

**AVALIAÇÃO DO PAPEL FUNCIONAL
DO GENE *NDRG4* NA TUMORIGÊNESE
DE MAMA**

RICARDO PEREIRA DE MOURA

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Doutor
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Anamaria Aranha Camargo

Co-Orientador: Dr. Érico Tosoni Costa

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Moura, Ricardo Pereira de

Avaliação do papel funcional do gene *NDRG4* na tumorigênese de mama / Ricardo Pereira de Moura – São Paulo, 2012.

128p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração:

Oncologia

Orientadora: Anamaria Aranha Camargo

Descritores: 1. METILAÇÃO DE DNA. 2. CARCINOMA DUCTAL DE MAMA/genética. 3. EXPRESSÃO GÊNICA. 4. TUMORIGÊNESE. 4. N-MYC DOWNSTREAM-REGULATED GENE.

DEDICATÓRIA

O sonho

Sonhe com aquilo que você quiser.
Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que se quer.
Clarisse Lispector

Há Momentos

Há momentos na vida em que sentimos tanto
a falta de alguém que o que mais queremos
é tirar esta pessoa de nossos sonhos
e abraçá-la.
Clarisse Lispector

Ao meu pai (*in memoriam*) e a minha mãe, com amor e gratidão pela confiança que depositaram em mim e pelo apoio que eu sempre pude contar.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Anamaria Aranha Camargo, obrigado por me aceitar em seu laboratório, acreditar em mim e possibilitar o desenvolvimento desse projeto. Por sua disponibilidade irrestrita, paciência, incentivo e apoio na conclusão desse trabalho. Pela sua preocupação com a formação profissional de cada membro de sua equipe, bem como em mantê-la sempre motivada. Trabalhar sob sua orientação foi um privilégio, aprendi muito durante todo esse tempo.

Ao Prof. Dr. Ricardo Brentani, um dos principais nomes no mundo da pesquisa sobre o câncer, que tive o privilégio de conhecer.

A minha amiga Ana Paula Medeiros Silva, pela convivência ao longo de todos estes anos. Obrigado por incentivar e acompanhar, desde o início, o desenvolvimento deste trabalho. Sempre aberta para um simples diálogo ou para oferecer seu apoio nos momentos mais difíceis que passamos. Nossas vidas se cruzaram na esquina do trabalho, tornando o dia-a-dia mais prazeroso. Hoje não estamos lado a lado no trabalho, porém continuamos unidos pela amizade. Espero e me dedico para que continue assim por um longo tempo. Obrigado também por compartilhar sua família, não tenho palavras que expressem o apoio que todos eles me proporcionaram. Obrigado Irma, Celso e Marcio, o apoio de todos vocês foi muito importante ao longo desse tempo.

A Dra. Dirce Carraro e a Dra. Helena Brentani, incluindo suas equipes, pela realização dos ensaios de *microarray* e análise dos resultados. Isso foi fundamental no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Érico, pelo valioso acompanhamento deste projeto, compartilhando seus conhecimentos sempre pautados no rigor científico. Por sempre se preocupar em oferecer ajuda, pela paciência, pelo apoio e pela convivência.

A toda turma que passou pelo laboratório, de estagiários a pós-graduandos. Jane Kaiano, Elisangela, Maria Cristina, Murilo, Anna Christina, Daniel, Fabrício Falconi, Fabricio Carvalho, Daniela Ierardi, Lílian Pires, Andrea Seixas, Mariana Granato, Camila Regina, Newton, Fernando, Felícia, Tamara, Elisa, Mônica, Valéria, Alex Fiorine, Bruna e Natália. Obrigado pela convivência e pelos bons momentos vividos dentro e fora do laboratório. Sem vocês, cada um ao seu modo, certamente tudo teria sido mais difícil.

A todos que permanecem no laboratório, profissionais de excelência, estudantes dedicados, que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho. Raphael, Fabiana, Fernanda, Paula, Érico, Gabriela, Lilianzinha, Camila Lopes e Paola.

A toda a equipe da Recepta, Daniela, Denise, Érika e Juliana pela imprescindível colaboração durante a realização dos ensaios de quimiorresistência. Em especial a Juliana.

Ao Departamento de Anatomia Patológica, em especial ao Prof. Dr. Fernando Soares e a Dra. Isabela Werneck pela ajuda com as análises de imunohistoquímica.

Ao Prof. Dr. André Carvalho, pelas análises estatísticas e ao Dr. Vladimir Cláudio Cordeiro pelo levantamento dos dados dos pacientes junto ao SAME.

Ao pessoal do Laboratório de Virologia, João, Neide, Laura, Lara, Enrique, Antonieta e Cecília. Pelo convívio ao longo destes anos. Em especial ao Enrique que além do convívio, fez uma leitura crítica desse trabalho.

À Andréa Trevisan, pela amizade dentro e fora do ILPC. Os momentos de descontração no Bar do Juarez foram excelentes.

A Isabel e a Léia, pelo apoio técnico e pela amizade.

Ao Pedro Galante pelos poucos, porém valiosos momentos de conversas e trocas de idéias “no café”.

Ao Júlio e Jorge Estefano, pela ajuda com os problemas de informática.

A todos os funcionários do ILPC pelo suporte técnico e administrativo e também pela convivência durante este período.

Aos demais colegas do ILPC pela convivência durante este período.

À Suely Francisco e demais funcionários da biblioteca da Fundação Antônio Prudente, pela boa vontade e auxílio na obtenção e organização do material bibliográfico.

À Ana Maria Kuninari, Luciana Pitombeira e Vanuza pelo excelente trabalho desenvolvido junto a secretaria de Pós Graduação e pelo carinho com que sempre me receberam.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e competência na avaliação deste trabalho.

A minha família, meus pais e meus irmãos Marcio, Roberto, Célia e Marcos, pelo amor, amizade, dedicação, paciência e equilíbrio. Meu porto seguro, obrigado pelo apoio e incentivo constantes. Obrigado pela confiança que vocês depositam em mim.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro (Bolsa Regular no País, Doutorado Processo Número 2009/53819-1).

RESUMO

Moura RP. **Avaliação do papel funcional do gene *NDRG4* na tumorigênese de mama.** São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Em trabalho anterior realizado pelo nosso grupo, descrevemos que o gene *NDRG4* se encontra silenciado em linhagens tumorais de mama devido a presença de metilação na sua região promotora. Neste trabalho, exploramos o papel do silenciamento do gene *NDRG4* na tumorigênese da mama. Em um primeiro momento, investigamos a associação entre a presença de metilação na região promotora do gene *NDRG4* em 61 amostras de tumores de mama e os dados clínico-patológicos das pacientes. Observamos uma associação estatisticamente significativa entre a presença de metilação do DNA na região promotora do gene *NDRG4* e fatores de pior prognóstico, tais como: número de linfonodos positivos ($p=0,025$), níveis elevados da proteína p53 ($p=0,014$) e o tamanho do tumor ($p=0,036$); bem como com uma menor taxa de sobrevida livre de metástase em 10 anos ($p=0,001$). Em análise multivariada, a presença de metilação do DNA na região promotora do gene *NDRG4* se mostrou um fator independente de prognóstico para sobrevida livre de metástase (HR=5.5 e $p=0.006$). Paralelamente, realizamos o silenciamento do gene *NDRG4* na linhagem de tumor de mama MCF7 utilizando a metodologia de shRNA. Variantes celulares, silenciadas para o gene *NDRG4*, apresentaram uma redução significativa na taxa de proliferação e na capacidade de formação de colônias isoladas e um aumento significativo na capacidade de migração. No entanto, não foram observadas diferenças significativas na capacidade de adesão e na susceptibilidade a taxanos dos clones silenciados.

SUMMARY

Moura RP. **[Evaluation of the functional role of gene *NDRG4* in breast tumorigenesis]**. São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

We have previously described that the *NDRG4* gene is silenced in breast tumor cell lines due to the presence of DNA methylation in its promoter region. In the present work, we have explored the role of *NDRG4* gene silencing in breast tumorigenesis. As a first step, we investigated the association between the presence of DNA methylation in the promoter region of the *NDRG4* gene in 61 breast tumor samples and the clinico-pathological parameters of the patients. We observed an statistically significant association between the presence of DNA methylation in the promoter region of the *NDRG4* gene and worse prognostic factors such as: the number of positive lymph nodes ($p=0,025$), overexpression of the p53 gene ($p=0,014$) and tumor size ($p=0,036$); as well as with a lower metastasis-free survival rate in 10 years ($p=0,001$). In a multivariate analysis, the presence of DNA methylation in the promoter region of the *NDRG4* gene was shown to be an independent prognostic factor for metastasis-free survival (HR=5.5 e $p=0.006$). In parallel, we have silenced the *NDRG4* gene in the MCF-7 breast tumor cell line using the shRNA methodology. Knock-down cell variants showed a significant reduction in the proliferation rate and in the capacity to form isolated colonies and a significant increase in the migration capacity. However, we have not observed significant differences in the adhesion capacity and susceptibility to taxanes in the knock-down variants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Identificação da ilha de CpG na região promotora do gene <i>NDRG4</i> feita através do programa Blat.....	18
Figura 2	Cromatograma representativo do seqüenciamento de um fragmento de Ilha de CpG do gene <i>NDRG4</i>	19
Figura 3	Análise da frequência de metilação de 82 dinucleotídeos CGs da ilha de CpG na região promotora do gene <i>NDRG4</i>	21
Figura 4	Frequência de metilação do gene <i>NDRG4</i> em tecidos mamários.....	54
Figura 5	Fragmento analisado da ilha de CpG do gene <i>NDRG4</i>	58
Figura 6	Especificidade do conjunto de iniciadores para a técnica de <i>Nested-MSP</i>	59
Figura 7A	Amplificação por <i>Nested-MSP</i> em linhagens de tumor de mama.....	62
Figura 7B	Amplificação por <i>Nested-MSP</i> em tecidos normais de mama.....	62
Figura 8	Imunoistoquímica anti- <i>NDRG4</i>	64
Figura 9	<i>Nested-MSP</i> do gene <i>NDRG4</i> em amostras tumorais de mama.....	66

Figura 10	Curva de sobrevida <i>Kaplan-Meier</i> com a análise cumulativa da sobrevida livre de metástases.....	72
Figura 11	Curva de sobrevida <i>Kaplan-Meier</i> com a análise cumulativa da sobrevida livre de metástases.....	72
Figura 12	Curva de sobrevida <i>Kaplan-Meier</i> com a análise cumulativa da sobrevida global.....	76
Figura 13	Curva de sobrevida <i>Kaplan-Meier</i> com a análise cumulativa da sobrevida global.....	76
Figura 14	Avaliação da eficiência de silenciamento do gene <i>NDRG4</i> por qRT-PCR.....	81
Figura 15	Seleção dos clones com maior eficiência de silenciamento.....	83
Figura 16	Clones selecionados por qRT-PCR.....	86
Figura 17	Western-blot fracionado dos clones apresentando silenciamento estável.....	86
Figura 18	Morfologia dos diferentes clones selecionados.....	87
Figura 19	Efeito do silenciamento do gene <i>NDRG4</i> na taxa de proliferação celular.....	90
Figura 20	Efeito do silenciamento do gene <i>NDRG4</i> na capacidade de sobrevivência e proliferação celular.....	93
Figura 21	Efeito do silenciamento do gene <i>NDRG4</i> na migração celular (quimiotática).....	94

Figura 22	Efeito do silenciamento do gene <i>NDRG4</i> na migração celular (haptotática).....	96
Figura 23	Efeito do silenciamento do gene <i>NDRG4</i> no processo de adesão.....	99
Figura 24	Efeito do silenciamento do gene <i>NDRG4</i> no processo de quimiorresistência ao Taxotere (Docetaxel).....	102
Figura 25	Efeito do silenciamento do gene <i>NDRG4</i> no processo de quimiorresistência ao Paclitaxel.....	103

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Característica das linhagens celulares usadas.....	15
Tabela 1	Diferença de expressão do gene <i>NDRG4</i> entre as linhagens tratadas e não tratadas com agente desmetilante (5-AzaDc).....	20
Tabela 2	Frequência de metilação nos dinucleotídeos presentes nos iniciadores para a técnica de <i>MSP</i> do gene <i>NDRG4</i>	57
Tabela 3	Validação da <i>Nested-MSP</i> em linhagens tumorais de mama e controles normais.....	61
Tabela 4	Descrição dos dados clínico-patológicos das pacientes com carcinoma ductal de mama incluídas nesse estudo...	67
Tabela 5	Correlação entre o status de metilação no gene <i>NDRG4</i> e os parâmetros avaliados nos pacientes.....	69
Tabela 6	Probabilidade acumulada de sobrevida livre de metástase e sobrevida global.....	71
Tabela 7	Análise multivariada de sobrevida livre de metástase à distância.....	74
Tabela 8	Análise multivariada de sobrevida global.....	75
Tabela 9	Avaliação da eficiência de transfecção pela citometria de fluxo.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	do inglês <i>microgram</i>
μl	do inglês <i>microliter</i>
μM	do inglês <i>micromolar</i>
14-3-3σ	do inglês <i>14-3-3 protein sigma</i>
5-AzaDc	<i>5-aza-2'-deoxicitidina</i>
A	Adenina
aa	Aminoácido
ADAM23	do inglês <i>ADAM metallopeptidase domain 23</i>
APC	do inglês <i>adenomatous polyposis coli</i>
ATCC	do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
BCSG1	do inglês <i>breast cancer-specific gene 1 protein</i>
Bdm1	do inglês <i>brain development-related molecule 1</i>
BLAT	do inglês <i>BLAST Like Alignment tool</i>
BLAST	do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Citosina
CASP8	do inglês <i>caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
CCND2	do inglês <i>cyclin D2</i>
CDH1	do inglês <i>cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)</i>
CDK	do inglês <i>Cyclin-Dependent kinase</i>
CDKN1A	do inglês <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
CDKN2A	do inglês <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	do inglês <i>complementary DNA</i>
C-myc	do inglês <i>proto-oncogene c-Myc</i>
CNVs	do inglês <i>copy number variation</i>
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CpG	do inglês <i>cytosine phosphate guanine</i>
CRABP2	do inglês <i>cellular retinoic acid binding protein 2</i>
CRIP-1	do inglês <i>cysteine-rich protein 1</i>
C_T	do inglês <i>Cycle Treshold</i>

