maioria do estrógeno circulante e seletivamente sensível a mudanças nos níveis de hormônio luteinizante [25]. Depois da menopausa, a aromatase presente no tecido gorduroso e músculos são responsáveis pela maioria do estrógeno circulante. A aromatase é altamente sensível ao estrógeno nos tecidos, tais como mama, útero, vagina, ossos, cérebro, coração e vasos sanguíneos que produzem esse hormônio de modo autócrino. O promotor do gene da aromatase na mama é menos sensível do que o promotor desse gene nos ovários e às flutuações dos níveis de hormônio luteinizante, mas mais sensível ao aumento de citocinas inflamatórias [25].

Os mecanismos que envolvem a resistência hormonal no câncer de mama são complexos e ainda pouco compreendidos. Infelizmente os tumores de mama RE negativos são extremamente agressivos e o mecanismo para isso ainda é desconhecido. Um dos motivos propostos para a agressividade desses tumores está relacionada com a protease catépsina D que estaria envolvida na inativação de RE [26]. Existem evidências de sinalização cruzada entre vários fatores de crescimento especialmente o receptor do fator de crescimento epidermal /HER2 [27].

1.3.3. *PGR* (receptor de progesterona)

O gene receptor de progesterona (*PGR*) está localizado na região 11q22 e codifica a proteína do receptor de progesterona (RP) e é importante para o desenvolvimento da glândula mamária e do aparelho reprodutor feminino. Este

receptor possui duas isoformas, RPA e RPB sendo ambas o resultado da transcrição alternativa entre 2 promotores de iniciação e tradução a partir de códons AUG diferentes. Estruturalmente, RPB difere de RPA somente porque B possui 165 amino ácidos a mais na região N-terminal [28] e funcionalmente quanto à atividade biológica. Estudos tem revelado, que em casos de tumores com prognóstico ruim a razão entre RPA e RPB é alterada com predominância de RPA e perda de RPB nesses tumores [28].

O RPA é o principal ativador transcricional da isoforma RPB [29]. O receptor de progesterona promove a proliferação celular e pode ser expresso tanto em tecidos normais quanto em neoplásicos [30]. Normalmente, em tecidos normais, as células expressam as duas isoformas em níveis equivalentes; enquanto que, em tumores, predomina a expressão de uma isoforma, geralmente a RPA [31]. A perda de expressão deste receptor e do RE constitui um potencial mecanismo de resistência à terapia hormonal e, em ambos os casos, a hipermetilação do promotor desses genes tem papel importante neste contexto [30].

Análises recentes em mais de 44000 pacientes tem demonstrado que tumores de mama ER α positivo/receptor de progesterona (RP) negativo e ER α /PR positivo são clínica e biologicamente subgrupos distintos [32]. Os autores criaram a hipótese de que a negatividade de RP pode refletir em uma interação direta entre a expressão de RP e a sinalização elevada por fatores de crescimento até mais do que a perda de funcionalidade de ER α .

O gene do RP possui uma ilha de CpG no primeiro exon, e a metilação dessa região tem sido demonstrada em 40% dos tumores de mama com ausência deste receptor e em linhagens tumorais RP negativo [31, 33]. Dados recentes mostraram que tanto RE quanto RP podem revelar à contribuições importantes na definição de tumores mais ou menos responsivos dividindo-os em subgrupos. A negatividade de ambos pode ocorrer por hipermetilação do DNA e a maioria dos tumores apresentam metilação de RP [31].

1.4. MECANISMOS MOLECULARES DO CÂNCER

O câncer é caracterizado por uma sucessão de alterações em vários genes. As primeiras etapas - iniciação e promoção - são decisivas para o estabelecimento da doença e incluem modificações em genes atrelados à regulação do ciclo celular.

Ao se multiplicar, cada alteração é transmitida ao grupo de células descendentes, determinando um crescimento clonal, de maneira que, em um dado momento, têm-se uma população de células alteradas, as quais escapam ao controle que regula a proliferação celular e começam a invadir tecidos e órgãos vizinhos, conferindo o caráter de progressão da doença maligna [34, 35].

Segundo Hanahan e Weinberg [36], existem seis alterações celulares comuns à maioria, ou até mesmo, a todos os tipos de câncer, a saber:

- Auto-suficiência em fatores de crescimento: as células tumorais são capazes de sintetizar fatores de crescimento próprios, e, desta maneira, escapam do controle do organismo;
- Insensibilidade a fatores inibitórios de crescimento: os mecanismos que impedem a multiplicação celular podem ser evitados pela síntese de moléculas promotoras da divisão celular, e também, pela hiperexpressão de oncogenes;
- Evasão a apoptose: em alguns tumores a hiperexpressão do oncogene *BAD* (mais conhecido como BCL-2 um elemento anti-apoptótico) e a inativação do *TP53* (p53) são estratégias que permitem o escape do processo fisiológico da apoptose;
- Potencial replicativo ilimitado: algumas células conseguem se multiplicar infinitamente, tornando-se “imortais”. Essa imortalização é verificada na maioria dos tumores e, pode decorrer, por exemplo, da expressão da enzima telomerase;
- Angiogênese sustentada: o tumor é capaz de promover a formação de novos vasos sanguíneos para obtenção de oxigênio e nutrientes;
- Invasão tecidual/metástase: alguns estudos apontam às moléculas de adesão intercelular e as proteases como os principais elementos envolvidos no processo de desagregação da massa tumoral e migração para outros tecidos, via circulação sanguínea.

Embora estejam disponíveis variadas técnicas de diagnóstico, um tumor sólido é clinicamente detectável quando possui cerca de 1g (a menor massa detectável), o que corresponde a uma população de células em torno de 10^9 [37]. Esse tumor já completou uma parte importante do seu ciclo vital, este é um grande impedimento no tratamento do câncer e mostra a necessidade do desenvolvimento de marcadores moleculares para diagnósticos visando detectar o câncer precocemente.

1.5. EPIGENÉTICA

O termo epigenética foi introduzido na década de 1940 por Conrad e Waddington e inicialmente foi definido como o processo no qual a informação genética de um organismo interage com o ambiente, definindo seu fenótipo [38].

Atualmente, a epigenética é caracterizada como um fenômeno que envolve a alteração herdável da expressão gênica que não implica uma alteração da seqüência de nucleotídeos e sim, uma modificação da conformação do DNA [39]. A herança epigenética envolve a transmissão (de uma célula à célula-filha ou de geração a geração) da informação não codificada pela seqüência de DNA [40].

Dois principais mecanismos (figura 2) que acarretam a alteração da estrutura tridimensional da molécula de DNA compreendem a modificação covalente do DNA e/ou das histonas [39, 41]

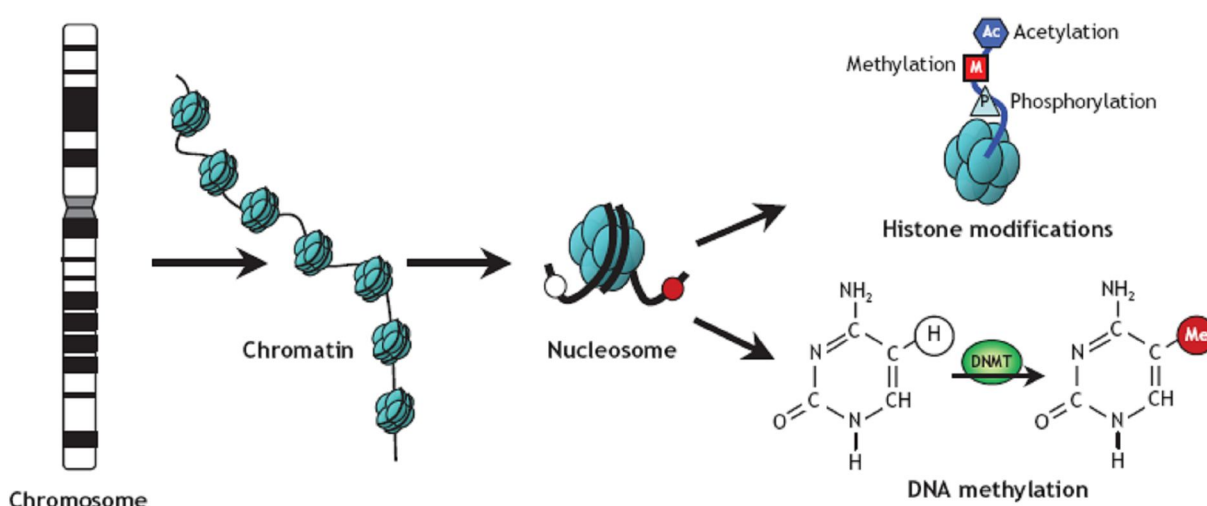


FIGURA 2 - ESQUEMA DAS PRINCIPAIS MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS.

Nota: Em eucariotos, 146 pb de DNA genômico envolvem um octâmero de histonas (composto de duas cópias das histonas H2A, H2B, H3 e H4) para formar a unidade básica da cromatina, os nucleossomos. A cromatina, por sua vez, é condensada para formar uma estrutura ainda mais compacta, o cromossomo. As modificações epigenéticas, embora herdáveis, são reversíveis, podem ocorrer ao nível de DNA e/ou de histonas e afetam a organização da cromatina, bem como a expressão de genes.

FONTE: RODENHISER; MANN, 2006 [42].

1.5.1. Modificações covalentes das histonas

As modificações pós-traducionais das histonas incluem a acetilação, metilação, fosforilação, poli-ADP ribosilação, ubiquitinação, entre outros. Tais alterações covalentes ocorrem nas extremidades amino-terminais destas proteínas que emergem dos nucleossomos. Uma vez que as histonas são modificadas, estas são reconhecidas por complexos de remodelamento de cromatina que, então, as

modificam, tornando-a acessível ou não aos fatores de transcrição (figura 3) [43].

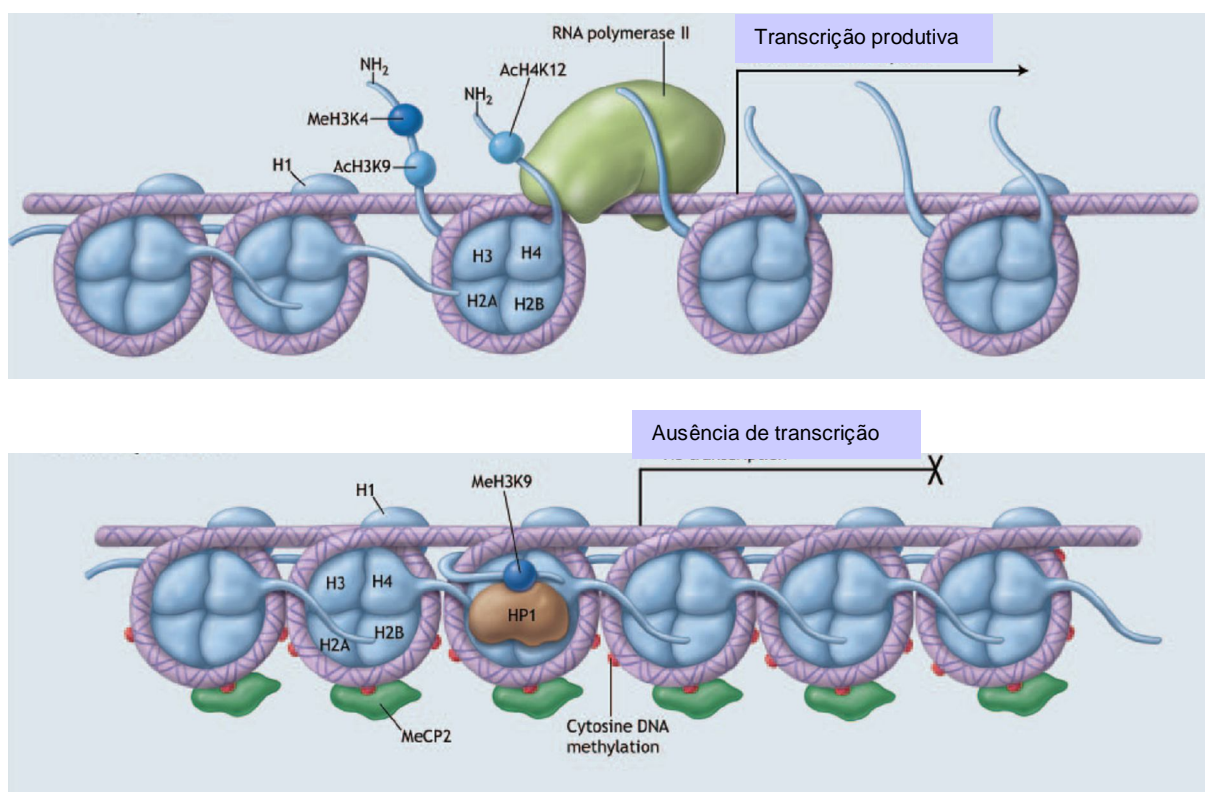


Figura 3: MECANISMOS EPIGENÉTICOS IMPLICADOS NA ATIVAÇÃO OU REPRESSÃO DA TRANSCRIÇÃO EM UM PROMOTOR DE UM GENE.

Legenda: A figura de cima mostra o DNA desmetilado (ausência de bolinhas vermelhas), e as modificações pós-traducionais das histonas que são histona H3 com a lisina metilada (MeH3K4), histona H3 com a lisina 9 acetilada (AcH3K9) e histona 4 com a lisina 12 acetilada (AcH4K12). Essas modificações proporcionam uma estrutura conformacional acessível para a RNA polimerase II e consequente transcrição ativa. A figura abaixo mostra a metilação do DNA (bolinhas vermelhas) interagindo com as proteínas MeCP2, ausências das modificações das histonas da figura acima e metilação da histona 3 na lisina 9. Essas alterações promovem a compactação da cromatina e ausência de transcrição.

Fonte: Matouk e Marsden, 2008 [43].

Dentre os processos de modificação das histonas o melhor caracterizado é o de acetilação/desacetilação, o qual é regulado pelas enzimas acetiltransferases (HATs) e desacetilases (HDACs). As HATs catalisam a adição do grupo acetil da molécula doadora acetil-coenzima A (acetil-CoA) aos resíduos de lisina das histonas, o que neutraliza a carga positiva das extremidades destas proteínas, enfraquecendo as interações eletrostáticas entre os nucleossomos, bem como entre as histonas e o DNA [41, 44, 45]. Dessa forma, a cromatina adota uma configuração mais aberta e, conseqüentemente, torna-se acessível à maquinaria de transcrição celular [41]. Embora a acetilação das histonas promova uma descondensação parcial dos domínios cromossômicos, tal configuração apenas denota uma região

transcricionalmente competente, sem estar, necessariamente, correlacionada com a ativação da transcrição *per se* [46]. As HDACs, por sua vez, desacetilam as histonas que, então, ligam-se fortemente ao DNA, tornando a cromatina condensada e transcricionalmente repressiva [39, 44]. Em função de sua ação, as HATs são consideradas co-ativadoras da transcrição, enquanto as HDACs são consideradas co-repressoras da transcrição [47].

Tem sido colocado como hipótese a existência de um complexo “código das histonas”, o qual pressupõe que a modificação de um resíduo de sua extremidade amino-terminal afeta as modificações subseqüentes na mesma proteína ou em histonas próximas, determinando o que se denomina de cooperatividade de modificações. A fosforilação da H3-S10, por exemplo, concomitante à acetilação da H3-K-14, impede a metilação da H3-K9 [44].

1.5.2. Modificação do DNA: metilação

A metilação do DNA envolve a adição covalente do grupo metil (CH_3), que advém do doador S-adenosilmetionina, ao carbono 5' da citosina, formando a quinta base do DNA humano, a 5-metilcitosina, identificada em 1948 [15]. As citosinas metiladas correspondem a 0,75-1% do total de bases do DNA [48].

Em geral, as citosinas adjacentes a uma guanina (no contexto 5' CG 3'), portanto, pertencentes aos dinucleotídeos CpGs (a letra *p* entre as bases C e G denota o grupo fosfato), são passíveis de serem metiladas [49]. A maioria dos dinucleotídeos CpGs foram progressivamente eliminados do genoma de eucariotos superiores durante a evolução em função do processo de deaminação espontânea que converte citosinas metiladas em timina [15, 50]. Grande parte dos dinucleotídeos CpGs remanescentes (cerca de 70% a 90%), que não estão presentes em ilhas de CpGs, encontram-se metilados no homem e na maioria dos vertebrados [15, 50, 51]. Os dinucleotídeos são encontrados em maiores concentrações nas ilhas de CpG, as quais estão geralmente presentes na região 5'UTR dos genes, especialmente no promotor e no primeiro exon. As ilhas são regiões com cerca de 1 kb de tamanho, que ocorrem em média a cada 100 kb e possuem frequência de dinucleotídeos CpG aproximadamente 10 vezes maior que o restante do genoma. Estas possuem uma razão de CpG para GpC de pelo menos 60% e ocorrem em mais da metade dos genes em humanos [15, 49, 50].

Tem sido proposto duas hipóteses para o papel evolucionário da metilação.

Em primeiro lugar, em virtude da quantidade de genes e o aumento da complexidade biológica dos organismos ao longo da evolução, a eficiência do controle transcricional teve que ser aprimorada. Ou seja, um possível mecanismo adicional deste controle seria desempenhado pela metilação do DNA, que, permitiria aos vertebrados acumular e utilizar genes extras importantes para seu desenvolvimento [49]. A outra teoria admite que a metilação poderia silenciar elementos genéticos parasíticos, como o genoma de vírus; e móveis, como os transposons, atuando como um mecanismo de defesa celular contra DNAs estranhos [15]. A metilação é catalisada por um grupo de enzimas, denominadas de DNA metilases, ou DNA metiltransferases (DNMTs). Dentre elas citam-se: DNMT1, DNMT2 e DNMT3, com suas isoformas. A DNMT1 reconhece preferencialmente substratos de DNA que se apresentam metilados em apenas uma fita (o que se denomina de DNA hemi-metilado), possibilitando que, durante a replicação, ocorra a propagação do padrão de metilação às fitas recém sintetizadas [49, 52]. Assim, esta enzima garante a manutenção da metilação pós-replicação por produzir dinucleotídeos CpGs simetricamente metilados na dupla fita de DNA [51, 53].

A DNMT2 possui um domínio catalítico sem atividade de DNMT em humano e, conseqüentemente, não apresenta capacidade de metilação [33, 54].

A DNMT3a e DNMT3b metilam com igual eficiência o DNA hemi-metilado e não metilado, *in vitro* e *in vivo*, são altamente expressos em células tronco-embrionárias e, são encontrados em níveis relativamente baixos nos tecidos somáticos adultos [33, 54].

Estas enzimas atuam no processo de metilação *de novo*, adicionando grupos metil em locais do DNA em que não existe metilação, mesmo na fita oposta [55]. O padrão de metilação resultante da ação da DNMT3 é estabelecido durante a embriogênese [47].

Nem todas as regiões do genoma são igualmente acessíveis às DNMTs. A DNMT3b, por exemplo, parece metilar preferencialmente regiões de cromatina inativa, como as seqüências presentes na região pericentromérica e as ilhas de CpG do cromossomo X inativo. Provavelmente, para assegurar uma eficiente metilação global do genoma são necessárias alterações da estrutura da cromatina para que as DNMTs possam ter acesso ao DNA [49].

Ao contrário das DNMTs, as desmetilases atuam ativamente promovendo a desmetilação do DNA. A 5-metilcitosina glicosilase, por exemplo, remove a citosina

metilada do DNA e, através do mecanismo de reparo do DNA o resíduo de citosina não metilado é novamente adicionado [56].

A metilação do DNA está vinculada ao mecanismo de silenciamento gênico. Geralmente, nas células normais, os dinucleotídeos CpGs presentes nas ilhas de CpG são desmetilados e a maioria da metilação ocorre nos dinucleotídeos presentes em DNA não-codificante [15]. Exceções a esta regra envolvem os genes presentes no cromossomo X inativo das mulheres, que possuem as ilhas de CpG metilados; e em genes imprintados, em que apenas o alelo materno ou paterno é expresso [49, 54, 57]. A metilação da citosina pode afetar a expressão dos genes por impedir estericamente a ligação de fatores de transcrição a seus sítios de reconhecimento presentes na região reguladora de seus respectivos genes. Por exemplo, a metilação inibe a ligação dos fatores de transcrição AP-2, *myc*, E2F e NF- κ B, que reconhecem sequências que apresentam dinucleotídeos CpGs. A inativação gênica também pode decorrer do recrutamento de complexos contendo repressores transcricionais e HDACs ao DNA metilado [55]. A MeCP2, por exemplo, possui um domínio de interação com as citosinas metiladas e também se associa com o co-repressor transcricional Sin3, o qual pode se ligar diretamente às HDACs 1 e 2 [54]. Tem sido verificado, inclusive, que as DNMTs podem suprimir a atividade transcricional dos genes por recrutar diretamente histonas desacetilases [47].

Os padrões de metilação são estabelecidos nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário pelas metilases *de novo* DNMT3a e DNMT3b e são copiados nas células somáticas pela DNMT1 de manutenção [33, 49]. Após ocorrer a fertilização, inicia-se uma onda de desmetilação durante a clivagem, seguido pela metilação *de novo* do genoma principalmente após a implantação do blastocisto e, esse processo pode continuar lentamente durante o restante do desenvolvimento [58]. Acredita-se que esse processo de desmetilação-remetilação converte os padrões de metilação específicos dos gametas para os específicos de tecidos somáticos [49]. Assim, com a diferenciação do embrioblasto, genes tecidos específicos são desmetilados de maneira tecido-específica, enquanto os genes constitutivos permanecem desmetilados [33, 59].

1.5.3. Metilação e câncer

Acredita-se que os mecanismos epigenéticos são importantes para a iniciação da tumorigênese e a manutenção do estado alterado das células tumorais

[44]. Embora o padrão de metilação seja estabelecido durante o desenvolvimento embrionário e seja mantido durante a vida do indivíduo, sabe-se que a idade, bem como a dieta, podem modificar esse padrão, comprometendo o controle normal da expressão dos genes e levando à instabilidade genética [44]. Uma dieta pobre em folato, por exemplo, tem sido associada à indução de câncer de fígado vinculado à hipometilação genômica e aumento da expressão de oncogenes, como o *KRAS* e *MYC* [58, 60].

A neoplasia é epigeneticamente caracterizada pela desmetilação global do DNA, com hipermetilação localizada de genes específicos, que acarretam, respectivamente, a instabilidade cromossômica e a inativação transcricional gênica, contribuindo com a progressão do câncer ou com o aumento da frequência de tumores [44, 51, 57, 61].

A avaliação do nível total de 5-metilcitosina após análise por Southern Blotting do DNA tumoral digerido com enzimas sensíveis à metilação forneceu a primeira evidência de que o genoma das células neoplásicas encontra-se hipometilado em relação às células normais [62]. Isto é válido especialmente para tumores sólidos, como é o caso do câncer colorretal, que apresenta redução de dez a 30% do conteúdo de 5-metilcitosina e no câncer de mama, no qual a hipometilação foi mais evidente, pois neste se observa uma redução superior a 50% [51].

Muitos dos efeitos globais da desmetilação decorrem da ativação de elementos transponíveis, normalmente silenciados, e de seqüências retrovirais presentes no genoma humano. A reativação de promotores associados a esses elementos poderiam globalmente afetar a transcrição e modificar a expressão gênica [51]. Além disso, a presença de transposons não metilados poderiam contribuir para a ocorrência de mutações genômicas e recombinações cromossômicas anômalas [51]. A expressão bialélica de genes imprintados resultante da hipometilação também pode favorecer o desenvolvimento de tumores [51, 63]. A LOI (*loss of imprinting*) do gene IGF-2 (fator de crescimento tipo insulina-2), por exemplo, torna os indivíduos mais susceptíveis ao desenvolvimento do câncer colorretal [51].

A partir da metade da década de 80, a relação entre a hipermetilação e o câncer adquiriu destaque. O silenciamento gênico decorrente da metilação aberrante foi demonstrado em 1986 com a calcitonina, a qual é um marcador para o câncer de pulmão de pequenas células [64].

Em virtude de a metilação poder acarretar a inativação gênica, a hipótese

two-hight-hit de Knudson (1971) foi reavaliada. Essa teoria admite que, somente quando os dois alelos do gene supressor de tumor estiverem inativados é que se verifica uma consequência fenotípica devido à perda de função deste gene. Em princípio, considerava-se que somente eventos genéticos, como a mutação ou a deleção, inativariam os dois alelos, mas, atualmente admite-se que um gene supressor de tumor pode ser inativado por uma combinação de modificações genéticas e epigenéticas. Assim, a mutação em um alelo concomitante à hipermetilação do outro pode acarretar a inativação do gene [48, 57].

O silenciamento epigenético pode predispor a eventos mutacionais durante a progressão do câncer, por exemplo, através da inativação de genes de reparo do DNA. O gene de reparo *MHL1* é freqüentemente hipermetilado em tumores que possuem instabilidade de microssatélite, como o coloretal [57]. O gene de reparo *MGMT* também é silenciado por hipermetilação em tumores, como o de cólon, pulmão, linfóide, entre outros [57, 61].

A hipermetilação pode também silenciar genes supressores de tumor, como o gene *VHL* (Von Hippel-Lindau), no carcinoma de rim [54, 65] *Rb*, no retinoblastoma *APC*, no carcinoma coloretal [54], etc.

Entre os diferentes tipos de câncer constata-se uma variação dos níveis de metilação dos genes, como é o caso do *GSTP1* que se encontra metilado em 90% dos tumores de próstata, mas é amplamente desmetilado na leucemia mielóide aguda [66].

Existem alguns modelos propostos para explicar a via da metilação *de novo* no promotor de genes supressores de tumor. Em células precursoras de câncer, a perda de fatores de transcrição ou a super-expressão de repressores transcricionais poderiam alterar a configuração da cromatina ao redor da região promotora, predispondo à inativação do promotor. Nas duas situações, a metilação é considerada um evento secundário. Outra hipótese, ao contrário, admite que a metilação *de novo* é um evento primário, dependente da super-expressão das DNMTs [53].

A metilação pode influenciar a tumorigenicidade por aumentar a probabilidade de ocorrência de mutações de transição $C^{me} \rightarrow T$, como verificado com o gene *TP53*, em que 50% das mutações pontuais ocorrem nas citosinas metiladas [57]. Tais mutações de transição ocorrem em função dos resíduos de 5-metilcitosina serem mais susceptíveis à deaminação [33, 54, 67]. A deaminação da citosina forma

a uracila, a qual é rapidamente reconhecida e reparada pela uracil DNA glicosilase (UDG); mas, a deaminação da 5-metilcitosina gera timina, que, por ocorrer naturalmente no DNA é mais difícil de ser detectada e reparada pela timina DNA glicosilase (TDG) [54].

Vários genes envolvidos com a regulação do ciclo celular, apoptose, resistência aos medicamentos; detoxificação; diferenciação; angiogênese e metástase podem ser hipermetilados no câncer [66]. No câncer de mama os genes *p16^{NK4a}*, *ESR1*, *PGR*, *CDH1*, *TIMP-3* e *BRCA1*, são os mais frequentemente metilados [68].

1.5.4. Terapêutica anti-tumoral e metilação

O estudo da metilação pode ser muito útil para o diagnóstico precoce e para definição do tratamento de vários tipos de tumores. O perfil de metilação permite distinguir entre tipos e sub-tipos de tumores e auxilia na escolha do agente quimioterapêutico para o tratamento. A metilação do gene de reparo *MGMT*, por exemplo, aumenta a sensibilidade dos gliomas ao tratamento com agentes alquilantes [66, 69].

Como a metilação das ilhas de CpG é mais frequente nas células tumorais, pois, como dito anteriormente, em geral, nas células normais os dinucleotídeos encontram-se desmetilados; a metilação pode ser um alvo importante na terapia anti-tumoral [70]. Além disso, ao contrário das alterações genéticas, a possibilidade de reverter as modificações epigenéticas torna viável o tratamento epigenético do câncer [44, 71].

Dentre as substâncias empregadas na terapia do câncer estão os inibidores de metilação, que incluem os análogos e não análogos de nucleosídeos. Os primeiros podem ser divididos em análogos ribonucleosídeos (como a 5-azacitidina, 5-Aza-CR, e a zebularina) ou desoxirribonucleosídeos (5-aza-2'-desoxicitidina, 5-Aza-CdR, e a 5-fluoro-2'-desoxicitidina, 5-F-CdR). Ambos possuem o carbono 5 do anel da citosina modificado e são metabolizados por quinases que os convertem a nucleotídeos trifosfato para posterior incorporação ao RNA ou DNA, respectivamente [44].

O principal análogo de citidina usado no tratamento do câncer é o 5-Aza-CdR. Este é capaz de inibir a metilação do DNA mesmo em concentrações micromolares, mas, apresenta-se instável em soluções aquosas, dificultando sua

administração [44, 72]. Apesar de serem amplamente empregados no tratamento anti-câncer, apresentam efeitos tóxicos e podem ser mutagênico *in vivo* [73]. Além disso, demonstrou-se que é capaz de ativar transcricionalmente genes sem promotores metilados e de promover modificação da estrutura da cromatina, aumentando a acetilação e a metilação da Lys4 da histona H3 [73].

O mecanismo de inibição de metilação desta droga é idêntico ao da 5-Aza-CR. O domínio catalítico da DNMT reage com o carbono 6 do anel da droga, formando um complexo covalente. Em seguida, ocorre a adição do grupo metil ao carbono 5 do análogo de citidina. Entretanto, em função da ausência do hidrogênio nesta posição, a DNMT não é liberada e permanece associada ao complexo [44, 74]. Apesar da DNMT1 também estar sujeita à degradação proteossomal após tratamento com 5-Aza-CdR, admite-se que a principal forma de inibição da ação desta enzima decorre da incorporação no complexo covalente droga-DNMT [44].

1.6. QUIMIOCINAS

As quimiocinas, também designadas de citocinas quimiotáticas [75] constituem um grupo de pequenas proteínas solúveis e altamente básicas, cujo peso molecular varia de oito a dez kDa [75, 76] com algumas exceções, como a linfotactina (Lptn) que possui 16 kDa e a fractalcina ou neurotactina, com 38 kDa [77].

As quimiocinas foram inicialmente descritas na década de 70 e na década seguinte, estas foram incluídas em um grupo de proteínas primeiramente denominado de *small inducible cytokine gene family* [78] e, posteriormente, designado de citocinas quimiotáticas. Em 2000 foi definida uma nomenclatura para estas moléculas, que consiste da família, seguida da letra “L” ou “R”, para denotar ligante ou receptor, respectivamente, e por último, um número de identificação que indica a ordem de descoberta [79, 80].

1.6.1 As quimiocinas e sua classificação

Estima-se a ocorrência de aproximadamente 50 quimiocinas e mais de 20 receptores em humanos [81]. Tradicionalmente, tais moléculas são divididas em quatro grupos de acordo com o arranjo dos dois primeiros (dos quatro) resíduos conservados de cisteína, adjacentes à extremidade amino-terminal [76, 82] como

pode ser visualizado na figura 4 abaixo.

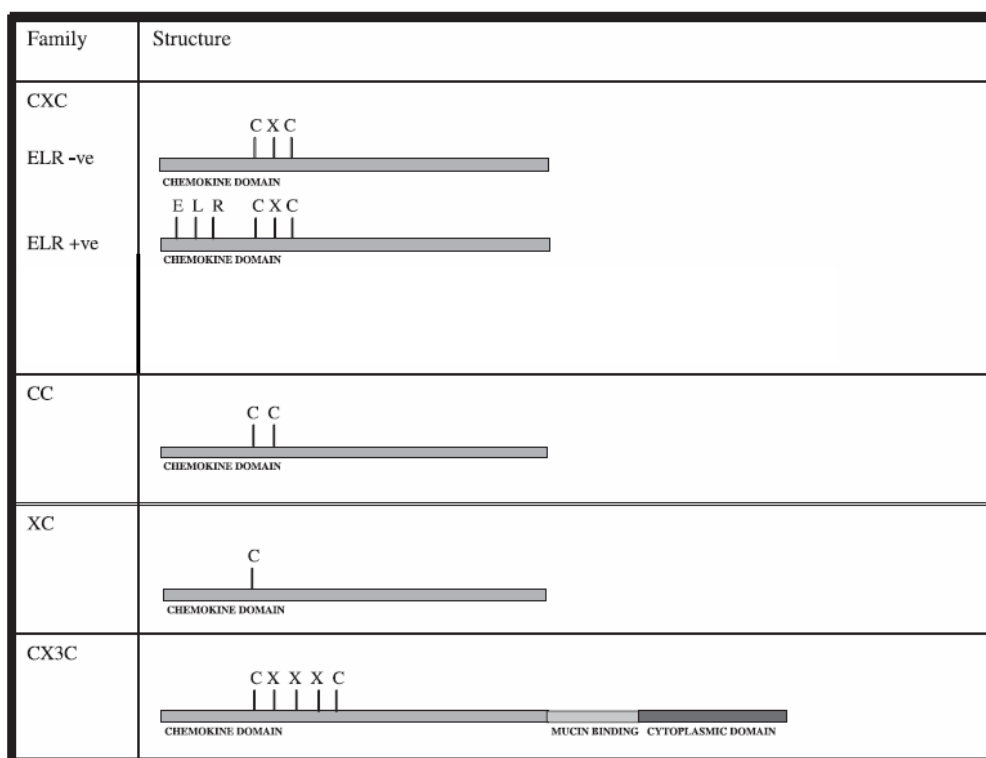


FIGURA 4- REPRESENTAÇÃO DAS FAMÍLIAS DE QUIMIOCINAS.