DAPK1	do inglês <i>death-associated protein kinase 1</i>
DEPC	do inglês <i>Di-etil pirocarbonate</i>
DNA	do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNMTs	DNA metiltransferases
dNTP	do inglês <i>deoxynucleoside 5' triphosphato</i>
EGF	do inglês <i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	do inglês <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	do inglês <i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
ER	do inglês <i>estrogen receptor</i>
ERα	do inglês <i>estrogen nuclear receptor alpha</i>
ESCC	Carcinoma de células escamosas do esôfago
ESTs	do inglês <i>expressed sequence tags</i>
EUA	Estados Unidos da América
FACs	do inglês <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FAPESP	Fundação de amparo a pesquisa do estado de São Paulo
G	Guanina
GAPDH	do inglês <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GBM	Glioblastoma Multiforme
GFP	do inglês <i>green fluorescent protein</i>
GFPT2	do inglês <i>glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2</i>
Grb2	do inglês <i>Growth Factor Receptor-Bound Protein 2</i>
GSTP1	do inglês <i>glutathione S-transferase pi 1</i>
HER2	do inglês <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HIC1	do inglês <i>hypermethylated in cancer 1</i>
HIN1	do inglês <i>cytokine high in normal-1</i>
HOP	do inglês <i>homeodomain-only protein</i>
HOXA5	do inglês <i>homeobox A5</i>
HOXB13	do inglês <i>homeobox B13 gene</i>
HR	do inglês <i>harzadous risc</i>
IC	intervalo de confiança
IDC	do inglês <i>Infiltrating Ductal Carcinoma</i>
Ig	do inglês <i>Immunoglobulin</i>

IGF1	do inglês <i>insulin-like growth factor 1</i>
IL17RB	do inglês <i>interleukin-17 receptor B gene</i>
ILC	do inglês <i>Infiltrating Lobular Carcinoma</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPTG	do inglês <i>isopropyl-β-D-thiogalactoside</i>
ISC	do inglês <i>Other Infiltrating Carcinomas (Special histological types)</i>
KDa	do inglês <i>kiloDalton</i>
MAPK	do inglês <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEC	Matriz extracelular
MgCl₂	do inglês <i>magnesium chloride</i>
MGMT	do inglês <i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
mM	do inglês <i>millimolar</i>
MoMuLV	do inglês <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
mRNA	do inglês <i>messenger RNA</i>
MSP	do inglês <i>Methylation specific PCR</i>
MX1	do inglês <i>myxovirus (influenza virus) resistance 1</i>
NaCl	do inglês <i>sodium chloride</i>
NCBI	do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDRG	do inglês <i>N-myc downstream regulator gene</i>
NDRG1-4	do inglês <i>NDRG family members 1-4</i>
NECC1	do inglês <i>not expressed in choriocarcinoma protein 1</i>
NES1	do inglês <i>normal epithelial cell-specific 1</i>
ng	do inglês <i>nanogram</i>
NH₄OAc	do inglês <i>ammonium acetate</i>
NIH	do inglês <i>National Institutes of Health</i>
nm	do inglês <i>nanometre</i>
NMDAR2B	do inglês <i>N-methyl D-aspartate receptor subtype 2B</i>
N-myc	do inglês <i>N-myc proto-oncogene protein</i>
OB1	do inglês <i>odd homeobox 1 protein</i>
OD	do inglês <i>optical density</i>
ORESTES	do inglês <i>open reading frame expressed sequence tags</i>

ORF	do inglês <i>Open Reading Frame</i>
p14ARF	do inglês <i>cyclin-dependent kinase 4 inhibitor A</i>
p16	do inglês <i>16 KDa protein</i>
p16INK4a	do inglês <i>CDK4 inhibitor p16-INK4</i>
p21	do inglês <i>21 KDa protein</i>
p57KIP2	do inglês <i>cyclin-dependent kinase inhibitor p57</i>
pb	do inglês <i>base pair</i>
PBS	do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	do inglês <i>polimerase chain reaction</i>
PDGF	do inglês <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
pH	do inglês <i>hydrogen ionic potential</i>
PI3K	do inglês <i>Phosphatidyl-Inositol-3-Quinase</i>
PLAU	do inglês <i>plasminogen activator, urokinase</i>
Poli-A	do inglês <i>polyadenylate</i>
PR	do inglês <i>progesterone receptor</i>
QM-MSP	do inglês <i>Quantitative Multiplex MSP</i>
qRT-PCR	do inglês <i>Quantitative Reverse transcriptase – PCR</i>
RARβ	do inglês <i>retinoic acid receptor, beta</i>
RASSF1A	do inglês <i>Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1</i>
RFC	do inglês <i>replication factor C (activator 1) 1</i>
RGS3	do inglês <i>regulator of G-protein signaling 3</i>
RNA	do inglês <i>acid ribonucleic</i>
RNAi	RNA de interferência
RNAse	do inglês <i>ribonuclease</i>
rpm	do inglês <i>rotation per minute</i>
SAHA	do inglês <i>suberoylanilide hydroxamic acid</i>
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatístico
SBR	Sistema de <i>Bloom & Richardson</i>
SDS-PAGE	do inglês <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
SFRP1	do inglês <i>secreted frizzled-related protein 1</i>

shRNA	small hairpin RNA
SNPs	do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SOCS1	do inglês <i>suppressor of cytokine signaling 1</i>
SPSS	do inglês <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SYK	do inglês <i>spleen tyrosine kinase</i>
T	Timina
TGFβRII	do inglês <i>transforming growth factor, beta receptor II</i>
THBS1	do inglês <i>thrombospondin 1</i>
TIMP3	do inglês <i>TIMP metalloproteinase inhibitor 3</i>
TMA	do inglês <i>tissue microarray</i>
TMS1	do inglês <i>target of methylation-induced silencing 1</i>
TNM	do inglês <i>Tumor Node Metastasis</i>
TP53	do inglês <i>tumor protein p53</i>
TP73	do inglês <i>tumor protein p73</i>
Tris	do inglês <i>hydroxymethyl aminomethane</i>
U	Uracila
WIF1	do inglês <i>WNT inhibitory factor 1</i>
XIAP	do inglês <i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O câncer de mama	1
1.2	As bases genéticas e epigenéticas do câncer	7
1.3	Alterações epigenéticas e a metilação do DNA	9
1.4	Alterações no padrão de metilação do DNA em tumores	11
1.5	Identificação de genes diferencialmente metilados através do tratamento de linhagens tumorais com o agente desmetilante 5-AzaDc seguido de análise global da expressão gênica	14
1.6	Estudo do padrão de metilação da Ilha CpG localizada na região promotora do gene <i>NDRG4</i> em linhagens tumorais de mama	17
1.7	A família NDRG (Down stream regulated gene)	22
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo geral	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Linhagens celulares	33
3.2	Coleção de amostras de DNA de tumores de mama	33
3.3	Extração de DNA e tratamento com bissulfito de sódio	34
3.4	Sequenciamento por bissulfito de sódio	35
3.5	Ensaio de <i>Nested-MSP</i>	36
3.6	Levantamento dos dados clínico-patológicos dos tumores de mama ...	37
3.7	Análise estatística dos resultados da <i>Nested-MSP</i>	38
3.8	Imunohistoquímica	39
3.9	Silenciamento do gene <i>NDRG4</i> por shRNA	39
3.10	Transfecção da linhagem celular MCF7	41
3.11	Seleção dos clones com maior nível de silenciamento	42
3.12	Extração de RNA	43

3.13	Síntese de cDNA	43
3.14	Análise do Nível de Expressão por qRT-PCR	44
3.15	<i>Western Blot</i> Fracionado	45
3.16	Ensaio funcionais.....	46
3.16.1	Curva de crescimento.....	46
3.16.2	Ensaio Clonogênico bidimensional.....	47
3.16.3	Ensaio de migração em transwell.....	48
3.16.4	Ensaio de adesão celular	49
3.16.5	Ensaio de Quimiorresistência	50
4	RESULTADOS.....	52
4.1	Estudo do padrão de metilação do DNA da ilha de CpG localizada na região promotora do gene <i>NDRG4</i> em tecido mamário normal e tumoral.....	52
4.2	Padronização e validação da técnica de MSP para a detecção de metilação na região promotora do gene <i>NDRG4</i>	55
4.3	Correlação entre a presença de metilação na região promotora do gene <i>NDRG4</i> detectada através de <i>Nested-MSP</i> e a expressão da proteína <i>NDRG4</i> detectada através de Imunohistoquímica.....	63
4.4	Presença de metilação da região promotora do gene <i>NDRG4</i> em tumores de mama e correlação com dados clínico-patológicos das pacientes	65
4.5	Análise de correlação entre a presença de metilação na região promotora do gene <i>NDRG4</i> e sobrevida livre de metástase à distância	70
4.6	Análise de correlação entre a presença de metilação na região promotora do gene <i>NDRG4</i> e sobrevida global.....	74
4.7	Análise funcional do gene <i>NDRG4</i> em linhagem de tumor de mama MCF7.....	77
4.7.1	Silenciamento gênico por shRNA.....	77
4.7.2	Seleção de clones celulares com silenciamento estável do gene <i>NDRG4</i>	82

4.7.3	Avaliação do nível de expressão de transcritos e da proteína NDRG4 nos clones selecionados para a realização dos ensaios funcionais	84
4.7.4	Caracterização morfológica dos clones selecionados	87
4.8	Ensaio funcional para avaliar o papel biológico do gene <i>NDRG4</i>	88
4.8.1	Efeito do silenciamento do gene <i>NDRG4</i> na taxa de proliferação celular	89
4.8.2	Efeito do silenciamento do gene <i>NDRG4</i> na capacidade de sobrevivência e proliferação celular	91
4.8.3	Efeito do silenciamento do gene <i>NDRG4</i> na migração celular	93
4.8.4	Efeito do silenciamento do gene <i>NDRG4</i> na adesão celular	97
4.8.5	Efeito do silenciamento do gene <i>NDRG4</i> na quimiosensibilidade aos taxanos	100
5	DISCUSSÃO	104
6	CONCLUSÕES	117
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo. Segundo estimativas feitas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2012, dos 518.510 novos casos de câncer diagnosticados na população brasileira, o câncer de mama será o mais freqüente entre os indivíduos do sexo feminino, sendo responsável por 52.680 novos casos da doença, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2011).

O câncer de mama é uma doença bastante heterogênea, apresentando uma grande variabilidade clínica e histopatológica. Mais de 95% dos tumores de mama pertencem a classe dos carcinomas originando-se do epitélio dos lóbulos e ductos das glândulas, mais especificamente das células luminais. Segundo sua histologia, as formas invasivas podem ser divididas em três grupos principais: carcinomas ductais invasivos (IDC), carcinomas lobulares invasivos (ILC) e outros carcinomas invasivos (tipos histológicos especiais) (ISC). Os IDCs constituem 70-85% de todos os carcinomas invasivos de mama, os ILCS 5-20% e os ISCs cerca de 10%. Embora existam controvérsias sobre os prognósticos, há um consenso geral de que pacientes com ISC têm prognóstico melhor que aqueles com IDC ou ILC (TOIKKANEN et al. 1997).

A etiologia do câncer de mama ainda não é totalmente conhecida, visto que, os fatores de risco identificados explicam somente uma pequena parte dos casos. Baseado em estudos epidemiológicos conduzidos em diferentes populações, os fatores de risco já bem estabelecidos incluem: idade avançada, eventos reprodutivos (menarca precoce antes de 12 anos, menopausa tardia após os 55 anos, nuliparidade, gravidez após os 30 anos, tempo de amamentação), uso de hormônios exógenos (contraceptivo oral e terapia de reposição hormonal), estilo de vida (consumo de álcool, tipo de dieta, obesidade e sedentarismo), densidade mamária aumentada na mamografia, aumento da densidade óssea pós-menopausa, história de doença de mama benigna, exposição à radiação ionizante, níveis aumentados de *IGF1* (*Insulin-like growth factor 1*) e prolactina e fatores genéticos (*BRCA1* e *BRCA2*) (DUMITRESCU e COTARLA 2005).

Os tradicionais testes para o diagnóstico de câncer de mama incluem o exame físico, mamografia e citologia aspirativa. Porém, infelizmente esses métodos não são sensíveis o suficiente para identificar o câncer de mama em estágios iniciais (RADPOUR et al. 2011). A principal forma de tratamento para o câncer de mama é a ressecção cirúrgica que pode ou não ser seguida de terapia adjuvante. A extensão da ressecção depende de vários fatores que incluem a histologia, o comprometimento das margens, o estado geral do paciente e a capacidade de tolerar a terapia adjuvante. A terapia adjuvante é adotada em pacientes com tumores maiores que 1 cm ou com metástases nos linfonodos axilares. Três modalidades de terapia adjuvante são comumente utilizadas: a quimioterapia (ex. taxanos e antraciclinas), a

terapia hormonal (ex. Tamoxifeno e inibidores de aromatase) e a radioterapia (VAN POZNAK e SEIDMAN 2002).

Os dois fatores prognósticos mais importantes para o câncer de mama são: a presença de metástases em linfonodos axilares e o tamanho do tumor (STYBLO e WOOD 1998). Os tumores de mama, localizados e em estágio inicial, requerem um tratamento menos agressivo e possuem melhor prognóstico, com uma taxa de sobrevida de 98% em 5 anos. Por outro lado, o diagnóstico tardio, após a ocorrência de metástases, resulta em diminuição da taxa de sobrevida para 27% (ETZIONI et al. 2003).

No entanto, cerca de 30% das pacientes com tumores menores que 1cm e que não apresentam acometimento de linfonodos morrem em decorrência da doença (STYBLO e WOOD 1998). Essas pacientes teoricamente se beneficiariam da administração de terapia adjuvante, contudo não é possível, até o momento, identificar tais pacientes. Por outro lado, a adoção de terapia adjuvante em todas as pacientes submetidas a ressecção cirúrgica é inviável devido a alta toxicidade do tratamento e ao elevado custo do mesmo (THOMSEN et al. 2003). Desta forma, podemos perceber que a presença de metástases em linfonodos axilares e tamanho do tumor são insuficientes para predizer o prognóstico da paciente comprometendo a escolha da melhor abordagem terapêutica.

Assim sendo, uma importante área na pesquisa sobre o câncer de mama é a identificação de genes envolvidos com a progressão tumoral e capacidade metastática, que possam ser utilizados como biomarcadores na

avaliação do prognóstico do paciente (SRINIVAS et al. 2001; NEGM et al. 2002).

A descoberta de biomarcadores para o câncer de mama nas últimas décadas, resultou em um melhor atendimento ao paciente no que diz respeito a detecção precoce da doença, melhor avaliação de prognóstico e novas terapias direcionadas, além de permitir a aplicação de terapias individualizadas para diferentes subgrupos moleculares. Neste contexto, o mais importante biomarcador do câncer de mama é a expressão do receptor de estrógeno (ER- α). Os tumores de mama ER-positivos (cerca de 80%) usam o hormônio esteróide estradiol como principal estímulo de crescimento, sendo portanto, alvo direto de terapias endócrinas com tamoxifeno (WEIGEL e DOWSETT 2010). Já os pacientes ER-negativos, tem um maior potencial de atingir resposta patológica completa com quimioterapia neoadjuvante. Isto pode ser parcialmente explicado pelas maiores taxas de proliferação nesses tumores ER-negativos (JONES et al. 2009). A expressão de progesterona é fortemente dependente da presença dos receptores de estrógeno. Tumores que expressam progesterona, mas não expressam receptor de estrógeno são incomuns e representam <1% de todos os casos de câncer de mama (VIALE et al. 2007). Por esta razão, esses tumores são submetidos a uma reavaliação para eliminar a possibilidade de resultados falso-negativos. Para estes casos, embora o benefício seja limitado, a terapia endócrina com tamoxifeno ainda é amplamente recomendada (WEIGEL e DOWSETT 2010).

Mais recentemente, o oncogene *HER2* foi identificado como indicador de prognóstico em pacientes com tumores de mama. A super-expressão de *HER2*, ocorre em 15% a 25% dos casos de câncer de mama invasivo. Os pacientes com super-expressão de *HER2* (*HER2* positivo) são mais propensos a recidivarem e apresentam uma menor sobrevida global. O *status* de *HER2* deve ser avaliado em todos os casos diagnosticados de câncer de mama, uma vez que os pacientes que apresentam a superexpressão ou amplificação do *HER2* podem ser beneficiados com a terapia anti-*HER2* (WEIGEL e DOWSETT 2010). Esta é uma das mais avançadas estratégias terapêuticas baseada no desenvolvimento do anticorpo monoclonal humanizado, trastuzumab (*Herceptin*; Genentech, Inc, South San Francisco, CA), que foi aprovado em 1998 para o tratamento do câncer de mama metastático em pacientes apresentando super-expressão do gene *HER2* (ROY e PEREZ 2009).

O gene *Ki67*, também surgiu recentemente como um marcador de proliferação tendo valor prognóstico moderado, além de ser considerado para a aplicação de terapia neoadjuvante. O gene *Ki67* é expresso em células em divisão e ausente em células quiescentes. Embora pouco se sabe sobre o papel dessa proteína na divisão celular, o *Ki67* é expresso durante as fases G1, S, G2 do ciclo celular com um pico durante a mitose e uma ausência na fase G0 (JONES et al. 2009). Assim como a proteína *Ki67*, a ciclina D1 e a ciclina E também são consideradas marcadores moleculares em potencial para o câncer de mama (WEIGEL e DOWSETT 2010).

Nos últimos anos, o perfil de expressão gênica dos tumores de mama tem sido utilizado com sucesso para avaliar o prognóstico da doença e orientar a terapia. Atualmente, 3 kits para avaliar o perfil de expressão gênica em pacientes com câncer de mama estão disponíveis nos EUA. Estes kits avaliam a expressão de genes específicos através das técnicas de qRT-PCR ou DNA *microarrays*. O *Oncotype DX™ Assay Breast cancer* (*Genomic Health, Redwood City, CA*), avalia o perfil de expressão de 21 genes por qRT-PCR, destes, 16 genes são relacionados com a progressão tumoral e 5 são genes de referência (MARCHIONNI 2007). Os resultados do teste são reportados como uma pontuação que vai de 0 a 100 e se correlaciona com a probabilidade de recorrência em 10 anos, em pacientes ER positivos sem acometimento linfonodal.

Já o kit *MammaPrint®* (Amsterdam, Holanda), é baseado na tecnologia de *microarrays*. Resumidamente, este teste classifica os pacientes por meio do cálculo da correlação do coeficiente entre os níveis de expressão de 70 genes em pacientes com até 55 anos sem acometimento linfonodal. Assim, com base no perfil de expressão desses genes os pacientes são classificados em dois grupos, de melhor ou de pior prognóstico.

Por fim, o *The Breast Cancer Profiling Test*, também conhecido como o teste da razão H/I, por ser baseado na relação de expressão de dois genes HOXB13 (*homeobox gene-B13*) e IL17RB (*interleukin- 17B receptor gene*). Esse kit foi desenvolvido pela AviaraDX e licenciado pela Quest Diagnostics, Inc. (Lyndhurst, NJ). A alta expressão do HOXB13 prevê a possibilidade de

recorrência da doença, já a alta expressão de IL17BR prevê o contrário. Portanto, quanto maior a proporção entre os dois genes maior a probabilidade de recorrência (MARCHIONNI 2007).

1.2 AS BASES GENÉTICAS E EPIGENÉTICAS DO CÂNCER

Câncer é um termo usado para definir um grande grupo de doenças que afetam diversos tecidos e têm em comum a proliferação anormal das células, que, em um segundo estágio, podem invadir os tecidos adjacentes e a colonizar órgãos distantes do sítio primário de proliferação. O câncer é causado por alterações genéticas e epigenéticas que se acumulam no material genético das células normais. Essas alterações são resultantes de erros na replicação do DNA durante a divisão celular e podem também ser induzidas através da exposição a agentes mutagênicos exógenos como, por exemplo, a exposição à luz ultravioleta e o consumo de álcool e tabaco, ou a agentes mutagênicos endógenos resultantes do metabolismo celular. Dois tipos de alterações somáticas são encontradas em tumores humanos: as mutações *drivers* e as *passengers*. As mutações *drivers* conferem à célula uma vantagem proliferativa e estão envolvidas de forma causal na formação do tumor, ao passo que as mutações *passengers* são biologicamente neutras e não conferem vantagem a célula tumoral (IWASA e MICHOR 2011).

Os tumores esporádicos, com raras exceções, originam-se de uma única célula. No entanto, durante cada divisão celular, uma nova alteração somática pode surgir nas células-filhas. Assim, a tumorigênese pode ser

comparada a teoria da evolução proposta por Charles Darwin, na qual as mutações *drivers* são selecionadas durante a tumorigênese através de várias ondas de seleção clonal conferindo à célula tumoral características vantajosas, favorecendo a sobrevivência e maior capacidade de proliferação, além de invasão e colonização de outros tecidos (CAHILL et al. 1999).

Várias etapas de proliferação são necessárias para produzir tumores macroscópicos. Desta forma, geralmente quando um tumor é detectado, ele é composto por bilhões de células malignas. Estas células carregam consigo todas as mutações somáticas que estavam presentes na célula fundadora (*Drivers*), além das mutações adicionais adquiridas durante a progressão do tumor (*drivers* e/ou *passengers*). Assim, embora a maioria dos tumores seja de origem monoclonal, a expansão do tamanho da população que ocorre após a transformação maligna, juntamente com a aquisição constante de mutações, promove um aumento dramático na heterogeneidade genética intratumoral (MARUSYK e POLYAK 2010). A existência da heterogeneidade clonal tem sido documentada para uma série de doenças malignas, incluindo leucemias; câncer de mama, próstata, cólon, cérebro, esôfago, cabeça e pescoço, bexiga, carcinomas ginecológicos; lipossarcoma; e mieloma múltiplo (MARUSYK e POLYAK 2010).

Recentemente, os avanços nas tecnologias de seqüenciamento permitiram uma caracterização mais abrangente das alterações genéticas que ocorrem nos tumores. Estas alterações incluem, as variações do número de cópia (CNVs), rearranjos cromossômicos, mutações pontuais e pequenas inserções e deleções (Indels) bem como alterações epigenéticas

envolvendo a modificação de histonas e metilação do DNA, como veremos a seguir (GALANTE et al. 2011; MARTÍN-SUBERO e ESTELLER 2011).

1.3 ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS E A METILAÇÃO DO DNA

A metilação do DNA, juntamente com a modificação de histonas são os principais mecanismos epigenéticos, capazes de alterar o padrão de expressão gênica sem afetar a seqüência de nucleotídeos do DNA (JONES e BAYLIN 2002; LAIRD 2003). A presença de metilação em regiões promotoras está diretamente associada à ausência ou diminuição da atividade transcricional, sendo portanto, um importante mecanismo de regulação da expressão gênica (RAZIN e CEDAR 1977; RAZIN e SHEMER 1999; ATTWOOD et al. 2002). A metilação é o mecanismo epigenético mais bem caracterizado, sendo um dos mecanismos envolvidos na manutenção da homeostasia da expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário, na diferenciação de tecidos e na inativação do cromossomo X (*imprinting genômico*). A metilação do DNA atua também na manutenção da estabilidade genômica, metilando seqüências repetitivas (*Alu*) e evitando a reativação de elementos transponíveis de DNA.

A metilação é uma característica de genomas eucariotos ocorrendo preferencialmente no carbono 5 de citosinas localizadas a 5' de guaninas. As guaninas precedidas de citosinas formam um dinucleotídeo CpG. A transferência do grupo metil ao carbono 5 das citosinas é catalisada pelas DNA metiltransferases (DNMTs) e estima-se que aproximadamente, 70-80% dos dinucleotídeos CpG, estejam metilados no genoma humano. No entanto,

os dinucleotídeos CpGs não se encontram randomicamente distribuídos no genoma, em vez disso, estão freqüentemente agrupados em regiões com alto conteúdo CG, denominadas “Ilhas de CpG” (RAZIN e CEDAR 1977; MCCLELLAND e IVARIE 1982).

GARDINER-GARDEN e FROMMER (1987), definiram Ilhas de CpG como sequencias de DNA contendo mais de 200 pares de bases, com conteúdo de guaninas e citosinas superior a 50% e uma razão entre a sequencia observada e a freqüência esperada de nucleotídeos CpG igual ou superior a 0,6. Com base nas sequências completas dos cromossomos 21 e 22, TAKAI e JONES (2002) sugeriram critérios mais estridentes que aumentavam a probabilidade das ilhas CpG estarem associadas à região 5' dos genes, além de excluir elementos repetitivos do tipo Alu ricos em dinucleotídeos CpG. Segundo TAKAI e JONES (2002), uma ilha de CpG deve ser definida como sequências de DNA maior que 500 pares de bases, com conteúdo de guaninas e citosinas superior a 55% e uma razão entre a sequência observada e a frequência esperada de nucleotídeos CpG igual ou superior a 0,65. As Ilhas de CpG são encontradas nas proximidades dos promotores dos genes de expressão constitutiva e em 40% das regiões promotoras de genes que apresentam uma expressão tecido específica (MCCLELLAND e IVARIE 1982).

1.4 ALTERAÇÕES NO PADRÃO DE METILAÇÃO DO DNA EM TUMORES

Alterações no padrão de metilação são freqüentemente encontradas em diversas patologias incluindo as neoplasias (SCHMUTTE e JONES 1998; BAYLIN et al. 1998; JONES e BAYLIN 2002). Dois tipos de alterações no padrão de metilação são freqüentemente encontrados em tumores: a hipometilação global do genoma e a hipermetilação localizada de ilhas de CpG presentes na região promotora de genes relacionados ao câncer (EHRlich 2002; ESTELLER 2002). Desta forma, essas alterações no padrão de metilação têm sido amplamente utilizadas na caracterização de novos genes envolvidos no processo de formação e progressão tumoral.

Dados da literatura reportam o envolvimento do mecanismo de metilação, de forma direta ou indireta, no processo de silenciamento de vários genes em tumores de mama (WIDSCHWENDTER e JONES 2002). Entre eles estão genes envolvidos com a aquisição das seis características essenciais para a sobrevivência das células tumorais, definidas por HANAHAN e WEINBERG (2000): auto-suficiência em relação a fatores de crescimento (*ER*, *PR*, *RASSF1A*, *SOCS1*), potencial replicativo ilimitado (*CDKN2A*, *CDKN1A*, *CCND2*, *RARB*), insensibilidade a sinais inibitórios do crescimento (*HIN1*, *TGFBR2*, *RFC*), evasão da morte celular programada (*CASP8*, *TP53*, *DAPK*, *TWIST*), angiogênese sustentada (*TP73*, *MASPIN*, *THBS1*), invasão tecidual e metástase (*CDH1*, *TIMP3*, *APC*, *BCSG1*, *prostatina*).