A esquerda está representado a família à qual as quimiocinas pertencem e à direita um modelo esquemático. As quimiocinas podem ser divididas dentro de quatro famílias: CXC, CC, XC e CX₃C. A família CXC é subdividida de acordo com a presença ou não do motivo ELR (glutamato, leucina, arginina).

FONTE: Laurence et al. 2005 [75].

As quimiocinas CXC (ou alfa) apresentam um aminoácido entre duas cisteínas. As quimiocinas CC, ou beta, possuem duas cisteínas adjacentes. A quimiocina XC (ou gama) não possui a primeira e a terceira, das quatro cisteínas conservadas e seu único representante é a linfotactina (Lp_{tn}). A quimiocina CX₃C (ou delta) como a fractalcina ou neurotactina, apresenta três aminoácidos entre as cisteínas, um domínio transmembrana tipo-mucina e pode ser encontrada nas formas solúvel e/ou ligada à membrana [77, 83].

Para nomear as quimiocinas adiciona-se a letra “L”, referente à ligante após a família e um número de identificação. Por exemplo, CXCL12 é uma quimiocina pertencente à família CXC, número 12. O mesmo vale para o receptor, pois a sistemática está baseada na estrutura de seu ligante [82]. Os grupos de quimiocinas podem possuir mais de um ligante para o mesmo receptor, sendo considerada uma relação inter cruzada (figura 5).

são constitutivamente expressas em determinados tipos de células e tecidos, e desencadeiam um papel vital no desenvolvimento e manutenção. Já as quimiocinas inflamatórias não são constitutivamente expressas, mas induzíveis por estímulos inflamatórios [85].

1.6.2. Características estruturais das quimiocinas

As quimiocinas são caracterizadas por possuir motivos específicos de cisteína, sendo que, a maioria delas possui quatro resíduos deste aminoácido formando duas pontes dissulfeto: Cys1-Cys3 e Cys2-Cys4, as quais limitam a flexibilidade da extremidade amino-terminal [78, 87].

Tais moléculas apresentam estruturas muito similares, com um curto domínio amino-terminal (com seis a 10 aminoácidos) antes da primeira cisteína e após a segunda cisteína ocorre um *loop*, denominado de *N-loop* (figura 6), com aproximadamente dez resíduos, que, em muitos casos, é seguido por uma hélice 3_{10} (estado helicoidal menos frequente caracterizado por pontes de hidrogênio intramoleculares). Logo após a hélice 3_{10} ocorrem três folhas betas antiparalelas (formando uma folha beta-pregueada) conectadas por loops flexíveis, contendo de três a quatro resíduos (*loop* 30s, entre e a primeira e a segunda folha beta; 40s, entre a segunda e a terceira e 50s, entre a última folha e a porção carboxi-terminal). Nos *loops* 30s e 50s ocorrem o terceiro e o quarto resíduos conservados de cisteína característicos destas moléculas. Por fim, segue a extremidade carboxi com uma alfa-hélice apresentando de 20 a 30 aminoácidos [78, 81].

A estrutura tridimensional das quimiocinas é estabilizada pelas duas pontes dissulfeto e por interações hidrofóbicas entre a hélice carboxi-terminal e uma porção da folha beta-pregueada [78, 81].

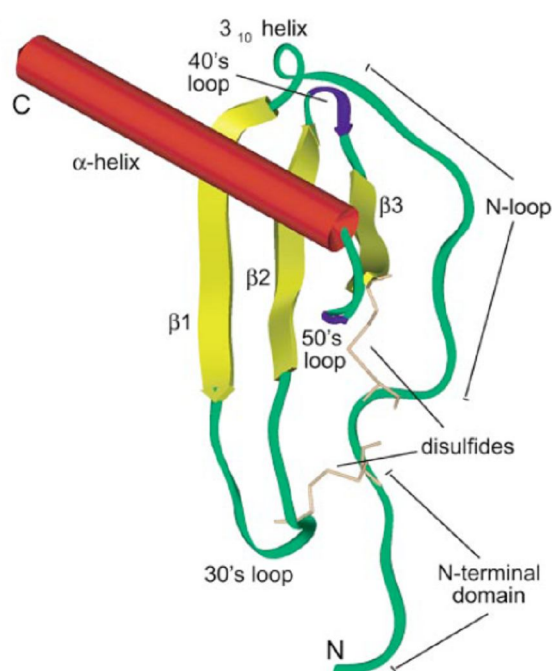


FIGURA 6 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DAS QUIMIOCINAS.
FONTE: FERNANDEZ e LOLIS [78].

Pela extremidade carboxi-terminal as quimiocinas podem se ligar a glicosaminoglicanos e a outras moléculas carregadas negativamente, como as glicoproteínas presentes na matriz extracelular ou outras moléculas presentes na superfície celular [77, 85].

Os receptores de quimiocinas apresentam sete domínios hidrofóbicos transmembrana em alfa-hélice (7-TMR) e também são designados de receptores acoplados às proteínas G (GPCRs), em função de seu mecanismo de sinalização, que envolve a ligação dos *loops* intracelulares à proteína G heterotrimérica ($\alpha\beta\gamma$). No segundo *loop* intracelular existe a sequência DRYLAIVHA, ou uma variação desta, que integra o motivo DRY (asparato-arginina-tirosina) e que é importante para a sinalização após interação com o ligante [78, 87].

Em cada *loop* extracelular ocorre uma cisteína e o terminal carboxi dos receptores contém resíduos de serina e treonina, que são passíveis de serem fosforilados após interação ligante-receptor e estão envolvidos na transdução de sinais bem como na dessensibilização do receptor [77, 83, 88]. São conhecidos cinco receptores para as quimiocinas CXC (CXCR1-5) e dez para as quimiocinas CC (CCR1-10) [77].

1.6.3. Interação receptor-ligante e a sinalização intracelular

Há duas hipóteses aventadas para o mecanismo de interação quimiocina-receptor sendo: (1) ligação do domínio central (região que compreende as três folhas-beta) da quimiocina aos *loops* extracelulares do receptor e (2) ligação do domínio amino-terminal da quimiocina com um “pacote helicoidal”, formado pelas hélices transmembrana, do receptor [81].

Em geral, uma quimiocina pode se ligar a vários receptores e um receptor pode ter várias quimiocinas ligantes, estabelecendo uma relação denominada de intercruzante [89]. No entanto, essa redundância somente ocorre entre ligante e receptores pertencentes à mesma família, ou seja, um receptor CC pode se ligar a diferentes quimiocinas CC, e vice-versa [90]. Além disso, essa promiscuidade não é regra e uma relação monogâmica entre ligante e receptor pode ser verificado, por exemplo, e com os pares: CCL25-CCR9, CCL20-CCR6, fractalcina-CX₃CR1 [88] e CXCR4-CXCL12, embora dados bem recentes tem descrito que CXCL12 também poderia se ligar a CXCR7 [91], um novo receptor identificado. Tal redundância também pode ser verificada entre as quimiocinas e sua célula-alvo, pois uma dada população de leucócitos possui receptores para diferentes quimiocinas. Este mecanismo permite que, quando uma quimiocina ou um receptor falhar, um novo conjunto de quimiocinas e de receptores pode manter as principais funções biológicas [92]. Ressalta-se, no entanto, que os diferentes ligantes que interagem com um receptor comum possuem, em geral, distintas propriedades, como por exemplo, diferente (a) afinidade pelo receptor, (b) capacidade de ligação a glicosaminoglicanos, (c) habilidade de induzir a dessensibilização do receptor, (d) tempo de meia-vida e (e) distribuição espacial (enquanto uma quimiocina é expressa na matrix extracelular, outra é expressa no endotélio, por exemplo) [93].

A interação do ligante com o receptor desencadeia a ativação do mesmo. Neste caso, o ligante estabiliza ou induz a uma mudança de conformação do receptor expondo α -hélices e sítios fundamentais para a ligação da proteína G, ativando-a [87]. Esta, em seu estado inativo, encontra-se na forma heterotrimérica ($\alpha\beta\gamma$), ligada ao GDP (guanosina difosfato). A subunidade α possui atividade GTPase e interage diretamente a *loops* intracelulares do receptor e à subunidade β , a qual forma um complexo com a subunidade γ . Com a interação ligante-receptor altera-se a conformação da subunidade α , diminuindo a sua afinidade pelo GDP [88]. Após a dissociação do GDP e acoplamento do GTP (guanosina trifosfato) à

subunidade α , esta assume sua conformação ativa e então se separa do receptor e do complexo heterodimérico $\beta\gamma$. Em seguida, inibe a atividade da adenilil ciclase, reduzindo os níveis de AMPc (adenosina monofosfato cíclico) intracelular, e, ativa efetores como a fosfolipase C $\beta 1$ e $\beta 2$, levando à hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), formação do fosfatidilinositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) [94]. Estes dois últimos são mensageiros lipídicos secundários que provocam elevações transitórias da concentração de cálcio citosólico (acarretando, por sua vez, a ativação de leucócitos, por exemplo) e ativam proteínas quinases, como a proteína quinase C (PKC), respectivamente [95]. As quinases, por sua vez, fosforilam moléculas efetoras, como as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) [77] ativando, na maioria dos casos, a via ERK1/2 [88].

Com a clivagem do fosfato terminal do GTP, a subunidade α da proteína G se dissocia do efetor, liga-se novamente ao complexo $\beta\gamma$ e ao receptor. Assim a proteína G assume sua forma heterotrimérica inativa, podendo receber um novo estímulo e reiniciar outro ciclo [87, 94, 96]. A fosforilação dependente do agonista (ligante) que ocorre na porção carboxi-terminal do receptor desencadeia a dessensibilização e a internalização do mesmo, interrompendo a continuidade dos estímulos [97].

1.7. PRINCIPAIS FUNÇÕES

As quimiocinas foram inicialmente descritas por sua capacidade de regular seletivamente o recrutamento e o tráfico de leucócitos. Atualmente, sabe-se que as quimiocinas participam de outros processos, como em respostas imunes, doenças infecciosas, no desenvolvimento de vários sistemas e órgãos, além de atuar no desenvolvimento e na progressão do câncer [98].

As quimiocinas também têm sido descritas como reguladoras na resposta inflamatória [90], em doenças auto-imunes e na infecção pelo HIV. Para que o vírus da imunodeficiência humana possa infectar os linfócitos ou macrófagos é necessária a ligação da proteína de superfície CD4 e de receptores de quimiocinas que atuam como co-receptores [99]. Os vírus que apresentam tropismo pelos linfócitos T (HIV-1 T-trópico) utilizam geralmente o receptor CXCR4, enquanto aqueles com tropismo pelos macrófagos (HIV-1 M-trópico) geralmente utilizam o receptor CCR5 [99]. No

entanto, outro receptor, o CCR8 (cujo ligante é a quimiocina CCL1), também medeia a infecção celular de HIV-1 M-trópico ou T-trópico [96].

Em função dos receptores de quimiocinas exercerem um papel fundamental no processo de infecção do HIV, bem como a evidência de que a interação destes com suas quimiocinas bloqueia a entrada do vírus nas células-alvo, torna estas moléculas alvos importantes no tratamento da AIDS [96, 98, 99].

1.7.1. Quimiocinas e Câncer

As quimiocinas podem ser secretadas por células tumorais, células adjacentes ao tumor e em locais de metástases sendo muito importantes no contexto do câncer [83].

Em muitos tipos de tumores pode ser verificada a ocorrência de infiltrados leucocitários nas regiões tumoral e peritumoral. Entre os tipos de leucócitos estão os linfócitos T, as células dendríticas (CD), as células *natural killer*, e alguns eosinófilos e neutrófilos; mas, os leucócitos de maior relevância são os monócitos, que migram da circulação para o tumor, estabelecendo uma população de macrófagos associados ao tumor (TAMs) [83, 100, 101].

As implicações dos leucócitos no câncer são divergentes. Em princípio, tais células poderiam reconhecer e atuar contra as células tumorais, mas, poderiam também fornecer sinais que favorecem o desenvolvimento tumoral [85, 89, 102].

Algumas quimiocinas atraem células do sistema inato que exercem função anti-tumoral. A CCL20, por exemplo, recruta, via receptor CCR6, CDs que desencadeiam uma resposta anti-tumoral dependente de células T. Após contato com o antígeno tumoral, essas células são ativadas e passam a expressar outros receptores de quimiocinas que estimulam sua migração a órgãos linfóides secundários, onde iniciam a resposta imune [85, 100].

No entanto, podem existir casos em que as células de defesa recrutadas pelas quimiocinas atuam a favor do tumor. Este é o caso dos TAMs, que, ao mesmo tempo que participam de processos de apresentação de antígeno, fagocitose, secreção de citocinas pelos T_H1 e citotoxicidade; podem viabilizar o estabelecimento e o crescimento tumoral por expressar fatores de crescimento e angiogênicos, metaloproteinases [85, 102]. Isto é frequentemente observado em carcinomas de mama, em que elevadas quantidades de TAMs estão associadas a tumores de alto grau, mais agressivos e conseqüentemente de pior prognóstico.

Além deste efeito indireto das quimiocinas no desenvolvimento do câncer, estas podem atuar direto no tumor. Um grande número de células tumorais expressa receptores de quimiocinas em sua superfície celular, que, quando ativados, desencadeiam vias de sinalização intracelular envolvidas na sobrevivência, proliferação, invasão e crescimento tumoral [85, 89]. Além disso, muitas células tumorais são capazes de secretar quimiocinas, que atuam de forma autócrina sobre a massa tumoral. Em ambos os casos, considera-se que as quimiocinas possuem um efeito direto nas células tumorais [102].

De forma parácrina, as quimiocinas também conferem vantagens de crescimento ao tumor via angiogênese, a qual é estimulada por fatores que induzem, como o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), ou inibem, como a angiostatina, este processo. Admite-se também que as quimiocinas podem regular a migração de células tumorais a locais metastáticos específicos, onde encontram condições que favorecem sua viabilidade. Nesse caso, os locais onde a metástase será formada devem apresentar elevada expressão de quimiocinas e estas devem induzir a migração das células tumorais que expressam seu receptor correspondente [100, 102].

Muitas células tumorais são capazes de secretar quimiocinas angiogênicas (ELR+). Embora CXCL12 não seja uma quimiocina ELR, é fortemente angiogênica, especialmente no câncer de mama, podendo induzir a migração e proliferação de células endoteliais e estimular a formação de vasos [86, 102]. Muller et al. [103] mostraram que, no câncer de mama, os órgãos-alvo de metástase expressam altos níveis da quimiocina CXCL12, e induzem a movimentação específica das células tumorais de mama que expressam o receptor correspondente a esta quimiocina, o CXCR4. Também se verificou que o receptor CXCR4 é altamente expresso em tecidos tumorais mamários, mas não no tecido normal de mama, e que seu ligante CXCL12, da mesma forma, encontra-se altamente expresso na medula óssea, pulmão e linfonodos, locais onde se observa maior ocorrência de metástases neste tipo de câncer. Observou-se, inclusive, que a neutralização com anticorpos monoclonais contra o CXCR4 acarretou a redução de metástases das células tumorais de mama para o pulmão e linfonodos em camundongos.

Além do mais, uma vez que as células tumorais interagem com a CXCL12, via seu receptor, ocorre a indução da sinalização intracelular que aumentam as propriedades metastáticas, de crescimento e de sobrevivência das células anormais

[104]. De fato, as quimiocinas e seus receptores parecem favorecer a proliferação e a sobrevivência das células tumorais mesmo sob condições de estresse. Em condições de hipóxia observa-se o aumento da expressão do CXCR4, que favorece o crescimento do tumor [105]. Além disso, diversos estudos tem demonstrado que os genes das quimiocinas poderiam ser regulados por mecanismos epigenéticos em diferentes tipos de câncer. Um recente trabalho realizado com linhagens de carcinoma de colon, demonstrou que o gene da quimiocina CXCL12 era regulado epigeneticamente [106].

1.7.2. CXCL12 ou SDF1 α

A quimiocina CXCL12, ou SDF1 α (de acordo com a nomenclatura antiga) é codificada por um gene presente na região 10q11 (figura 7)³. Três variantes derivadas de processamentos transcricionais alternativos têm sido caracterizadas (tabela 2).



FIGURA 7 - LOCALIZAÇÃO DO GENE CXCL12 NO CROMOSSOMO.

O CXCL12 está localizado no braço longo do cromossomo 10, na posição q11.21, representado pelo traço vermelho na figura.

FONTE: UCSC GENOME BROWSER ON HUMAN ASSEMBLY.

TABELA 2-DADOS REFERENTES AOS VARIANTES TRANSCRICIONAIS DO CXCL12

VARIANTE TRANSCRICIONAL	1	2	3
GENBANK ENTRY	NM_199168.2	NM_000609.4	NM_001033886.1
NÚMERO DE PARES DE BASES	1937	3542	471
NÚMERO DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA CODIFICADA	89	93	119

FONTE: UNIGENE (ver nota 3).

Possui três isoformas principais sendo a CXCL12 α a forma predominante contendo 89 aminoácidos; CXCL12 β que se diferem por 4 aminoácidos na região C-terminal por processamento alternativo; e a isoforma CXCL12 γ encontrada principalmente em cérebros e corações de ratos após injúrias isquêmicas. Todas derivam de eventos de processamento partindo dos primeiros 3

³ Dados disponíveis em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene>>

exons usando 4 exons diferentes [107]. Danos ao DNA como irradiação e compostos químicos causam um aumento na expressão de CXCL12 na medula de ratos e em culturas celulares [108]. Camundongos knockout para os genes CXCL12/CXCR4 demonstram ter um papel importante no desenvolvimento embrionário. CXCL12 deficientes morrem no útero com defeitos severos do septo cardíaco e um mau desenvolvimento da medula óssea. Já a deleção do CXCR4 resulta em distúrbios circulatórios, imunes e hematopoiéticos [109].

O CXCL12 é expresso em vários tecidos, rins, pele, cérebro, musculatura esquelética, mas, sua expressão é marcadamente acentuada especialmente em linfonodos, pulmões, fígado e medula óssea [110]. Tal ligante é também altamente expresso por fibroblastos do estroma, associados ao carcinoma, os quais exibem características de miofibroblastos, uma vez que apresentam expressão aumentada de Actina de Músculo Liso- α (α -SMA) e capacidade de induzir a contração da matriz de colágeno [111, 112]. Ainda não foi esclarecido se as células do carcinoma promovem a indução da conversão dos fibroblastos pré-existentes no estroma mamário ou de seus progenitores a miofibroblastos [112] e, da mesma forma, se os miofibroblastos ou seus progenitores poderiam ser recrutados de fora da massa tumoral [113]. Admite-se que os fibroblastos associados ao carcinoma poderiam sofrer alterações epigenéticas, acarretando a formação de TGF- β autócrino, que poderia converter fibroblastos à miofibroblastos [111]. Além disso, sabe-se que a região do estroma possui elevada taxa de alterações genéticas (perda de heterozigosidade e mutações somáticas) e, considera-se que o acúmulo dessas modificações poderia contribuir para ativar os fibroblastos associados ao carcinoma [111].

1.8. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que uma vez estabelecida a massa tumoral no órgão primário, certas células são capazes de ultrapassar seus limites geográficos originais e se instalar em outros locais, via circulação sanguínea, pela liberação de proteases [5, 114]. Muitos estudos apontam a existência de uma migração direcionada das células cancerosas a órgãos específicos, o que explicaria a maior ocorrência de metástases endereçadas ao pulmão, fígado e ossos, nos casos de câncer de mama [11, 12, 115].

Algumas investigações têm demonstrado que as quimiocinas e seus receptores atuam no processo de migração das células cancerosas, de maneira que foi verificada a ocorrência de quimiocinas expressas em órgãos-alvo nas quais se ligam especificamente receptores de quimiocinas expressos em células tumorais [103].

Algumas células não-neoplásicas presentes no microambiente tumoral, por exemplo, secretam a quimiocina SDF-1, renomeada como CXCL12, a qual por intermédio do receptor CXCR4, é capaz de atrair células cancerosas. O CXCR4 é fundamental para o desenvolvimento metastático para órgãos onde o CXCL12 está expresso, além disso, alguns trabalhos indicam seu envolvimento com a disseminação e progressão de diversos tumores [97, 107, 116, 117]. O gene *CXCL12* é hiperexpresso em fibroblastos estromais no local do tumor e nas células do tumor sua expressão é ausente, mostrando assim a interação CXCR4/CXCL12 na progressão local do tumor [113, 118]. Em 1995, Shirozu et al. mapearam o gene da quimiocina *CXCL12* e constataram a ausência de uma região TATA box e a presença de dinucleotídeos CpG. Outro estudo importante com este gene determinou a localização de uma região promotora [119].

Este trabalho teve início em nosso laboratório com o estudo da regulação epigenética do gene *CXCR4* em câncer de mama pela mestre Mariana Grochoski. Com intuito de avaliarmos se o gene *CXCL12* também poderia ser regulado por epigenética, nós iniciamos este projeto realizando análises de expressão em linhagens de câncer de mama. Linhagens que não possuíam a expressão do gene *CXCL12* foram submetidas ao tratamento com o composto 5-aza-CdR (detalhes em material e métodos) e voltaram a expressar o gene de interesse. A partir desta evidência, iniciamos o trabalho após a análise da região promotora, de escolha de uma ilha de CpG para estudo, tratamento das amostras, clonagem e

sequenciamento. Entretanto, um estudo concomitante neste mesmo tipo de câncer realizado por Wendt, et al. (2007) [120] avaliou o perfil de metilação deste gene por MSP em 15 tumores primários de mama sem, no entanto, correlacionar com os dados clínicos das amostras avaliadas. Além disso, foram sequenciadas uma linhagem normal (MCF10A) e duas tumorais (MDA-MB-231 e MCF-7) para o desenho dos iniciadores em uma região diferencialmente metilada. Outras cinco linhagens também foram avaliadas quanto ao MSP, entre elas a MDA-MB-435. A região avaliada pelo grupo de Wendt, et al.[120] no entanto, não coincidia com a região por nós primariamente escolhida. Sendo assim, incluímos a análise desta outra ilha com intuito de avaliarmos se o padrão de metilação encontrado por este grupo [120] em uma população americana, seria também representativo nas nossas amostras brasileiras.

Uma análise minuciosa da região 5' em relação ao início da transcrição (TSS) do gene *CXCL12* nos mostrou a presença de um importante sítio ERE próximo à região foco do nosso estudo. Esta característica nos indicou a escolha desta ilha uma vez que a importância do gene *ESR1* (receptor de estrogênio) já está bem estabelecida pela literatura tanto para a proliferação de diversos tecidos quanto para a conduta quanto ao tratamento de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com a ausência ou presença da expressão deste gene. Outra evidência importante foram os dados teóricos determinados por Hall e Korach (2003) [121] que demonstravam que o gene *CXCL12* poderia ser regulado via receptor de estrogênio. Além disso, em um trabalho realizado pela aluna de iniciação científica Simone Foggiatto em nosso laboratório, (resultados repetidos para confirmação), mostravam relação entre a hipermetilação do gene *ESR1*, com conseqüente ausência da proteína nas amostras tumorais do nosso estudo. Diversos valores significativos com os dados clínico-patológicos foram encontrados. Sendo assim, nossos objetivos encontram-se descritos a seguir.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a participação da metilação no controle da expressão do gene

CXCL12 em linhagens tumorais de mama para posterior correlação dos achados de metilação em tumores primários com aspectos clínico-patológicos.

2.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar através de RT-PCR o padrão de expressão do gene *CXCL12* em linhagens normais e tumorais de mama.
- Clonar e sequenciar a Ilha de CpG 4 da região promotora do gene *CXCL12* identificando os dinucleotídeos CG diferencialmente metilados em linhagens normais e tumorais de mama
- Através da técnica de MSP (Methylation Specific PCR) estudar o padrão de metilação da ilha de CpG do gene *CXCL12* em amostras de tumores primários de mama provenientes Hospital Nossa Senhora das Graças, estocadas no Banco de Tumores do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do departamento de Genética do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.
- Correlacionar os dados de metilação das amostras tumorais com os dados clínico-patológicos das pacientes a fim de determinar o envolvimento desta ilha de CpG na progressão tumoral em mama.
- Correlacionar com os resultados de metilação por MSP do gene do receptor de estrógeno alfa (*ESR1*) com dados clínico-patológicos e avaliar sua provável correlação com o perfil de metilação das ilhas de CpG do gene *CXCL12* avaliadas nesse estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

O material biológico utilizado no estudo foram linhagens celulares humanas de câncer de mama e tumores primários de mama. As linhagens foram cedidas pelo Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer em São Paulo e foram: MDA-MB-435, MDA-MB-436, MCF-7, PMC42, e nas linhagens normais HB4a (imortalizada por vírus SV40) [122] e HB4aC3.6, que é uma linhagem HB4a modificada com altos níveis de expressão de *ERBB2* (HER2) [18]. A utilização do painel de células se justifica do ponto de vista metodológico pela disponibilidade de grandes quantidades

de material, assim como pela ausência de contaminação com células normais.

As amostras de tumores de mama foram gentilmente cedidas pela Dra. Enilze S. F. Ribeiro e pelo Dr. Iglénir João Cavalli, responsáveis pelo Banco de Tumores do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Todas as amostras catalogadas neste Banco de Tumores foram obtidas mediante consentimento informado dos pacientes (ANEXO) e aprovação do Comitê de Ética, Processo nº 25000.007020/2003-93; registro no CONEP: 7220 e parecer nº 251/2003, de 20/02/2003 do Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba-PR (proveniência das amostras sob responsabilidade do Dr. Rubens Silveira Lima).

Todas as amostras foram analisadas por anatomopatologistas dos Laboratórios do Hospital Nossa Senhora das Graças ou do Hospital de Clínicas. Os resultados obtidos aqui descritos foram coletados dos laudos das pacientes e estão de acordo com critérios estabelecidos na literatura. Alguns desses dados são derivados de avaliação subjetiva da observação das amostras por microscopia ótica (tipo e grau histológico, percentagem de células visualizadas com marcadores de imunohistoquímica).

Todas as amostras analisadas foram do sexo feminino, com idade média de $57.8 \pm 14,7$ anos (27 a 84 anos). Os tipos histológicos foram: carcinoma ductal invasivo (IDC) $n = 51$ (das 69 amostras) (73,9%) e carcinoma lobular invasivo (ILC), $n = 18$ (26,1%). A presença de linfonodos positivos foi de 35 (51,5%) e negativos de 33 (48,5%). O grau histológico foi determinado de acordo com o critério de Bloom-Richardson [123] (quanto maior o grau, maior a perda de diferenciação celular, mais avançado está o tumor, ou seja, mais tardio ocorreu o diagnóstico da doença) e foram Grau I 27, 6%, Grau II 47,8% e Grau III em 24.6%. O estadiamento denominado TNM (**T**amanho, número de linf**N**odos acometidos e presença de **M**etástases) foi feito de acordo com a classificação oficial [124]. Os testes de marcadores moleculares feitos por imunohistoquímica (IHC) foram mostrados nos laudos em percentagem de células coradas. A partir dos dados obtidos dos laudos médicos, nós dividimos os resultados de receptor de estrógeno alfa (RE) em escores (de acordo com o número de células que apresentaram coloração com o marcador). O escore 0 significa que até 10% de células estavam coradas. O escore 1, 10 a 30%, o escore 2 de 30 a 50% e o escore 3 mais do que 50% de células coradas. Os dados de HER2 (*ERBB2*) foram obtidos utilizando-se o protocolo de IHC

HercepTest™ (DAKO A/S, Grostrup, Dinamarca). Este protocolo é subjetivo e dividido de 0 a 3 de acordo com o número de células coradas visualizadas. É de rotina que os resultados a partir de +2 sejam confirmados por ensaio de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) utilizando sonda para RNA mensageiro do gene *ERBB2*, para confirmar o resultado. Este cuidado na obtenção deste resultado de HER2 é devido ao fato de que este marcador é de pior prognóstico para a paciente, e nesses casos, o médico pode optar pelo tratamento com anticorpo monoclonal Herceptin. Outros dados clínico-patológicos (tamanho do tumor, recorrência local, metástases e morte) encontram-se detalhados na tabela 6 do ítem resultados (e na tabela 10 do anexo).

3.2. CULTIVO DE CÉLULAS

Os cultivos das linhagens foram realizados em meio RPMI1640 (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% e antibióticos, garamicina (40 µg/ml) para evitar contaminação bacteriana, ciprofloxacina (10 µg/ml) para evitar contaminação por espécies do gênero *Mycoplasma*, anfotericina B (2,5 µg/ml) para evitar contaminação por fungos e leveduras. Algumas linhagens receberam suplementação de hormônios como insulina (5 µg/ml) (HB4a, MDA-MB-435, MDA-MB-436, PMC42 e HB4aC3.6) e hidrocortisona (100 µg/ml) (HB4a, HB4aC3.6 e PMC42). O início do cultivo é feito com amostras retiradas do estoque em nitrogênio líquido contendo aproximadamente 10^6 células. Foi feito, descongelamento a 37°C e as células foram repassadas dos tubos criogênicos para um tubo de 15 ml contendo 2 mL de meio RPMI 1640. Os tubos foram centrifugados a 700 x g por 3 min, o sobrenadante contendo DMSO (importante para integridade das células ao congelamento) foi retirado e as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI suplementado e transferidas para garrafa pequena (24 cm³) contendo 3 ml de meio de cultura. Os frascos foram então incubados em estufa com tensão de CO₂ a 5% e a 37°C. O meio de cultura foi regularmente substituído em dias alternados dependendo da linhagem e número de células mortas visualizadas.

A confluência de aproximadamente 90% das células foi o indicativo para expansão da garrafa pequena para a média (80 cm³). Neste processo, as células foram tratadas com TrypLE™ Express (Gibco) (tripsina 0,25 %) em quantidade suficiente para cobrir a superfície da garrafa onde as células estavam aderidas e incubadas por 3 a 5 minutos em estufa a 37°C. Ao observar que as células se

soltaram foi adicionado o dobro de meio de cultura completo para diluição da tripsina. As células desagregadas foram então transferidas para tubos de 15 mL e centrifugadas a 700 x g por 3 min. O meio contendo tripsina foi descartado, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultivo RPMI-1640 novo e completo, transferidas para a nova garrafa e incubadas na estufa de CO₂.

3.3. AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE *CXCL12* EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA

O nosso objetivo de estudar a ilha de CpG 4 por MSP nos tumores envolve a etapa inicial de encontrar quais CGs são diferencialmente metilados (metilados nas linhagens que não expressam o gene de estudo e o inverso nas linhagens que expressam o gene). O reconhecimento desses CGs permite planejar os iniciadores para MSP. Para alcançar esse objetivo é necessário o conhecimento de quais linhagens expressam o gene *CXCL12*. Por essa razão realizamos ensaio de RT-PCR em todas as linhagens mesmo naquelas que já haviam sido descritas na literatura. Além disso, essas linhagens seriam mais tarde utilizadas como controle e padronização dos iniciadores de MSP antes de utilizarmos os DNAs de tumores.

Para o ensaio de RT-PCR foram seguidas as etapas descritas abaixo.

3.3.1. Extração de RNA

O RNA total foi isolado de um número aproximado de 4×10^6 células utilizando *TRIzol Reagent* (Life Technologies, USA), segundo especificações do fabricante. A extração do RNA utilizando esse reagente é uma adaptação do método desenvolvido por Chomczynski, P. em 1987 [125]. O método consiste de lavagem inicial das células na garrafa com PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄), adição de *TRIzol Reagent* suficiente para cobrir a superfície da garrafa onde as células estão aderidas e incubação (para lise e dissolução dos componentes celulares mantendo a integridade do RNA). O lisado de células é então distribuído em alíquotas de 1 ml para tubos contendo 250 µL de clorofórmio. Os tubos foram homogeneizados com agitação vigorosa e então centrifugados a 4°C e 8100 x g por 20 min em centrífuga (em centrífuga tipo Eppendorf) e a seguir a fase aquosa foi coletada para um novo tubo. O RNA total foi precipitado com 500 µL de isopropanol com incubação a -20°C por cerca de 18

horas. Após esse período os tubos foram centrifugados por 8100 x g por 10 minutos, e em seguida o RNA total precipitado foi lavado com etanol 75%, seco à temperatura ambiente e solubilizado em aproximadamente 30 µL de água tratada com DEPC 0,1% (Gibco). Todo procedimento utilizado nesta técnica foi realizado em câmara de fluxo laminar com uso de luvas, touca e máscara autoclavados duas vezes, assim como todo o material utilizado. Esse procedimento tem como finalidade a inativação de RNAses contaminantes. O material para eletroforese foi tratado preventivamente como recomendado [126].