Ao longo da década que se seguiu, estas seis características foram consolidadas e na tentativa de englobar as contribuições do microambiente tumoral na tumorigênese, mais quatro categorias foram propostas. Dessas quatro, duas já foram incluídas: desenvolvimento de instabilidade genômica e a indução do estado inflamatório no microambiente tumoral. As outras duas características são consideradas emergentes, são elas: capacidade de reprogramação do metabolismo celular, apoiando a proliferação neoplásica; e por fim, a capacidade de evasão das células tumorais da destruição, pelo sistema imunológico, em particular por linfócitos T e B, macrófagos e células *Natural killer* (HANAHAN e WEINBERG 2011).

A identificação de regiões diferencialmente metiladas no genoma tumoral é um passo importante para se entender o papel da metilação na tumorigênese, mas também para ampliar o leque de marcadores moleculares disponíveis para o diagnóstico e a avaliação clínica do câncer de mama. A utilização da metilação do DNA como marcador tumoral é vantajosa, já que ao contrário da molécula de RNA e da proteína, o DNA é bastante estável e de fácil manipulação viabilizando a implantação de testes de detecção na rotina clínica. Além disso, devido a alta especificidade e sensibilidade das técnicas utilizadas para avaliar o padrão de metilação (geralmente baseadas em PCR), células tumorais com alterações na metilação podem ser detectadas mesmo em meio a uma grande quantidade de células normais. Por fim, ao contrário das alterações genéticas, que são de tipos diferentes e ocorrem em diferentes regiões do gene, as alterações no padrão de metilação ocorrem sempre na mesma região, simplificando a

metodologia de detecção (VERMA e SRIVASTAVA 2002; ESTELLER 2003; PATEL et al. 2003).

Neste cenário, vários genes metilados foram identificados em câncer de mama. As funções biológicas desempenhadas por eles incluem: regulação do ciclo celular (*p16INK4a*, *p14ARF*, *14-3-3 σ* , *ciclina D2*, *p57KIP2*), apoptose (*APC*, *DAPK1*, *HIC1*, *HOXA5*, *TWIST*, *TMS1*), reparo do DNA (*GSTP1*, *MGMT*, *BRCA1*), regulação hormonal (*ER α* , *PR*), adesão celular e invasão (*CDH1*, *APC*, *TIMP3*), angiogênese (*maspin*, *THBS1*), inibição de crescimento celular (*RAR β* , *RASSF1A*, *SYK*, *TGF β RII*, *HIN1*, *NES1*, *SOCS1*, *SFRP1*, *WIF1*), dentre outros (LO e SUKUMAR 2008).

Como consequência desse perfil favorável, ao longo da última década, vários ensaios foram desenvolvidos objetivando a detecção de metilação em amostras nas quais a quantidade de material é muito limitada (LAIRD 2003). Nesse contexto, FACKLER et al. (2004) desenvolveram uma técnica chamada QM-MSP (*Quantitative Multiplex Methylation Specific PCR*) capaz de amplificar sequências metiladas a partir de pequenas quantidades de DNA. Esta técnica combina multiplex PCR e MSP quantitativo e abre a possibilidade de usar os fluidos corporais como material para detecção de metilação, incluindo lavado ductal, soro e aspirado por agulha fina, bem como em amostras parafinadas e fragmentos de biópsias. Através desse método, foi avaliado a hipermetilação de genes, sabidamente silenciados por metilação em tumores de mama, incluindo *NES-1*, *APC*, *ciclina D2*, *RAR β* , *TWIST*, *RASSF1A*, e *HIN1* em tecido e lavado ductal, permitindo discriminar os tecidos normais, tumores benignos e tumores malignos. No entanto,

antes da utilização clínica, estes achados necessitam validação através de estudos clínicos prospectivos. Além disso, os testes para avaliar a metilação necessitam padronização, simplificação, bem como avaliação em programas de garantia de qualidade externa. Contudo, acredita-se que os genes metilados têm o potencial para fornecer uma nova geração de biomarcadores para o câncer (FACKLER et al. 2004).

1.5 IDENTIFICAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE METILADOS ATRAVÉS DO TRATAMENTO DE LINHAGENS TUMORAIS COM O AGENTE DESMETILANTE 5-AzaDc SEGUIDO DE ANÁLISE GLOBAL DA EXPRESSÃO GÊNICA

A identificação em larga escala de genes diferencialmente metilados em tumores pode ser feita combinando-se o tratamento de linhagens tumorais com agentes desmetilantes e metodologias para a análise global do padrão de expressão gênica para a identificação de genes induzidos pelo tratamento (YAMASHITA et al. 2002). Agentes desmetilantes como, por exemplo, o 5-AzaDc (5-aza-2'-deoxicitidina), são análogos da citosina e, quando incorporados à molécula de DNA, se ligam irreversivelmente à DNA-metiltransferase, impedindo a ação da enzima durante o processo de divisão celular (CHRISTMAN 2002). Desta forma, o tratamento com 5-AzaDc é capaz de reduzir significativamente os níveis de metilação existentes na célula e reativar a expressão de genes regulados por metilação.

A hipermetilação, causando o silenciamento de genes supressores de tumor, é um evento bastante característico em tumores humanos. Assim, YAMASHITA et al. (2002) usando agentes desmetilantes (5-AzaDc) e inibidores de histona deacetilase (tricotatina A), para a reativação de genes supressores de tumor epigeneticamente silenciados em carcinoma de células escamosas do esôfago (ESCC); identificaram 7 candidatos a supressor de tumor: *CRIP-1*, *D apolipoproteína*, *U neuromedina*, *NMDAR2B*, *HOP*, *OB1*, e *NECC1* (YAMASHITA et al. 2002, 2008; KIM et al. 2006). Nesse mesmo contexto, CALMON et al. (2009), estudaram quatro linhagens celulares derivadas de câncer de cabeça e pescoço (FaDu, UM-SCC-14A, UM-SCC-17A e UM-SCC-38A). Nesse estudo, foram identificados dois genes epigeneticamente silenciados e reativados pelo tratamento com 5-AzaDc, *CRABP2* e *MX1*. Além disso, a ausência da proteína CRABP2 foi associada com diminuição da sobrevida livre de doença, indicando o uso da expressão do gene *CRABP2* como um biomarcador de prognóstico para câncer de cabeça e pescoço (CALMON et al. 2009).

Em nosso laboratório, foi desenvolvido um projeto (Projeto Regular FAPESP 04/09088-9) cujo objetivo foi identificar genes diferencialmente metilados em linhagens tumorais de mama. Neste projeto, combinamos o tratamento de linhagens tumorais de mama (MCF-7, MDA-MB-435 e MDA-MB-231) com o agente desmetilante 5-AzaDc com a análise global do padrão de expressão pela técnica de *microarrays* de cDNA, para a identificação dos genes induzidos pelo o tratamento. As característica das linhagens provenientes de tumor de mama foram descritas na Quadro 1.

Quadro 1 - Características das linhagens celulares

Linhagens	N° ATCC	Patologia	Origem	Potencial Invasivo ^a	Potencial Metastático ^b
MCF-7	HTB-22	Adenocarc	Infusão pleural	+ / ++	--
MDA-MB-231	HTB-26	Adenocarc	Infusão pleural	++++	+
MDA-MB-435	HTB-129	Ductal Carcinoma	Infusão pleural	+++	++++

Fonte: Quadro baseado em dados publicados anteriormente (THOMPSON et al. 1992).

^a Potencial invasivo analisado em ensaios de quimioinvasão.

^b Potencial metastático relativo verificado através de ensaios de metástase espontânea em camundongo nude.

Em resumo, um total de 46 (0.95%), 140 (2.9) e 71 (1.5%) genes de 4.608 genes analisados (clones ORESTES - *Open reading frame ESTs*) apresentaram um aumento de expressão de pelo menos três vezes nas linhagens MCF-7, MDA-MB-435 e MDA-MB-231, respectivamente; totalizando 257 (5.4%) genes distintos. Do total de genes identificados, seis (2.3%) foram induzidos nas três linhagens analisadas e 31 (11.9%) foram induzidos em pelo menos duas linhagens. A indução em pelo menos duas linhagens foi estabelecida como um dos critérios para a seleção de candidatos para validação por qRT-PCR (*Quantitative Reverse transcriptase – PCR*).

Outro critério adotado, foi a presença de ilha CpG na região promotora do gene induzido. Dos 37 genes induzidos em pelo menos duas

linhagens, 29 (78.4%) apresentaram ilha de CpG na sua região promotora, e desses, 23 tiveram a sua expressão avaliada por qRT-PCR. Dos 23 genes avaliados, 16 apresentaram aumento de expressão de pelo menos três vezes após o tratamento; confirmando os dados iniciais do *microarray*.

A avaliação do padrão de metilação da região promotora desses genes nas linhagens submetidas ou não ao tratamento foi feita através da técnica de modificação do DNA por bissulfito de sódio seguida de seqüenciamento. Quatro genes (*NDRG4*, *GFPT2*, *PLAU* e *RGS3*) apresentaram redução nos níveis de metilação da região promotora após o tratamento com o agente desmetilante, confirmando assim, o envolvimento da metilação na regulação da expressão desses genes.

1.6 ESTUDO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DA ILHA CpG LOCALIZADA NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *NDRG4* EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA

A identificação da ilha de CpG na região promotora do gene *NDRG4*, foi feita através do programa *Blat* (<http://genome.ucsc.edu/>) disponibilizado pela Universidade de Santa Cruz (California - EUA), alinhando o mRNA do gene contra o genoma humano. A análise da ilha de CpG disponibilizada pelo *Blat* é feita através do programa *CpG Plot* (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>). Desta forma, foram encontradas três ilhas de CpG para o gene *NDRG4*, que são denominadas CpG 186, CpG 20 e CpG 41 de acordo com o número de dinucleotídeos CpG presentes na

região (Figura 1). Por estar localizada mais a 3' do sítio de início de transcrição, a probabilidade da ilha CpG 186 estar relacionada com a regulação do gene é maior. Esta ilha possui 186 dinucleotídeos CpG distribuídos ao longo de 1563 pares de bases, que estão localizados nos nucleotídeos - 583 a +980 em relação ao sítio de início de transcrição do gene (Figura 3).

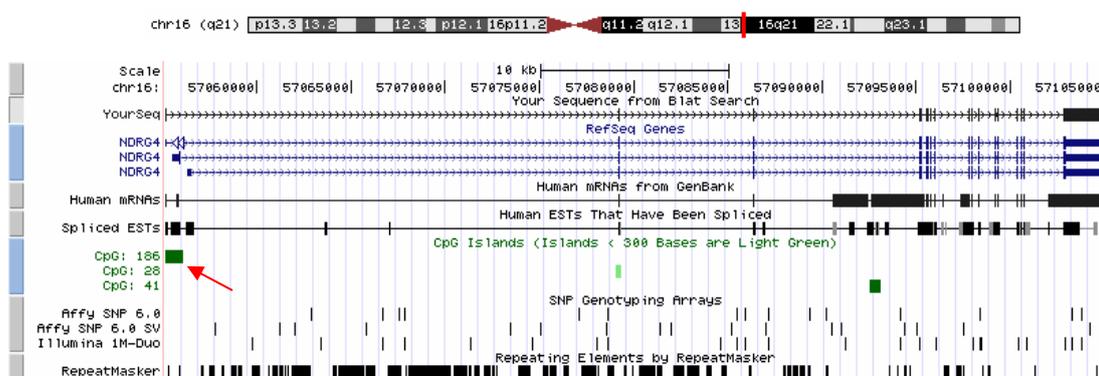


Figura 1 - Identificação da ilha de CpG na região promotora do gene *NDRG4*. A identificação da ilha de CpG do gene *NDRG4* foi feita através do programa Blat (<http://genome.ucsc.edu/>), alinhando o mRNA do gene contra o genoma humano. As três ilhas CpG encontradas para o gene *NDRG4* estão em verde (CpG 186, CpG 20 e CpG 41). A ilha CpG 186, seta vermelha, esta localizada a 3' do sítio de início de transcrição.

Após a obtenção da seqüência nucleotídica, iniciadores para a amplificação da ilha de CpG do gene *NDRG4* foram desenhados. O DNA das três linhagens tumorais de mama, (MCF-7, MDA-MB-435 e MDA-MB-231) submetidos ou não a ação do agente desmetilante 5-AzaDc foram tratados com bissulfito de sódio, para a conversão das bases C (Citosina) não metiladas em U (Uracila). O tratamento promove a conversão de citosinas não-metiladas em uracilas através de uma reação de deaminação,

o que não ocorre com as citosinas metiladas (CLARK et al. 1994). Após o tratamento, parte da ilha 186, contendo 82 dinucleotídeos CpG, distribuídos ao longo de 538 nucleotídeos, e localizada nos nucleotídeos -387 a +103 em relação ao sítio de início de transcrição do gene, foi amplificada e clonada. Então, cinco clones independentes de cada linhagem tratada ou não com agente desmetilante (Mock e 5-Aza) foram seqüenciados (Figura 2).

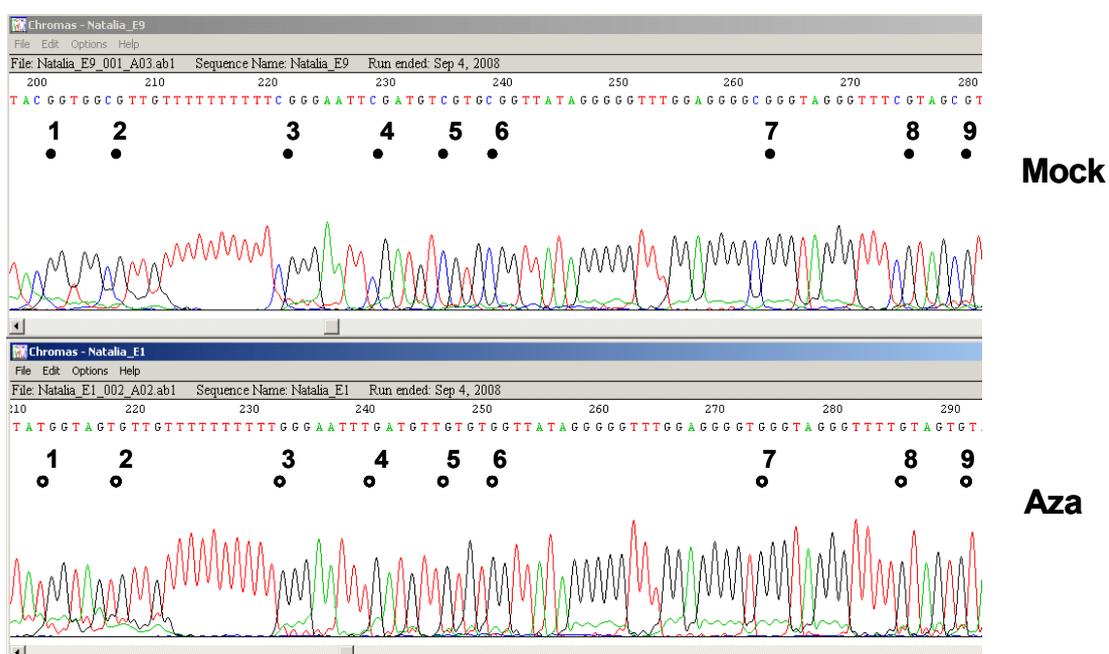


Figura 2 - Cromatograma representativo do seqüenciamento de um fragmento de Ilha de CpG do gene *NDRG4* na linhagem MDA-MB-435 antes (Mock) e após (Aza) a submissão ao agente desmetilante 5-AzaDc. Os círculos preenchidos representam as citosinas metiladas na linhagem antes do tratamento, já na linhagem tratada com agente desmetilante, os círculos não preenchidos representam as citosinas que foram desmetiladas devido ao tratamento. Estas citosinas desmetiladas, após a conversão com bissulfito de sódio, são transformadas em U (uracila) e substituídas pelo nucleotídeo T (timina) durante as reações de PCR e seqüenciamento.

Usando a linhagem não tratada (Mock) como referência, foi observado uma redução de 69.8 e 91.9% nos níveis de metilação na ilha de CpG do gene *NDRG4* nas linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-435, respectivamente. Já a linhagem MCF7, não apresentava níveis elevados de metilação na região promotora deste gene e desta forma, não foram observadas grandes alterações nos níveis de metilação após o tratamento com agente desmetilante (12.6%). Esses dados (não publicados) são consistentes com os resultados de indução de expressão obtidos nos experimentos iniciais de *microarrays* e validados por qRT-PCR, nos quais foi observado maior expressão do gene *NDRG4* após o tratamento com agente desmetilante nas linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-435 (Tabela 1 e Figura 3).

Tabela 1 - Diferença de expressão do gene *NDRG4* entre as linhagens tratadas e não tratadas com agente desmetilante (5-AzaDc)

Gene	Linhagem		% Meth	Microarray	qRT-PCR
<i>NDRG4</i>	MCF-7	Mock	54,6	7,12	7,5
		Aza	42		
	MDA-MB-231	Mock	90	3,59	8,24
		Aza	20,24		
	MDA-MB-435	Mock	92,4	3,12	15,81
		Aza	0,48		

Avaliação da frequência de metilação global do fragmento seqüenciado da região promotora do gene *NDRG4* (CpG 186) e diferença de expressão (*fold*) entre as linhagens tumorais de mama submetidas ou não ao agente desmetilante 5-AzaDc, pela técnica de *Microarray* e qRT-PCR.

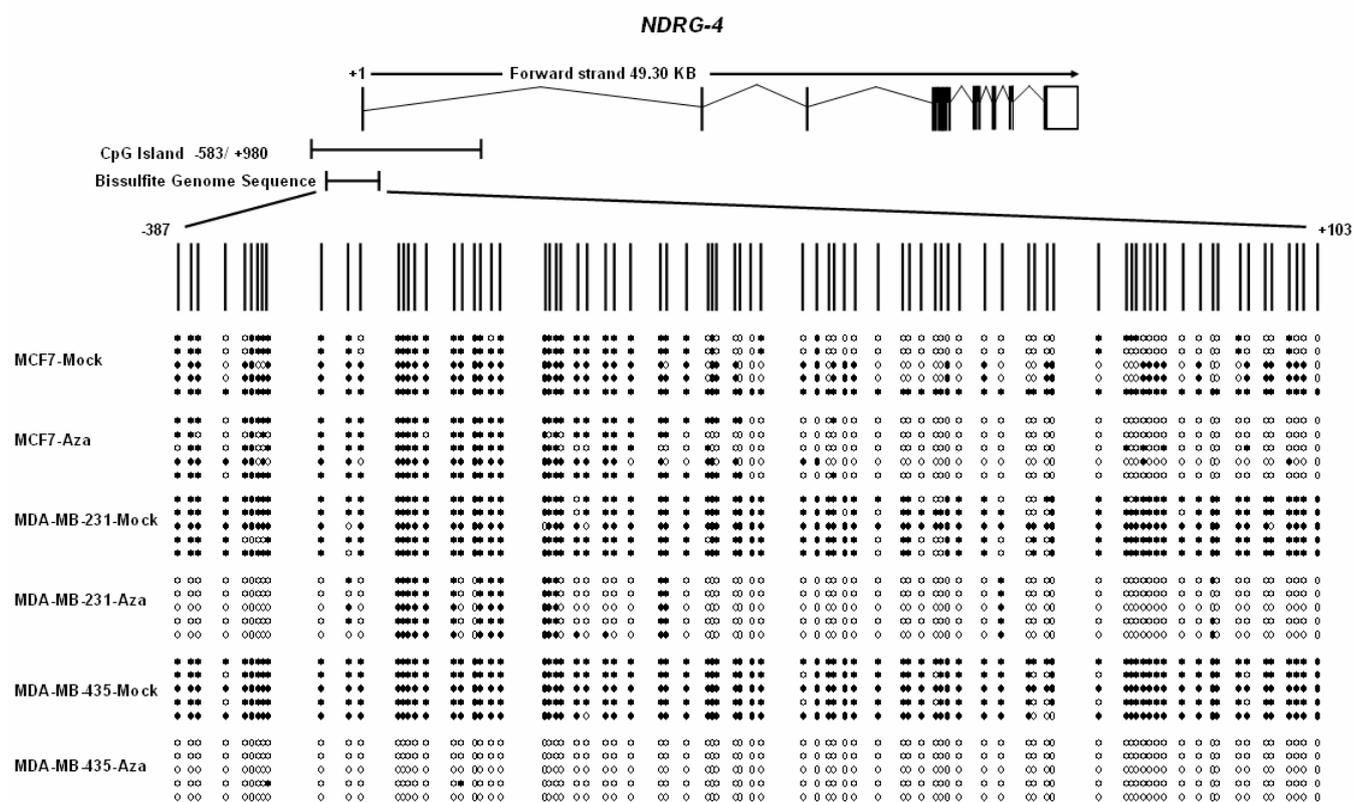


Figura 3 - Análise da frequência de metilação de 82 dinucleotídeos CGs da ilha de CpG na região promotora do gene *NDRG4*. Os exons e as regiões não traduzidas foram representadas por caixas preenchidas e não preenchidas respectivamente, já os introns foram representados por linhas interligando os exons. O sítio de início de transcrição foi representado por +1. A figura expandida representa a posição da ilha de CpG na região promotora do gene, analisada por sequenciamento após a conversão por bissulfite de sódio. Os traços verticais representam os dinucleotídeos CGs individualizados, cujo espaçamento reflete a densidade de dinucleotídeos CGs nesta região. O perfil de metilação nas linhagens tratadas (Aza) e não tratadas (Mock) estão representados na parte inferior do painel. Cada linha representa um clone seqüenciado, os círculos vazios e preenchidos representam os dinucleotídeos CGs desmetilados e metilados, respectivamente. Foram analisadas as linhagens tumorais de mama MCF7, MDA-MB-231 e MDA-MB-435, tratadas ou não com agente desmetilante 5-AzaDc.

1.7 A FAMÍLIA NDRG (*DOWN STREAM REGULATED GENE*)

A família NDRG (*N-myc downregulated gene*) é composta por quatro membros denominados *NDRG1-4*. O primeiro membro identificado e responsável pelo nome da família foi o *NDRG1*, uma vez que sua expressão é reprimida pelos oncogenes *N-myc* e *C-myc*. Usando a técnica de *differential display* (LIANG e PARDEE 1992), foi observado que o gene *NDRG1* está reprimido em linhagens celulares de neuroblastoma e neuroepitelioma contendo *N-myc* amplificado. A interação entre a proteína *N-myc* com o promotor do gene *NDRG1* foi evidenciada *in vitro* através da supressão de *N-myc*, resultando em reativação do gene *NDRG1* (LI e KRETZNER 2003). No entanto, embora o nome NDRG pressuponha que todos os genes dessa família sejam regulados pelo oncogene *N-myc*, não foram observadas evidências de interações entre a proteína *N-myc* e a região promotora dos membros *NDRG3* e *4* (MELOTTE et al. 2010).

Os genes dessa família codificam proteínas com localização citoplasmática, conservadas evolutivamente e que pertencem a superfamília das alfa/beta hidrolases. No entanto, nenhum membro possui o motivo catalítico necessário para atuação como uma hidrolase (SHAW et al. 2002). A sequência de aminoácidos dos membros da família NDRG apresenta homologia que varia de 57% a 65% entre si. Análises filogenéticas revelaram que os genes *NDRG1* e *NDRG3* pertencem a uma sub-família enquanto *NDRG2* e *NDRG4* pertencem a outra (QU et al. 2002). Além disso, a homologia global entre os membros da família NDRG sugere que eles se

originaram através de eventos de duplicação gênica durante a evolução (MELOTTE et al. 2010).

Todos os membros da família NDRG contêm uma ilha CpG em sua região promotora em torno do sítio de início da transcrição (MELOTTE et al. 2010). O gene *NDRG1* está localizado no cromossomo 8q24.2 e codifica para uma proteína de 394 aminoácidos distribuídos ao longo de 16 exons e sua expressão é ubíqua (BANDYOPADHYAY et al. 2004). Já o gene *NDRG2* está localizado no cromossomo 14q11, possui duas variantes de *splicing*: a *NDRG2*, que codifica para uma proteína de 371 aminoácidos distribuídos ao longo de 14 exons, e a *NDRG2*^{VAR} codifica para uma proteína de 357 aminoácidos distribuídos ao longo de 13 exons (DENG et al. 2003). O seu padrão de expressão em tecidos humanos foi avaliado por *Northern blot* e sugere uma inversa correlação entre o nível de expressão e taxa de proliferação celular (YAO et al. 2008). O gene *NDRG3* está localizado no cromossomo 20q11, codifica para uma proteína de 363 aminoácidos distribuídos ao longo de 16 exons. Altos níveis de expressão do gene *NDRG3* foram detectados em testículo, ovário e próstata através de *Northern blot* (ZHAO et al. 2001).

Por fim, o gene *NDRG4* foi primeiramente identificado em cérebro de rato e denominado *Bdm1* (*brain development-related molecule 1*) (YAMAUCHI et al. 1999). Em humanos, este gene está localizado no cromossomo 16q21-22.1, sendo composto por 17 exons distribuídos ao longo de 26 kilobases. Três transcritos gerados por *splicing* alternativo foram identificados para esse gene *NDRG4-B*, *NDRG4-B*^{VAR} e *NDRG4-H*. *NDRG4-B*

e *NDRG4-B^{VAR}* foram isoladas a partir de biblioteca de cérebro, enquanto *NDRG4-H* foi isolada a partir de biblioteca de coração. As três isoformas diferem na região *5'UTR*, mas apresentam a região *3'UTR* idênticas, contendo 2 sítios de poliadenilação alternativos. As isoformas *NDRG4-B* (3160 bp) e *NDRG4-B^{VAR}* (3199 bp) codificam proteínas compostas por 339 e 352 aminoácidos, respectivamente. Já a isoforma *NDRG4-H* possui o primeiro ATG (*starting códon*) determinado por predição, seu transcrito é composto por 3173 de bases e codifica uma proteína composta por 371 aminoácidos. As diferentes isoformas de *splicing* têm expressão tecido-específica, sendo *NDRG4-B* expressa apenas no cérebro, enquanto *NDRG4-H* é expressa em coração e cérebro (ZHOU et al. 2001). O distinto padrão de expressão desta família sugere que seus quatro membros possuem diferentes, porém relacionadas, funções nos diferentes tecidos em que estão presentes (QU et al. 2002).

Embora a função exata dos membros da família NDRG não seja clara, algumas evidências sugerem que mutações nestes genes estão associadas com diversas doenças neurológicas e síndromes eletrofisiológicas. Além disso, a expressão aberrante de membros dessa família está associada a funções oncogênicas e supressoras tumorais que afetam as principais características da carcinogênese como, proliferação, diferenciação, migração e invasão celular (MELOTTE et al. 2010).