A quantificação do RNA total extraído foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando-se que 1 DO_{260nm} equivale a 40 µg/ml de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas. O valor ideal dessa relação deve estar contido na faixa de 1,8 a 2,0. A integridade dos RNAs extraídos foi verificada aplicando-se 1 µg de RNA total em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo 0,2 µg/ml. Antes de ser aplicado, o RNA foi preparado com tampão de amostra desnaturante contendo uréia (7 M de uréia e 30% glicerol). Todos os procedimentos foram realizados com material para uso exclusivo de RNA. Assim sendo, foram considerados íntegros os RNAs que apresentaram as bandas correspondentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S bem evidentes, tendo a primeira o dobro da intensidade da segunda.

3.3.2. Obtenção da primeira fita de cDNA

Aproximadamente 500 ng de RNA total foram transcritos reversamente à primeira fita de cDNA na presença de 200 U da enzima transcriptase reversa (Superscript II, Gibco BRL), utilizando 25 pmoles do iniciador OLIGO dT em uma reação com volume final de 20 µL contendo solução tampão 1X, 25 U de inibidor de RNase (Promega) e 200 µM de dNTPs. Inicialmente incubou-se a mistura de RNA, água e o iniciador a 65°C por cinco minutos para abertura de possíveis estruturas secundárias. A reação de síntese de cDNA foi realizada a 42°C por 60 minutos seguida de 72°C por 15 minutos.

O gene de expressão constitutiva *GAPDH* foi utilizado como controle para analisar a eficiência de síntese e qualidade do cDNA nas amostras. Eficiência significa que existe quantidade de RNAm do gene alvo equivalente a que existia na

célula e qualidade significando que o cDNA está puro sem contaminação com DNA genômico. Para isso, os iniciadores dos genes estudados foram planejados sobre exons adjacentes. Deste modo, a presença de uma banda de massa molecular correspondendo a amplificação de fragmento contendo o íntron intercalado pode ser facilmente detectada.

A reação de RT-PCR foi realizada com 1 μ L de cDNA (não se quantifica cDNA porque qualquer valor obtido, não se aplicaria a quantidade do gene de estudo diluído entre todos os genes expressos pela célula) em um volume final de 20 μ L contendo tampão 1X de PCR (Invitrogen), 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, 1U *Taq* Platinum (Invitrogen) e 8 pmoles de iniciadores específicos. As condições de amplificação do gene de expressão constitutiva *GAPDH* foram: desnaturação do cDNA e ativação da *Taq* DNA polimerase por 10 minutos a 95°C e em seguida 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 63°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final desta ciclagem as moléculas tiveram um tempo de extensão extra de 5 minutos a 72°C. As sequências dos iniciadores utilizados para o gene de expressão constitutiva *GAPDH* foram: *GAPDH* universal 5' CTG CAC CAC CAA CTG CTT A e *GAPDH* reverso 5' CAT GAC GGC AGG TCA GGT C.

3.3.3. RT-PCR do gene *CXCL12*

Iniciadores específicos para o gene *CXCL12* foram desenhados na região 3' da molécula de RNAm e foram utilizados nas reações de RT-PCR para avaliar o padrão de expressão gênica. Os iniciadores foram planejados (com T_m adequado e sem formação estruturas secundárias estáveis ou de homodímeros) com o auxílio do programa Oligotech (programa sem custo disponível em <http://www.oligotech.com/analysis.php>) e posicionados entre os exons 2 e 3. As sequências dos iniciadores utilizados foram: RT-C12 universal CAA CGT CAA GCA TCT CAA e reverso 5'AGC TGC AAT ATC ATA CCG TA, sendo que o fragmento amplificado esperado por estes iniciadores era de 383 pares de bases. As reações foram realizadas em um volume final de 20 μ L contendo 1 μ L de cDNA, tampão 1X de PCR (Invitrogen), 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, 1 U *Taq* Platinum (Invitrogen) e 8 pmoles dos iniciadores específicos. As condições da reação foram: desnaturação por 10 minutos a 95°C e em seguida 38 ciclos de desnaturação a 94°C por 45

segundos, anelamento 58°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final, as moléculas foram submetidas a mais 5 minutos de extensão a 72°C.

3.3.4. Eletroforese em Géis de Agarose 1% e de Poliacrilamida 8%

Os produtos das reações de RT-PCR, reações de *nested*-PCR, DNA obtido das linhagens e dos tumores foram visualizados em géis de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0.2 µg/ml. Os produtos das reações de MSP (a ser descrito no item 3.6) foram primariamente avaliados em géis de poliacrilamida (por se tratar de um método mais sensível) e depois aplicados em eletroforese de gel de agarose 1%.

Os géis de poliacrilamida 8% foram feitos utilizando-se uma solução de acrilamida e bis-acrilamida na proporção 29:1, TEMED a 0,1% (Life Technologies) como doador de elétrons da reação e persulfato de amônio (APS) a 0,1% como catalisador da reação. As eletroforeses foram conduzidas em aparato de gel médio a 120 V por aproximadamente 1 hora. A revelação dos resultados foi feita pela impregnação com nitrato de prata segundo o método de Sanguinetti et al. [127]. Para a revelação, cada gel de aproximadamente 56 cm² foi incubado por três minutos em 50 mL de solução fixadora (0,75% de ácido acético glacial, 10% de etanol absoluto), sob agitação, à temperatura ambiente. A esta solução foi adicionado 1 mL de nitrato de prata (10%) e o gel foi incubado por mais 10 minutos. Após impregnação do DNA com prata, o fixador foi desprezado e o gel foi lavado com água filtrada em Millipore (água ultra pura). Para revelação, foi adicionado 50 mL de solução reveladora (hidróxido de sódio 3%) seguida de e 0,7 mL de formaldeído 37%. O gel foi incubado sob agitação até o aparecimento de uma coloração castanho escura ao DNA impregnado. Após a revelação, o gel foi incubado em 50 mL de solução fixadora por 10 minutos, lavado com água ultra pura e a seguir seco em papel celofane transparente.

Este método de coloração é mais sensível em relação a agarose, sendo importante para a avaliação dos resultados tanto positivos quanto negativos das amostras analisadas (brometo de etídeo tem sensibilidade na ordem de nanograma e a coloração por prata na ordem de picograma de DNA).

3.3.5. Tratamento das Linhagens Tumerais com o Agente Desmetilante 5-Aza-2'-

Desoxicitidina

Para confirmar o papel da metilação na regulação da expressão do gene *CXCL12*, as linhagens MDA-MB-435, MDA-MB-436 e MDA-MB-231, que apresentaram resultado negativo no RT-PCR, foram tratadas com o agente desmetilante 5-aza-2'-desoxicitidina (Sigma). Uma quantidade de 10^6 células foi adicionada a uma garrafa de 24 cm³ e cultivada até a aderência confluenta das células. Foram feitas trocas diárias de meio de meio de cultura contendo 1 μM de 5-aza-2'-desoxicitidina por aproximadamente uma semana. Após este período de tratamento, as células foram lavadas com PBS 1X e o RNA total foi extraído da mesma forma descrita no item 3.3.1.

A partir do RNA obtido das linhagens tratadas, o cDNA foi sintetizado e reações de RT-PCR para *CXCL12* foram realizadas conforme descrito no item 3.3.3. Os produtos foram visualizados em gel de poliacrilamida 8% e depois em géis de agarose 1% conforme descrito no item 3.3.4.

3.4. CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DA ILHA DE CpG 4 DO GENE *CXCL12* EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA

Wendt et al. (2007)[120] haviam determinado o perfil de metilação de uma região do promotor do gene *CXCL12* (aqui por nós denominada de ilha 2) em linhagens tumorais de mama MDA-MB-231 e MCF-7 (que são linhagens que dispomos). Com o perfil de metilação determinado e a evidência de regulação por este mecanismo, estes autores planejaram iniciadores para *methylation specific* PCR (MSP) em tumores primários de mama. Em nosso trabalho nós utilizamos estes dados para análise de amostras de pacientes brasileiras. Entretanto nós buscamos alguma outra região do promotor que fosse candidata para estudo, e assim ampliar o conhecimento sobre o mecanismo de desligamento desse gene (levando em consideração que a região promotora tem uma extensa área rica em CGs).

Então buscamos identificar e localizar as ilhas de CpG na região 5' do sítio de início de transcrição (TSS), planejar iniciadores flanqueando a região de interesse para clonagem utilizando PCR *nested*, clonar os fragmentos correspondentes à ilha de CpG obtida por PCR das diferentes linhagens normais e tumorais em vetor de sequenciamento e, por fim, sequenciar e analisar a região de estudo.

3.4.1. Identificação das Ilhas de CpG do gene *CXCL12*

A localização do gene *CXCL12* no genoma humano foi feita através do site Unigene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unigene>) e coletada a sequência de RNAm a partir da sequência referência NM_1991168.2. Ao seguir este *link* foi escolhido novamente e apareceram todas as informações sobre esse gene, inclusive a sequência. Para coletar a sequência do gene foi escolhido o modo FASTA na janela *Display*. A sequência do RNAm do gene *CXCL12* foi então colada na janela principal do site Blat Search Genome (<http://genome.ucsc.edu>). Depois da submissão da sequência foi escolhida a opção *browser* onde aparece o cromossomo e todas as informações já existentes sobre o gene. Nessa janela escolhe-se CpG islands *full* (no item *regulation*). Aparecem destacadas em verde, abaixo da sequência gênica, se existirem, as ilhas de CpG do gene. Clicando nesse quadrado tem-se a opção de solicitar a sequência de DNA. Optamos por 2 kb a montante e 1000 kb à jusante da região TSS. Foi gerada uma sequência de 5677 pb. Com esta sequência, a presença de ilhas de CpG foi verificada através da ferramenta CpGplot disponível na página do grupo European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot>). Este programa mostra as ilhas de CpG seguindo os parâmetros estipulados por Gardiner-Garden e Fromer [128] que define uma Ilha de CpG como uma sequência ≥ 200 pb de DNA com $\geq 50\%$ de C+G e \geq do que 0,6 de CpG observados/ CpG esperados. Foram identificadas cinco regiões ou 5 ilhas de CpG (ver posteriormente nos resultados).

Para escolher uma outra região de estudo além daquela já descrita Wendt et al.(2007) [106] nós submetemos esta região contendo 5677 pb a programas de busca de sítios consenso para fatores de transcrição. Os programas foram o TESS (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>) também utilizado no trabalho de García-Moruja et al. (2005) [119] e o programa denominado Genomatix (<http://www.genomatix.de/>)⁴. Com auxílio destes programas identificamos prováveis sítios de ligação para fatores de transcrição dentro e fora das ilhas encontradas. Nesta região foi encontrada uma sequência consenso ERE (elemento de resposta ao estrógeno), ou seja, um consenso de ligação para a proteína do receptor de estrógeno alfa a 19 pb da ilha 4. Em virtude da presença deste elemento ERE, escolhemos a ilha de CpG 4 para o estudo de metilação.

3.4.2. Desenho dos iniciadores

⁴ Resultados completos encontram-se na tabela 7 do anexo.

Neste estudo, apenas a ilha de CpG 4 foi amplificada, clonada e sequenciada. Foram desenhados dois pares de iniciadores para amplificação desta ilha.

Para amplificar a região de interesse para estudo de metilação, o DNA deve ser antes tratado com bissulfito de sódio (técnica descrita e explicada a seguir no tópico 3.4.4) e os iniciadores planejados não devem anelar em nenhum dinucleotídeo CpG. Essa característica é importante para que a reação de PCR seja capaz de amplificar a região em estudo, tanto em amostras altamente metiladas, quanto em amostras desmetiladas. Uma vez que o tratamento com bissulfito de sódio gera a deaminação das citosinas do DNA, deve ser considerado, durante o desenho dos iniciadores, que na seqüência universal todas as citosinas são convertidas em timina e na sequência dos iniciadores reverso todas as guaninas são convertidas em adenina. Para tanto facilitar o processo de escolha da região mais adequada para o planejamento dos iniciadores, utilizamos um programa disponível na internet chamado *Methprimer* (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) que mostra a conversão do DNA após o tratamento com bissulfito [129].

A Ilha de CpG 4 do gene *CXCL12* possui 297 pares de bases e está localizada entre os nucleotídeos -1872 e -1575. Para obter esse fragmento clonado foi utilizado PCR *nested* (porque o DNA após o tratamento com bissulfito fica em baixa concentração e rico em regiões com timinas). As regiões utilizadas para o desenho dos iniciadores da primeira reação amplificariam um fragmento de 499 pares de bases (entre os nucleotídeos -1916 e -1578) e não pode ser visto em gel por estar diluído entre diversos outros fragmentos amplificados. Isto ocorre porque nas reações *nested* as temperaturas de anelamento na primeira etapa são pouco estridentes para garantir que, apesar da contaminação com milhões de outros fragmentos, também ocorra a amplificação do fragmento esperado. Na segunda etapa as temperaturas foram aumentando a estringência para então amplificar somente o fragmento de interesse (ver abaixo as condições de PCR utilizadas) de 338 pares de bases. A figura 8 abaixo mostra o DNA no formato dado pelo programa *Methprimer*, (DNA tratado na fita alinhada abaixo) e os iniciadores planejados para as 2 reações de PCR.

```
TGCTCTTAAAGAACTGAAGGCAGTGAGGTCCAGTGAAGAAGGCAGCCGTCCGGCCGCC
| | : | : | | | | | | | : | | | | | | | : | | | | | | | | : | | : ++ | ++ | ++ | : : : :
```


As linhagens celulares em estudo foram crescidas até confluência total em garrafa média, destacadas com tratamento com tripsina, concentradas por centrifugação, e digeridas em 4 ml de tampão TES (1M Tris/HCl, 0,5M EDTA e 10% SDS) contendo 100 µg/ml de Proteinase K por aproximadamente 18 horas. No dia seguinte, foi realizada a extração do DNA com 1 volume de fenol/clorofórmio e após a obtenção de uma emulsão homogênea a mistura foi centrifugada a 700 x g por 10 minutos. O processo foi repetido até ser obtida uma fase aquosa transparente livre de proteínas. Depois da recuperação da fase aquosa para um novo tubo falcon o DNA foi precipitado a -20°C por aproximadamente 18 horas com de acetato de sódio 3M (1/10 do volume total), pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto. No dia seguinte, após centrifugação refrigerada a 4°C a 8100 x g por 30 minutos (em centrífuga Hitashi); o precipitado de DNA foi lavado com etanol 70%, seco em estufa a 37°C, ressuspensão em água ultrapura estéril, transferido para tubos de 1,5 ml e armazenado a 6°C ± 2°C. A quantidade e qualidade do DNA obtido foram avaliadas através de leituras em espectrofotômetro e gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo a 0,2 µg/ml, respectivamente.

3.4.4. Tratamento de DNA com Bissulfito de Sódio.

Os DNAs das linhagens quantificados em espectrofotômetro Nanodrop (Instituto Ludwig) e dos tumores primários de mama, quantificados no espectrofotômetro Gene QuantII foram submetidos ao tratamento com o bissulfito de sódio. Este agente promove a deaminação de citosinas não metiladas transformando-as em uracila (que após a reação de PCR são convertidas em timinas), mantendo as citosinas metiladas como citosinas já que o grupamento metila protege contra a primeira etapa da reação de deaminação. O método empregado para tratar o DNA com bissulfito de sódio corresponde a uma adaptação [130]. Inicialmente, aproximadamente 1 µg de DNA genômico foi misturado a 0,5 µg/µL de DNA de esperma de salmão (que atua como um carreador) e a mistura foi desnaturada com 0,3 M de hidróxido de sódio a 50°C por 20 minutos. Após a desnaturação seguiu-se a modificação do DNA com bissulfito de sódio. Nesta etapa, o DNA foi incubado a 70°C durante 3 horas com 500 µL de uma solução alcalina de bissulfito de sódio/hidroquinona (2,5 mM bissulfito de sódio, 350 mM hidróxido de sódio e 125 mM de hidroquinona). Em seguida, foi adicionado às amostras 1 mL de resina (*Wizard[®] PCR Preps DNA Purification Resin*, Promega) e a mistura foi

transferida para uma coluna de purificação (*Wizard Minicolumns*, Promega) através de um seringa de 5 mL. Foi feita uma lavagem das amostras na coluna com 4 mL de isopropanol 80% com o auxílio da seringa. A seguir a coluna foi seca por centrifugação por 3 min a 15900 x g e o DNA foi eluído com 45 µL de água aquecida a 80°C para um tubo tipo *eppendorf* de 1,5 mL novo. A seguir, para completa deaminação do DNA, foi feito um tratamento com hidróxido de sódio 0,3 M, por incubação a 5 min e em seguida foi feita precipitação com acetato de amônio 5 M e 350 µL de etanol absoluto. Na etapa de precipitação do DNA, foi adicionado 1 µL de glicogênio 20 mg/mL e o DNA modificado foi incubado a -20°C por um período de 16 a 20 horas. No dia seguinte, após centrifugação durante 30 minutos a 15900 x g, lavagem com etanol 70% gelado e secagem em estufa a 37°C, o DNA foi ressuspenso em 30 µL de tampão TE (10 mM Tris HCl pH 8,0 e 1mM EDTA pH 8,0). Utilizamos também EpiTect® Bissulfite kit (Qiagen) para o tratamento com bissulfito de sódio dos DNAs das linhagens e DNAs tumorais, segundo protocolo fornecido pelo fabricante.

Para sabermos se o DNA foi eficazmente tratado por esta técnica, realizamos a técnica de *nested*-PCR para a sequencia satélite SATR-1. Esta sequencia foi caracterizada como hipometilada em amostras tumorais de câncer de mama, mas não em amostras normais [131]. Esta característica lhe é conferida pela alta taxa de nucleotídeos T na região analisada, semelhante ao resultado com tratamento pelo bissulfito de sódio. Assim, se as amostras forem eficazmente tratadas pelo composto, apresentarão grandes quantidades de timinas e os iniciadores para a sequencia SATR-1 se anelarão, caso contrário, os iniciadores não serão capazes de se anelarem e, portanto, não haverá a amplificação do fragmento. A reação de *nested* para esta região segue as mesmas condições para o gene *CXCL12* (a ser descrito no item 3.4.5), diferindo apenas nas temperaturas de anelamento sendo 48, 50 e 52°C para a primeira reação e 52, 54 e 56°C para a segunda reação. Os iniciadores utilizados para a amplificação do controle SATR-1 foram: HIPO2 Universal-1 5' GTT ATA TTA TTT TTT GTT TTT TTG, HIPO2 Reverso-1 5' ACA TTT CCT TAT AAT ATT ATT CC, HIPO2 Universal-2 5' TAT AGT GGT GGT GTA TAT TTG e HIPO2 Reverso-2 5' CAC CTA ACC TAT AAT ATT TCT TC.

3.4.5. Reação de PCR *nested* para clonagem da Ilha de CpG 4

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 1x tampão de PCR, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 1 U de *Taq* Platinum (Invitrogen), 8 pmoles de iniciadores e 1 µL de DNA previamente tratado com bissulfito de sódio. As reações *nested* foram realizadas nas mesmas condições utilizando de 1 µL do produto da primeira reação como molde. As reações foram realizadas em condições *Touch Up* com incremento de 2°C na temperatura de anelamento após o primeiro ciclo e com aumento de mais 2°C após o sexto ciclo e seguindo com esta temperatura de anelamento até o final da reação. Os iniciadores utilizados para a amplificação da ilha de CpG 4 do gene *CXCL12* estão descritos a seguir: C12-Universal-1: 5' GTA GTG AGG TTT AGT GAA G, C12-Reverso-1: 5' CCA TAA ATA CCA CAA TAA CTT C e C12-Universal-2: 5' AGG TTT TTG TTG GGT TGG, C12-Reverso-2: 5' CAA ATC CTA AAT CCA ACT AC (ver figura 5 acima). Para a primeira reação a temperatura inicial de anelamento foi 51 °C e para a reação *nested* a temperatura inicial foi 53 °C. As condições de amplificação do fragmento, tanto na primeira reação como na reação *nested*, foram: desnaturação inicial do DNA por 10 minutos a 94°C, seguida por 1 ciclo de desnaturação a 94°C durante 3 minutos, temperatura inicial de anelamento por 3 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos. Cinco ciclos de desnaturação a 94°C durante 3 minutos, segunda temperatura de anelamento por 3 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos. Por fim, 35 ciclos sucessivos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, temperatura final de anelamento por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final da ciclagem, as moléculas foram estendidas por 7 minutos a 72°C. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,2 µg/mL.

3.4.6. Clonagem da Ilha de CpG 4 do gene *CXCL12*.

Os fragmentos amplificados por PCR *nested* foram purificados em gel de agarose 1 % utilizando QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) seguindo as especificações do fabricante. Para a clonagem dos fragmentos, foi utilizado um kit da Invitrogen que contém o plasmídeo pCR2.1®. Esse sistema faz a clonagem de produtos de PCR que possuem adeninas nas extremidades 3' que são adicionadas pela enzima *Taq* Polimerase formando extremidades coesivas durante a reação de amplificação. O vetor linearizado possui timinas nas pontas 3' (também na forma de extremidades coesivas), proporcionando a complementação e ligação. Foram

utilizados aproximadamente 30 ng de produto de PCR e 50 ng do vetor pCR2.1® o que equivale a uma razão molar de 1:3 (vetor:inserto) na reação de ligação, a qual foi realizada segundo as instruções do fornecedor. O produto de ligação foi utilizado para transformação por eletroporação de bactérias *Escherichia coli* (DH10B) eletrocompetentes estocadas em glicerol 15%. Neste processo, foi feita eletroporação em campo elétrico de 4 Ω m 330 μ F em eletroporador (Gibco) de 1,5 μ L do produto de ligação em alíquota de 40 μ L de DH10B eletrocompetente. As células eletrocompetentes foram preparadas conforme protocolo [126]. Após a eletroporação, as bactérias transformadas foram recuperadas em 1 mL de meio SOC [126] em agitador rotatório a 37°C e 120 rpm durante 1 hora e plaqueadas em meio LB agar contendo estreptomicina 20 μ g/ μ L (para seleção da estirpe de *E. coli*), ampicilina 250 μ g/ μ L e canamicina 50 μ g/ μ L (marcas de seleção do vetor), X-gal 25 μ g/ml e IPTG 45 μ g/ml (seleção dos clones por alfa complementação). Para a seleção dos clones a serem sequenciados, foi realizada uma reação de PCR de 16 colônias brancas de cada placa que foram palitadas isoladamente em tubos com os reagentes. As reações foram realizadas em um volume final de 20 μ L contendo 1X tampão de PCR (Invitrogen), 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 1 U *Taq* polimerase (Gibco-BRL) e 8 pmoles de iniciadores específicos para o inserto (da *nested 2*). As condições da reação foram: desnaturação por 5 minutos a 94 °C e em seguida 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, 57°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final da ciclagem as moléculas foram estendidas por 5 minutos a 72°C. Os produtos foram observados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,2 μ g/mL.

3.4.7. Mini-preparação de Plasmídeos

Das 16 colônias selecionadas para a PCR, dez \pm duas colônias positivas tiveram seu DNA plasmidial purificado por mini-preparação realizada com QIAprep® Spin Miniprep kit (Qiagen) segundo protocolo do fabricante. A qualidade e quantificação do DNA plasmidial extraído foi feita visualmente por eletroforese em gel de agarose 1% utilizando como padrão de concentração o vetor circular pGEM® (100 ng).

3.4.8. Reação de Sequenciamento

Para cada fragmento clonado no mínimo oito colônias foram utilizadas. Este número é utilizado porque mesmo em linhagens existe grande heterogeneidade entre as células. Ou seja, algumas células podem ter sofrido metilação nos 2 alelos ou em 1 alelo ou ainda, metilação em um alelo e deleção no segundo alelo e assim por diante [56]. Portanto, a literatura tem mostrado que 8 clones conduz a uma razoável representatividade de alelos. O sequenciamento dos clones foi realizado segundo a técnica de terminação com dideoxynucleotídeos descrita por Sanger em 1977 [132] e modificada por Karger et al. [133] utilizando-se o *Kit Big Dye terminator* (Applied Biosystems) num sistema de 10 μL contendo: 3 μL de Big Dye Terminator v3.0, 1 μL de Tampão Save Money 2,5X (200 mM TrisHCl e 5 mM MgCl_2), 10 pmoles de iniciadores universal ou reverso M13 (Invitrogen) e aproximadamente 250 ng de DNA plasmidial. As condições das reações foram: desnaturação por 1 minuto a 95°C, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos e 60°C por 2 minutos e 30 segundos para anelamento e extensão. Os produtos do sequenciamento foram submetidos à eletroforese capilar no sequenciador automático de DNA ABI 377 (Applied Biosystems).

3.5. ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO ATRAVÉS DO MÉTODO COBRA (COMBINED BISSULFITE RESTRICTION ANALYSIS)

Nesta técnica, o DNA tratado com bissulfito de sódio tem a ilha de CpG do gene *CXCL12* amplificada por PCR *nested* (mesmo produto usado para clonagem) e o produto de PCR é digerido pela enzima *BstU1* que tem como sítio de restrição CGCG. A presença de metilação nos dinucleotídeos CpG preserva o sítio da enzima após o tratamento com bissulfito de sódio, ao passo que a ausência de metilação modifica o sítio enzimático (C é convertido em T após este tratamento), impedindo a digestão.

Para esta análise, 2 μL (~ 30 ng) do produto de PCR *Nested* (descrito no item 4.4.5) purificado por extração do gel de agarose foram digeridos com 10 unidades da enzima de restrição *BstU1* (New England Biolabs), num sistema de reação de 20 μL contendo 1X Neb Buffer 2 (New England Biolabs). A digestão ocorreu a 60°C por 4 horas e o produto de digestão foi revelado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% como descrito no item 3.3.4.

3.6. ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO GENE *CXCL12* EM TUMORES

PRIMÁRIOS DE MAMA PELA TÉCNICA DO TRATAMENTO DE DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO SEGUIDO DE PCR ESPECÍFICO PARA METILAÇÃO (MSP)

O estudo da metilação da ilha de CpG 4 do gene *CXCL12* em DNA de amostras de tumores primários de mama foi feito utilizando-se iniciadores desenhados especificamente para a técnica de MSP (*Methylation Specific PCR*) descrita por Herman et al. em 1996 [65]. O desenho dos iniciadores para a região do DNA em estudo somente pode ser realizado após o sequenciamento da ilha de CpG porque é necessário o conhecimento dos dinucleotídeos importantes no processo de regulação da expressão do gene, ou seja, os dinucleotídeos que se apresentam diferencialmente metilados nas linhagens normal (que expressa o gene de interesse) e tumoral que não expressa o gene. Os iniciadores foram desenhados para a situação metilada (gene silenciado por metilação) e para a situação não metilada (gene ativo) dentro da região rica em CpG e possuem pelo menos um dinucleotídeo CG diferencialmente metilado na sua sequencia.

O estudo da ilha de CpG 2 (que já havia sido previamente estudada em outros trabalhos) para poder ser avaliada em nossas amostras precisou de uma revisão dos iniciadores. Na figura 9 e 10 abaixo está representada a região da ilha de CpG 2 e CpG 4 (respectivamente) do gene *CXCL12* onde estão destacadas as regiões escolhidas para o desenho dos iniciadores. Na Tabela 3 encontram-se as sequencias, temperaturas de anelamento e os dinucleotídeos englobados dos iniciadores para MSP.

```

AAGC CGGGCAGGTGG CGAGCTTGAGCCCCACGCACAGAAAGCAGGACCCCTCGGCTG
: ||| :++ | : || || | ++ | : || | | : : : : ++ | : || | | : | | | : : : : ++ | : |
TAAGT CGGGTAGGTGG CGAGTTTGTAGTTTTTA CGTATAGAAAGTAGGATTTTTTT CGGTG

CCTTGGGC CGCCAC CGCCAGCAGGCCCTC CGCC CGGACTAAGTTGTTTGCTTTTCATG
: : | | | :++ : | :++ : | : | | : : : : ++ : ++ | | : | | | | | | : | | | : | | |
TTTTGGGT CGTTAT CGTTAGTAGGTTTTT CGTT CGGATTAATTTGTTTGTTTTTTATTG

GTTTCATTCAGTTCC CGCCAT CGAAAGGCCCGTCC CGCAGCTTTCCA CGCGCC CCCCCA
| | : | : | | : | | : :++ : | ++ | | | : :++ | :++ : | : | | : : | +++++ : : : |
GTTTTTATTTAGTTTTT CGTTAT CGAAAGGTTT CGTTT CGTAGTTTTTTA CGCGCG TTTTA

CTTTA CGCCTAAGGTCCTCAGTCTCTCCAGTGGGGCCCTGTACAGGGACAATAAG CGGC
: | | | ++ : | | | | : : | | | : : : | | | | | : : | | | : | | | | | ++ | :
TTTTA CGTTTTAAGGTTTTT TAGTTTTTTTAGTGGGGTTTTGTTATAGGGATAATAAG CGGT

CCTCCAGC CGGCGT CGCTCAGGCTG CGGACCTCACTGCAGAC CGGGCCAGCGGTG CGGGG
: : : | | :++ | ++ | ++ | : | | | : ++ | : : : : | | | :++ | : : | ++ | | ++ | |
TTTTTAGT CGGCGT CGTTTAGGTTG CGGATTTTTATTGTAGAT CGGGTAG CGGTG CGGGG

CCCAG CGGAGCCTGAGAAGGTCAAAGGC CGGAG CGCACTG CGCCT CGGGAGCACAGAGGG
: : : | ++ | | : : | | | | | | : | | | : ++ | | ++ : : | ++ : | ++ | | | : : | | | | |
TTTTAG CGGAGTTTTGAGAAGGTTAAAGGT CGGAG CGTATTG CGTTTT CGGGAGTATAGAGGG

```

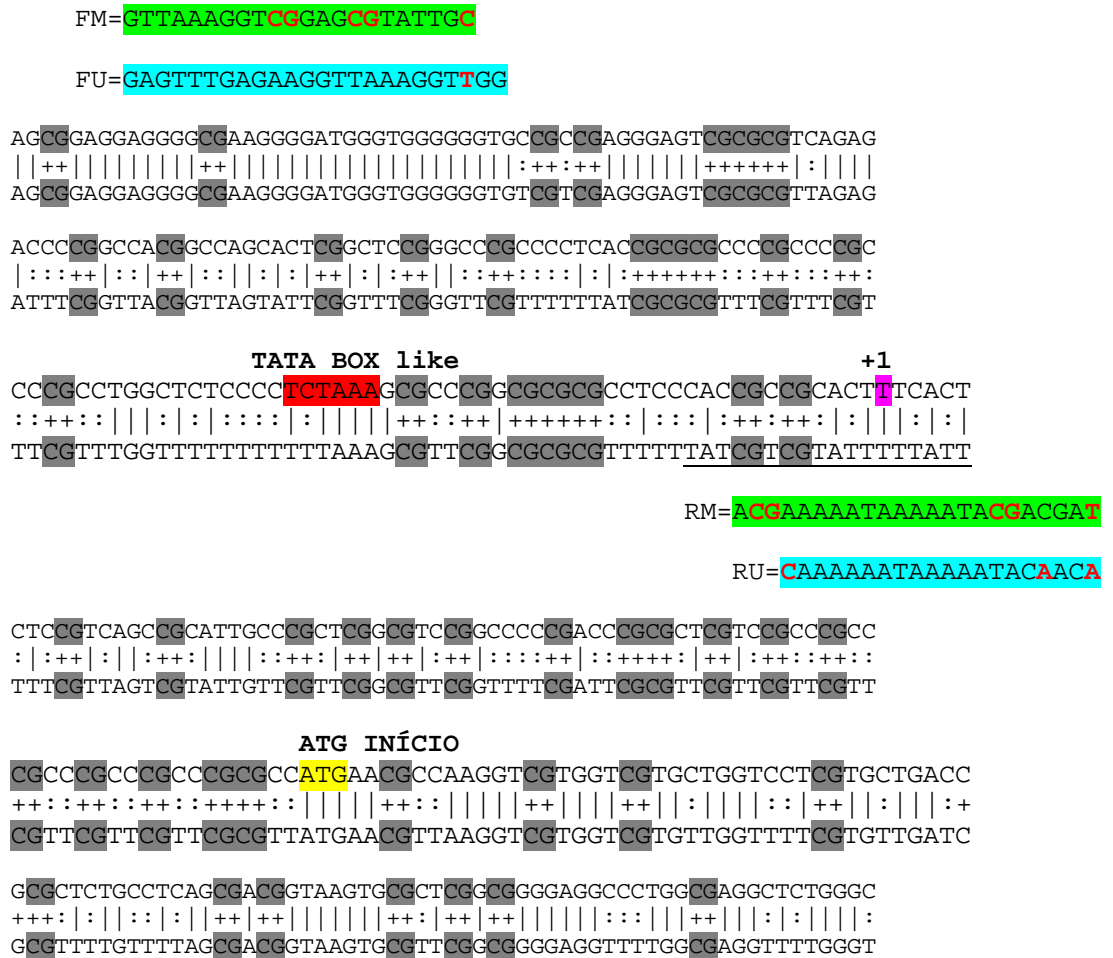
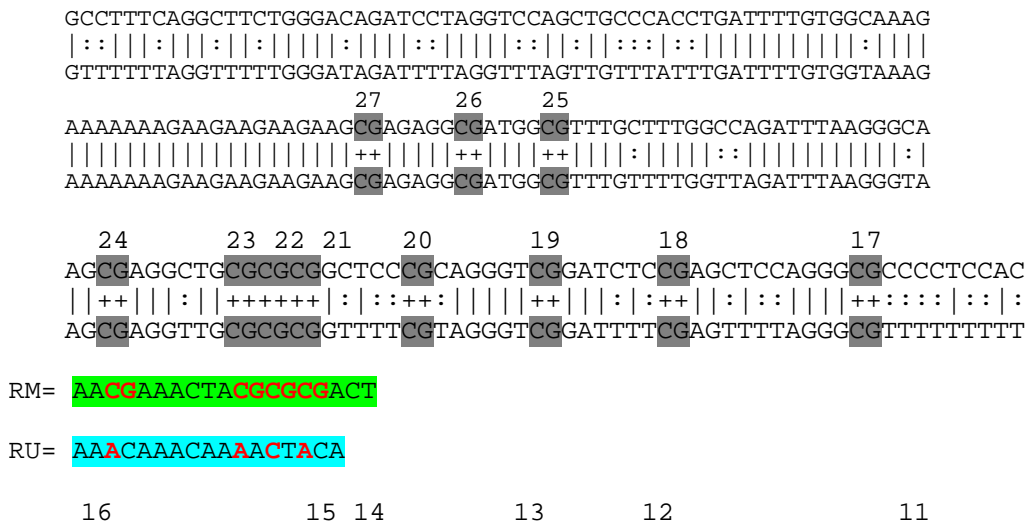


Figura 9. ILHA DE CpG 2 DO GENE CXCL12 AVALIADA POR WENDT et al, 2006 [106].