Diversos estudos vêm revelando a associação do gene *NDRG1* com tumorigênese, mais especificamente supressão de metástases. Característica esta, observada diante da diminuição da capacidade invasiva

tanto *in vitro* como *in vivo*, em ensaios superexpressando *NDRG1* em linhagens celulares de câncer de cólon, próstata e de mama (KOVACEVIC e RICHARDSON 2006). A expressão de *NDRG1* está significativamente reduzida em diferentes tumores, incluindo mama, cólon e próstata (BANDYOPADHYAY et al. 2004). A metilação da região promotora do gene *NDRG1* esta envolvida com inibição de expressão em linhagens tumorais, uma vez que a sua reativação foi observada através do uso de agente desmetilante. Em tumores de mama, o nível de expressão de *NDRG1* está negativamente correlacionado com o aparecimento de metástase em ossos e linfonodos. Entretanto, não há correlação com o tamanho ou grau histológico do tumor (BANDYOPADHYAY et al. 2004). Considerando o envolvimento do gene *NDRG1* com supressão de metástase, foi proposto que a sua expressão fosse usada como um marcador de bom prognóstico em pacientes com câncer. Assim, foi observado em pacientes com câncer de mama e de próstata com maior nível de expressão de *NDRG1*, apresentaram maiores taxas de sobrevida em cinco anos. Este dado também foi observado em pacientes com câncer colorretal, nos quais a sobrevida de 2 anos para os pacientes com tumor expressando *NDRG1* foi de 82,4%, enquanto a sobrevida para pacientes com baixa expressão de *NDRG1* foi de 69,6%. Em pacientes com câncer de pâncreas também foi observada uma correlação estatisticamente significativa entre a expressão de *NDRG1* e melhor prognóstico (KOVACEVIC e RICHARDSON 2006).

O gene *NDRG2* foi identificado em um estudo que visava isolar genes candidatos a supressor de tumor, com níveis de expressão reduzidos em

glioblastoma. Assim, foi mostrado que o gene *NDRG2* é expresso em tecidos cerebrais normais e gliomas de baixo grau, mas sua expressão é significativamente reduzida em glioblastoma (DENG et al. 2003). Segundo YAO et al. (2008), a redução na expressão do gene *NDRG2* pode ser observada em vários tumores tais como: meningioma, glioblastoma e câncer gástrico. Em meningiomas grau III e em um sub-grupo de meningiomas de baixo grau (com comportamento clínico agressivo), a baixa expressão do *NDRG2* foi detectada em nível de mRNA e proteína. No caso de câncer gástrico, pacientes portadores da doença foram divididos em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de expressão do gene *NDRG2*. A taxa de sobrevivência dos pacientes com ausência de expressão desse gene, foi reduzida quando comparada a taxa de sobrevivência dos pacientes que apresentaram expressão do gene. Este dado sugere que a perda de expressão do gene *NDRG2* pode ser usada como um fator de prognóstico para câncer gástrico. Em um outro trabalho também utilizando meningiomas como objeto de estudo, foi detectada a associação entre a perda de expressão do gene *NDRG2* e hipermetilação (LUSIS et al. 2005). Nesse contexto, a hipermetilação na região promotora do gene *NDRG2* foi observada também em tumores de mama, cólon, fígado, glioblastomas primários, câncer coloretal bem como em linhagens celulares de câncer de pulmão (MELOTTE et al. 2010).

O envolvimento do gene *NDRG3* com o processo de tumorigênese ainda não é bem conhecido porém, um recente trabalho sugere que o gene

NDRG3 é regulado por andrógeno e sua superexpressão contribui com o fenótipo maligno de células tumorais de próstata (WANG et al. 2009).

A caracterização funcional do gene *NDRG4* foi realizada inicialmente em cérebro de rato, onde a expressão desse gene foi detectada em abundância. Os resultados obtidos sugerem que este gene participe de processos de diferenciação celular e formação de neuritos (OHKI et al. 2002). Nesse trabalho, os autores avaliaram se a proteína *NDRG4* contribui para a diferenciação de células neurais, onde células PC12 de rato foram silenciadas para o gene *NDRG4* usando cDNA *anti-sense*. Dos clones estavelmente transfectados, seis clones apresentaram níveis reduzidos de proteína de *NDRG4*, mas, inesperadamente, dois clones apresentaram níveis bastante elevados da proteína *NDRG4*. Os clones que apresentaram diminuição dos níveis da proteína *NDRG4* apresentaram neuritos mais curtos do que as células controle. Já os clones expressando maiores quantidades de proteína *NDRG4* não mostraram supressão do crescimento de neuritos. Estes resultados sugerem que *NDRG4* desempenha um papel no crescimento de neuritos em células PC12 (OHKI et al. 2002).

O primeiro estudo funcional silenciando o gene *NDRG4* em um animal vertebrado, *Zebrafish*, mostrou que embora esse gene não seja necessário para a especificação e diferenciação precoce das células do miocárdio, o gene *NDRG4* exerce um papel importante na regulação da proliferação celular dos miócitos e no desenvolvimento cardíaco normal. Assim, foi demonstrado que o silenciamento do gene *NDRG4* resulta na diminuição do número de cardiomiócitos comprometendo a morfologia cardíaca e

resultando em um coração de fraca contratibilidade e de ritmo lento (QU et al. 2008). Outro interessante estudo funcional foi feito por YAMAMOTO et al. (2011), que geraram linhagens de camundongos deficientes (Knockout) para o gene *NDRG4*. Os animais em questão apresentaram dificuldades de memorização e de aprendizagem espacial, mas não apresentaram deficiência na função motora. Nesse estudo, eles também induziram a isquemia focal temporária do cérebro, sendo observado que os animais deficientes para o gene *NDRG4* apresentaram lesões maiores e problemas neurológicos mais severos quando comparado com os animais controles. Os resultados desse trabalho indicam que *NDRG4* contribui para a manutenção dos níveis de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) intracerebrais, o que é necessário para a preservação da aprendizagem espacial e a resistência à morte de células neuronais causados pela isquemia (YAMAMOTO et al. 2011).

Recentemente, MELOTTE et al. (2009) publicaram um trabalho descrevendo o envolvimento do gene *NDRG4* na formação e progressão de tumores de cólon. Neste trabalho, foi observada a associação entre a redução de expressão e a presença de metilação na região promotora do gene em linhagens tumorais de cólon (RKO e HCT116). Em seguida, a presença de metilação na região promotora do gene *NDRG4* foi avaliada através da técnica de *Nested-MSP* em duas séries independentes de tumores de cólon e tecido normal adjacente. Foram observadas frequências de metilação em torno de 86% e 70% nas duas séries de tumores de cólon e de 4% em mucosa normal. A análise do tecido tumoral de três pacientes

apresentando *NDRG4* metilado, revelou uma diminuição na expressão de transcritos e proteína, reproduzindo assim, os dados observados em células de linhagem tumoral de cólon. Além disso, foram feitos ensaios funcionais em linhagem celular HCT116 e RKO superexpressando o gene *NDRG4*. As células transfectadas com *NDRG4* apresentaram número significativamente reduzido de colônias, assim como significativa redução de proliferação avaliada através da incorporação de ³H-timidina ao DNA. Também foi observado uma diminuição na taxa de invasão em matrigel nas células HCT116 transfectadas com o gene *NDRG4*, embora a taxa de migração não tenha revelado diferenças significativas (MELOTTE et al. 2009).

Por fim, a presença de metilação nesse gene foi avaliada em fezes de 75 pacientes com tumor de cólon e a frequência encontrada foi superior a 50%; contra 7% em indivíduos normais. Esses dados indicaram uma sensibilidade de 61% e especificidade de 93% para a detecção de células tumorais. Baseado nestes resultados, MELOTTE et al. (2009) sugeriram a inclusão do gene *NDRG4* metilado como um biomarcador para a detecção de câncer colorretal.

Em 2009, SCHILLING et al. investigaram o papel do gene *NDRG4* em astrócitos e glioblastomas multiformes (GBM). Nesse trabalho, os autores mostraram que a expressão do gene *NDRG4* está aumentada em GBM e é necessária para a viabilidade de astrócitos primários e linhagens celulares provenientes de GBM, assim como em células CD133 positivas (células-tronco tumorais) e CD133 negativas, derivadas de GBM primários. O silenciamento do gene *NDRG4* provoca parada do ciclo celular em G1

seguido de apoptose. A parada em G1 está associada a uma diminuição da *ciclina D1* e um aumento de *p27KIP1*. Já a apoptose, está associada a uma diminuição na expressão de *XIAP* e *survivina*. Assim, neste trabalho foi observado que o gene *NDRG4* é necessário para a progressão do ciclo celular e sobrevivência das células. Além disso, foi demonstrada a redução da capacidade tumorigênica das células silenciadas para o gene *NDRG4* implantadas no crânio de camundongos imunodeprimidos (SCHILLING et al. 2009). Em contraste, DING et al. (2012), em um trabalho recente constatou que o gene *NDRG4* está menos expresso em GBM em comparação com tecidos normais, tanto em níveis de RNA quanto em níveis de proteína. Além disso, eles observaram que a super-expressão de *NDRG4* inibe a proliferação de células GBM. Por fim, os autores também sugerem o que o gene *NDRG4* tem um papel de supressor de tumor (DING et al. 2012).

Outro estudo recentemente publicado, avaliou a correlação entre a expressão de *NDRG4* com as características clinicopatológicas e avaliação prognóstica em pacientes com gliomas. Neste trabalho, a expressão do gene *NDRG4* foi avaliada através das técnicas de imunohistoquímica e Western blot em 128 pacientes com gliomas. Segundo os dados de imunohistoquímica, a expressão de *NDRG4* foi significativamente reduzida em relação aos tecidos cerebrais não neoplásicos ($P = 0,008$), e a diminuição da expressão foi correlacionada com o crescente grau do glioma. Estes resultados foram confirmados por análise de Western blot. Além disso, a análise multivariada mostrou que a diminuição da expressão do gene *NDRG4* ($P = 0,03$) e necrose intra-tumoral ($P = 0,03$) foram dois importantes

fatores prognósticos independentes identificados pelo modelo de riscos proporcionais de Cox. Este trabalho mostra pela primeira vez que a expressão do gene *NDRG4* está diminuída em gliomas humanos e que esta diminuição está associada a um pior prognóstico (LI et al. 2012).

Esses trabalhos avaliam e mostram algumas evidências do envolvimento do gene *NDRG4* em câncer de cólon e glioblastomas. Contudo, ainda não existem relatos na literatura indicando o seu envolvimento em tumores de mama. Assim, em nosso estudo decidimos avaliar a presença de metilação na região promotora do gene *NDRG4*, em amostras de pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama. Posteriormente, os dados de metilação foram cruzados com os dados clínico-patológicos dos pacientes com o intuito de avaliar o potencial do *status* de metilação do gene *NDRG4* como marcador de prognóstico para o câncer de mama. Por fim, foram feitos alguns ensaios *in vitro*, utilizando como modelo a linhagem MCF7, buscando fazer a caracterização funcional desse gene desvendando os possíveis mecanismos de sua atuação na tumorigênese da mama.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial da hipermetilação do gene *NDRG4* como marcador tumoral em câncer de mama e investigar o papel modulador do gene *NDRG4* nos processos de proliferação e migração celulares, características importantes para a formação e progressão tumoral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a frequência de metilação da região promotora do gene *NDRG4* através de MSP em 60 amostras de tumores de mama de pacientes atendidos no Hospital A.C. Camargo e correlacionar com os dados clínico-patológicos dos pacientes.
- Avaliar a correlação entre metilação e expressão da proteína *NDRG4* por imunohistoquímica em amostras disponibilizadas pelo Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo.
- Avaliar o envolvimento do gene *NDRG4* no controle da proliferação e mobilidade celular através do silenciamento por RNAi e realização de ensaios *in vitro*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS CELULARES

As linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231, MDA-MB-435 e MCF-7) obtidas da *American Type Culture Collection* - www.atcc.org (ATCC) e disponíveis em nosso laboratório, foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C em atmosfera úmida. Estas linhagens foram regularmente testadas para contaminação com micoplasma.

3.2 COLEÇÃO DE AMOSTRAS DE DNA DE TUMORES DE MAMA

Amostras de DNA, disponíveis em nosso laboratório, são provenientes de carcinomas ductais invasivos da mama extraídos de pacientes tratados no Hospital A.C. Camargo no período de 1998 a 2001, com pelo menos 120 meses de seguimento. Nesta casuística, foram excluídos pacientes jovens (idade inferior a 35 anos) ou que tinham histórico familiar de câncer de mama, bem como pacientes submetidos a tratamento neoadjuvante com radio e quimioterapia. Todas as amostras foram coletadas mediante consentimento informado dos pacientes. Esta casuística faz parte de uma primeira coleção de tumores do Hospital A.C. Camargo estabelecida em colaboração com o Instituto Ludwig e regulamentada junto ao CONEP

(nº 728/2000). Grande parte dessas amostras foi utilizada em um projeto anterior do nosso grupo que avaliou o padrão de metilação do gene *ADAM23* em tumores primários de mama (VERBISCK et al. 2009). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital A.C. Camargo de acordo com o parecer emitido no dia 23/03/2010 N°-1357/10.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA E TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

O DNA genômico das diferentes linhagens tumorais e amostras de tumores de mama foram extraídos pelo método convencional de fenol/clorofórmio (SAMBROOK et al. 2001). O tratamento com bissulfito de sódio foi feito a partir de 2µg de DNA. Para tanto, o DNA foi desnaturado com 0.3M NaOH por 20 minutos a 40°C, então 500 µl de uma solução recém-preparada de bissulfito de sódio/hidroquinona (2.5mM NaHSO₃, 350mM NaOH e 125mM C₆H₆O₂) foi adicionada e incubada a 70°C por 3 horas. Após a incubação, o DNA foi purificado com resina (Wizard® Miniprep DNA purification resin – Promega) e lavado com 4ml de isopropanol 80%. Então 0.3M NaOH foi adicionado, e a amostra incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado 3M acetato de amônio (NH₄OAc) e a solução foi incubada por mais 5 minutos. Então, foi feita a precipitação com 350µl de etanol absoluto e o DNA foi ressuspendido em 20µl de água. A quantificação do DNA tratado com bissulfito de sódio foi feita através do equipamento NanoDrop® (O.D. 260 e 280nM). Por fim, o

DNA tratado com bissulfito de sódio foi estocado a -70°C até o momento de uso (GOLDENBERG et al. 2004).

3.4 SEQUENCIAMENTO POR BISSULFITO DE SÓDIO

A seqüência nucleotídica da ilha de CpG do gene *NDRG4* foi obtida através do alinhamento da sequencia de mRNA do gene (NM_020465.2) em estudo contra a seqüência de referência do genoma humano, usando o programa Blat (<http://genome.ucsc.edu/>) disponibilizado pela Universidade de Santa Cruz. Após a obtenção da seqüência nucleotídica, os iniciadores para a *Nested-PCR* foram desenhados com o auxílio do programa *Oligotech*® (Versão 1.0, 1995). Após o tratamento com bissulfito de sódio, parte da ilha de CpG (538nt) presente na região promotora do gene *NDRG4* foi amplificada por *Nested-PCR* usando na primeira reação 50ng de DNA e os iniciadores Fow- GGT TTT TTT TGG GAG TTT AAA T e Rev- AAA CTA ACC CTA AAC TCA AAA A a 58°C de anelamento. Já na segunda reação (*Nested*), uma fração de 1 μ l da primeira reação foi amplificada usando os iniciadores internos FN- TTT TGG GAG TTT AAA TAA AGA TTA e RN- AAA AAA ACT AAC CCT AAA ATA A a 55°C de anelamento. As duas reações foram feitas em um volume final de 20 μL contendo 1X tampão *Taq* Platinum (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl_2 , 200 μM de dNTPs, 0,2 μM de cada iniciador e 1U de *Taq* Platinum (Invitrogen). Após a amplificação o fragmento foi clonado, utilizando o sistema pGEM-T (Promega), e cinco clones de cada

linhagem (Mock e 5-Aza) foram seqüenciados usando o sistema *BigDye* e o seqüenciador ABI 3100 (*Applied Biosystems*).

3.5 ENSAIO DE *NESTED-MSP*

A técnica de *Nested-MSP* é uma variação da técnica de *MSP* (*Methylation Specific PCR*), cujo objetivo é aumentar a sensibilidade de detecção. Neste caso foram usados os iniciadores desenhados para o sequenciamento por bissulfito Fow 5' GGT TTT TTT TGG GAG TTT AAA T 3' e Rev 5' AAA CTA ACC CTA AAC TCA AAA A 3' para gerar o primeiro amplicom de 548bp, partindo de 50ng de DNA tratado pelo bissulfito de sódio. Então, uma fração (1µl) da primeira reação foi amplificada usando os iniciadores desenhados para *MSP*. Os iniciadores para os ensaios de *MSP* foram desenhados com base nos dados obtidos a partir do sequenciamento completo da ilha de CpG localizada na região promotora do gene *NDRG4*, nas linhagens tratadas e não tratadas. Assim, foram escolhidos, na medida do possível, dinucleotídeos CpGs desmetilados pela ação do agente desmetilante apresentando relação direta com a indução da expressão do gene após o tratamento. Os iniciadores para a condição metilada foram: Fow 5' GCG TCG CGG TTT TCG TTC 3' e Rev 5' CGA ACT AAA AAC GAT ACG CCG 3' (193bp). Para a condição não metilada Fow 5' AGG TTT TGT GTT GTG GTT TTT GTT T 3' e Rev 5' AAC CAA ACT AAA AAC AAT ACA CCA 3' (200bp).

As duas reações foram feitas em um volume final de 20 µL contendo 1X tampão *Taq* Platinum (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0,2 µM de cada iniciador e 1U de *Taq* Platinum (Invitrogen). As condições utilizadas para as duas reações de amplificação foram: 10 minutos a 95°C para ativação da enzima, seguido de ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento por 45 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos e um ciclo para extensão final de 72°C por 5 minutos. A primeira reação foi feita em 35 ciclos de anelamento a 55°C. Já a segunda reação, foi feita em 40 ciclos a 63°C. Os produtos das reações foram visualizados em géis a 8% de poliacrilamida corados com nitrato de prata.

3.6 LEVANTAMENTO DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DOS TUMORES DE MAMA

Os dados clínico-patológicos dos pacientes foram levantados e atualizados a partir dos prontuários dos pacientes arquivados no serviço de arquivo médico (SAME) do Hospital do Câncer A.C. Camargo. Para cada uma das amostras foram levantados os seguintes dados clínico-patológicos: data de nascimento, data do diagnóstico da doença, realização de quimioterapia ou radioterapia adjuvante, estágio da doença segundo o TNM, tamanho do tumor, classificação do grau histológico conforme SBR (*Sistema de Bloom & Richardson*), a presença de linfonodos positivos, expressão dos marcadores moleculares ER (receptor de estrógeno), EP (receptor de progesterona) e p53, a presença de metástases no momento da cirurgia, a

presença de recidivas locais e a distância; e o *status* atual do paciente. Para a realização dessa etapa de levantamento dos dados, contamos com a participação da Dra. Maria do Socorro Maciel do Departamento de Mastologia e do Dr. Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima do Departamento de Oncologia Clínica, ambos no Hospital do Câncer A.C. Camargo.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DA *NESTED-MSP*

A frequência de metilação do gene *NDRG4*, obtida nos ensaios de *Nested-MSP* para as amostras de carcinomas ductais invasivos de mama, foi cruzada com os dados clínico-patológicos dos pacientes a fim de se avaliar a existência de associações estatísticas. A associação entre as variáveis qualitativas foi feita através do teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher e a análise de sobrevida global e livre de doença foi realizada pelo método de *Kaplan-Meier*, com o teste de *log-rank* para a comparação das curvas. Para todos os testes, foi estabelecido um erro $\alpha=5\%$, isto é, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. O programa *SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)* para *Windows* versão 15.0 (*SPSS Inc. Chicago, IL*) foi usado para as análises estatísticas. Para a realização das análises estatísticas contamos com a participação do Dr. André Lopes Carvalho, atualmente no Hospital de Câncer de Barretos-SP.

3.8 IMUNOHISTOQUÍMICA

As análises de imunohistoquímica foram realizadas em material incluído em parafina (corte 4 micra) do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo. Para tanto, o anticorpo anti-NDRG4 (mouse *anti-human*) disponibilizado pela Novus biological corp® (Cod. H00065009-M01 clone 2G3) na diluição 1:500 associado ao polímero DAKO foi utilizado. Os cortes foram corados pelo método imunohistoquímico e foram examinados ao microscópio convencional, sendo a leitura realizada pela observação da presença de coloração marron escuro (positivo). Além disso, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina. Para a realização desta etapa contamos com a participação da Dra. Isabela Werneck da Cunha do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo.

3.9 SILENCIAMENTO DO GENE *NDRG4* POR shRNA

Para o silenciamento pós-transcricional do gene *NDRG4* foi usado o kit para expressão de *shRNA* (*small hairpin RNA*) disponibilizado comercialmente pela OriGene Technologies® (Cat – TG303003). Estas construções consistem de regiões específicas para o gene alvo que sejam comuns entre suas isoformas, além de integrar as características necessárias para a modelagem em moléculas de shRNAs. Cada kit contém 4 construções diferentes, além de dois controles negativos para o silenciamento (vetor vazio e *scrambled*). Estas construções possuem

cassetes contendo seqüências gene específicas produzidas através do uso de oligonucleotídeos sintéticos clonados nos sítios de BamHI e Hind III em vetores pGFP-V-RS, que também possuem o gene reporter para a expressão da proteína GFP (*green fluorescent protein*). O cassette de expressão, que está sob a ação do promotor humano U6, tem uma seqüência de 29 nucleotídeos específica para o gene alvo, uma região espaçadora (grampo) de 7 nucleotídeos seguida de outros 29 bp correspondentes à seqüência específica no sentido reverso complementar. Por fim, uma seqüência de terminação (TTTTTT), localizada *downstream* aos 29 bp complementares à seqüência específica, finaliza a transcrição feita pela RNA Pol III. O vetor pGFP-V-RS possui além do gene de resistência à kanamicina, para seleção de clones em bactérias, o gene de resistência à puomicina para a seleção de células humanas.

Foram usados dois kits na tentativa de silenciar o gene *NDRG4*, totalizando oito construções contendo diferentes seqüências alvo. Abaixo estão listados os 8 fragmentos de seqüências alvo:

Kit 1

5A.1 - TTCAACTTCGAGGACATGCAGGAGATCAC

6A.2 - GCTGACTGAAGCCTTCAAATACTTCCTGC

7A.3 - GAGGAGCTGGTGAACAACACAGAGTTGGT

8A.4 - CACTACGACCTTCCTGAAGATGGCAGACT

Kit 2

5B.1 - CAGACACAGACTGGAAGGAACATGACATC

6B.2 - CCTGCAGCTCTTCTGGAACATGTACAACA

7B.3 - GTTCAAGTATGTGATTGGCATCGGAGTGG

8B.4 - AGCCTTCAAATACTTCCTGCAAGGCATGG.

3.10 TRANSFEÇÃO DA LINHAGEM CELULAR MCF7

A linhagem celular MCF7 foi transfectada com os DNAs plasmidiais, purificados pelo HiSpeed® Plasmid Purification and Maxi Mid kit (Qiagen), contendo os cassetes para expressão de shRNA e os respectivos controles. Foi usado o método de lipotransfecção reversa com o reagente de transfecção FuGENE® (Merck), no qual cerca de 35×10^4 células foram transfectadas em suspensão seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, foram usadas três condições variando quantidades de reagente de transfecção (μl) e de DNA (μg), as proporções foram respectivamente 3:2, 3:1 e 6:1. As diferentes proporções FuGENE®/DNA foram adicionadas à suspensão celular para posterior distribuição em placas de 6 poços (35mm^3 Costar®).

Vinte e quatro (24) horas após o procedimento de transfecção, as populações de células foram tratadas com tripsina e uma alíquota da suspensão de células foi retirada para que a eficiência de cada condição de transfecção fosse avaliada através de citometria de fluxo. Para tanto, foi usado o equipamento Bencton Dickinson Facscalibur™ para avaliar a presença da proteína GFP. A seleção das células transfectadas teve início quarenta e oito (48) horas após o procedimento de transfecção, quando foi adicionado ao meio $1\mu\text{g/ml}$ de puromicina. Após um período de 15 dias de

seleção, a concentração de puromicina foi diminuída para 200ng/ml, sendo esta a concentração de manutenção. Como controle da atividade do antibiótico, células MCF7 sem passar pelo procedimento de transfecção, foram cultivadas na presença de 1µg/ml puromicina. A morte de 100% das células controle, não transfectadas, foi observada ao final de 15 dias.

3.11 SELEÇÃO DOS CLONES COM MAIOR NÍVEL DE SILENCIAMENTO

Para o isolamento dos clones, populações de células MCF7 transfectadas com as construções de shRNA e selecionadas com 1µg/ml de puromicina, foram diluídas e semeadas de forma a obter 30 células por poço (15 células por ml) em placas de 6 poços (35mm³ Costar®). Assim, após duas semanas foi possível observar a formação de colônias isoladas. A coleta dos clones foi feita de forma manual, aspirando-se por vácuo o meio de cultura em torno da colônia isolada e colocando uma gota de tripsina sobre a colônia. Na primeira etapa de expansão, os clones coletados foram semeados em placa de 96 poços para posterior expansão em placas de 24 poços e 6 poços até atingir quantidade suficiente para extração de RNA e análise da expressão do gene *NDRG4* por qRT-PCR.

3.12 EXTRAÇÃO DE RNA

Células cultivadas até atingir uma confluência de cerca de 70% em placas de 6 poços (35mm³ de área Costar[®]) foram lavadas com PBS (1x). Em seguida, cerca de 1ml do reagente TRIzol[®] (Invitrogen) foi usado para proceder à extração do RNA total, segundo normas do fabricante. Após a extração do RNA, o equipamento NanoDrop[®] foi usado para medir a densidade óptica a 260 e 280nm (OD₂₆₀). A concentração do RNA foi calculada usando a relação: 1OD_{260 nm} = 40 µg/ml RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de pureza do RNA. Por fim, a qualidade do RNA total extraído das amostras foi verificada através de eletroforese em gel a 1% de agarose.

3.13 SÍNTESE DE cDNA

A síntese de cDNA foi feita partindo de 2µg de RNA total usando a transcriptase reversa MoMuLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) presente no kit SuperScriptTMIII (Invitrogen), usado de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração de cDNA foi estimada com base em 2µg de RNA total em volume final de 20µl para reação de síntese, resultando em 100ng/µl.