A região analisada neste trabalho situa-se entre o nucleotídeo -493 ao +168 (destacado em cinza) em relação ao sítio de início da transcrição +1. As regiões coloridas destacadas correspondem a: em verde estão localizados os iniciadores de MSP para condição metilada e em azul para condição não metilada segundo dados coletados da literatura [106] e revisados nesse trabalho. Em vermelho está destacada a região similar a um TATA BOX do gene *CXCL12*. Em rosa o início do gene e em amarelo destaca-se o início do sítio de transcrição (+1) [119]. Em amarelo destaca-se o ATG enquanto os dinucleotídeos CG apresentam-se destacados em toda a sequência em tom de cinza escuro. A linha de baixo contém a sequência de DNA após tratamento com bissulfito de sódio.



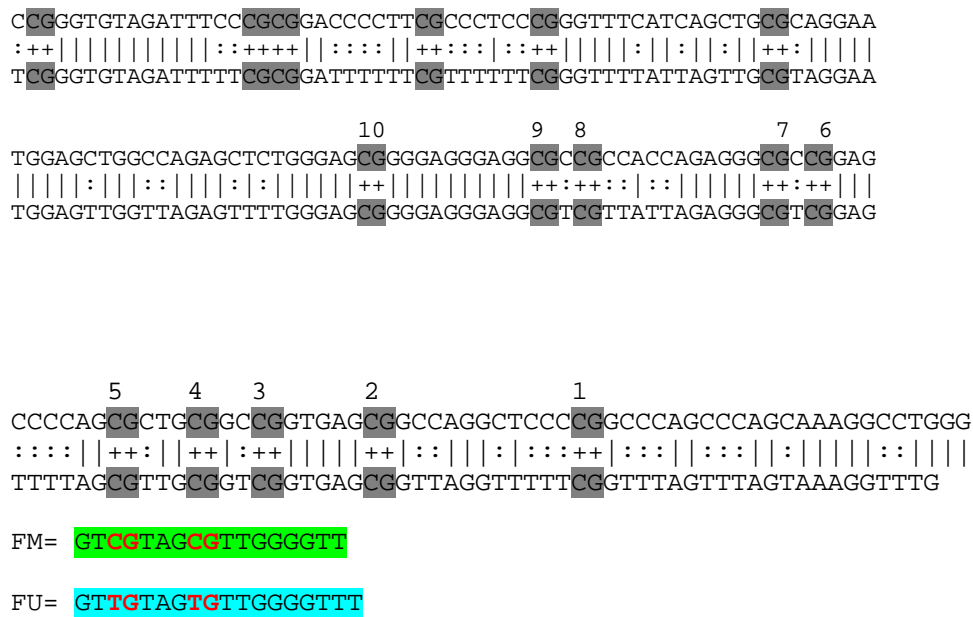


Figura 10. ANÁLISE DA ILHA DE CpG 4 DO GENE *CXCL12*.

A linha de cima representa os nucleotídeos normais desta região e a linha de baixo representa o DNA após tratamento com bissulfito de sódio embaixo de cada região escolhida para o desenho dos iniciadores [129] estão às sequencias dos mesmos sendo que as sequencias em verde correspondem a condição metilada e as em azul, às condições não metiladas. Grifados em vermelho estão sinalizados os dinucleotídeos presentes na sequencia dos iniciadores, considerando a síntese a partir do tratamento com bissulfito de sódio.

TABELA 3 - INICIADORES PARA MSP

Iniciadores	Seqüência 5'-3'	T _m de anelamento (°C)	CpGs	Amplicom (pb)
C12 (4)-MF	GTCGTAGCGTTGGGGTT		4, 5	
C12 (4)-MR	AACGAACTACGCGGACT	64	21, 22, 23 e 24	200
C12 (4)-UF	GTTGTAGTGTGGGGTTT		4, 5	
C12 (4)-UR	AAACAAACAAAATACTACA	57.8	21, 22, 23 e 24	189
C12 (2)-MF	GTTAAAGGTCGGAGCGTATTGC		5 e 6	
C12 (2)-MR	ACGAAAATAAAAATACGACGAT	59.5	33, 34 e 35	237
C12 (2)-UF	GAGTTTGAGAAGGTTAAAGGTTGG		5 e 6	
C12 (2)-UR	CAAAAATAAAAATACAACA	50	33, 34 e 35	249

Nota: O número entre parênteses equivale à ilha de CpG onde anelam os iniciadores. C12: gene de estudo; M: metilado (*forward-F* ou *reverso-R*); U: não metilado (*unmethylated*) tanto para o iniciador universal (ou *forward-F*) quanto para o reverso (R).

As reações de MSP foram padronizadas variando-se a temperatura e o tempo de anelamento, a concentração final de MgCl₂ na reação e o tempo de duração dos ciclos. As reações com os iniciadores U e M foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo solução tampão 1X; 2 mM de MgCl₂ para a ilha 2 e 1,5 mM de MgCl₂ para a Ilha 4; 200 µM de dNTPs; 8 pmoles de cada iniciador (*forward* e *reverso*); 1 U

de *Taq* Platinum (Invitrogen) e 0,5 a 2 μ L de DNA tumoral tratado com bissulfito de sódio. As condições de amplificação foram: 95°C por 10 minutos (para a ativação da enzima), 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, temperatura de anelamento (Tabela 3) entre 16 e 30 segundos e 45 segundos de extensão a 72°C, com uma extensão final de 5 minutos a 72°C. As reações foram realizadas com todas as linhagens e depois como controle da reação na etapa com os tumores foram utilizados os DNAs das linhagens MCF-7 (não metilada) e MDA-MB-435 (metilada). As reações foram analisadas primariamente em géis de poliacrilamida 8% corados com nitrato de prata e posteriormente em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,2 μ g/mL.

3.7. Análise Estatística dos Dados

A análise da associação entre as variáveis qualitativas foi realizada utilizando o programa *Prism 5 for Windows* (GraphPad Prism 5.0) através do teste do qui-quadrado (X^2) ou teste exato de Fischer. Foi estabelecido um erro de 5%, ou seja, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE *IN SÍLICO* DO GENE *CXCL12*

Para analisar a existência de ilhas de CpG na região promotora do gene *CXCL12*, utilizamos ferramentas disponíveis na Internet (descrito em 3.4.1) para analisar a sequência que englobava desde a região promotora até o início do primeiro exon (foram avaliados 2 kb à jusante e 1 kb à montante do início da transcrição do gene). Uma sequência contendo 5677 pb foi obtida e foram identificadas cinco ilhas de CpG como mostrado na Figura 11 exposto em formato de gráfico. Estes dados foram obtidos de acordo com o estipulado por Gardiner e Fromer em 1987 [128]. O gráfico superior (A) mostra a razão entre o número observado e o esperado de dinucleotídeos CpG. Este número é dado pela fórmula:

$$\text{Esperado} = \frac{\text{(número de citosinas x número de guaninas)}}{\text{Comprimento da ilha}}$$

No gráfico (B) está exposto em percentagem, o conteúdo de guaninas + citosinas. E, no último gráfico (C), estão representadas as ilhas de CpG pertencentes à região avaliada. O programa CpGPlot [134] define como ilha de CpG a região com mais de 200 pares de bases que contenham pelo menos 50% de G+C e uma razão entre o observado e esperado igual ou superior a 0,6 [128].

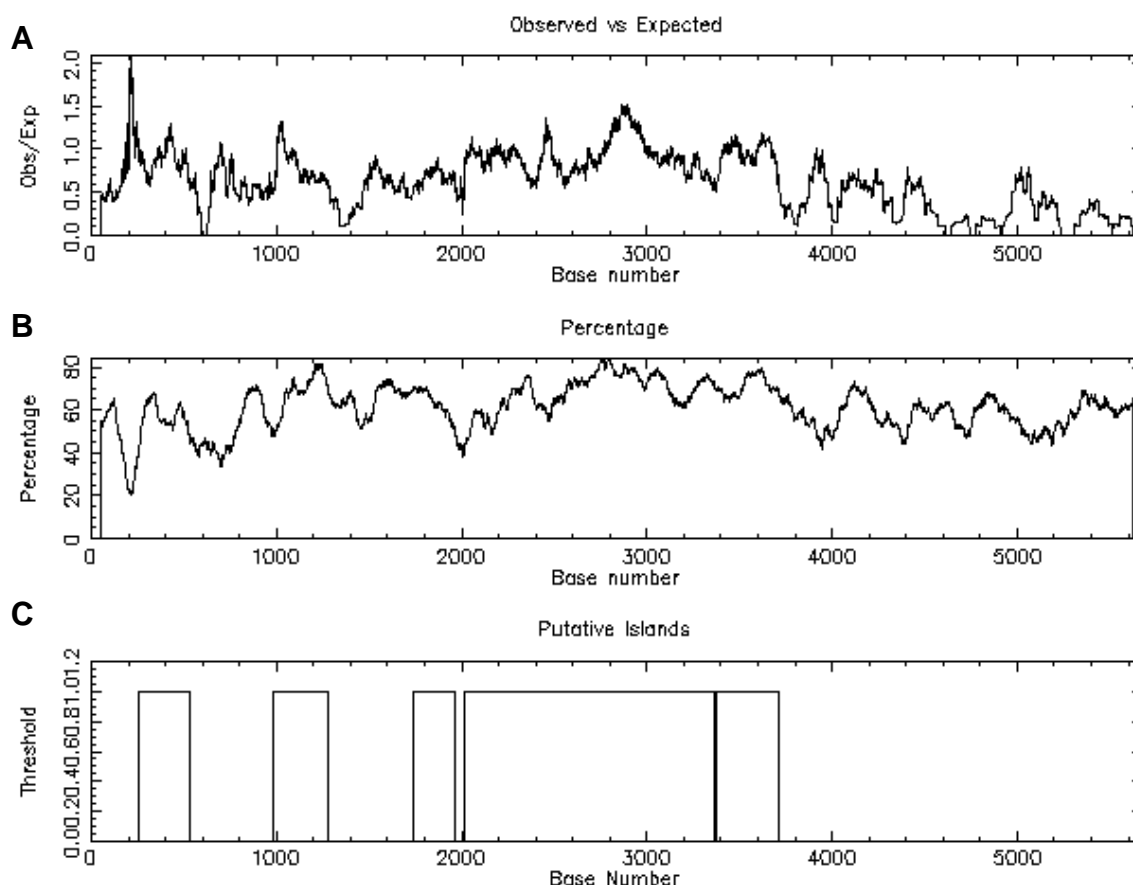


Figura 11. RESULTADO OBTIDO PELO PROGRAMA CpGPLOT .

Fonte: CpGPLOT.

(A) Representa a razão entre o Observado/Esperado da frequência de dinucleotídeos CG; (B) mostra a percentagem de CG na região analisada; e (C) denota a localização das ilhas de CpG dentro da região avaliada.

Nota: Os gráficos são representativos das ilhas de CpG presentes na região promotora (2kb à montante e 2 kb à jusante da região 5' TSS) do gene *CXCL12*. No terceiro gráfico podemos observar a presença das cinco ilhas na região avaliada.

A sequência de DNA de 3447 pb (contida dentro dos 5677 pb) contendo as 5 ilhas de CpG está mostrada na figura 12. Destacamos as posições das ilhas e a densidade de dinucleotídeos CG em cada ilha. Estas ilhas estão localizadas nos nucleotídeos +512 ao +853 para a ilha 1, do -840 ao +506 para a ilha 2, do -1118 ao

-893 para a ilha 3, do -1872 ao -1575 para a ilha 4 e do -2594 ao -2323 para a ilha de CpG 5.

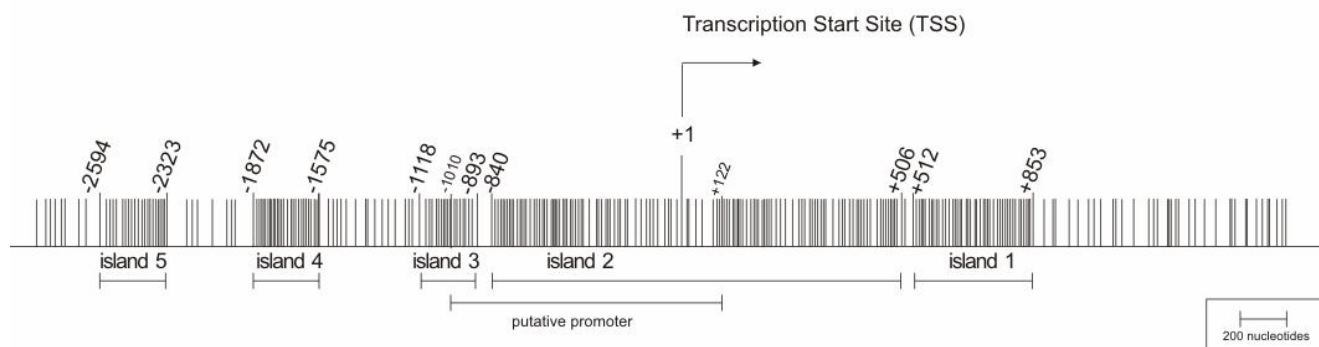


FIGURA 12: ANÁLISE DA REGIÃO 5'TSS DO GENE *CXCL12* E A IDENTIFICAÇÃO DE SUAS ILHAS DE CpG.

Esquema representativo da região 5'TSS analisada. Os traços representam todos os dinucleotídeos presentes nesta região. A numeração acima dos traços mais intensos sinalizam a localização de início e término das cinco ilhas presentes. A região denominada como *putative promoter* sinaliza a localização identificada por García-Moruja [119] com atividade do promotor. O nucleotídeo +1 (início do sítio de transcrição) encontra-se sinalizado na figura.

Nota: O esquema está em escala.

O promotor do gene *CXCL12* não possui uma sequência *TATA box* (sendo portanto considerado como *TATA less*) e esta característica é considerada comum entre as quimiocinas [135]. García-Moruja et al. [119], utilizando vetores construídos com segmentos que variavam da posição -1010 até +122, determinou a posição relativa do promotor e com o uso de ferramentas de bioinformática (TESS e TRANSFAC) foram identificados diversos sítios Sp1 (importantes para transcrição em ilhas de CpG). Wendt et al. em carcinoma de mama [106] utilizando ensaios com vetores contendo a proteína luciferase, concluiu que a posição referente ao nucleotídeo -493 ao +168 e possuía o promotor ativo. A procura de possíveis sítios contendo fatores de regulação da transcrição do gene *CXCL12*, utilizamos duas ferramentas de bioinformática (TESS e MatInspector⁵ [136]) que identificaram todos os prováveis sítios de fatores de transcrição (tabela 7 do anexo). Entre eles, estão oito elementos ERE (elementos responsivo ao estrogênio) (figura 13a) sendo que quatro deles encontram-se dentro do primeiro exon, dois dentro da ilha 2; um a 19 pb a 5' da ilha 4 e um a 5' da ilha 5. Os fatores de transcrição denominados de ERE tem sido descritos como regulatórios da proliferação celular e com capacidade de induzir a transcrição de determinados genes-alvo [137]. A ilha de CpG 4 foi

⁵ Programas disponíveis sob endereços eletrônicos: <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess> e <http://www.genomatix.de/>

escolhida para estudo de metilação em função da presença do sítio ERE contendo o consenso GACC (figura 13b) levando em consideração que dos outros sete sítios, dois estão dentro da ilha 2 que já foi estudada e incluída no nosso trabalho e as demais estão em regiões distantes e com consenso sem a sequência GACC (tabela 7 do anexo) que parece ser essencial para pelo menos um *half site* [138].

A escolha de uma região contendo um ERE teve como suporte também em estudos realizados com estes elementos, mostrando que seriam capazes de controlar a expressão gênica mesmo estando posicionados em até 700 bases de distância de uma ilha [139]. Um outro trabalho tem relacionado que estes elementos ERE poderiam controlar a expressão do *CXCL12* [137].

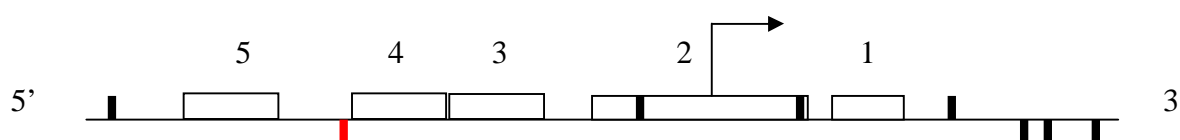


Figura 13a. LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS ERE NA REGIÃO 5'TSS DO GENE *CXCL12* . Região 5' TSS 5'-3'. As caixas representam as 5 ilhas de CpG localizadas pelo CpGPlot (ver números acima das caixas). Os traços em negrito representam a localização das EREs. Traços para baixo significam que estão na fita oposta. O traço vermelho corresponde a ERE localizada a 19 nucleotídeos de distância da ilha 4.

Fonte: a autora.

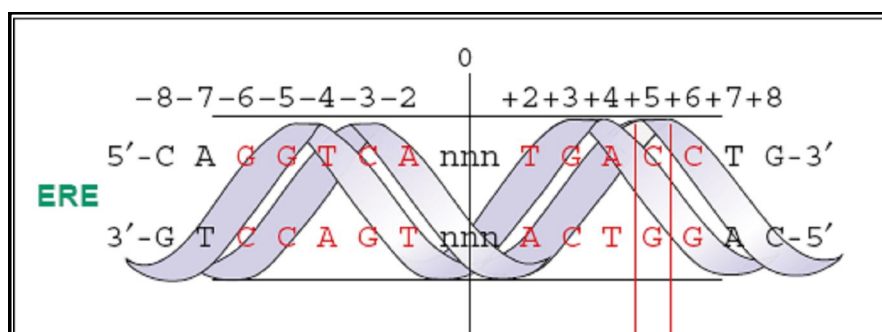
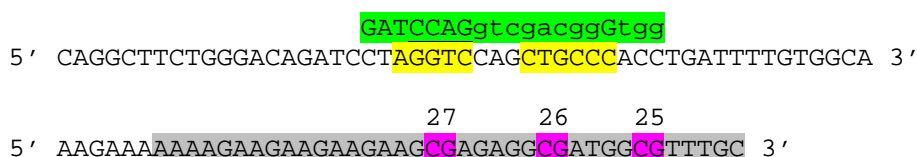


Figura 13b. LOCALIZAÇÃO DO SÍTIOS ERE NA REGIÃO 5' DA ILHA 4.

A sequência acima mostra os dinucleotídeos encontrados pelo programa Genomatix destacada em verde. Em amarelo a região complementar. Em cinza o final da ilha de CpG 4. em cor de rosa os CpG 5' 27, 26 e 25. A figura abaixo da sequência mostra um consenso de ERE e os principais nucleotídeos essenciais para atividade funcional de uma ERE.

Fonte: GRUBER, CJ. et al. 2004 [138]

Ao determinar a presença da ERE provavelmente importante na regulação da transcrição do gene *CXCL12*, e por ainda não ter sido avaliada, realizamos a identificação e análise desta ilha. Como levantamento estatístico populacional, buscamos avaliar ambas as ilhas (ilha de CpG 2 e 4) utilizando a técnica de MSP nas amostras brasileiras, com intuito de correlacionar com os dados das populações americana e chinesa. Com intuito ainda de relacionarmos estes fatores à regulação epigenética deste gene, avaliamos a regulação epigenética do gene *ESR1* (receptor de estrogênio) nestas mesmas amostras.

4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *CXCL12* EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA

Para avaliar o padrão de expressão utilizamos a técnica de RT-PCR. Para isso, o RNA total das linhagens tumorais foi extraído (item 3.3.1), avaliado qualitativamente (por eletroforese em gel de agarose 1%) e quantitativamente (dosagem em espectrofotômetro). Na figura 14 abaixo, pode-se visualizar a eletroforese de RNA de algumas amostras extraídas, com as bandas correspondentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S bem evidentes, tendo a primeira o dobro da intensidade da segunda e ausência de contaminação com DNA genômico.

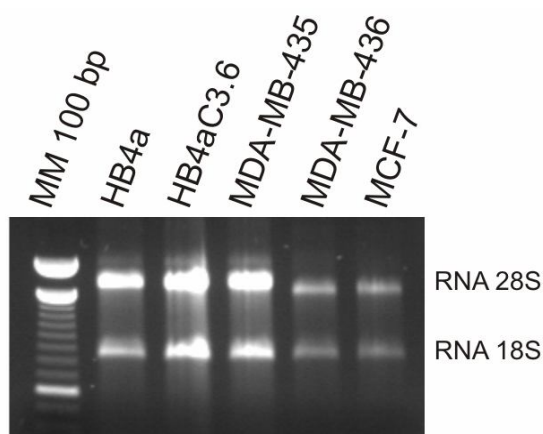


Figura 14 . RNA TOTAL EXTRAÍDO DE LINHAGENS DE MAMA.

MM trata-se do marcador de massa molecular 100 bp. Acima da figura constam os nomes das linhagens a que se refere à banda constante no gel e do lado direito as posições relativas das sub-unidades do RNAr.

As concentrações obtidas mediante a relação entre A260nm e A280nm (DO_{260}/DO_{280}) fornecem uma estimativa da pureza dos ácidos nucleicos. Soluções

puras de DNA e RNA possuem valores de DO_{260}/DO_{280} entre 1,8 e 2. Se existe contaminação com fenol ou proteínas, a relação DO_{260}/DO_{280} será muito menor, e a precisão nas quantidades de ácidos nucleicos será baixa [126]. Sendo assim, sabe-se que essas concentrações medidas (ver tabela 4) são apenas uma estimativa, não sendo preciso o volume da solução de RNA que deve ser usado para conter em torno de 500 ng de RNA para síntese de cDNA. Apesar de algumas das amostras analisadas não possuírem valores de pureza tão elevados, os contaminantes presentes não atrapalharam nas reações subsequentes, sendo possível a continuidade dos experimentos.

TABELA 4 - QUANTIFICAÇÃO DOS RNAS EXTRAÍDOS PELO ESPECTROFOTÔMETRO GENEQUANT II (PHARMACIA BIOTECH)

Linagem	Abs 260nm	Abs 280nm	Concentração (ng/μL)	Razão (260nm/280nm)
HB4a	0,090	0,068	222,9	1,32
MDA-MB-436	0,159	0,098	621,8	1,62
MCF7	0,126	0,084	473,6	1,5
MDA-MB-435	0,147	0,087	560,9	1,69
HB4a C3.6	0,048	0,033	158,0	1,45
PMC42	0,147	0,087	488,5	1,69
MCF7	0,126	0,084	455,6	1,56

Após a quantificação, foram utilizados aproximadamente 500 ng de RNA total em reações de transcrição reversa com iniciadores oligodT, para a síntese de primeira fita de cDNA (item 3.3.2). A eficiência destes cDNAs sintetizados foi avaliada por PCR do gene constitutivo *GAPDH*. Os resultados de RT-PCR do gene de expressão constitutiva *GAPDH* (gliceraldeído 6-fosfato desidrogenase) com 35 ciclos de todas as linhagens mostraram o fragmento esperado de 296 pares de bases como observado na figura 15 que segue:

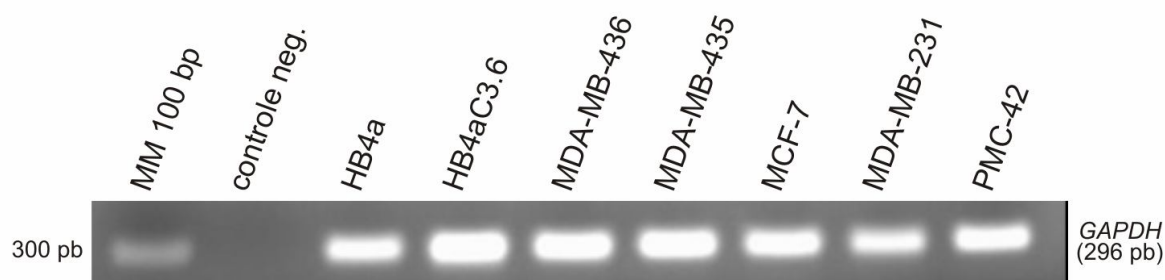
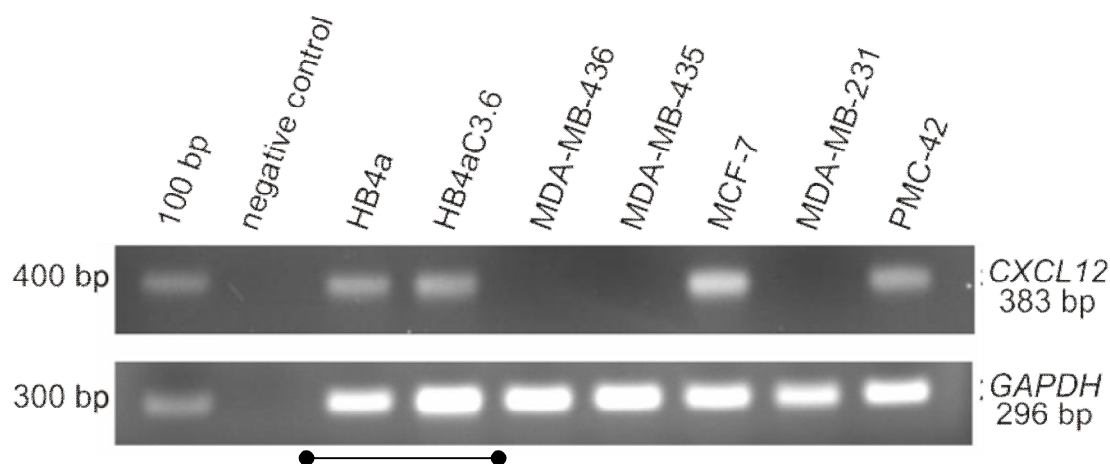


Figura 15. PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE CONSTITUTIVO *GAPDH*.

MM trata-se do marcador de massa molecular 100 bp e à esquerda da figura encontra-se o tamanho da banda referente ao marcador. controle neg. é equivalente ao controle negativo da reação de PCR. Acima da figura constam os nomes das linhagens a que se refere à banda constante no gel. Do lado direito consta o nome do gene e o tamanho do fragmento esperado.

A partir deste resultado pode-se concluir que o cDNA sintetizado possuía boa qualidade, porque não visualizamos uma banda que correspondesse a contaminação da preparação com DNA genômico, e quantidade, porque a banda obtida está bem visualizada em gel de agarose.

Uma vez constatada qualidade e quantidade adequadas de cDNA, este foi utilizado como molde em reações de RT-PCR para o gene *CXCL12* (item 3.3.3) com intuito de avaliar seu perfil de expressão nas linhagens utilizadas neste trabalho (Figura 16). O fragmento esperado para *CXCL12* era 383 pb e não foi visualizada uma banda de 499 pares de bases que significaria uma contaminação com DNA genômico.

**Figura 16.** RT-PCR DO GENE *CXCL12* E DO GENE CONTROLE *GAPDH* EM LINHAGENS NORMAIS E TUMORAIS DE MAMA.

As bandas correspondentes às linhagens analisadas por RT-PCR estão nomeadas segundo a indicação constante na figura. 100 bp indica o marcador de massa molecular sendo que o tamanho do fragmento correspondente a altura do marcador está sinalizada à esquerda. A seta abaixo da figura sinaliza as linhagens normais. A indicação à direita corresponde ao gene constante na figura e abaixo o tamanho do fragmento esperado.

A partir do RT-PCR podemos concluir que as linhagens HB4a (normal imortalizada por SV40), HB4aC3.6 (derivada da HB4a que expressa grande quantidade de *ERBB2* ou Her2) e PMC42 apresentam níveis basais de expressão do gene *CXCL12*. A linhagem MCF-7 (caracterizada como uma linhagem pouco agressiva) expressa o gene de interesse e que as linhagens MDA-MB-435, MDA-

MB-436 e MDA-MB-231 (caracterizada como altamente agressivas) não expressam o gene *CXCL12*. Os dados encontrados corroboram aos da literatura, sendo que as linhagens tumorais MDA-MB-436 e PMC42, e as normais HB4a e HB4aC3.6 ainda não haviam sido descritas.

Um trabalho recentemente publicado demonstrou que há regulação epigenética do gene *CXCL12* em linhagens de colon e mama [106, 120]. As linhagens por eles avaliadas tratam-se da MDA-MB-435, MDA-MB-231 e MCF-7 também presentes em nosso estudo. Neste estudo realizado em 2007, a linhagem MDA-MB-435 foi tratada com o agente desmetilante 5-aza-2'-desoxicidina (5-aza-CdR) e tornou a expressar o gene *CXCL12*. Com intuito de controlar nossos experimentos e complementar estes dados tratamos em culturas essas linhagens com o agente desmetilante 5-aza-CdR. Esse composto é uma molécula fosforilada, análoga à citosina que é incorporada à fita do DNA durante a replicação. Uma vez incorporada, a DNA metil transferase 1 (DNMT de manutenção de metilação do DNA) forma um complexo inativo com o análogo e permanece ligada ao DNA. O resultado final é a depleção da enzima na célula e, conseqüentemente, desmetilação global do genoma [140]. Quando a linhagem passa a expressar o gene de estudo após o tratamento, há um forte indicativo de que a regulação da expressão desse gene ocorre devido à metilação do DNA. Dentre as linhagens tratadas, apenas MDA-MB-435 e MDA-MB-231 tornaram a expressar o gene de interesse (Figura 17). Esta característica pode ser um indicativo da regulação epigenética do gene *CXCL12* nas linhagens analisadas confirmados nesse trabalho. No entanto, outros mecanismos podem estar envolvidos na regulação epigenética dos genes, como por exemplo, a acetilação ou metilação dos resíduos de lisina das histonas como discutidos no item 1.5.1. Como a linhagem MDA-MB-436 não voltou a expressar o gene *CXCL12* acreditamos que estes outros mecanismos de regulação poderiam estar controlando a transcrição nesta linhagem [43].

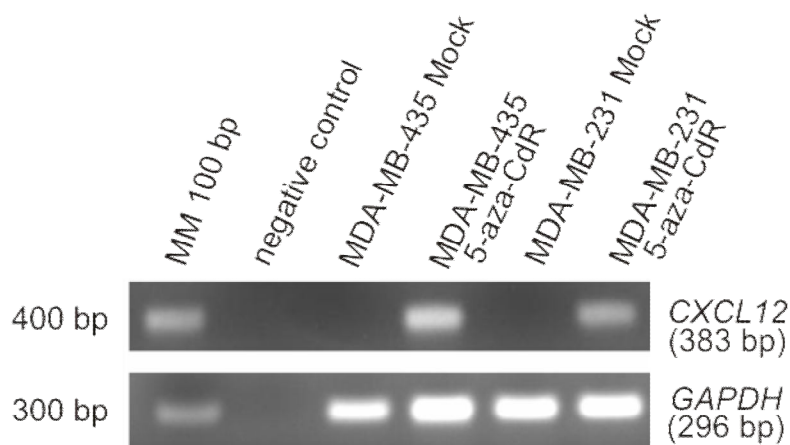


Figura 17. RE-EXPRESSÃO DO GENE *CXCL12* APÓS O TRATAMENTO DAS LINHAGENS COM O AGENTE DESMETILANTE 5-AZA-2'-DESOXICITIDINA.

Estão mostradas as bandas pertencentes às linhagens que voltaram a expressar o gene de interesse (MDA-MB-435 e MDA-MB-231) em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Abaixo está o gene controle *GAPDH*

Nota: MM 100 bp trata-se do marcador de massa molecular com seu tamanho correspondente à esquerda. *Negative control* foi o controle negativo da reação de PCR. *Mock* é uma denominação utilizada em inglês para as linhagens que não foram submetidas ao tratamento. À direita da figura encontra-se o gene *CXCL12* e seu controle *GAPDH* junto ao tamanho do fragmento esperado para esta reação.

4.3 SEQUENCIAMENTO DA ILHA DE CpG 4 DO GENE *CXCL12* DE LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA, ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO E SUA CORRELAÇÃO COM A EXPRESSÃO GÊNICA

A análise do perfil de metilação da ilha de CpG 4 da região promotora do gene *CXCL12* nas linhagens normais e tumorais foi feita através do sequenciamento e confirmado pelo método de COBRA.

Para isto, o DNA das linhagens foi extraído pelo método do fenol: clorofórmio (item 3.4.3) e a qualidade do material purificado foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% utilizando como controle DNA de massa molecular de concentração conhecida. Na figura 18 abaixo, pode ser visualizada a qualidade das amostras extraídas. O DNA das amostras encontra-se íntegro, observamos ausência de degradação, de contaminação por RNA e a correta diluição das amostras.

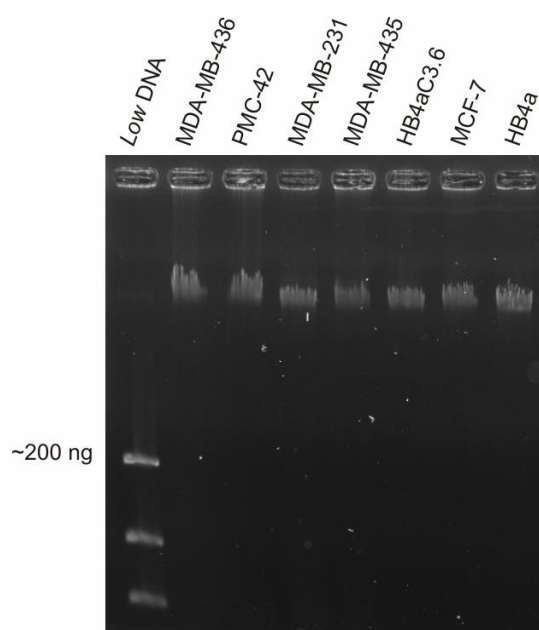


Figura 18. DNA GENÔMICO EXTRAÍDOS DAS LINHAGENS DE MAMA.

Low DNA equivale ao marcador de massa molecular de DNA, onde a banda superior equivale a ~200 ng. Acima da figura estão denominadas as linhagens.

Comparando-se com o marcador de massa molecular podemos concluir que existe pelo menos 200 ng de DNA aplicado em cada *lane*. As amostras de DNA foram a seguir quantificadas por espectrofotometria com leitura de razão 260/280 nm (tabela 5).

TABELA 5- QUANTIFICAÇÃO DOS DNAS EXTRAÍDOS DE LINHAGENS TUMORAIS

Linhagem (amostra)	Concentração (ng/μL)	Razão 260nm/280nm
PMC-42	57,7	1,94
MDA-MB-436	70,4	1,92
MDA-MB-231	90,8	1,89
MDA-MB-435	91,2	1,92
HB4a	112,5	1,93
HB4a C3.6	135,2	1,90
MCF-7	67,5	1,89

Após a quantificação, os DNAs das linhagens foram submetidos ao tratamento com o agente deaminante bissulfito de sódio (item 3.4.4). Como controle

de eficiência do tratamento, foi feita uma reação de PCR *nested* para a região satélite SATR-1[131], da qual se espera um fragmento de 690 pares de bases se o tratamento com bissulfito foi eficiente e se o DNA tratado encontra-se em quantidade suficiente para obter os produtos de PCR. Na Figura 19 pode-se observar a eficiência do tratamento uma vez que todas as amostras amplificaram o fragmento de DNA esperado.

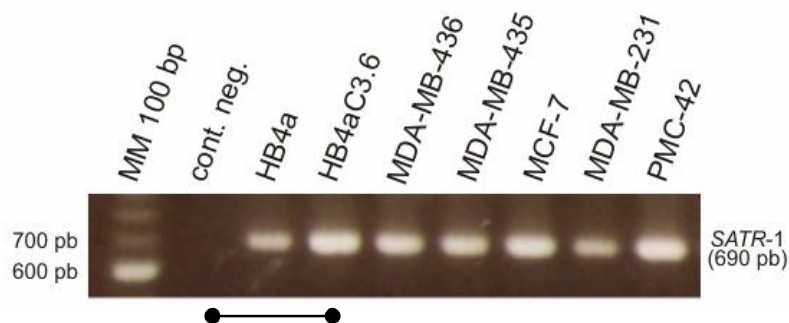


Figura 19. CONTROLE DA EFICIÊNCIA DO TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO - FRAGMENTO DO CONTROLE SATR-1 AMPLIFICADO POR PCR *NESTED*.

MM trata-se do marcador de massa molecular 100 bp e à esquerda da figura encontra-se o tamanho da banda referente ao marcador. cont.neg. é equivalente ao controle negativo da reação de PCR. Acima da figura constam os nomes das linhagens a que se refere à banda abaixo. Do lado direito consta o nome do controle e o tamanho do fragmento esperado.

Uma vez constatada a eficiência do tratamento para o DNA das linhagens, foi realizada a PCR *nested* da ilha de CpG 4 do gene *CXCL12* com intuito de se isolar e purificar o fragmento. A Figura 20 mostra o fragmento de DNA esperado contendo 338 pares de bases.

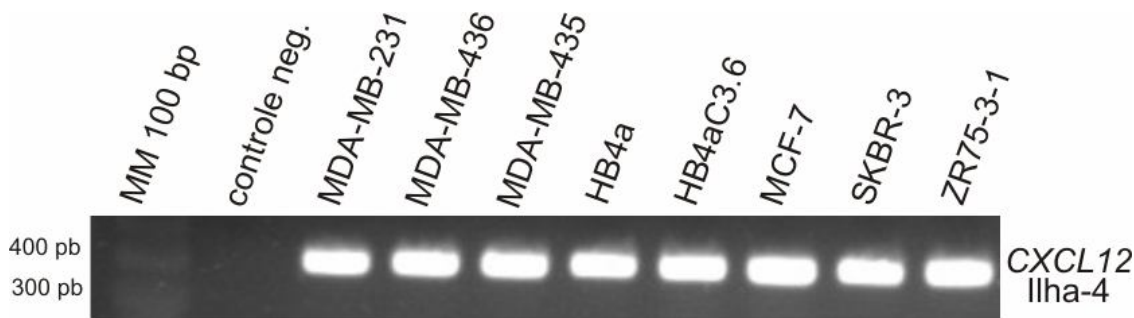


Figura 20. ILHA DE CpG 4 DO GENE *CXCL12* AMPLIFICADA POR *NESTED*-PCR.

MM trata-se do marcador de massa molecular 100 bp e à esquerda da figura encontra-se o tamanho da banda referente ao marcador. Controle neg. é equivalente ao controle negativo da reação de PCR. Acima da figura encontram-se denominadas as linhagens utilizadas na reação. À direita consta o gene e a ilha avaliada.

Após a amplificação do fragmento de DNA de 338 pares de bases, foi feita purificação das bandas provenientes do PCR *nested* em gel de agarose 1% e o

produto de PCR purificado foi submetido à nova eletroforese para verificar a eficiência de purificação e quantificação visual para a etapa seguinte de clonagem. Na Figura 21 abaixo a eficiência da purificação pode ser visualizada:

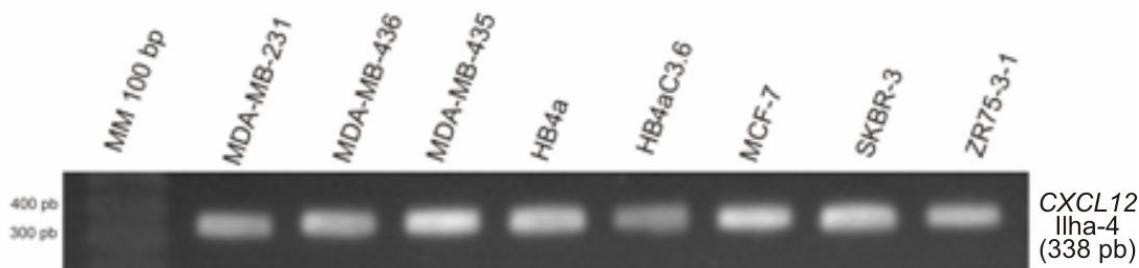


Figura 21. PRODUTOS DE PCR NESTED PURIFICADOS.

MM trata-se do marcador de massa molecular 100 bp e à esquerda da figura encontra-se o tamanho da banda referente ao marcador. Controle neg. é equivalente ao controle negativo da reação de PCR. Acima da figura encontram-se denominadas as linhagens utilizadas na reação. À direita consta o gene e a ilha avaliada.

A partir do fragmento purificado, foi realizada a etapa de clonagem. Para isto, utilizando um ensaio da Invitrogen® que contém o plasmídeo pCR2.1 foi realizada a ligação do fragmento purificado ao plasmídeo sendo posteriormente inserido em estirpe de *E.coli* DH10B (ver item 3.4.6). A Figura 22 abaixo mostra um exemplo de amplificação do fragmento de 338 pb clonado. As bandas foram obtidas por PCR a partir de colônias brancas, ou seja, pela seleção de clones recombinantes por alfa complementação [126].

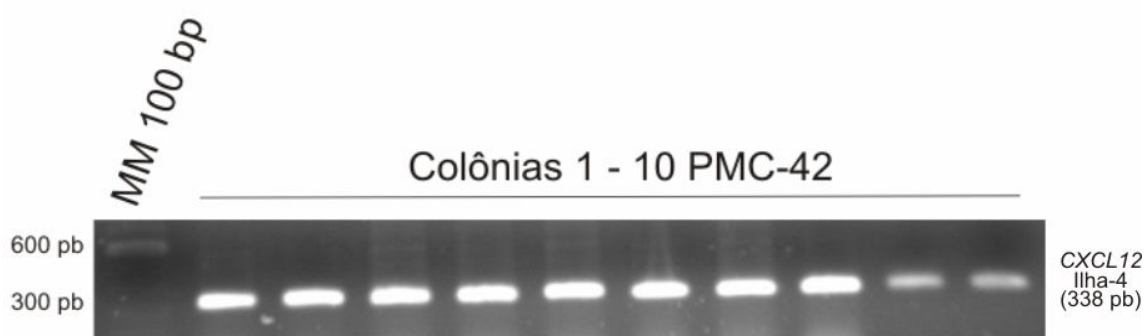


Figura 22. PCR DE COLÔNIA DA ILHA DE CpG 4 DO GENE *CXCL12*.

MM trata-se do marcador de massa molecular 100 bp e à esquerda da figura encontra-se o tamanho da banda referente ao marcador. Acima da figura constam as dez colônias de uma mesma linhagem submetida à clonagem. Do lado direito consta o nome do gene e o tamanho do fragmento esperado.

Após a confirmação da clonagem (através do fragmento esperado amplificado por PCR), os clones selecionados foram cultivados e o DNA plasmidial foi purificado através do método de lise alcalina (item 3.4.7). Na Figura 23 abaixo estão demonstrados alguns exemplos de plasmídeos obtidos a partir da clonagem da Ilha

de CpG 4 da linhagem HB4a em gel de agarose (após a purificação).

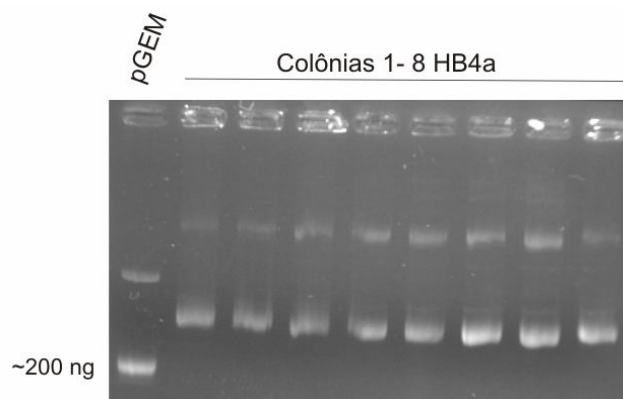
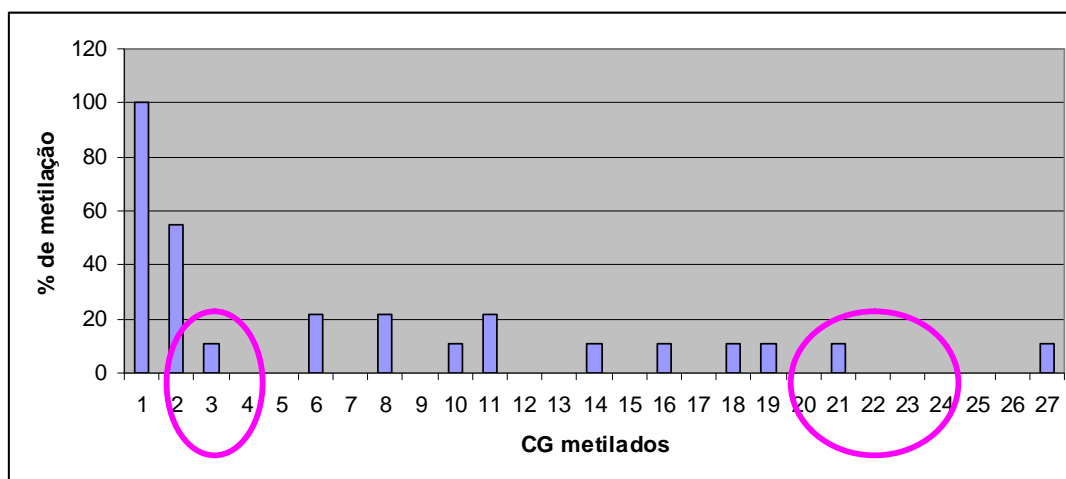


Figura 23. DNA PLASMIDIAL EXTRAÍDO DE 8 COLÔNIAS DE DH10B TRANSFORMADAS. O marcador utilizado foi o pGEM contendo 200 ng. Acima da figura constam as colônias de uma mesma linhagem de onde foi extraído o DNA para o sequenciamento.

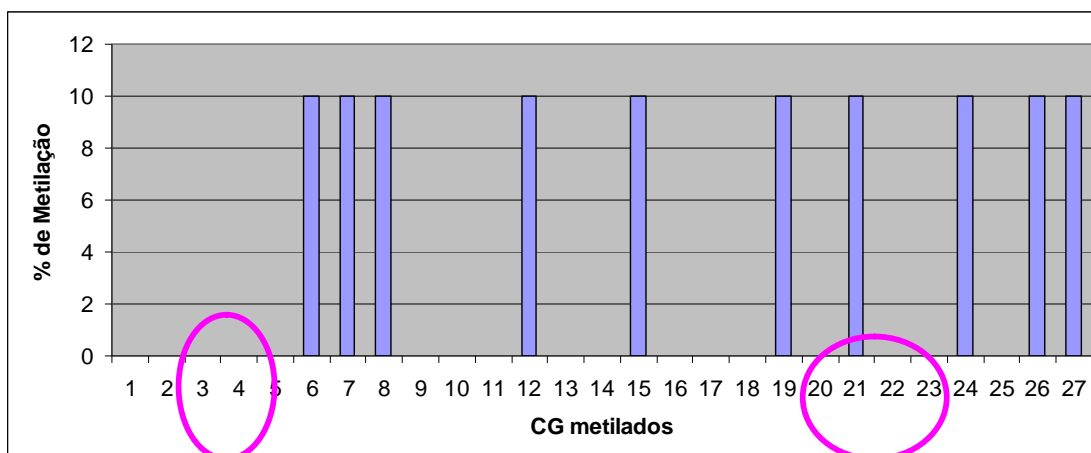
A Figura 23 acima demonstra que o DNA plasmidial de cada colônia apresentava boa quantidade para proceder à etapa seguinte de sequenciamento. As amostras de DNA de 10 ± 2 clones de cada linhagem foi submetido à reação utilizando o protocolo do Kit *Big Dye terminator* e o sequenciador ABI Prism 377 (item 3.4.8). No Anexo, a tabela 8 mostra a situação (metilada ou não metilada) de cada dinucleotídeo CG de cada colônia sequenciada. Esses dados foram utilizados para elaboração dos gráficos da figura 24 abaixo. Os gráficos mostram a percentagem de metilação encontrada para cada dinucleotídeo CG das colônias avaliadas e abaixo de cada gráfico está a percentagem de metilação global da respectiva linhagem. A linhagem MDA-MB-231 foi excluída a partir da etapa de clonagem do trabalho.

A) Percentagem de Metilação – HB4a



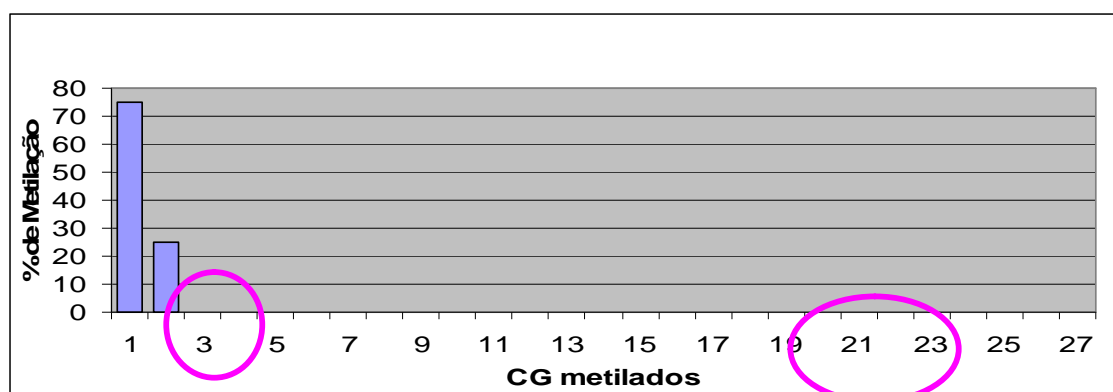
HB4a = 11 %

B) Percentagem de Metilação – HB4aC3.6



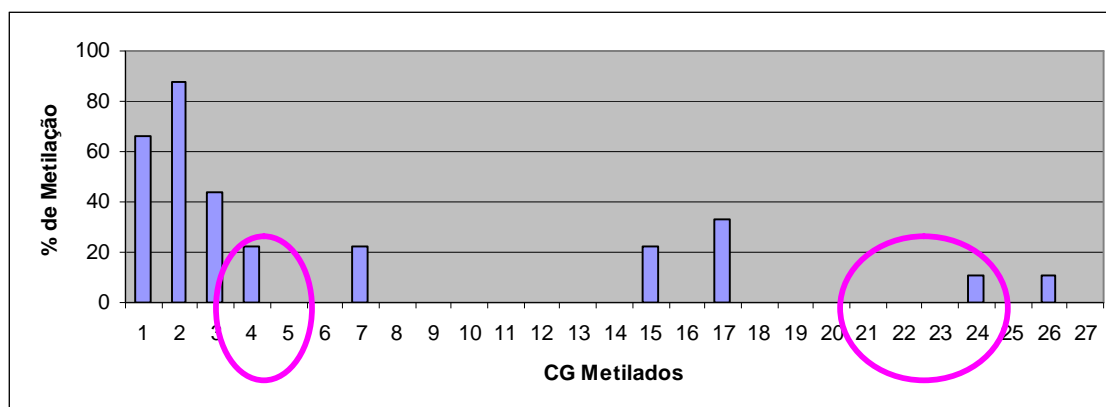
HB4aC3.6 = 4 %

C) Percentagem de Metilação – MCF-7



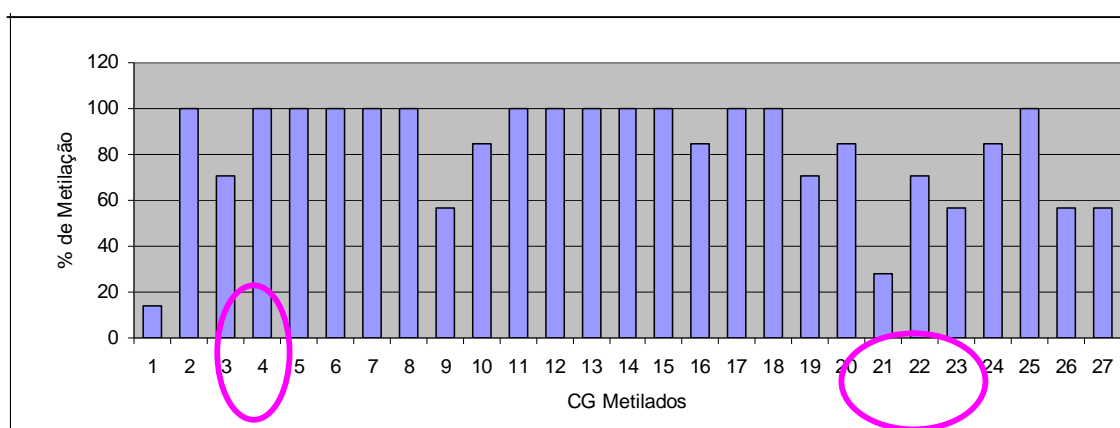
MCF-7 = 5 %

D) Percentagem de Metilação – PMC-42



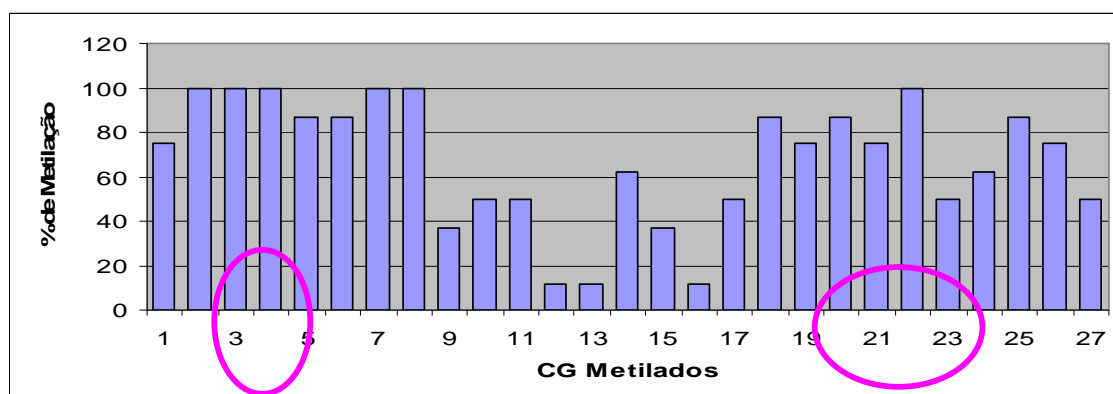
PMC-42 = 12 %

E) Percentagem de Metilação – MDA-MB-435



MDA-MB-435 = 84 %

F) Percentagem de Metilação – MDA-MB-436



MDA-MB-436 = 71 %

Figura 24. GRÁFICOS REPRESENTATIVOS DAS PERCENTAGENS DE METILAÇÃO DE CADA DINUCLEOTÍDEO CpG DAS LINHAGENS CELULARES.

Os gráficos estão enumerados de A – F sendo intitulados com o nome da linhagem a qual pertencem. Abaixo de cada gráfico consta a percentagem de metilação global da linhagem avaliada. As elipses em cor-de-rosa destacam a localização dos iniciadores de MSP (item 3.6).

Todas as linhagens apresentaram um perfil de metilação que corresponde com a expressão gênica. As linhagens que expressam (HB4a, HB4aC3.6, PMC42 e MCF-7) o gene *CXCL12* e as linhagens que não expressam ou tem a expressão diminuída do gene (MDA-MB-436, MDA-MB-435), possuem dinucleotídeos que são diferencialmente metilados e provavelmente regulam o seu silenciamento e são: 4, 5, 9, 10, 12, 13, 21, 22, 23, 24, 25, 26 e 27.

Na figura 25 abaixo é possível avaliar a metilação global de cada linhagem. Relacionando com o perfil de expressão (constante ao lado) podemos também

concluir quais dinucleotídeos seriam relevantes para a técnica de MSP. Apesar de 13 dinucleotídeos CpG demonstrarem relevância para a localização dos iniciadores, utilizando a ferramenta de bioinformática *Oligotech* (que avalia a presença de possíveis homodímeros e nos fornece o valor de T_m) só foi possível planejar os iniciadores que englobam os dinucleotídeos 4, 5, 21, 22, 23 e 24 . No esquema abaixo é possível visualizar a localização destes iniciadores e quais nucleotídeos seriam avaliados tanto para reação de MSP para a situação metilada (M) e não metilada (U).

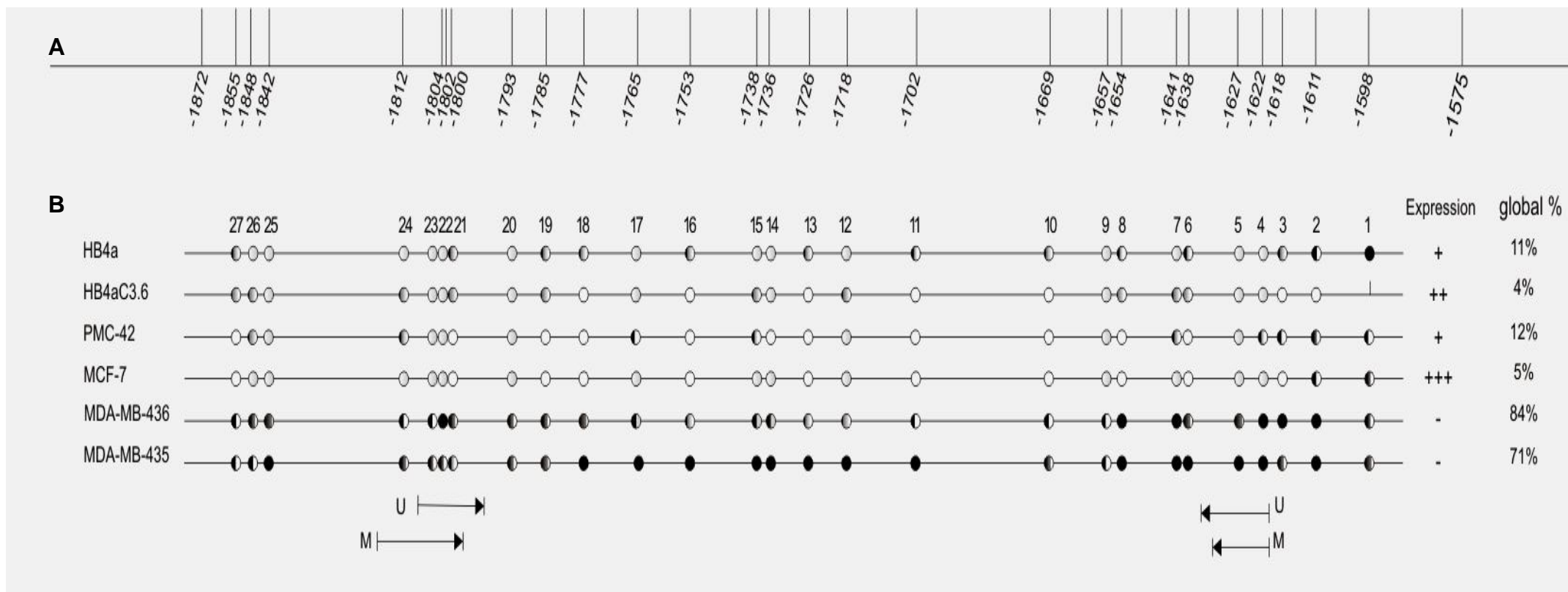


FIGURA 25: PERFIL DE METILAÇÃO GLOBAL DAS LINHAGENS AVALIADAS PARA A ILHA DE CpG 4 DO GENE *CXCL12*.

Em A está representada a localização dos dinucleotídeos ao longo da sequência. Cada traço corresponde a um dinucleotídeo. Em B estão numerados de 27 a 1 os CpG constantes na sequência analisada correspondente às posições em A. À esquerda do esquema constam os nomes correspondentes de cada linhagem, contendo os CpG avaliados globalmente quanto ao perfil de metilação encontrado. Os círculos sinalizam estes CpGs e a percentagem de metilação é dada pela região escurecida. Círculos brancos correspondem aos CpGs 100% desmetilados e o traço corresponde à CGs indeterminados. À direita encontra-se o perfil de expressão da respectiva linhagem juntamente com o valor numérico de metilação global encontrado. Abaixo do esquema estão sinalizadas as posições dos respectivos iniciadores sintetizados, tanto para a reação MSP U (*unmethylated*) e MSP M (*methylated*). Obs: Este esquema está em escala.

Outra técnica utilizada para analisar o perfil de metilação da região promotora dos DNAs das linhagens foi a *Combined Bisulfite Restriction Analysis* (COBRA). Os mesmos fragmentos purificados foram submetidos à digestão com a enzima *BstU1* (item 3.5), que reconhece sítios CGCG e realiza a clivagem. Após o tratamento com bissulfito de sódio, se os dinucleotídeos estiverem metilados, eles permanecerão como CGCG por uma proteção ao tratamento com bissulfito de sódio que o grupamento metil lhes confere. Caso estes dinucleotídeos não estejam metilados, os mesmos serão convertidos à TGTG após o tratamento com bissulfito de sódio e PCR, e a enzima, por conseguinte não reconhecerá, não ocorrendo a clivagem. Os tamanhos de fragmentos esperados podem ser visualizados na figura 26 abaixo.

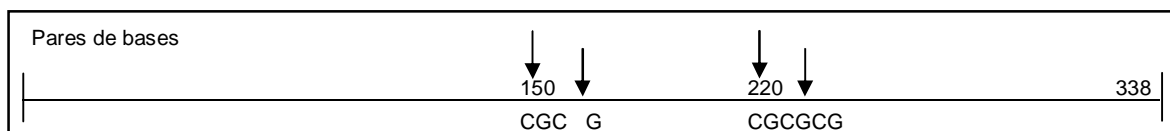


Figura 26. ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS FRAGMENTOS ESPERADOS PARA A TÉCNICA DE COBRA DA ILHA DE CpG 4 DO GENE *CXCL12*.

Nota: Os números constantes acima da linha correspondem ao número de bases presentes na região, e os CGs abaixo sinalizam aonde haverá a clivagem caso os mesmos estejam metilados. Para esta região, esperávamos a ocorrência de fragmentos correspondentes à: 64, 66, 114, 116, 158, 180, 222 e 224 pares de bases.

A Figura 27 a seguir ilustra o padrão de digestão do fragmento da ilha-4 do gene *CXCL12* das linhagens celulares utilizadas neste trabalho.

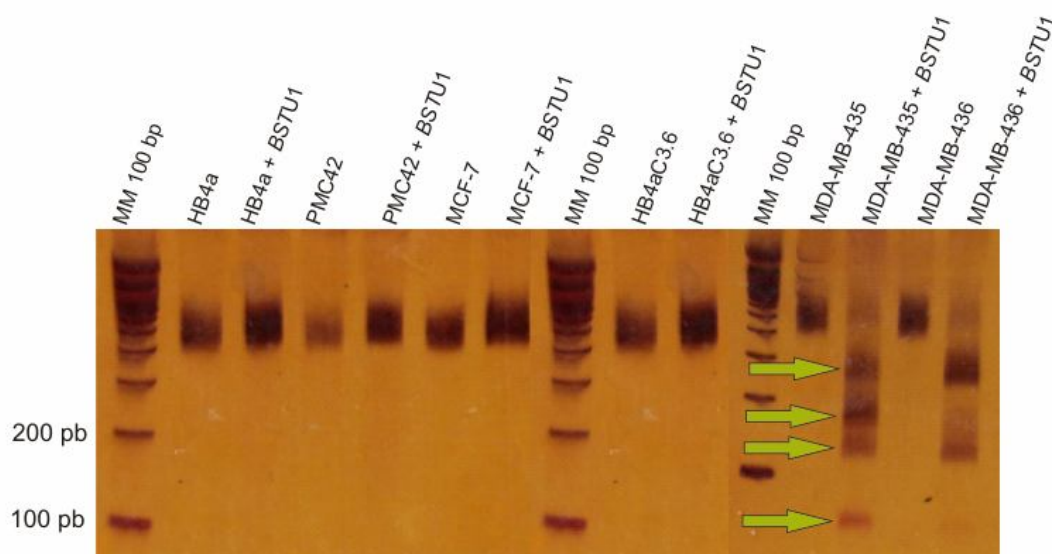


Figura 27. COBRA DA ILHA DE CpG 4 DO GENE *CXCL12*.

As flechas verdes indicam as linhagens que sofreram digestão pela enzima *BstU1*. As linhagens correspondentes às bandas da figura encontram-se intituladas acima. Segue-se o nome da linhagem

sem a digestão e ao lado, a mesma linhagem submetida à reação com a enzima. MM 100 bp trata-se do marcador de massa molecular 100 bp. À esquerda da figura encontram-se enumeradas as bandas correspondentes ao marcador.

As linhagens HB4a, PMC42, MCF-7 e HB4aC3.6, que expressam o gene *CXCL12*, não apresentaram as bandas correspondentes à digestão como já era o esperado. Os dados obtidos pela técnica de sequenciamento também confirmaram estes resultados.

Como visualizado pela técnica de RT-PCR, as linhagens MDA-MB-435 e MDA-MB-436 não expressam o gene *CXCL12*. Portanto, para a técnica de COBRA esperávamos a digestão destas linhagens. E as bandas correspondentes à digestão esperada, através da análise do sequenciamento foram obtidas.

Nesta técnica espera-se que as linhagens apresentem bandas provenientes da digestão desencadeada pela enzima. No entanto, cada linhagem apresentará um padrão particular de tamanhos de fragmentos de acordo com os sítios disponíveis, não possuindo, portanto, um consenso. Embora esta técnica tenha estado de acordo com os dados de sequenciamento, alguns dos dinucleotídeos presentes nos sítios de restrição da enzima *BstU1* não são importantes para a regulação gênica sendo seu uso restrito a uma técnica complementar aos dados de sequenciamento. Em virtude disto, sua utilização tem caído em desuso pela comunidade científica.

4.4 ANÁLISE DA METILAÇÃO EM AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA

4.4.1 *Methylation Specific* PCR (MSP)

A partir da análise do sequenciamento dos DNAs das linhagens tumorais de mama foi possível concluir quais dinucleotídeos da ilha de CpG 4 seriam importantes para o silenciamento do gene *CXCL12*. Sendo assim, os iniciadores desenhados para as reações de MSP poderiam englobar qualquer um destes dinucleotídeos: 4, 5, 9, 10, 12, 13, 21, 22, 23, 24, 25, 26 e 27. No entanto, apenas os dinucleotídeos 4 e 5 (para iniciadores universais) e do 21, ao 24 (para os iniciadores reversos) foram passíveis de construção de iniciadores para a reação de MSP (visualizar figura 25 no ítem acima). A técnica de MSP é importante para o estudo da expressão de um gene em amostras de tumores, já que para estes não se espera fazer a clonagem e

sequenciamento da Ilha de CpG. Para análise de correlação dos dados clínico-patológicos com os resultados de metilação foram utilizados tumores primários de mama do Banco de Tumores do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética. Os DNAs desses tumores foram extraídos pelo protocolo do fenol:clorofórmio pelo Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética e alguns também pelo nosso laboratório (seguindo o mesmo protocolo de extração de DNA de linhagens celulares). A Figura 28 a seguir mostra o aspecto de alguns DNAs tumorais extraídos. Percebe-se que quase todos apresentam um pouco de degradação, ou seja, o DNA possui quebras em pontos múltiplos apresentando um aspecto arrastado no gel, porém observa-se pela banda formada acima do arrastado, que ainda existe DNA genômico íntegro nas amostras. Essa degradação pode ser atribuída à estocagem inadequada das peças tumorais. O ideal é o que se faz no Hospital do Câncer em São Paulo, onde a estocagem das amostras é feita em nitrogênio líquido com material resinoso especial imediatamente após a cirurgia. Por isso, essa degradação observada pode ser devido ao não congelamento das peças tumorais imediatamente após a cirurgia ou ao transporte do hospital ao laboratório, que não foi feito em nitrogênio líquido como recomendado. Provavelmente o conjunto destes fatores acabou atribuindo às amostras a perda de integridade de suas macromoléculas, porém os experimentos demonstraram que a degradação não impediu que a técnica de MSP funcionasse.

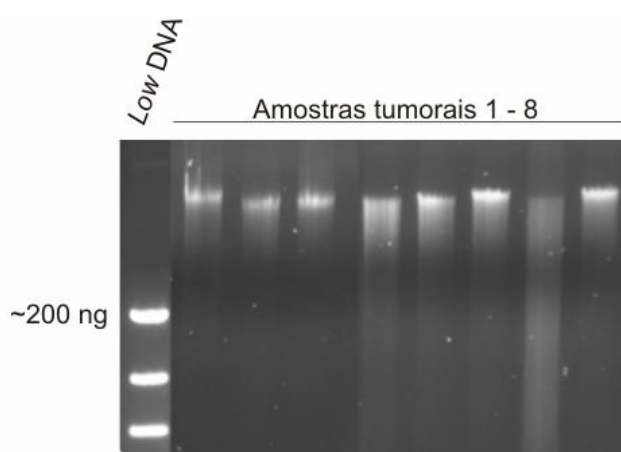


Figura 28. DNAs EXTRAÍDO DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.

Low DNA equivale ao marcador de massa molecular, onde a banda superior equivale a ~200 ng.

Os DNAs extraídos foram então submetidos ao tratamento com bissulfito de sódio. Assim como para o DNA tratado das linhagens, todos os DNAs tumorais

tratados foram submetidos ao PCR controle para a sequência satélite SATR-1 (item 3.4.4). A Figura 29 abaixo mostra o resultado de uma reação padrão para verificação da eficácia do tratamento com bissulfito de sódio de alguns dos tumores analisados. Na foto é possível observar que todos os DNAs foram eficientemente tratados com o composto.

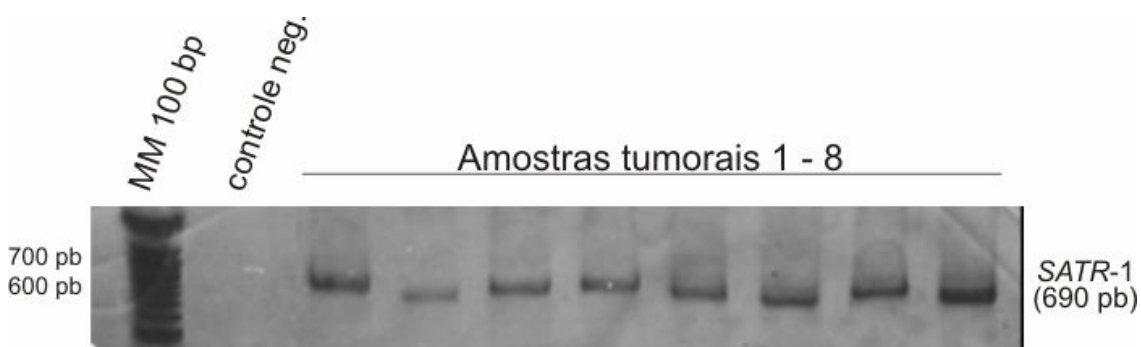


Figura 29. CONTROLE DA EFICIÊNCIA DO TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO - FRAGMENTO DA REGIÃO SATR-1 AMPLIFICADO POR NESTED PCR.

Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. controle neg. é equivalente ao controle negativo da reação de PCR. Do lado direito consta o nome do gene e o tamanho do fragmento esperado. MM trata-se do marcador de massa molecular 100 bp e à esquerda da figura encontra-se o tamanho da banda referente ao marcador.

A partir da eficiência verificada frente ao tratamento com bissulfito de sódio nas amostras tumorais, partiu-se para a padronização da técnica de MSP. Para a padronização é importante salientar a importância da utilização de linhagens, uma vez que se espera que estas sejam homogêneas quanto a característica celular. Estas linhagens, avaliando os dados de RT-PCR e do sequenciamento irão apresentar as bandas correspondentes à condição metilada ou não metilada, ou até mesmo nas duas reações com intensidades distintas dependendo da percentagem de metilação dos CpG abrangidos pelos iniciadores.

Os DNAs das amostras de tumores primários de mama tratados com bissulfito de sódio foram então submetidos às reações de MSP para as condições U (*unmethylated*) e M (*methylated*) em ambas as ilhas. Para a ilha de CpG 2, refizemos a análise dos iniciadores, e observamos que os mesmos estavam escritos de modo errado para ambas as reações. Após as correções, tentamos exaustivamente a padronização da técnica, uma vez que a metodologia utilizada pelos autores (do outro estudo) desta ilha não foi disponibilizada [106]. A reação para a condição metilada foi padronizada e igualmente avaliada para as linhagens

em comum e esperávamos uma banda correspondente a um amplicom de 237 pb. No entanto, o padrão entre as linhagens para a condição não metilada não era reprodutível, sendo que a cada reação os controles apresentavam a amplificação de fragmentos diferentes. Partindo disto, consideramos como análise da condição não metilada, apenas os resultados obtidos para a ilha de CpG 4.

Já para a ilha de CpG 4, a padronização da técnica foi congruente aos resultados de RT-PCR e sequenciamento. Esperávamos que as linhagens que não expressam o gene e apresentaram seu sequenciamento com dinucleotídeos desmetilados apresentassem a banda correspondente ao amplicom de 189 pb (HB4a, HB4aC3.6, PMC42 e MCF-7). Enquanto as linhagens que não possuíam expressão do gene e/ou seu sequenciamento com dinucleotídeos metilados apresentassem a banda correspondente ao amplicom de 200 pb (MDA-MB-435, MDA-MB-436 e MDA-MB-231).

As duas ilhas de CpG foram analisadas nesta técnica. Partindo do pressuposto que as linhagens MDA-MB-231, MDA-MB-435 e MCF-7 coincidiam entre nossos trabalhos, consideramos seus dados de expressão e de MSP como controle adicional em nossas amostras. Os resultados por nós encontrados coincidem com os dados (quanto ao perfil de metilação de cada linhagem) do grupo americano. Na figura 30 abaixo pode ser visualizada a padronização da técnica de MSP para as condições U e M nas linhagens normais e tumorais.

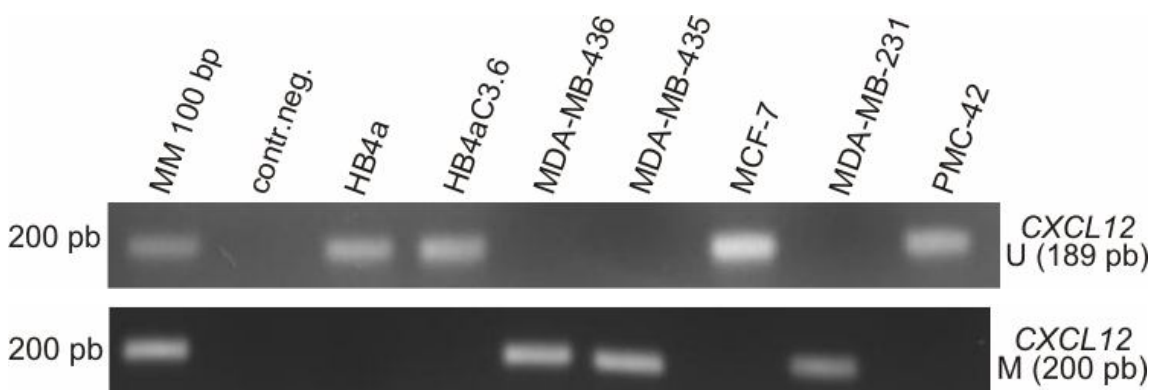


Figura 30. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA MSP REAÇÃO NÃO METILADA (U = UNMETHYLATED) E METILADA (M = METHYLATED) NAS LINHAGENS NORMAIS E TUMORAIS DE MAMA.

Acima da figura constam as linhagens das bandas correspondentes no gel. MM 100 bp é o marcador de massa molecular 100 bp e à esquerda é mostrado o tamanho correspondente à sua banda. Contr.neg trata-se do controle negativo da reação de MSP. À direita é mostrado o gene de interesse e o tamanho do fragmento esperado. U trata-se da reação *unmethylated* e M trata-se da reação *methylated*.

Para a ilha de CpG 2 o padrão de metilação encontrado foi o mesmo da ilha de CpG 4. A padronização para o gene do receptor de estrógeno também foi executada (pela aluna de iniciação científica Simone Foggatto) e pode ser visualizada na figura 31 abaixo.

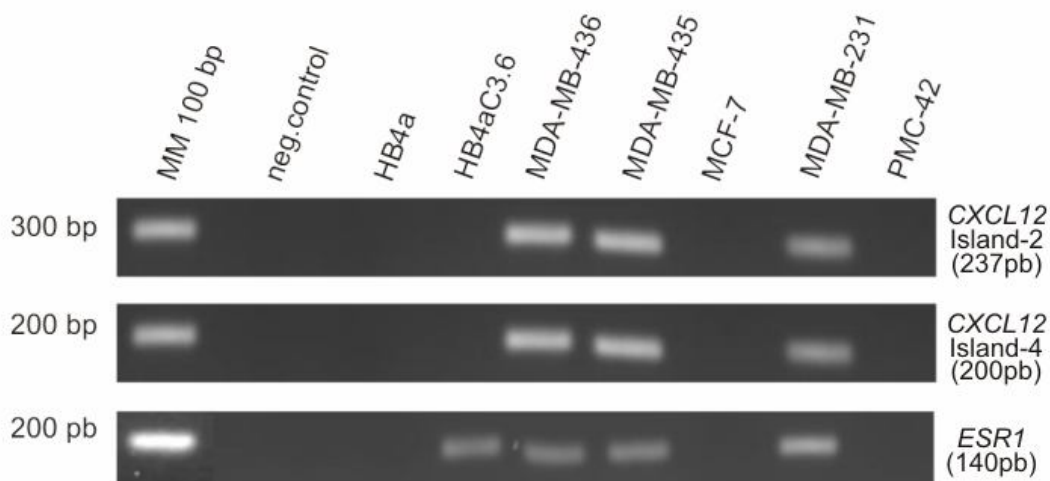


Figura 31. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA MSP REAÇÃO METILADA (M = METHYLATED) NAS LINHAGENS NORMAIS E TUMORAIS DE MAMA PARA OS GENES *CXCL12* E *ESR1*.

Acima da figura constam as linhagens das bandas correspondentes no gel. MM 100 bp é o marcador de massa molecular 100 bp e à esquerda é mostrado o tamanho correspondente à sua banda. Contr.neg trata-se do controle negativo da reação de MSP. À direita é mostrado o gene de interesse e o tamanho do fragmento esperado.

As linhagens MDA-MB-436, MDA-MB-435 e MDA-MB-231 estão metiladas em ambas as ilhas avaliadas. Isso era de se esperar porque as linhagens de tumor foram coletadas de líquido pleural de pacientes com metástases nos pulmões. E, portanto são células em estágio avançado em termos de potencial carcinogênico e um grande número de alterações de máxima perda de diferenciação celular e de expressão gênica são esperadas.

Confirmados os resultados esperados nas linhagens, foram feitas as reações com as amostras de tumores. Para esta análise utilizamos sempre um controle positivo e um negativo. Para a condição U, a linhagem escolhida foi a MDA-MB-435 que apresentava 84% de metilação global (a maior percentagem) como controle negativo. Para a condição M, a linhagem escolhida foi a MCF-7, com 5% de metilação global como controle negativo. O inverso destas condições eram considerados como controles positivos. Estas linhagens também foram escolhidas por coincidirem com o trabalho de Wendt et al.[120].

Todas as amostras de tumores apresentaram resultado positivo para a reação U, sendo, portanto, utilizado como controle positivo para a presença de DNA

nas amostras avaliadas para as duas ilhas. A presença dessa banda se deve à heterogeneidade de células presentes em uma amostra tumoral que sempre possui células normais, ou infiltrado inflamatório (para minimizar isso teria que ser feito uma microdissecção dos tumores por um patologista antes da extração do DNA). Na figura 32 estão representadas as bandas referentes à reação U nas amostras tumorais numeradas de acordo com a tabela 10 presente no anexo:

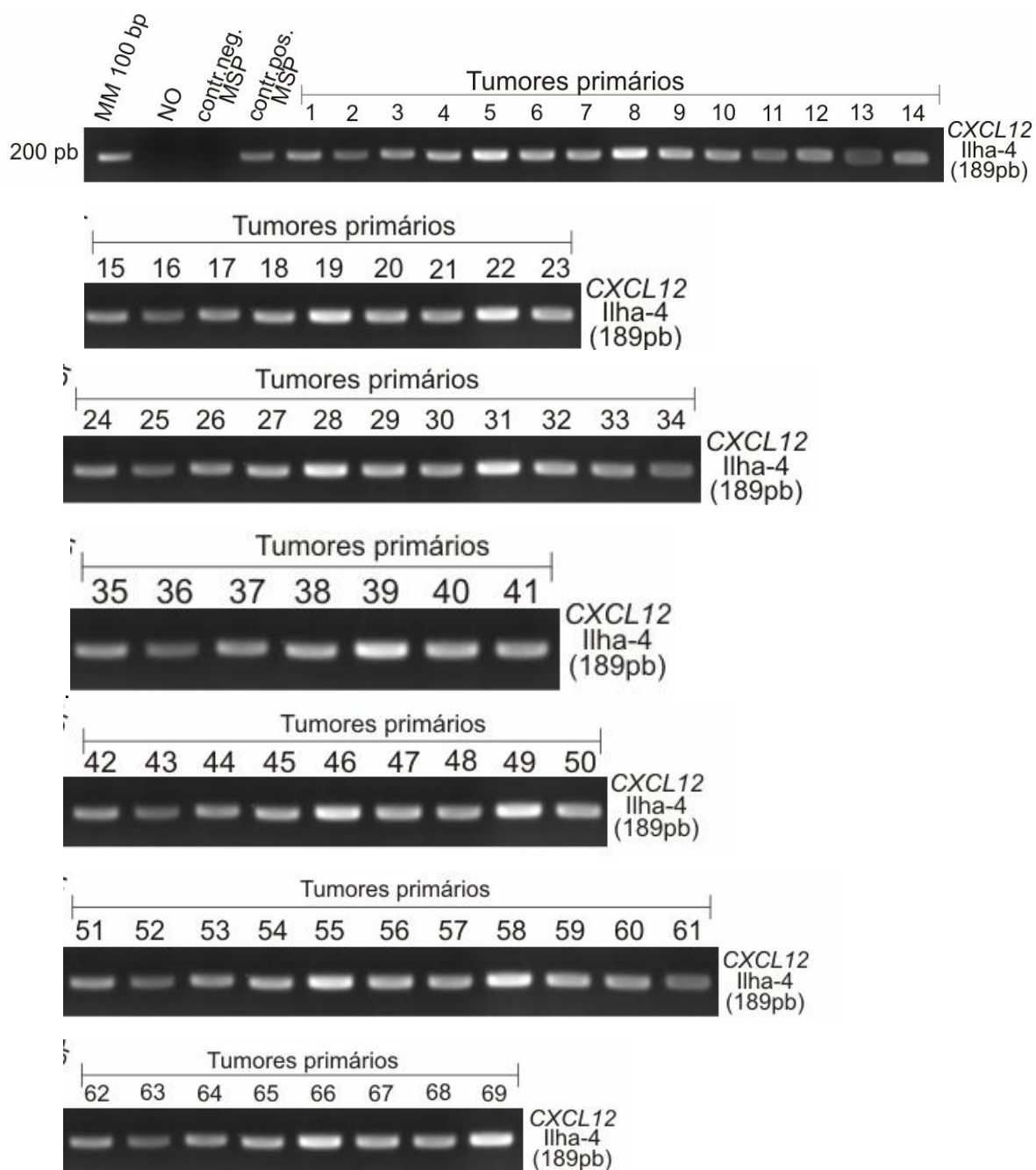
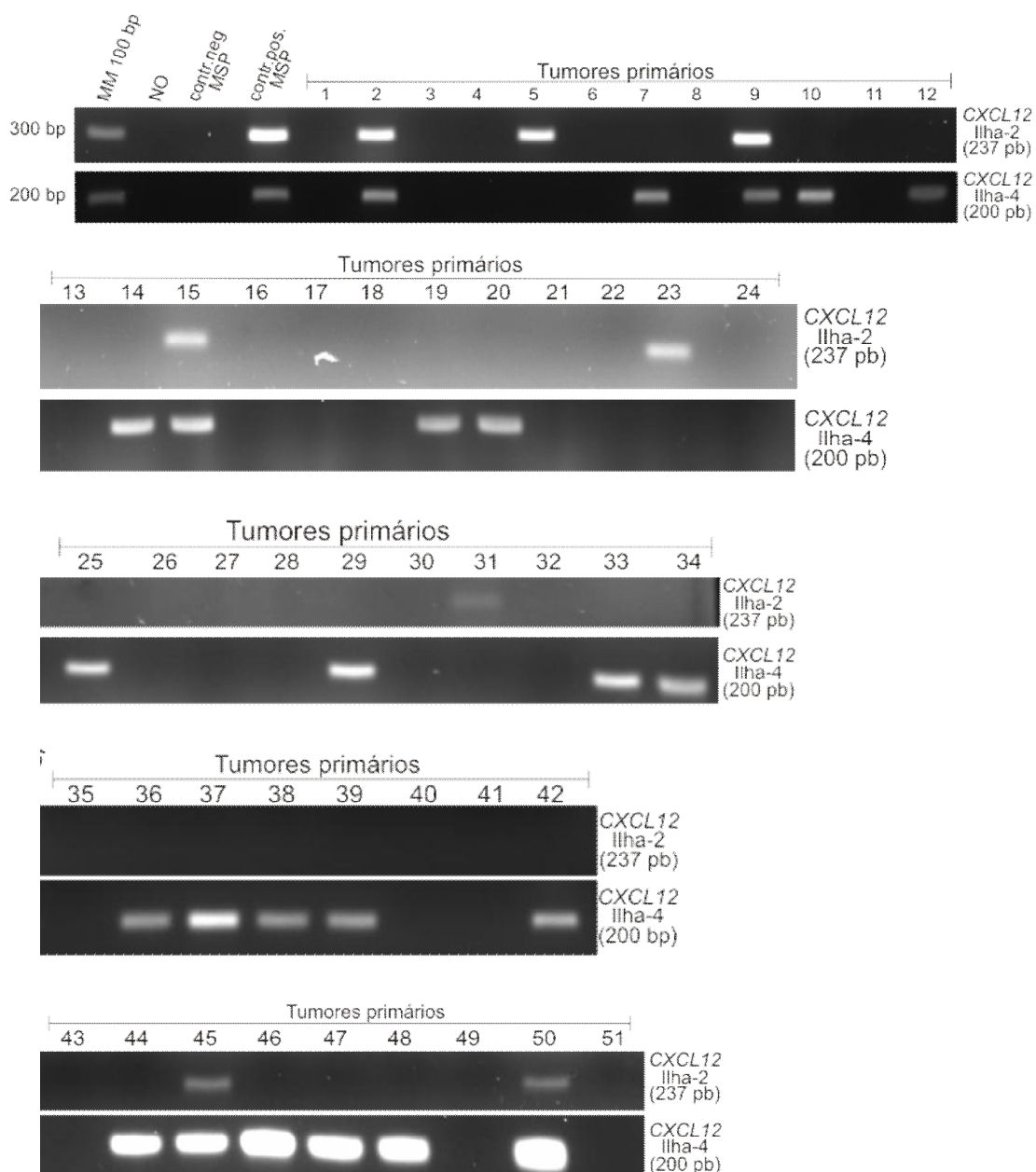


Figura 32. MSP DA REAÇÃO NÃO METILADA DA ILHA DE CpG 4 DO GENE *CXCL12* NAS AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.

MM 100 bp é o marcador de massa molecular e a numeração à esquerda corresponde ao seu tamanho do fragmento. NO é o controle negativo da reação de PCR. Contr.neg.MSP trata-se de uma linhagem que não possui a banda correspondente à condição não metilada. Contr.pos.MSP trata-se de uma linhagem que possui a banda correspondente à condição não metilada. Os números

constantes acima dos géis correspondem ao número das amostras de tumores primários e estes correspondem à tabela 10 presente no anexo. À direita da figura constam a qual ilha pertence o gel e o tamanho do fragmento esperado.

Nas figuras que seguem, as duas ilhas estão alinhadas uma acima da outra, sendo a ilha de CpG 2 na porção superior e a ilha de CpG 4 na porção inferior da figura⁶. Todas as reações possuíam seus controles e na figura 33 abaixo estão representadas as bandas referentes à reação M nas amostras tumorais numeradas de acordo com a tabela 10 presente no item anexo:



⁶ Os números dos tumores da tese não são correspondentes aos números dos tumores no artigo científico para publicação.

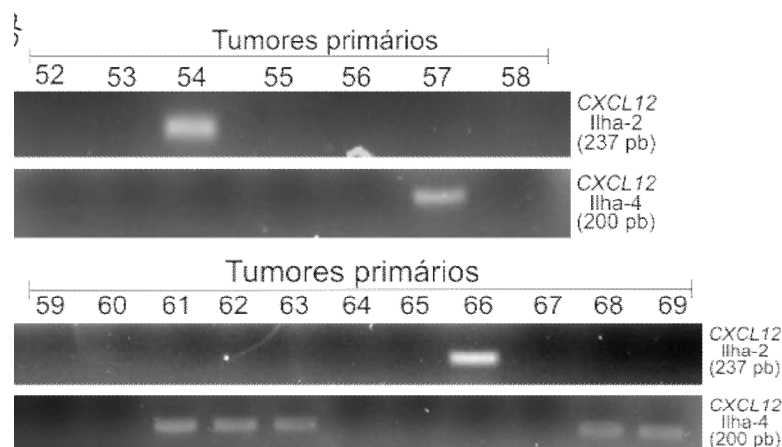


Figura 33. MSP DO GENE *CXCL12* NAS AMOSTRAS 1 A 69 DOS TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.

MM 100 bp é o marcador de massa molecular e a numeração à esquerda corresponde ao tamanho do fragmento. NO é o controle negativo da reação de PCR. Contr.neg.MSP trata-se de uma linhagem que não possui a banda correspondente à condição metilada. Contr.pos.MSP trata-se de uma linhagem que possui a banda correspondente à condição metilada. Os números constantes acima dos géis correspondem ao número das amostras de tumores primários e estes correspondem à tabela 10 presente no anexo. À direita da figura estão nomeados os géis a qual ilha pertencem e o tamanho do fragmento esperado.

Nossos resultados mostram que poucas amostras tumorais apresentaram a ilha 2 metilada do que esperávamos quando comparado com os trabalhos já publicados [120, 141], e o inverso com a ilha 4. Portanto com intuito de aumentar a credibilidade desses dados fizemos sequenciamento por amostragem da ilha 4 de 3 tumores (executada pela aluna de iniciação científica Renata Slowik). Escolhemos os tumores número 6 (nenhuma ilha metilada), 5 (ilha 2 metilada) e 50 (as duas ilhas metiladas). Os resultados do sequenciamento são mostrados na figura 34 abaixo e confirmam os dados de MSP nos permitindo mais confiança no perfil de bandas observado (as bandas não são artefatos de reação de PCR). O tumor número 50 que tem a banda da condição metilada para a ilha 4, apresentou os 27 CG metilados na reação de sequenciamento, ou seja, está mesmo completamente metilada assim como nas linhagens que não expressam *CXCL12*.

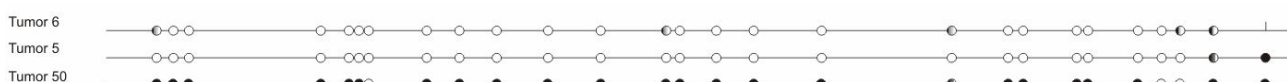


Figura 34. SEQUENCIAMENTO DA ILHA DE CpG 4 DOS TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.

Os números à esquerda correspondem aos tumores CP402 (6), CP408 (5) e CP559 (50) (respectivamente, de cima para baixo) da tabela 10 do anexo.

Nota: Esta figura foi dividida em segmentos para uma melhor análise. O esquema completo poderá ser visualizado no item anexo.

A diferença no padrão de metilação entre as ilhas pertencentes a um mesmo gene já tem sido descrita como característica particular de cada câncer. É sabido

que a regulação epigenética de um determinado gene pode ser mantida ou não de acordo com o tipo celular envolvido e que diferentes gradientes de quimiocinas podem estar atuando nesta progressão tumoral [103].

Analisando os resultados de MSP das amostras tumorais para as duas ilhas, podemos concluir que há diferenças entre a ocorrência de metilação entre elas. Apenas nove amostras, ou 13% mostraram-se metiladas para a ilha 2 enquanto 30 tumores, ou 44% apresentaram metilação para a ilha 4. E ainda, apenas quatro amostras, ou 5,8%, encontram-se metiladas simultaneamente nas duas ilhas e destas, apenas três (4%) apresentaram metilação para ambas as ilhas e para o receptor de estrógeno. O próximo passo seria a avaliação estatística destes dados frente às características clínico-patológicas das amostras dos tumores primários utilizados.

4.4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS CORRELACIONADOS COM A METILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CXCL12* PARA AS ILHAS DE CpG 2 E 4.

Na tabela 10 do anexo encontram-se os detalhes dos dados clínico-patológicos avaliados das pacientes cujos tumores foram utilizados neste estudo e seus respectivos resultados de MSP. Na tabela 6, abaixo, estão mostrados os dados da análise estatística e a correlação entre a metilação e as variáveis clínicas. Para a ilha de CpG 2 os dados estão alinhados na coluna (a) e para ilha de CpG 4, na coluna (b). Dez pacientes apresentavam menos de 45 (14,5%) anos de idade no ato cirúrgico e 59 (85,5%) apresentavam mais que 45. Das 69 amostras tumorais malignas analisadas, 13 (19,7%) foram diagnosticadas com estágio I, 31 (47%) com estágio II, 22 (33,3%) com estágio III e IV. O tamanho do tumor também foi avaliado nas amostras, sendo que 19 (27,6%) foram classificadas como T1 (≤ 2 cm), 36 (52,2%) como T2 (tumor ≥ 2 cm ≤ 5 cm) e 14 (20,2%) como T3 (tumor > 5 cm) e T4 (tumor de qualquer tamanho com extensão para parede torácica e/ou edema, ou ulceração da pele, ou carcinoma inflamatório). Estas mesmas amostras foram classificadas quanto ao grau de diferenciação histológico (SBR), sendo um total de 19 amostras ou 27,6% consideradas de grau I, 36 ou 52,2% como grau II e 14 ou 20,2% de grau III, variando nos tipos histológicos carcinoma ductal invasivo (CDI) - que totaliza 73,9% das amostras - ou carcinoma lobular invasivo (CLI) - totalizando

26,1% das pacientes. Estas amostras foram selecionadas por não possuírem diferentes tipos histológicos associados ao tumor, sendo consideradas como “puramente” invasivas contendo porções *in situ*.

Trinta e cinco amostras tumorais ou 51,5% das pacientes apresentaram linfonodos comprometidos. Além disso, foi verificado que 15 (22,5%) de 67 pacientes apresentaram metástases à distância e que 18 pacientes foram a óbito (26,9%) em decorrência do câncer. Quinze pacientes tiveram recidivas, totalizando 22,4% das amostras. Quanto aos receptores hormonais, 57 (83,8%) de 68 amostras apresentaram positividade para receptor de estrógeno (RE) e 45 ou (78,9%) foram positivas para receptor de progesterona (RP). A expressão de HER2 foi pesquisada em 64 amostras, sendo que 20 ou 31,3% apresentaram resultado positivo.

De modo didático, separamos a análise estatística das duas ilhas de CpG para avaliarmos os resultados obtidos. A frequência de metilação apresentada na ilha de CpG 2 foi de 9 em 69 amostras, totalizando 13 %, contra 40 % e 63 % apresentados por Wendt e Zhou et al. [120, 141] respectivamente para esta mesma região. Dos dados clínico-patológicos avaliados, não obtivemos valores de p significativos para as variáveis: idade ($p=0.3378$), estágio ($p=0.7470$), tamanho do tumor ($p=0.8764$), SBR ($p=0.3899$), acometimento de linfonodos ($p=0.7304$), presença do receptor de progesterona ($p=1.0000$). A ocorrência de metástases ($p=1.0000$), óbito ($p=1.0000$) ou recidiva ($p=0.5255$) também não mostraram valores significativos para p . Apesar de podermos concluir que a ocorrência de metilação nas amostras analisadas para a presença do receptor de fator de crescimento HER2 ($p=0.0587$) e ausência do receptor de estrógeno ($p=0.1130$) apresentar uma tendência à significância do valor de p , seria necessária a inclusão de novas amostras para verificar esta possibilidade. Também não houve diferença estatística entre os tipos histológicos (ductal ou lobular invasivo) incluídos nesta análise ($p=1.0000$).

Os resultados de MSP da ilha de CpG 4 resultou em 30 tumores metilados das 69 amostras ou 44% no total. A análise estatística revelou que a variável idade ($p=0.4958$), estágio ($p=0.0898$), tamanho do tumor ($p=0.6961$), acometimento de linfonodos ($p=0.8116$), presença dos receptores HER2 ($p=0.5902$) ou progesterona ($p=1.0000$), tipo histológico ($p=0.4101$) e recidivas locais ($p=0.1649$) não apresentaram valores de p significativos. No entanto, as variáveis referentes ao receptor de estrógeno ($p=0.0020$), SBR ($p=0.0483$), ocorrência de metástases

($p=0.0212$) e óbito ($p=0.0267$) mostraram resultado estatístico significativo.

Através destes resultados podemos observar que a ilha de CpG 4 é mais frequentemente metilada nas amostras tumorais de pacientes brasileiras, ao contrário da ilha de CpG 2, onde não foi observado nenhum valor significativamente estatístico. Após esta análise e mediante as características das amostras, podemos concluir que há também, além de diferenças entre as populações de células dos diferentes tipos de cânceres existentes (e sua regulação epigenética), diferentes regiões em um mesmo gene sendo reguladas de maneiras diferentes em distintas populações.

4.4.3. CORRELAÇÃO ENTRE A HIPERMETILAÇÃO DA ILHA DE CpG 4 E A HIPERMETILAÇÃO DO GENE *ESR1* E SUAS POSSÍVEIS CONTRIBUIÇÕES AOS VALORES ESTATÍSTICOS.

Em estudo realizado com a hipermetilação do promotor do gene *ESR1*, 28 tumores em um total de 69 amostras apresentaram a região promotora hipermetilada, totalizando 41%. A correlação com os dados clínico-patológicos pode ser visualizada na tabela 6 (dados c) abaixo. A hipermetilação do receptor de estrógeno não foi significativamente relacionada com a idade ($p=0.1838$), presença do receptor HER2 ($p=0.4249$), recidiva ($p=0.3854$) ou tipo histológico ($p=0.7829$). No entanto, os parâmetros estágio ($p=0.0003$), tamanho do tumor ($p=0.0029$), acometimento de linfonodos ($p=0.0288$), presença dos receptores hormonais: estrógeno ($p=0.0065$) e progesterona ($p=0.0072$), a ocorrência de metástases e morte ($p<0,0001$) apresentaram valores significativos de p . Correlacionando os dados obtidos por imunohistoquímica (IHC) e a frequência de metilação entre as amostras (ver figura 35 abaixo), nós vimos que a medida que as amostras apresentaram hipermetilação a quantidade de proteína expressa diminuía, sendo esta relação significativamente estatística ($p < 0,0001$) (ver item 3.1).

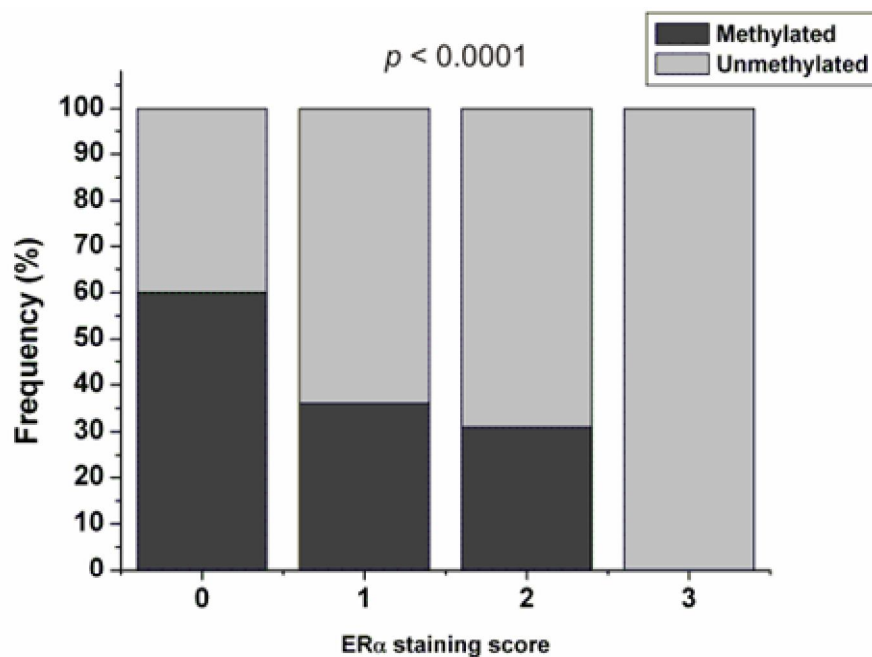


Figura 35: CORRELAÇÃO ENTRE A HIPERMETILAÇÃO DO GENE *ESR1* E A EXPRESSÃO DO SEU RECEPTOR POR IMUNOHISTOQUÍMICA.

As barras pretas correspondem ao número de amostras metiladas do total. *Frequency* está relacionado com a taxa de metilação enquanto 0, 1, 2 e 3 são equivalentes ao escore.

O fato de haverem sítios que poderiam regular a transcrição do gene *CXCL12* na ilha 4, apesar do promotor ser identificado na ilha 2, e de que esta ilha não se mostra relevante em nossas análises, nos leva a investigar se a ilha 4 seria importante para a regulação da transcrição nas amostras brasileiras.

TABELA 6: CORRELAÇÃO DOS GENES *CXCL12* E *ESR1* E OS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DOS 69 TUMORES PRIMÁRIOS:

Variáveis	Amostras (%)	<i>CXCL12</i> metilação ^(a)		<i>P</i> ^a	<i>CXCL12</i> metilação ^(b)		<i>P</i> ^b	<i>ESR1</i> metilação ^(c)		<i>P</i> ^c
		M (%)	U (%)		M (%)	U (%)		M (%)	U (%)	
1) Idade										
< 45	9 (13)	0	10 (100)	0.5578	3 (30)	7 (70)	0.4958	2 (20)	8 (80)	0.1838
≥ 45	60 (83)	9 (15.3)	50 (84.7)		27 (46)	32 (54)		26 (44)	33 (56)	
2) Estádio										
I	13 (19.7)	2 (15.4)	11 (84.6)	0.7470	4 (31)	9 (69)	0.0898	1 (7.7)	12 (92.3)	0.0003*
II	31 (47)	5 (16.1)	26 (83.9)		13 (42)	18 (58)		10 (32.3)	21 (67.7)	
III/IV	22 (33.3)	2 (9.1)	20 (90.9)		13 (59.1)	9 (40.9)		16 (72.7)	6 (27.3)	
3) Tamanho do tumor										
pT1	19 (27.6)	3 (15.8)	16 (84.2)	0.8764	8 (42.1)	11 (57.9)	0.6961	4 (21)	15 (79)	0.0029*
pT2	36 (52.2)	4 (11.1)	32 (88.9)		14 (38.9)	22 (61.1)		13 (36.1)	23 (63.9)	
pT3/pT4	14 (20.2)	2 (14.3)	12 (85.7)		7 (50)	7 (50)		11 (78.6)	3 (21.4)	
4) SBR										
I	19 (27.6)	4 (21.1)	15 (78.9)	0.3890	6 (31.6)	13 (68.4)	0.0483*	2 (11)	17 (89)	0.0012*
II	33 (47.8)	3 (9.1)	30 (90.9)		13 (39.4)	20 (60.6)		14 (42.4)	17 (57.6)	
III	17 (24.6)	2 (11.8)	15 (88.2)		11 (65)	6 (35)		12 (71)	5 (29)	
5) Compr. de linfonodos										
Positivo	35 (51.5)	4 (11.4)	31 (88.6)	0.7304	16 (46)	19 (54)	0.8116	19 (54.3)	16 (45.7)	0.0288*
Negativo	33 (48.5)	5 (15.1)	28 (84.9)		14 (42)	19 (58)		9 (27.3)	24 (72.7)	
6) Receptor de Estrogênio (RE)										
Positivo	57 (83.8)	5 (8.8)	52 (91.2)	0.1130	22 (38.6)	35 (61.4)	0.0020*	20 (35.1)	37 (64.9)	0.0065*
Negativo	11 (16.2)	3 (27.8)	8 (72.7)		10 (90.9)	1 (9.1)		9 (81.8)	2 (18.2)	

7) HER2										
Positivo	20 (31.3)	4 (20)	16 (80)		10 (50)	10 (50)		10 (50)	10 (50)	
Negativo	44 (68.7)	3 (6.9)	41 (93.1)	0.1915	18 (41)	26 (59)	0.5902	17 (38.6)	27 (61.4)	0.4249
8) Receptor de Progesterona (RP)										
Positivo	45 (78.9)	6 (13.3)	39 (86.7)		19 (57.8)	26 (42.2)		16 (36)	29 (64)	
Negativo	12 (21.1)	1 (8.3)	11 (91.7)	1.0000	5 (42)	7 (58)	1.0000	10 (83.3)	2 (16.7)	0.0072*
9) Metástases										
Positivo	15 (22.4)	2 (13.3)	13 (86.7)		11 (10.3)	4 (86.7)		13 (86.7)	2 (13.3)	
Negativo	52 (77.6)	6 (11.5)	46 (88.5)	1.0000	20 (38.5)	32 (61.1)	0.0212*	14 (26.9)	38 (73.1)	< 0.0001*
10) Recidiva										
Positivo	5 (7.5)	1 (20)	4 (80)		4 (80)	1 (20)		3 (60)	2 (40)	
Negativo	62 (92.5)	8 (13)	54 (87)	0.5255	26 (58)	36 (42)	0.1649	24 (38.7)	38 (61.3)	0.3854
11) Morte										
Positivo	18 (26.9)	2 (25)	16 (75)		12 (66.7)	6 (33.3)		18 (100)	0	
Negativo	49 (73.1)	6 (12.2)	43 (87.8)	1.0000	17 (34.7)	32 (65.3)	0.0267*	12 (24.5)	37 (75.5)	< 0.0001*
12) Tipo Histológico										
Carcinoma Ductal Invasivo (CDI)	51 (73.9)	7 (13.7)	44 (86.3)		24 (47.1)	27 (52.9)		20 (39.2)	31 (60.8)	
Carcinoma Lobular Invasivo (CLI)	18 (26.1)	2 (11.1)	16 (88.9)	1.0000	6 (33.3)	12 (66.7)	0.4101	8 (44.4)	10 (55.6)	0.7829

a: corresponde a análise da ilha de CpG 2, b: corresponde a análise da ilha de CpG 4, c: corresponde a análise estatística do gene *ESRI*, *p*: valor de *p* estatístico para os testes de χ^2 e teste exato de Fisher para as duas ilhas de CpG analisadas, M: resultados positivos para a reação metilada (methylated), U: resultados positivos para a reação não-metilada (unmethylated), *: valores de *p* significativos (valores <0.05).

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento e a progressão do câncer de mama são influenciados por propriedades intrínsecas e do ambiente das células tumorais (estroma). Sendo que existem múltiplas moléculas de sinalização entre esses dois ambientes, das quais destacamos as quimiocinas. Muller et al. (2001) [103] mostraram pela primeira vez que as metástases não acontecem ou não são direcionadas ao acaso e que existe seletividade entre as células tumorais e seus alvos.

O câncer é o resultado de diversas alterações genéticas e epigenéticas. Ao contrário da genética, a epigenética envolve mecanismos que modulam a expressão gênica. Nos últimos 10 anos vem aumentando o interesse no conhecimento de como essa modulação pode estar alterada no câncer [57].

Este projeto teve início com resultados de RT-PCR do gene *CXCL12* porque nos mostraram que algumas linhagens tumorais de mama aparentemente perderam a capacidade de expressar esse gene (Figura 16). Além disso, o gene voltava a ser expresso quando tratado com agente desmetilante em cultura (Figura 17). A partir desses resultados propusemos que esse gene poderia sofrer regulação da expressão por metilação da região promotora. Logo em seguida foram publicados os resultados de Wendt et al (2007) [120] revelando os dados que nós já havíamos detectado. A partir disso resolvemos analisar do mesmo modo que esse trabalho amostras tumorais de mama a que tínhamos disposição e verificar se o mesmo perfil de metilação se repetiria. Além disso, incluímos um estudo minucioso das ilhas de CpG desse gene e o perfil de metilação do gene do receptor de estrógeno e buscar a correlação entre os dados obtidos.

A partir da análise das ilhas de CpG identificamos a presença de cinco ilhas na região promotora. A ilha de CpG 2 já havia sido caracterizada como hipermetilada em carcinoma de mama (e colon), sendo considerado como fator de progressão tumoral nas amostras americana [120] e chinesa [141]. No entanto, este gene por possuir uma extensa região considerada como promotora do gene, analisamos quais outras ilhas poderiam influenciar a expressão do gene *CXCL12*.

Nossos resultados mostraram poucos alvos de proteínas fatores de transcrição além da ilha 2 exceto pela existência de um sítio ERE (elemento responsivo ao estrógeno) próximo a ilha 4. Gruber et al. [138] ao analisarem a sequência desses sítios em diversos trabalhos, buscando um consenso comum

encontraram a sequência GGTCAnnnTGACC. Comparando com o ERE próximo à ilha 4 GGcaggctgGACC observamos que existe um provável *half site*. Além disso Lin et al. [137] mostraram por análise de microarray 1243 sítios de ligação para o receptor de estrógeno alfa no genoma humano, e nessa longa lista está presente o gene *CXCL12*. Além disso, nós procuramos identificar outros genes que tivessem um sítio ERE funcional próximo, mas, não inserido em uma ilha de CpG. Nossa busca nos levou aos dados de Watanabe et al. [142] que criaram uma biblioteca de genes responsivos a estrógeno. Entre os vários genes por eles avaliados, destacamos o *PITX2* que possui um ERE posicionado no nucleotídeo -190 ao -205 (a 165 pares de bases da ilha de CpG mais próxima) e esse ERE foi fortemente relacionado com a transcrição deste gene. Sendo assim, podemos concluir que o sítio ERE detectado próximo à ilha de CpG 4 pode estar envolvido na regulação da transcrição do gene *CXCL12* através de uma interação com a ilha de CpG adjacente.

Em busca de uma melhor compreensão de como poderia ocorrer essa interação encontramos os dados de Hall e Korach [121] que em 2003 propuseram um modelo no qual o estrógeno se liga ao seu receptor, e o dímero ativado teria um sítio de ligação no promotor do gene *CXCL12* interferindo na sua transcrição. A proteína produzida teria efeitos autócrinos e parácrinos, ou seja, a quimiocina ligando-se ao receptor na célula alvo do estrógeno, fazendo *feed back* positivo ou então se ligando ao seu receptor em outra célula ativando a via MAPK e conduzindo a proliferação celular. Esse modelo vem corroborar o trabalho de Wendt et al. [120] que mostrou que o silenciamento do gene *CXCL12* está relacionado com maior potencial metastático, ou seja, que as células do tumor primário que silenciam o gene ficam em vantagem seletiva para sair em busca de um local secundário.

A ilha de CpG 4 encontra-se a 565 pb da provável região promotora estudada por Garcia-Moruja et al. [119] e poderia ser especulada quanto a sua influência na regulação da transcrição. Entretanto, Antequera e Bird [50] discutem em sua revisão, que o número de ilhas de CpG que possuem relação espacial com TSS conhecidos nem sempre é óbvia, tendo demonstrado alguns exemplos com novos transcritos iniciando em ilhas de CpG distantes do promotor principal.

Diante dessas evidências parece plausível supor um papel regulatório da ilha 4 na expressão de *CXCL12*. Analisando os resultados de MSP das amostras tumorais para as duas ilhas, podemos concluir que há diferenças entre a ocorrência

de metilação entre elas. Apenas nove amostras, ou 13% mostraram-se metiladas para a ilha 2 enquanto 30 tumores, ou 44% apresentaram metilação para a ilha 4. E ainda, apenas quatro amostras, ou 5,8%, encontram-se metiladas simultaneamente nas duas ilhas.

Wendt et al. (2007) [120] demonstraram que ocorre regulação epigenética do gene *CXCL12* nas amostras americanas por eles avaliadas. No entanto, seu trabalho não fez correlações com os dados clínico-patológico das pacientes, além de que, apenas 15 amostras tumorais foram avaliadas quanto ao padrão de metilação. Já no trabalho desenvolvido por Zhou et al. [141] houve correlação com os dados clínico-patológicos (em relação aos de IHC) das pacientes asiáticas. A provável baixa influência da ilha 2 na regulação do gene *CXCL12* em nossas amostras pode ser explicada pelas diferenças populacionais. Dados do IBGE⁷ mostram que a região metropolitana de Curitiba é composta por 81,7 % de brancos, 1,57% de mulatos, 1,7 % de negros e 0,9% de ameríndios e orientais. Além disso, um estudo populacional para avaliar a variabilidade do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) feito por Braun-Prado et al. (2000) [143] mostrou grande diversidade étnica inclusive quando comparada com a população europeia e africana. Essas diferenças populacionais podem estar causando as diferenças que nós observamos para regiões preferencialmente envolvidas no desligamento do gene de estudo.

Nossos resultados mostraram que a hipermetilação da ilha 4 ocorre também com maior frequência em amostras com ausência da proteína $RE\alpha$ e hipermetilação do gene *ESR1* (ver tabela 6 no item resultados), demonstrando que a distância de um sítio de ligação de proteína ao DNA e uma ilha de CpG pode ser importante. O ERE, nesse caso, localizado a 19 pb da ilha 4 poderia estar influenciando na metilação adjacente e a suposta ligação do receptor de estrógeno ativado, poderia ser atenuada ou até mesmo ausente. Essa sugestão tem suporte em experimentos de Curradi et al. [139] que demonstraram que em torno de 8 até 700 dinucleotídeos metilados podem inibir a região promotora adjacente modificando a estrutura da cromatina. Portanto, a hipermetilação da ilha 4 pode dificultar a ligação de $ER\alpha$ ao seu sítio de ativação no DNA. Por outro lado, diversos trabalhos tem mostrado também o inverso. A ausência da proteína $ER\alpha$ como fator prognóstico devido à falta de ativação de seus alvos. Sabe-se que sessenta por cento dos tumores primários

⁷ Dados disponíveis em: <http://ibge.gov.br>

de mama são ER α positivo e dois terços dos tumores avançados respondem à terapia com anti-estrógenos, como por exemplo o tamoxifen (Novaldex[®]). Entretanto mais de um terço das pacientes não expressam ER α ao diagnóstico. E um terço dos tumores que são positivos ao diagnóstico perdem a expressão de ER α durante a progressão tumoral [33]. Essa perda de expressão significa que as células do tumor de mama não são mais reguladas por estrógeno para seu crescimento e que não há mais resposta à terapia endócrina. Isso resulta em maior agressividade do tumor e pior prognóstico da doença. Isso porque outras vias de transdução de sinal para proliferação são ativadas. Portanto, ER α é um elemento regulatório de crescimento em câncer de mama, e sua expressão são críticas para a progressão tumoral.

O primeiro trabalho a relatar que o gene *ESR1* poderia sofrer inativação de transcrição por hipermetilação em linhagens e tumores primários de mama foi descrito por Lapidus et al.[29]. A partir disto, utilizando a técnica de MSP para tecidos mamários normais e linhagens tumorais que expressam ER α , a região promotora mostrou-se desmetilada, enquanto 35% a 70% dos tumores primários apresentaram a região promotora de *ESR1* metilado [144, 145]. Mirza et al. [146] detectaram que 66% das amostras, em um total de 50, possuíam *ESR1* hipermetiladas e Zhao et al. [147] encontraram 60% de metilação, em 138 tumores, nas amostras da população chinesa avaliada. Portanto, a hipermetilação do gene de ER α é um fator comum visto em diversos trabalhos e populações e que parece ter relevância quanto à resposta ao tratamento hormonal.

Além dos prováveis efeitos sobre o tratamento do câncer de mama, o silenciamento gênico e consequente ausência da proteína ER α , pode ter efeitos em seus diversos genes-alvo de resposta como observado por Leu et al. [148]. Na proposta de um modelo para explicar esse mecanismo, seus experimentos sugerem que o gene do receptor de progesterona (*PGR*), ou outro alvo hipotético contendo um sítio ERE dentro da região promotora e que seja dependente da ligação de ER α , torna-se hipermetilada e silenciada por proteínas repressoras da transcrição na ausência do ativador. Ou seja, quando o gene *ESR1* é inativado e a proteína ER α está ausente, todos os seus genes-alvos são susceptíveis ao desligamento epigenético. Esses dados vem de encontro com os nossos resultados. Aparentemente, o desligamento do gene *ESR1* por hipermetilação e consequente ausência ou diminuição da proteína ER α , é capaz de conduzir ao desligamento do

gene *CXCL12*. E como consequência, a ausência da proteína *CXCL12* sinaliza as vias que conduzem essas células à progressão do tumor para metástases em tumores de grau histológico (SBR) avançados, com RP negativo e na continuidade da doença ao aumento do número de mortes das pacientes.

6. CONCLUSÃO

Apesar de todas estas evidências, não podemos, contudo, afirmar se a hipermetilação da ilha 4 poderia estar envolvida na mudança estrutural da cromatina, dificultando a ligação de $ER\alpha$ ao seu sítio alvo na ativação da transcrição de *CXCL12* ou se, a ausência da $ER\alpha$ devido a hipermetilação da região promotora do gene *ESR1*, frequentemente relacionada com resistência à terapia hormonal, pode contribuir para o silenciamento epigenético do gene *CXCL12*. Entretanto, podemos concluir com os nossos resultados que existe correlação entre a hipermetilação do gene *ESR1* e *CXCL12* na ilha 4 em pacientes que tiveram grau histológico avançado, presença de metástases e morte, e que essa correlação pode ser um fator importante de prognóstico e prevenção no tratamento dessas pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. INCA: **Câncer**. In: *Secretaria de Atenção à Saúde- Disponível em <http://www.inca.gov.br>*. Edited by Saúde Md; 2007.
2. INCA: **Estimativas 2008: Incidência de câncer no Brasil**. In: *Instituto Nacional do Câncer*. Edited by <http://www.inca.gov.br> MdSdBDe. Rio de Janeiro; 2007.
3. Paguirigan A, Beebe DJ, Liu B, Alexander C: **Mammary stem and progenitor cells: tumour precursors?** *Eur J Cancer* 2006, **42**(9):1225-1236.
4. Junqueira LC, Carneiro, J. (ed.): **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.
5. Douglas C: **Patofisiologia geral: mecanismo da doença**. São Paulo: Robe; 2000.
6. Woodward W, Chen, MS, Behbod, F, Rosen, JM.: **On mammary stem cells** *Journal of Cell Science* 2005, **v.118**:3585-3594.
7. Warri A, Saarinen, NM, Makela, SI: **Can modulation of mammary gland development by dietary factors support breast cancer prevention?** *Hormone Research* 2007, **v.168**:248-260.
8. Dimri G, Band H, Band V: **Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models**. *Breast Cancer Res* 2005, **7**(4):171-179.
9. Viana L, Martins, M, Geber, S.: **Ginecologia**. Rio de Janeiro; 2001.
10. Hospital ACC. In: *Departamento de Mastologia* São Paulo; 2006.
11. Filho G: **Bogliolo Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
12. Faria JL: **Patologia especial com complicações clínicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.
13. Page DL, Anderson, T.J.: **Diagnostic histopathology of the breast cancer** *New York: Churchill Livingstone* 1987.
14. Dumitrescu R, Cotarla, I: **Understanding breast cancer risk - were do we stand in 2005?** *Journal Cell Molecular Medic* 2005, **v.9**(1):208-221.
15. Singal R, Ginder GD: **DNA methylation**. *Blood* 1999, **93**(12):4059-4070.
16. Zhang M, Rosen, JM: **Stem cells in the etiology and treatment of cancer** *Current Opinion in Genetics e Development* 2006, **v.16**:60-64.
17. Rose PG: **Endometrial carcinoma**. *N Engl J Med* 1996, **335**(9):640-649.
18. Harris RA, Eichholtz TJ, Hiles ID, Page MJ, O'Hare MJ: **New model of ErbB-2 over-expression in human mammary luminal epithelial cells**. *Int J Cancer* 1999, **80**(3):477-484.
19. Clemons M, Goss P: **Estrogen and the risk of breast cancer**. *N Engl J Med* 2001, **344**(4):276-285.
20. Hall JM, Couse JF, Korach KS: **The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling**. *J Biol Chem* 2001, **276**(40):36869-36872.
21. Murphy MJ, Jr.: **Molecular Action and Clinical Relevance of Aromatase Inhibitors**. *Oncologist* 1998, **3**(2):129-130.
22. Millis RR: **Correlation of hormone receptors with pathological features in human breast cancer**. *Cancer* 1980, **46**(12 Suppl):2869-2871.
23. Ikeda K, Inoue S: **Estrogen receptors and their downstream targets in cancer**. *Arch Histol Cytol* 2004, **67**(5):435-442.
24. Giacinti L, Claudio PP, Lopez M, Giordano A: **Epigenetic information and estrogen receptor alpha expression in breast cancer**. *Oncologist* 2006,

- 11(1):1-8.
25. Fabian C: **Tamoxifen or raloxifene in postmenopausal women for prevention of breast cancer: a tale of two choices--counterpoint.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007, **16**(11):2210-2212.
 26. Rochefort H, Glondu M, Sahla ME, Platet N, Garcia M: **How to target estrogen receptor-negative breast cancer?** *Endocr Relat Cancer* 2003, **10**(2):261-266.
 27. Schiff R, Massarweh S, Shou J, Osborne CK: **Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**(1 Pt 2):447S-454S.
 28. Hopp TA, Weiss HL, Hilsenbeck SG, Cui Y, Allred DC, Horwitz KB, Fuqua SA: **Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(8):2751-2760.
 29. Lapidus R, Fergusson A, Ottaviano Y, Parl F, Smith H, Weitzman S, Baylin S, Issa J, Davidson N: **Methylation of estrogen and progesterone receptor gene in breast tumors.** *Clin Cancer Research* 1996, **2**(5):805-810.
 30. Liu ZJ, Zhang XB, Zhang Y, Yang X: **Progesterone receptor gene inactivation and CpG island hypermethylation in human leukemia cancer cells.** *FEBS Lett* 2004, **567**(2-3):327-332.
 31. Graham JD, Yager ML, Hill HD, Byth K, O'Neill GM, Clarke CL: **Altered progesterone receptor isoform expression remodels progestin responsiveness of breast cancer cells.** *Mol Endocrinol* 2005, **19**(11):2713-2735.
 32. Arpino G, Bardou VJ, Clark GM, Elledge RM: **Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome.** *Breast Cancer Res* 2004, **6**(3):R149-156.
 33. Yang X, Yan L, Davidson NE: **DNA methylation in breast cancer.** *Endocr Relat Cancer* 2001, **8**(2):115-127.
 34. Varmus H, Weinberg R: **Genes and the biology.** In: *Scientific American Library.* 1993.
 35. Gester H: **B-carotene, vitamin E and vitamin C in different stages of experimental carcinogenesis.** *European Journal of Clinical Nutrition* 1995, **49**(3):155-168.
 36. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**(1):57-70.
 37. Kumar A, Fausto: **Patologia - Bases Patológicas das Doenças, 7a edn:** ELSEVIER; 2005.
 38. Murrell A, Rakyan VK, Beck S: **From genome to epigenome.** *Hum Mol Genet* 2005, **14 Spec No 1**:R3-R10.
 39. Verma M, Srivastava S: **Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention.** *Lancet Oncol* 2002, **3**(12):755-763.
 40. Fazzari MJ, Grealley JM: **Epigenomics: beyond CpG islands.** *Nat Rev Genet* 2004, **5**(6):446-455.
 41. Waggoner D: **Mechanisms of disease: epigenesis.** *Semin Pediatr Neurol* 2007, **14**(1):7-14.
 42. Rodenhiser D, Mann M: **Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications.** *CMAJ* 2006, **174**(3):341-348.
 43. Matouk CC, Marsden PA: **Epigenetic regulation of vascular endothelial**

- gene expression.** *Circ Res* 2008, **102**(8):873-887.
44. Yoo CB, Jones PA: **Epigenetic therapy of cancer: past, present and future.** *Nat Rev Drug Discov* 2006, **5**(1):37-50.
 45. Sterner DE, Berger SL: **Acetylation of histones and transcription-related factors.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2000, **64**(2):435-459.
 46. Eberharther A, Becker PB: **Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics.** *EMBO Rep* 2002, **3**(3):224-229.
 47. Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB: **DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer.** *Oncogene* 2001, **20**(24):3156-3165.
 48. Worm J, Guldberg P: **DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy.** *J Oral Pathol Med* 2002, **31**(8):443-449.
 49. Bird A: **DNA methylation patterns and epigenetic memory.** *Genes Dev* 2002, **16**(1):6-21.
 50. Antequera F, Bird A: **CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins.** *Curr Biol* 1999, **9**(17):R661-667.
 51. Wilson AS, Power BE, Molloy PL: **DNA hypomethylation and human diseases.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1775**(1):138-162.
 52. Pradhan S, Esteve PO: **Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression.** *Clin Immunol* 2003, **109**(1):6-16.
 53. Tycko B: **Epigenetic gene silencing in cancer.** *J Clin Invest* 2000, **105**(4):401-407.
 54. Robertson KD, Jones PA: **DNA methylation: past, present and future directions.** *Carcinogenesis* 2000, **21**(3):461-467.
 55. Singhal H, Thomson, S.: **Breast Cancer Evolution: instant access to minds of medicine.** In: *Emedicine.* Disponível em: <http://www.emedicine.com/med/topic3287.htm>; 2004.
 56. Gronbaek K, Hother C, Jones PA: **Epigenetic changes in cancer.** *APMIS* 2007, **115**(10):1039-1059.
 57. Jones PA, Baylin SB: **The fundamental role of epigenetic events in cancer.** *Nat Rev Genet* 2002, **3**(6):415-428.
 58. Jaenisch R, Bird A: **Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals.** *Nat Genet* 2003, **33** Suppl:245-254.
 59. Turker MS: **Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation.** *Oncogene* 2002, **21**(35):5388-5393.
 60. Feinberg AP, Vogelstein B: **Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers.** *Biochem Biophys Res Commun* 1983, **111**(1):47-54.
 61. Esteller M: **CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future.** *Oncogene* 2002, **21**(35):5427-5440.
 62. Feinberg AP, Vogelstein B: **Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts.** *Nature* 1983, **301**(5895):89-92.
 63. Ehrlich M: **DNA hypomethylation, cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome and chromosomal rearrangements.** *J Nutr* 2002, **132**(8 Suppl):2424S-2429S.
 64. Baylin SB, Hoppener JW, de Bustros A, Steenbergh PH, Lips CJ, Nelkin BD: **DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas.** *Cancer Res* 1986, **46**(6):2917-2922.

65. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB: **Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(18):9821-9826.
66. Das PM, Singal R: **DNA methylation and cancer.** *J Clin Oncol* 2004, **22**(22):4632-4642.
67. Schmutte C, Jones PA: **Involvement of DNA methylation in human carcinogenesis.** *Biol Chem* 1998, **379**(4-5):377-388.
68. Yan L, Yang X, Davidson NE: **Role of DNA methylation and histone acetylation in steroid receptor expression in breast cancer.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001, **6**(2):183-192.
69. Esteller M: **Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005, **45**:629-656.
70. Baylin SB: **DNA methylation and gene silencing in cancer.** *Nat Clin Pract Oncol* 2005, **2 Suppl 1**:S4-11.
71. Hellebrekers DM, Griffioen AW, van Engeland M: **Dual targeting of epigenetic therapy in cancer.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1775**(1):76-91.
72. Momparler RL: **Cancer epigenetics.** *Oncogene* 2003, **22**(42):6479-6483.
73. Laird PW: **Cancer epigenetics.** *Hum Mol Genet* 2005, **14 Spec No 1**:R65-76.
74. Zhou J, Gurates B, Yang S, Sebastian S, Bulun SE: **Malignant breast epithelial cells stimulate aromatase expression via promoter II in human adipose fibroblasts: an epithelial-stromal interaction in breast tumors mediated by CCAAT/enhancer binding protein beta.** *Cancer Res* 2001, **61**(5):2328-2334.
75. Laurence AD: **Location, movement and survival: the role of chemokines in haematopoiesis and malignancy.** *Br J Haematol* 2006, **132**(3):255-267.
76. Balkwill F: **Cancer and the chemokine network.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**(7):540-550.
77. Wang JM, Deng X, Gong W, Su S: **Chemokines and their role in tumor growth and metastasis.** *J Immunol Methods* 1998, **220**(1-2):1-17.
78. Fernandez EJ, Lolis E: **Structure, function, and inhibition of chemokines.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002, **42**:469-499.
79. Kulbe H, Levinson NR, Balkwill F, Wilson JL: **The chemokine network in cancer--much more than directing cell movement.** *Int J Dev Biol* 2004, **48**(5-6):489-496.
80. Zlotnik A, Yoshie O: **Chemokines: a new classification system and their role in immunity.** *Immunity* 2000, **12**(2):121-127.
81. Allen SJ, Crown SE, Handel TM: **Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism.** *Annu Rev Immunol* 2007, **25**:787-820.
82. Slettenaar VI, Wilson JL: **The chemokine network: a target in cancer biology?** *Adv Drug Deliv Rev* 2006, **58**(8):962-974.
83. Rollins BJ: **Chemokines.** *Blood* 1997, **90**(3):909-928.
84. Ma Q, Jones D, Springer TA: **The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment.** *Immunity* 1999, **10**(4):463-471.
85. Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S: **The role of CXC chemokines and their receptors in cancer.** *Cancer Lett* 2008, **267**(2):226-244.
86. Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A: **Role of chemokines in tumor growth.** *Cancer Lett* 2007, **256**(2):137-165.
87. Rossi D, Zlotnik A: **The biology of chemokines and their receptors.** *Annu Rev Immunol* 2000, **18**:217-242.

88. Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Florio T, Schettini G: **Chemokines and their receptors in the central nervous system.** *Front Neuroendocrinol* 2001, **22**(3):147-184.
89. Balkwill F, Coussens LM: **Cancer: an inflammatory link.** *Nature* 2004, **431**(7007):405-406.
90. Ben-Baruch A, Xu L, Young PR, Bengali K, Oppenheim JJ, Wang JM: **Monocyte chemotactic protein-3 (MCP3) interacts with multiple leukocyte receptors. C-C CKR1, a receptor for macrophage inflammatory protein-1 alpha/Rantes, is also a functional receptor for MCP3.** *J Biol Chem* 1995, **270**(38):22123-22128.
91. Schutyser E, Su Y, Yu Y, Gouwy M, Zaja-Milatovic S, Van Damme J, Richmond A: **Hypoxia enhances CXCR4 expression in human microvascular endothelial cells and human melanoma cells.** *Eur Cytokine Netw* 2007, **18**(2):59-70.
92. Colobran R, Pujol-Borrell R, Armengol MP, Juan M: **The chemokine network. II. On how polymorphisms and alternative splicing increase the number of molecular species and configure intricate patterns of disease susceptibility.** *Clin Exp Immunol* 2007, **150**(1):1-12.
93. Colobran R, Pujol-Borrell R, Armengol MP, Juan M: **The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their functional complexity.** *Clin Exp Immunol* 2007, **148**(2):208-217.
94. Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, Dutt P, Yang Y, Qin S, Newman W, Groopman JE: **The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways.** *J Biol Chem* 1998, **273**(36):23169-23175.
95. Ben-Baruch A, Michiel DF, Oppenheim JJ: **Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells.** *J Biol Chem* 1995, **270**(20):11703-11706.
96. Horuk R: **Chemokine receptors.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2001, **12**(4):313-335.
97. Singh S, Singh UP, Grizzle WE, Lillard JW, Jr.: **CXCL12-CXCR4 interactions modulate prostate cancer cell migration, metalloproteinase expression and invasion.** *Lab Invest* 2004, **84**(12):1666-1676.
98. Zlotnik A: **Chemokines in neoplastic progression.** *Semin Cancer Biol* 2004, **14**(3):181-185.
99. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA: **The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry.** *Nature* 1996, **382**(6594):829-833.
100. Rollins BJ: **Inflammatory chemokines in cancer growth and progression.** *Eur J Cancer* 2006, **42**(6):760-767.
101. Ben-Baruch A: **Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions.** *Breast Cancer Res* 2003, **5**(1):31-36.
102. Ben-Baruch A: **The multifaceted roles of chemokines in malignancy.** *Cancer Metastasis Rev* 2006, **25**(3):357-371.
103. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN *et al*: **Involvement of chemokine receptors**

- in breast cancer metastasis. *Nature* 2001, 410(6824):50-56.**
104. Ben-Baruch A: **Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. *Semin Cancer Biol* 2006, 16(1):38-52.**
 105. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W: **Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* 2003, 425(6955):307-311.**
 106. Wendt MK, Johannesen PA, Kang-Decker N, Binion DG, Shah V, Dwinell MB: **Silencing of epithelial CXCL12 expression by DNA hypermethylation promotes colonic carcinoma metastasis. *Oncogene* 2006, 25(36):4986-4997.**
 107. Yasumoto K, Koizumi K, Kawashima A, Saitoh Y, Arita Y, Shinohara K, Minami T, Nakayama T, Sakurai H, Takahashi Y *et al*: **Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. *Cancer Res* 2006, 66(4):2181-2187.**
 108. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR: **Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998, 393(6685):595-599.**
 109. Salvucci O, Bouchard A, Baccarelli A, Deschenes J, Sauter G, Simon R, Bianchi R, Basik M: **The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study. *Breast Cancer Res Treat* 2006, 97(3):275-283.**
 110. Balkwill F: **The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol* 2004, 14(3):171-179.**
 111. Serini G, Gabbiani G: **Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res* 1999, 250(2):273-283.**
 112. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C: **Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* 2001, 12(9):2730-2741.**
 113. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA: **Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005, 121(3):335-348.**
 114. Weinberg RA: **Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989, 49(14):3713-3721.**
 115. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC: **Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002, 2(8):563-572.**
 116. Dewan MZ, Ahmed S, Iwasaki Y, Ohba K, Toi M, Yamamoto N: **Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2006, 60(6):273-276.**
 117. Zhang L, Yeger H, Das B, Irwin MS, Baruchel S: **Tissue microenvironment modulates CXCR4 expression and tumor metastasis in neuroblastoma. *Neoplasia* 2007, 9(1):36-46.**
 118. Sato N, Matsubayashi H, Fukushima N, Goggins M: **The chemokine receptor CXCR4 is regulated by DNA methylation in pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* 2005, 4(1):70-76.**
 119. Garcia-Moruja C, Alonso-Lobo JM, Rueda P, Torres C, Gonzalez N, Bermejo M, Luque F, Arenzana-Seisdedos F, Alcami J, Caruz A: **Functional characterization of SDF-1 proximal promoter. *J Mol Biol* 2005, 348(1):43-**

- 62.
120. Wendt MK, Cooper AN, Dwinell MB: **Epigenetic silencing of CXCL12 increases the metastatic potential of mammary carcinoma cells.** *Oncogene* 2007, **27**(10):1461-1471.
 121. Hall JM, Korach KS: **Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells.** *Mol Endocrinol* 2003, **17**(5):792-803.
 122. Stamps AC, Davies SC, Burman J, O'Hare MJ: **Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalized by retroviral infection with a temperature-sensitive SV40 T-antigen construct.** *Int J Cancer* 1994, **57**(6):865-874.
 123. **TNM classification of malignant tumours**
 124. INCA: **TNM: classificação de tumores malignos.** In: *Instituto Nacional do Câncer*. Edited by <http://www.inca.gov.br> MdS-. Rio de Janeiro; 2004.
 125. Chomczynski P, Sacchi N: **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem* 1987, **162**(1):156-159.
 126. Sambrook J, Russel DW: **Molecular cloning: A laboratory manual** New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.
 127. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ: **Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels.** *Biotechniques* 1994, **17**(5):914-921.
 128. Gardiner-Garden M, Frommer M: **CpG islands in vertebrate genomes.** *J Mol Biol* 1987, **196**(2):261-282.
 129. LC L, R D: **MethPrimer: designing primers for methylation PCRs.** In: *Bioinformatics*. vol. (11). Nov: 18; 2002: 1427-1431.
 130. Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, Oliveira J, Lopes C, Nelson WG, Sidransky D: **Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma.** *J Natl Cancer Inst* 2001, **93**(22):1747-1752.
 131. Costa FF, Paixao VA, Cavalher FP, Ribeiro KB, Cunha IW, Rinck JA, Jr., O'Hare M, Mackay A, Soares FA, Brentani RR *et al*: **SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer.** *Cancer Genet Cytogenet* 2006, **165**(2):135-143.
 132. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**(12):5463-5467.
 133. Karger AE: **Separation of DNA sequencing fragments using an automated capillary electrophoresis instrument.** *Electrophoresis* 1996, **17**(1):144-151.
 134. **European Bioinformatics Institute**
 135. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Honjo T: **Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene.** *Genomics* 1995, **28**(3):495-500.
 136. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T: **MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites.** *Bioinformatics* 2005, **21**(13):2933-2942.
 137. Lin CY, Vega VB, Thomsen JS, Zhang T, Kong SL, Xie M, Chiu KP, Lipovich L, Barnett DH, Stossi F *et al*: **Whole-genome cartography of estrogen receptor alpha binding sites.** *PLoS Genet* 2007, **3**(6):e87.
 138. Gruber CJ, Gruber DM, Gruber IM, Wieser F, Huber JC: **Anatomy of the**

- estrogen response element.** *Trends Endocrinol Metab* 2004, **15**(2):73-78.
139. Curradi M, Izzo A, Badaracco G, Landsberger N: **Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**(9):3157-3173.
140. Bender CM, Gonzalgo ML, Gonzales FA, Nguyen CT, Robertson KD, Jones PA: **Roles of cell division and gene transcription in the methylation of CpG islands.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**(10):6690-6698.
141. Zhou W, Jiang Z, Liu N, Xu F, Wen P, Liu Y, Zhong W, Song X, Chang X, Zhang X *et al*: **Down-regulation of CXCL12 mRNA expression by promoter hypermethylation and its association with metastatic progression in human breast carcinomas.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2008, **135**(1):91-102.
142. Watanabe K, Sakai F, Orii H: **Stepwise dilution screening of a cDNA library by polymerase chain reaction.** *Anal Biochem* 1997, **252**(1):213-214.
143. Braun-Prado K, Vieira Mion AL, Farah Pereira N, Culpi L, Petzl-Erler ML: **HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population.** *Tissue Antigens* 2000, **56**(5):417-427.
144. Li S, Rong M, Iacopetta B: **DNA hypermethylation in breast cancer and its association with clinicopathological features.** *Cancer Lett* 2006, **237**(2):272-280.
145. Lapidus RG, Nass SJ, Davidson NE: **The loss of estrogen and progesterone receptor gene expression in human breast cancer.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998, **3**(1):85-94.
146. Mirza S, Sharma G, Prasad CP, Parshad R, Srivastava A, Gupta SD, Ralhan R: **Promoter hypermethylation of TMS1, BRCA1, ERalpha and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients.** *Life Sci* 2007, **81**(4):280-287.
147. Zhao L, Wang L, Jin F, Ma W, Ren J, Wen X, He M, Sun M, Tang H, Wei M: **Silencing of estrogen receptor alpha (ERalpha) gene by promoter hypermethylation is a frequent event in Chinese women with sporadic breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2008.
148. Leu YW, Yan PS, Fan M, Jin VX, Liu JC, Curran EM, Welshons WV, Wei SH, Davuluri RV, Plass C *et al*: **Loss of estrogen receptor signaling triggers epigenetic silencing of downstream targets in breast cancer.** *Cancer Res* 2004, **64**(22):8184-8192.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO

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

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

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

Data: __/__/__

Assinatura (do doador ou responsável) ou impressão datiloscópica

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

Data: __/__/__

Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

ESTADIAMENTO CLÍNICO

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

CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA - TNM

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

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

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

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

o tamanho do tumor.

cN	Linfonodos regionais	
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados	
N0	Ausência de metástase para linfonodos regionais	
N1	Metástase para linfonodos axilares ipsilaterais móveis	
N2		
	N2a	Metástase para linfonodos axilares coalescentes ou aderidos a estruturas adjacentes
	N2b	Metástase clinicamente aparente na mama interna na ausência de metástase axilar
N3		
	N3a	Metástase para linfonodo infraclavicular
	N3b	Metástase para linfonodo da mama interna e axilar
	N3c	Metástase para linfonodo supraclavicular
cM	Metástase à distância	
	Mx	Metástase à distância não pode ser avaliada
	M0	Ausência de metástase à distância
	M1	Presença de metástase à distância

Classificação patológica (pTNM) 6ª edição (UICC)

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

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

pN	Linfonodos regionais	
	pNx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
	pN0	Ausência de metástase para linfonodos regionais
	pN0	(i -/+)**
	pN0	(MOL -/+)**
pN1	pN1mi	Micrometástase (maior que 0,2 mm e menor ou igual a 2 mm) em axila ou CMI
	pN1a	1 a 3 linfonodos axilares ipsilaterais comprometidos incluindo pelo menos uma metástase maior que 2 mm

	pN1b	Linfonodos da mama interna com metástase microscópica identificada em linfonodo sentinela, mas não clinicamente aparente
	pN1c	1 a 3 linfonodos axilares comprometidos incluindo pelo menos uma metástase maior que 2 mm e linfonodos da mama interna com metástase microscópica sem linfonodos sentinela, mas não clinicamente aparente
pN2	pN2a	4 a 9 linfonodos axilares comprometidos incluindo pelo menos uma metástase maior que 2 mm
	pN2b	Linfonodos da mama interna clinicamente aparentes na ausência de comprometimento axilar
pN3	pN3a	10 linfonodos axilares comprometidos incluindo pelo menos uma metástase maior que 2 mm
	ou	
	--	Linfonodo infraclavicular ipsilateral comprometido
	pN3b	Linfonodos da mama interna clinicamente comprometidos na presença de comprometimento de linfonodos axilares
	ou	
	--	Mais de 3 linfonodos axilares comprometidos e linfonodos da mama interna com metástase microscópica identificada em linfonodo sentinela, mas não clinicamente aparente
	pN3c	Linfonodo(s) supraclavicular ipsilateral comprometido

** Casos em que a metástase linfonodal consiste em apenas células tumorais isoladas ou formando agrupamentos menores que 0,2 mm, que, em sua maioria, são detectados pela imunohistoquímica (i) ou por biologia molecular (MOL), são classificados como pN0, pois tipicamente não mostram evidência de atividade metastática.

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

Resumo

Classificação por estádios

Estádio 0 Tis	N0 M0	Estádio IIIA	T0 N2 M0
Estádio I T1*	N0 M0		T1* N2 M0
Estádio IIA	T0 N1 M0		T2 N2 M0
	T1* N1 M0		T3 N1, N2 M0
	T2 N0 M0	Estádio IIIB	T4 N0,N1, N2, M0
Estádio IIB	T2 N1 M0	Estádio IIIC	Qualquer T N3 M0
	T3 N0 M0	Estádio IV	Qualquer T, Qualquer N M1

*T1 inclui T1 mic.

GRAU TUMORAL (SBR)

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

O grau de diferenciação é avaliado de acordo com a habilidade do tumor em originar formações tubulares, glandulares ou papilares. O pleomorfismo descreve a forma do núcleo. O índice mitótico avalia o número de mitoses encontrados na amostra do tumor. A soma dos pontos dos três componentes determina os graus: 1 (bem diferenciado), 2 (moderadamente

diferenciado) e 3 (fracamente diferenciado). Pacientes com um escore de SBR de 3 apresentam um risco relativo de 4,4 comparado com aquelas com um escore de SBR de 1 para tempo livre de doença por cinco anos.

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

1. **Fonte:** Menke, C.H.; Biazús, J.V.; Xavier, N.L.; Cavalheiro, J.A.; Rabin, E.G.; Bittelbrunn, A.; Cericatto, R. Rotinas em Mastologia. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p. 158, 163 a 165.

Tabela 7: ANÁLISE DA REGIAO 5'UTR DE CXCL12 PELO PROGRAMA MatINSPECTOR

Detailed Information	Start pos.	End pos.	Strand	Sequence
Human and murine ETS1 factors	14	34	+	cctgcaggGGAgtcagcact
Human and murine ETS1 factors	203	223	+	aggaggcCGGTagtgaggcac
Estrogen response elements	258	276	+	tgcagccAAGGgcaagtgc
Core promoter motif ten elements	279	299	-	ccatcccAGCGggggcggctg
Signal transducer and activator of transcription	444	462	-	gcttttgaaGGAatggat
Vertebrate TATA binding protein factor	519	535	-	cacttTAAAaagacctg
Glucocorticoid responsive and related elements	561	579	-	acacgagaccaTGTTctt
Glucocorticoid responsive and related elements	577	595	+	tgtgtacctcatGTGctc
Glucocorticoid responsive and related elements	577	595	-	ggaGCACatgaggtacaca
Human and murine ETS1 factors	587	607	-	aagctggAGGAaggagcacat
Estrogen response elements	703	721	-	tggagccaagctCACccg
Human and murine ETS1 factors	840	860	+	tgctgacGGAgtcagccaa
Human and murine ETS1 factors	1114	1134	-	gacctgggGGAagcacagaga
Estrogen response elements	1122	1140	+	cttccccAGGTcagttgc
Core promoter initiator elements	1131	1141	+	ggTCAGttgca
Human and murine ETS1 factors	1154	1174	-	tggaatgaGGAacctcggct
Brachyury gene, mesoderm developmental factor	1228	1248	-	tgagcgcggaGGTgtcacagt
Human and murine ETS1 factors	1229	1249	-	atgagcgCGGAggtgtcacag
Signal transducer and activator of transcription	1283	1301	+	gacctacaGGAacagaag
Vertebrate TATA binding protein factor	1309	1325	+	agcaaTAAAaactagaa
Human and murine ETS1 factors	1331	1351	-	ccccccCGCAagtcatgggg
Estrogen response elements	1421	1439	-	aagtgttAAGGacacagac
Core promoter motif ten elements	1483	1503	-	caggaccAGCGcagctgagtc
Signal transducer and activator of transcription	1630	1648	-	aagtttctGCAAagagtt
Signal transducer and activator of transcription	1632	1650	+	ctcttgcaGGAaacttca
Human and murine ETS1 factors	1633	1653	+	tctttgcAGGAaacttca
Core promoter motif ten elements	1659	1679	+	gaAGCTcagcggcctgagcca
Core promoter motif ten elements	1742	1762	+	acAGCGcagcgagtttctt
Signal transducer and activator of transcription	1755	1773	-	ttctTTCGctgaagagaaa
Signal transducer and activator of transcription	1757	1775	+	tctTTCagcgaagagaaaa
Human and murine ETS1 factors	1984	2004	+	aagagacAGGAagacagcggc
Core promoter motif ten elements	2013	2033	-	gcAGCGacgcggacctggcg

RNA polymerase II transcription factor II B	2105	2111	+	ccgCGCC
Signal transducer and activator of transcription	2146	2164	-	ccgcTCCctgcaagccga
Activator-, mediator- and TBP-dependent core promoter element for RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters	2380	2390	-	gcGCGGgaagg
RNA polymerase II transcription factor II B	2385	2391	+	ccgCGCC
Core promoter motif ten elements	2392	2412	+	agtcccgAACGctctcttggg
Estrogen response elements	2432	2450	-	gcagagcgAGGTcagccgg
Activator-, mediator- and TBP-dependent core promoter element for RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters	2624	2634	+	ggGCGGgagcc
Core promoter motif ten elements	2661	2681	+	cccgccgAGCGcacttaccgt
RNA polymerase II transcription factor II B	2740	2746	-	ccgCGCC
Human and murine ETS1 factors	2779	2799	+	cgggggCCGgacgccgagcgg
General transcription factor IID, GTF2D	2816	2854	+	agagtgaagtgcggcgggtgggagggcgcgGCCGggcgc
Vertebrate TATA binding protein factor	2847	2863	-	ccctcTAAAgcggccgg
Core promoter motif ten elements	2865	2885	+	agAGCCaggcggggcggggcg
Activator-, mediator- and TBP-dependent core promoter element for RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters	2900	2910	+	ggGCGGgcccg
Glucocorticoid responsive and related elements	2992	3010	+	tccgtccctctGTGctcc
Core promoter motif ten elements	3013	3033	-	aggccggAGCGcactgcccct
Estrogen response elements	3030	3048	-	gcctgagaAGGTcaaaggc
Core promoter motif ten elements	3041	3061	-	ggggcccAGCGgagcctgaga
Core promoter motif ten elements	3051	3071	-	ccAGCGgtgcggggcccagcg
Activator-, mediator- and TBP-dependent core promoter element for RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters	3055	3065	-	gtGCGGggccc
Signal transducer and activator of transcription	3213	3231	+	tcgatggcgGGAActgaat
Activator-, mediator- and TBP-dependent core promoter element for RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters	3217	3227	+	tgGCGGgaact
General transcription factor IID, GTF2D	3256	3294	+	ttagtcccggcggagggcctgctggcgggtGGCGgccc
Core promoter initiator elements	3387	3397	-	tcTCATtcccg
Human and murine ETS1 factors	3521	3541	-	gagaggtcGGAgtacaaagg
Core promoter initiator elements	3546	3556	-	gcTCATttcac
Vertebrate TATA binding protein factor	3669	3685	+	ctgtaagTAAGtccttt
Vertebrate TATA binding protein factor	3683	3699	-	aagtactTAGGtttaa
Human and murine ETS1 factors	3689	3709	-	gtaaggcAGTAagtacttagg
Signal transducer and activator of transcription	3703	3721	+	gcctTACCcaagaaaagct
Core promoter initiator elements	4026	4036	+	ggTCAGtcgcc

Activator-, mediator- and TBP-dependent core promoter element for RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters	4124	4134	+	agGCGGgagcg
Human and murine ETS1 factors	4152	4172	+	agggctccGGAActccgctgg
Core promoter initiator elements	4349	4359	-	ctTCAGttctt
Core promoter motif ten elements	4435	4455	-	ccAGCGctgcgccggtgagc
Core promoter motif ten elements	4440	4460	-	gagccccAGCGctgcgccgg
Activator-, mediator- and TBP-dependent core promoter element for RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters	4612	4622	+	ctGCGGgagcc
Core promoter motif ten elements	4617	4637	+	ggAGCCgcgagcagcctcgct
Human and murine ETS1 factors	4676	4696	-	aaaaaagaAGAAgaagaagcg
Human and murine ETS1 factors	4679	4699	-	agaaaaaaAGAAgaagaagaa
Estrogen response elements	4714	4732	+	ggtgggcagctgGACctag
Glucocorticoid responsive and related elements	4832	4850	-	acagtagcttcTGTTctgg
Human and murine ETS1 factors	4862	4882	-	cgactagcGGAAGggatggcc
Core promoter motif ten elements	4864	4884	-	aacgactAGCGgaagggatgg
Vertebrate TATA binding protein factor	4880	4896	-	aagtattTAACgaacga
Vertebrate TATA binding protein factor	4997	5013	+	acgcaTAAAatacttag
Human and murine ETS1 factors	5025	5045	+	atgctaggGGAAtgatggagca
Vertebrate TATA binding protein factor	5064	5080	-	ctattTAAAatcctaac
Vertebrate TATA binding protein factor	5069	5085	+	gatttTAAAtagggtgg
Vertebrate TATA binding protein factor	5133	5149	-	ggtttTAAAttcaatc
Vertebrate TATA binding protein factor	5138	5154	+	aaattTAAAaccctggc
General transcription factor IIIC, GTF3C	5225	5235	+	AGTTcgagacc
Human and murine ETS1 factors	5227	5247	-	gttagccaGGATggtctcgaa
Plant TATA binding protein factor	5453	5467	+	aataTGTAaataaat
Plant TATA binding protein factor	5481	5495	+	aataTGTAaataaaa
Estrogen response elements	5560	5578	-	acatGTCAaatggcctgg
Human and murine ETS1 factors	5620	5640	-	aggggtggGGAActcgctga

Legenda: Em cinza estão sublinhados os sítios de ligação do elemento ERE, posicionados de acordo com a seqüência de 5776 pb avaliadas. O sítio ERE localizado próximo à ilha de CpG 4 está grifado em vermelho.

Continuação...

Linhagem/colônia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
MDA-MB436 1	um	m	m	m	um	m	m	m	um	um	um	um	um	um	um	um
MDA-MB436 2	m	m	m	m	m	m	m	m	um	um	um	um	um	um	um	um
MDA-MB436 3	m	m	m	m	m	m	m	m	um	um	um	um	um	m	m	um
MDA-MB436 4	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	um
MDA-MB436 5	m	m	m	m	m	m	m	m	um	m	m	um	um	m	m	m
MDA-MB436 6	um	m	m	m	m	m	m	m	um	um	m	um	um	m	um	um
MDA-MB436 7	m	m	m	m	m	um	m	m	m	m	um	um	um	m	um	um
MDA-MB436 8	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	um	um	um	um	um
MDA-MB435 1	m	m	m	m	m	m	m	m	um	m	m	m	m	m	m	m
MDA-MB435 2	m	m	?	m	m	m	?	m	um	m	m	m	m	m	m	um
MDA-MB435 3	um	m	m	m	m	m	m	m	m	um	m	m	m	m	m	m
MDA-MB435 4	m	m	um	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
MDA-MB435 5	m	m	m	m	m	m	m	m	um	m	m	m	m	m	m	m
MDA-MB435 6	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
MDA-MB435 7	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
MDA-MB435 8	m	m	um	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m

Linhagem/colônia	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
MDA-MB436 1	um	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
MDA-MB436 2	um	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
MDA-MB436 3	m	m	um	m	um	m	um	m	m	m	m
MDA-MB436 4	m	m	m	m	m	m	m	um	m	m	um
MDA-MB436 5	m	m	m	m	um	m	um	m	m	um	um
MDA-MB436 6	?	m	?	m	m	m	?	?	?	?	?
MDA-MB436 7	um	um	m	um	m	m	um	um	m	m	m
MDA-MB436 8	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	um
MDA-MB435 1	m	m	m	m	m	um	um	m	m	m	um
MDA-MB435 2	m	m	m	m	um	m	um	um	m	m	um
MDA-MB435 3	m	m	um	m	um	m	m	m	m	m	m

MDA-MB435 4	m	m	um	um	um	m	m	m	m	um	m
MDA-MB435 5	m	m	m	m	m	um	um	m	m	m	um
MDA-MB435 6	m	m	m	m	um	m	m	m	m	um	m
MDA-MB435 7	m	m	m	m	um	m	m	m	m	um	m
MDA-MB435 8	?	?	um	um	?	um	m	?	m	um	m

Continuação...

Linhagem/colônia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
MCF7 1	m	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um
MCF7 2	m	m	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um
MCF7 3	m	m	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um
MCF7 4	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um
MCF7 5	m	um	?	um	?	?	?	um	um	um	um	um	um	um	um
MCF7 6	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um
MCF7 7	m	um	um	um	um	um	um	um	?	um	um	um	um	um	um
MCF7 8	m	um	?	um	?	?	?	um	um	um	um	um	um	um	um

Linhagem/colônia	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
MCF7 1	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um
MCF7 2	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um
MCF7 3	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um
MCF7 4	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um
MCF7 5	um	?	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um
MCF7 6	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um
MCF7 7	um	um	um	um	um	um	?	um	um	um	um	um
MCF7 8	?	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um	um

Legenda: m: dinucleotídeo metilado; um: dinucleotídeo não metilado; ?: indeterminado. Os números na primeira linha da tabela correspondem aos 27 CpGs que foram clonados e sequenciados da ilha 4 do gene *CXCL12*.

TABELA 9: RESULTADOS DE MSP E COMPARAÇÃO COM OS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS AMOSTRAS TUMORAIS

Amostra	CDI - GI	Idade paciente	(TNM)	Linfonodo	Proteína RE	MSP M	score RE	Proteína RP	score RP	erb-B2	Estadio	Recidiva	Metástase	Óbito	C12 - 2	C12 - 4
1	CP162	49	T1	-	+	-	P 25-30	+	P30	nd	I	-	-	-	-	-
2	CP287	83	T1	-	+	-	P 70	+	P50	nd	I	-	-	-	+	+
3	CP323	50	T2	-	+	-	P >30	nd	nd	-	IIA	-	-	-	-	-
4	CP332	30	T2	-	+	-	P80	+	P30	+	IIA	-	-	-	-	-
5	CP402	68	T2	+	+	-	P 30	+	P30	-	IIB	-	-	-	+	-
6	CP408	60	T2	-	+	-	P>30	+	P30	-	IIA	-	-	-	-	-
7	CP425	72	T2	-	+	-	P>50	+	P50	+	IIA	-	-	-	-	+
8	CP456	75	T1	-	+	-	P>30	+	P>30	+	I	-	-	-	-	-
9	CP460	66	T1	-	+	+	P10-30	+	P10-30	+	I	-	-	-	+	+
10	CP471	52	T2	+	+	-	P>30	+	P10	-	IIB	-	-	-	-	+
11	CP515	63	T1	-	+	-	P10-30	+	P10-30	-	I	-	-	-	-	-
12	CP528	42	T1	-	+	-	P30	+	P80	-	I	-	-	-	-	+

Amostra	CDI - GII	Idade paciente	(TNM)	Linfonodo	Proteína RE	MSP M	Score RE	Proteína RP	score RP	erb-B2	Estadio	Recidiva	Metástase	Óbito	C12 - 2	C12 - 4
13	CP172	68	T2	+	+	+	P>30	+	P>30	-	IV	-	+	+	-	-
14	CP174	51	T3	+	+	+	P40	+	P40	+	IV	-	+	+	-	+
15	CP197	66	T1	+	-	-	N		N.	+	IIA	-	-	-	+	+
16	CP271	47	T2	+	+	-	X	nd	X	-	IIB	-	-	+	-	-
17	CP290	71	T1	nd	+	nd	P10	Nd	nd	-	pT1,pNX,pM	-	-	-	-	-
18	CP314	74	T2	-	+	+	P10-30	+	P10	+	IIA	-	-	-	-	-
19	CP337	62	T2	-	+	-	P80	+	P80	-	IV	-	+	+	-	+
20	CP341	73	T2	+	+	-	P50	+	P50	-	IIB	-	-	-	-	+
21	CP365	39	T2	+	+	-	P10-30		N	-	IIB	-	-	-	-	-
22	CP366	63	T2	-	+	-	P30		N	+	IIA	-	-	-	-	-
23	CP413	83	T2	+	+	-	P10-30	+	P10-30	-	IIB	-	-	-	+	-
24	CP487	68	T1	-	+	-	P>30	+	P10-30	-	I	-	-	-	-	-
25	CP497	45	T1	+	+	+	P>30	+	P>30	-	IV	-	+	+	-	+
26	CP520	71	T4	+	+	-	P>50	+	P10	+	IIIC	-	-	-	-	-
27	CP527	53	T2	+	-	-	N		N	+	IIIA	-	-	-	-	-

28	CP532	56	T2	+	+	-	P10-30	+	P70-80	-	IIIC	-	-	-	-	+
29	CP536	40	T2	+	+	-	P50	+	P50	+	IIIC	-	-	-	-	-
30	CP542	40	T2	+	+	-	P30	+	P50	+	IIA	-	-	-	-	-
31	CP547	54	T2	+	+	+	P30	+	P30-50	-	IIIA	-	-	-	-	-
32	CP427	55	T1	+	+	+	X	+	X	+	IV	-	+	+	-	-
33	CP556	63	T2	-	+	-	P50	+	P50	-	IIA	-	-	-	-	+
34	CP562	49	T2	+	+	+	P10-30	+	P50	+	IIIA	-	-	-	-	+

Amostra	CDI - GIII	Idade paciente	(TNM)	Linfonodo	Proteína RE	MSP M	score RE	Proteína RP	score RP	erb-B2	Estadio	Recidiva	Metástase	Óbito	C12 - 2	C12 - 4
35	CP243	48	T4	+	+	+	X	+	X	-	IIIB	nd	+	+	-	-
36	CP310	56	T1	+	+	-	P50	+	X	+	IIA	-	-	-	-	+
37	CP338	44	T2	-	-	+	N	-	N	-	IIA	-	-	-	-	+
38	CP399	82	T2	+	+	+	P10-30	+	P10	-	IIB	-	-	+	-	+
39	CP422	75	T4	-	+	-	P>30	+	P>30	-	IV	+	+	+	-	+
40	CP424	63	T2	+	+	-	P	-	N	-	IIB	-	-	-	-	-
41	CP432	66	T4	+	+	+	P5-10	+	P10-30	-	IIIB	-	-	-	-	-
42	CP434	59	T2	+	-	+	N	-	N	-	IV	-	+	+	-	+
43	CP470	67	T2	-	+	-	P10-30	+	P>30	-	IIA	-	-	-	-	-
44	CP505	72	T4	+	-	+	N	-	N	-	IV	+	+	+	-	+
45	CP525	45	T3	+	+	+	P10-30	+	P10	+	IIIA	-	+	+	+	+
46	CP537	69	T2	-	-	+	N	-	N	-	IIB	+	-	-	-	+
47	CP539	55	T1	+	-	+	N	-	N	+	IIA	-	-	-	-	+
48	CP545	27	T3	-	-	+	N	-	N	+	IIB	-	-	-	-	+
49	CP558	51	T1	-	+	-	P10-30	+	P50	-	I	-	-	-	-	-
50	CP559	79	T2	-	-	+	N	-	N	+	IV	-	+	+	+	+
51	CP430	54	T4	+	-	+	X	-	X	+	IIIB	-	+	+	-	-

Amostra	CLI - GI	Idade paciente	(TNM)	Linfonodo	Proteína RE	MSP M	score RE	Proteína RP	score RP	erb-B2	Estádio	Recidiva	Metástase	Óbito	C12 - 2	C12 - 4
52	CP319	68	T2	-	+	-	P10-30	+	P>30	-	IIA	-	-	-	-	-
53	CP389	84	T2	-	nd	-	X	nd	X	nd	IIA	-	-	-	+	-
54	CP476	71	T3	+	+	-	X	nd	X	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
55	CP485	59	T1	-	+	-	P10-30	+	P10-30	-	I	-	-	-	-	-
56	CP501	53	T1	-	+	-	P>30	+	P>30	-	I	-	-	-	-	-
57	CP300	65	T1	-	+	-	X	+	X	-	I	+	-	-	-	+
58	CP339	53	T2	+	+	+	X	nd	P10	-	IIB	-	+	+	-	-
Amostra	CLI - GII	Idade paciente	(TNM)	Linfonodo	Proteína RE	MSP M	score RE	Proteína RP	score RP	erb-B2	Estádio	Recidiva	Metástase	Óbito	C12 - 2	C12 - 4
59	CP256	55	T2	+	+	-	P80	+	P80	-	IIB	-	-	-	-	-
60	CP390	44	T1	-	+	-	P10-30	+	P10-30	-	I	-	-	-	-	-
61	CP420	52	T2	-	+	+	P10-30	+	P10	-	IIA	-	-	-	-	+
62	CP445	46	T3	+	+	+	P>30	+	P>50	-	IIIA	-	+	+	-	+
63	CP506	55	T3	+	+	+	P>30	+	P>30	-	IV	-	+	+	-	+
64	CP535	79	T1	-	+	-	P5-10	-	N	-	I	-	-	-	-	-
65	CP412	42	T2	-	+	-	X	nd	X	-	IIA	-	-	-	-	-
66	CP297	76	T3	-	+	+	X	+	X	-	IIA	+	nd	nd	+	-
67	CP574	45	T2	+	-	+	X	-	X	-	nd	-	-	-	-	-
68	CP585	66	T2	+	+	+	X	-	X	-	IIB	-	-	-	-	+
69	CP529	46	T3	-	+	+	P10-30				IIIA	-	-	+	-	+

Legenda: CDI carcinoma ductal invasivo; CLI: carcinoma lobular invasivo; G: grau histológico (SBR); CP: número do cadastro da paciente no Banco de Tumores; RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; HER2: receptor de fator de crescimento HER-2; MSP: PCR específico para Metilação; nd: não determinado

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)