3.14 ANÁLISE DO NÍVEL DE EXPRESSÃO POR qRT-PCR

A expressão do transcrito *NDRG4*, nas linhagens pré e pós transfecção e nos clones individuais, foi avaliada por meio de qRT-PCR no equipamento ABI Prism[®] 7700 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) utilizando o sistema de detecção SYBR[®] Green (Applied Biosystems cat 4309155). Os iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa *Primer Express 2.0* de forma a amplificar todas as variantes do gene *NDRG4*. A seqüência dos iniciadores são: Fw – 5'CCT TCC TGA AGA TGG CAG ACT CT 3' e Rev – 5' AGT CAG CTT CCC TGG CTG TGT 3'. Além dos parâmetros utilizados pelo programa, os iniciadores foram desenhados em exons vizinhos. O intron entre os dois exons contém 168nt, desta forma a amplificação do cDNA é favorecida e ao mesmo tempo uma eventual contaminação com DNA genômico pode ser evidenciada. O gene normalizador, utilizado para corrigir variações nas quantidades iniciais de cDNA, foi o *GAPDH*. O desenho dos iniciadores seguiu os mesmos critérios usados para o gene alvo (*NDRG4*). As seqüências dos iniciadores são: Fw – 5' GTC ACA TGGC GTC TTC ACC A 3' Rev – 5' GTG GCA GTG ATG GCA TGG AC 3'. A expressão diferencial foi determinada pelo método de quantificação relativa. Para o cálculo da expressão diferencial foi usado o modelo matemático proposto por PFAFFL (2001).

3.15 WESTERN BLOT FRACIONADO

Após o cultivo em garrafas médias até atingir 70% de confluência, as células foram coletadas após tratamento com tripsina e lavadas com PBS 1x. Tanto a fração de proteínas citoplasmáticas quanto as nucleares, foram separadas com o kit NucBuster™ Protein Extraction (Novagen), de acordo com as recomendações do fabricante. A dosagem de proteína foi feita pelo método colorimétrico descrito por Bradford (BRADFORD 1976). A leitura das concentrações foi feita em leitor de ELISA usando filtro 595nm.

Cerca de 30µg de extrato de proteína foi aplicado em gel SDS-PAGE (12% de poliacrilamida), e após a eletroforese foi feita a transferência para membrana de nitrocelulose (Hybond™-C Extra Amersham Bioscience). A eficiência de transferência foi avaliada através da coloração por *Ponceau* (0,1% ponceau, 1% Ácido acético) e então a membrana foi bloqueada com 5% leite desnatado Molico em TBST (10 mM Tris, 150 mM NaCl e 0.05% TWEEN® 20, pH 7.5) por 1 hora, sob agitação constante a temperatura ambiente. Em seguida, a solução contendo o anticorpo primário anti-NDRG4 *Prestige*® (Sigma Catálogo HPA 0153013) e preparado em leite desnatado a 5% em TBST (diluição 1:100), foi adicionada e a membrana incubada por 14 a 22 horas sob agitação a 4°C. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes com TBST, temperatura ambiente e sob agitação, por 10 minutos cada lavagem. Em seguida, as membranas foram incubadas por 1 hora com a solução contendo anticorpo secundário (IgG Anti Mouse, *Peroxidase linked whole antibody, Amershan*), preparada em leite desnatado a 5% em TBST

(diluição 1:4000). A solução de anticorpo secundário foi descartada e a membrana lavada 3x por 10 minutos com TBST. Para a visualização do resultado, foi usado o kit ECL™ *Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare) e posterior exposição contra o filme de raio X.

3.16 ENSAIOS FUNCIONAIS

Em todos os ensaios funcionais, a contagem de células viáveis, isto é, aquelas que não se coravam com *Trypan Blue* (Sigma), foi feita em câmara de Neubauer.

3.16.1 Curva de Crescimento

Cerca de 1×10^4 células foram semeadas em duplicata em placas de 6 poços (35mm³ Costar®) contendo meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubadas em estufa a 37°C a 5% CO₂. Após 24 horas de incubação, foi coletado o primeiro ponto, e os pontos subsequentes foram coletados do terceiro ao oitavo dia. As células foram coletadas após serem lavadas com 1x PBS e tratadas com tripsina. Em seguida, foram fixadas em 3,7% de formaldeído em 1x PBS para posterior contagem em câmara de Neubauer. Foram realizados três ensaios independentes, em duplicata e a análise estatística foi feita pelo ANOVA seguido pelo método de *Dunn's Multiple Comparison Test* (GraphPad Prism® versão 4.03).

3.16.2 Ensaio Clonogênico Bidimensional

Cerca de $0,25 \times 10^4$ células foram semeadas em duplicata em placas de 6 poços (35mm^3 Costar[®]) contendo meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubadas em estufa a 37°C a 5% CO_2 . Estas células foram cultivadas por cerca de 18 dias. Após a formação de colônias isoladas, as células foram fixadas com 3,7% de formaldeído em 1x PBS e coradas com violeta cristal por cerca de 10 minutos. A contagem do número de colônias foi feita visualmente. Foram realizados três ensaios independentes, em duplicata e a análise estatística foi feita pelo Anova seguido de *Tukey's Multiple Comparison Test* (GraphPad Prism[®] versão 4.03).

3.16.3 Ensaio de Migração em Transwell

- **Ensaio de migração quimiotática**

Após o carenciamento por 24 horas, as células foram lavadas com 1x PBS e tratadas com tripsina. Em seguida, a suspensão de células foi centrifugada a 2500rpm durante 3 minutos e então, foram lavadas 3 vezes em meio RPMI sem soro e posteriormente contadas em câmara de Neubauer.

O plaqueamento, em placa de 24 poços do tipo *Transwell[®] 8.0 μm Permeable support* (Costar), foi feito da seguinte maneira: no compartimento inferior de cada poço, foi adicionado 600 μL de meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino. Cerca 1×10^5 células ressuspendidas em 100 μL meio RPMI sem soro foram semeadas sobre as membranas porosas, no compartimento

superior de cada poço (insertos 6.5mm). As placas foram incubadas em estufa a 37°C a 5% CO₂ por um período de 24 horas para permitir a migração das células para a face inferior da membrana. Decorrido o período de migração, os insertos foram lavados 1 vez em 1x PBS e as células foram fixadas em 3,7% formaldeído em 1x PBS por 20 minutos. Após o processo de fixação, os insertos foram lavados 3 vezes em 1x PBS e as células que não foram capazes de atravessar a membrana porosa (parte superior do inserto), foram removidas com o auxílio de hastes flexíveis de algodão.

Os núcleos das células que migraram para a parte inferior da membrana foram corados com 300µl de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (1 µg/ml) por 10 minutos, lavadas uma vez em 1x PBS e armazenadas nas placas contendo 500µl de 1x PBS no escuro a 4°C até o momento de captura das imagens. Cerca de nove campos representativos de cada inserto foram fotografados para o cálculo do número de células que migraram, representadas pelos núcleos corados com DAPI, que é um composto fluorescente que se liga fortemente a regiões ricas em AT no DNA. Foram realizados seis ensaios independentes, em duplicata e a análise estatística foi feita pelo ANOVA seguido de *Tukey's Multiple Comparison Test* (GraphPad Prism® versão 4.3).

- **Ensaio de migração haptotática**

As células previamente cultivadas com meio RPMI suplementado com 10% de SFB foram utilizadas neste tipo de ensaio. Inicialmente foi feita a etapa de *coating*, na qual foi aplicado substrato sem soro na parte inferior do

inserto em placa de 24 poços do tipo *Transwell® 8.0µm Permeable support* (Costar). Para tanto, os insertos foram incubadas por 16 horas a 4°C com 5µg/mL de colágeno tipo I (BD-Bioscience) (300µl/poço) diluído em RPMI. A etapa de bloqueio seguiu-se com a retirada do meio contendo colágeno e a adição de 0,3ml de solução de bloqueio (2,5% BSA em 1x PBS), para posterior incubação a 37°C por 1 hora. Então, as células foram lavadas com 1XPBS e tratadas com tripsina. Em seguida, foram lavadas duas vezes com 1X PBS; contadas e ressuspensas em meio RPMI sem soro, seguindo-se o mesmo procedimento usado no ensaio de migração quimiotática, com exceção do soro fetal bovino na parte inferior de cada poço e do tempo de migração, neste caso 12 horas. Foram realizados três ensaios independentes, em duplicata e a análise estatística foi feita pelo ANOVA seguido de *Tukey's Multiple Comparison Test* (GraphPad Prism® versão 4.3).

3.16.4 Ensaio de Adesão Celular

Inicialmente foi feita a etapa de *coating*, na qual foi usado como substrato colágeno (5µg/mL) diluído em RPMI sem soro, ou meio RPMI a 10% de SFB em placas de 24 poços, para posterior incubação por 16 horas a 4°C (*overnight*). A etapa de bloqueio seguiu-se com a retirada do meio contendo colágeno ou SFB e a adição de 0,5µl de solução de bloqueio (BSA 2,5% em 1x PBS), para posterior incubação a 37°C por 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas com 1x PBS, tratadas com tripsina e novamente lavadas duas vezes com 1x PBS; contadas e ressuspensas em meio RPMI

sem soro. Foram plaqueadas 20×10^4 células em 500µl por poço. Decorrido o tempo de 2 horas de adesão, os poços foram lavados com PBS para retirar as células não aderidas. Após a fixação, com 3,7% formaldeído em 1x PBS por 20 minutos, foi procedida a etapa de coloração por 10 minutos com 0,1% cristal violeta (em 2% etanol). A solução corante foi retirada e o seu excesso removido por 3 sucessivas lavagens com 1X PBS. Após a adição de 300µl/poço de solução solubilizante (2%SDS em água), os resultados foram obtidos em leitor de ELISA (comprimento de onda 595nm). Foram realizados tres ensaios independentes, em duplicata e a análise estatística foi feita pelo ANOVA seguido de *Tukey's Multiple Comparison Test* (GraphPad Prism® versão 4.3).

3.16.5 Ensaio de Quimiorresistência

Os efeitos citotóxicos foram avaliados após o tratamento com cada composto Paclitaxel (Sigma-aldrich®) ou Docetaxel (Taxotere®/Rhone-Poulenc Rorer) através do ensaio de MTT (3 - (4,5 - dimethylthiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltertrazolim, Sigma-aldrich®). Para tanto, as células MCF7 previamente cultivadas foram semeadas (3×10^3 células) em placas de 96 poços e incubadas em estufa a 5% de CO₂ a 37 C°. Após 24 h, foram adicionadas as drogas diluídas em meio RPMI acrescido de 10% de SFB. Foram usadas diluições seriadas, Docetaxel partindo de 20µM diluindo em escala de 10x até 2×10^{-5} µM; e de Paclitaxel partindo de 10µM diluindo em escalas 10x até 10^{-5} µM. Após 48 h de incubação em estufa a 5% de CO₂ a 37 C°, foi adicionado 10 µl da solução de MTT solução (5 mg/ml), seguindo-

se uma incubação por um período adicional de 4 h. Depois disso, a reação MTT foi encerrada adicionando 100µl de dimetil sulfóxido (DMSO). A absorbância a 495 nm foi medida em espectômetro automático ELISA (iMark™ Microplate reader - Bio Rad). A concentração da droga na qual 50% das células sobreviveram (IC50) foi calculada com base nos dados obtidos pelo leitor de ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) de três ensaios independentes em duplicata, através de regressão não linear. Para determinar a existência de diferenças entre os grupos foi usado o teste ANOVA seguido de *Newman-Keuls test* ($p < 0,05$) (GraphPad Prism® versão 4.03).

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO DNA DA ILHA DE CpG LOCALIZADA NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *NDRG4* EM TECIDO MAMÁRIO NORMAL E TUMORAL

O gene *NDRG4* foi isolado em experimentos para a identificação de genes diferencialmente metilados, em tumores de mama nos quais três linhagens tumorais de mama (MCF-7, MDA-MB-435 e MDA-MB-231) foram tratadas com o agente desmetilante 5-AzaDc. Os genes induzidos pelo tratamento, foram identificados através de análise global do padrão de expressão pela técnica de *microarrays* de cDNA e a confirmação dos dados de *microarrays* de cDNA foi feita por qRT-PCR. Já a presença de metilação na região promotora desse gene, foi confirmada através de conversão do DNA das linhagens com bissulfito de sódio seguido de seqüenciamento. O tratamento com o bissulfito de sódio promove a conversão de citosinas não-metiladas em uracilas através de uma reação de deaminação, o que não ocorre com as citosinas metiladas (CLARK et al. 1994).

Com o objetivo de validar os dados de metilação diferencial da região promotora do gene *NDRG4*, obtidos nas três linhagens de mama, foi feito o sequenciamento do DNA após conversão por bissulfito de sódio em amostras de tecidos mamários, normais e tumorais. Após a conversão, parte da ilha de CpG contendo 82 dinucleotídeos CG distribuídos ao longo de 538

nucleotídeos e englobando o sítio de início de transcrição do gene *NDRG4* foi amplificada e clonada (Figura 3). Buscando representar a heterogeneidade do padrão de metilação do tecido tumoral, cinco clones, representando diferentes alelos de cada amostra foram seqüenciados. Ao todo, foram analisadas 7 amostras: três tecidos normais incluindo duas mamoplastias e uma margem de tumor e quatro tumores ductais invasivos de mama. O sequenciamento de DNA após o tratamento com bissulfato de sódio das amostras normais revelou um baixo percentual de metilação global, que variou de 3,9% (Margem 2) a 9,5% (Mamoplastia 3). O contrário foi observado em duas amostras de carcinoma ductal invasivo, Tumor 24 com uma média de 43% de metilação global, onde o clone com maior percentual de metilação apresentou 72% e o clone com menor percentual de metilação apresentou 2%. Já o Tumor 1936, apresentou uma média de 46% de metilação global, com o máximo de 76,8% e o mínimo de 75,6%. Este dado confirma a presença de metilação diferencial da região promotora do gene *NDRG4* em tumores primários de mama em relação ao tecido normal (Figura 4).

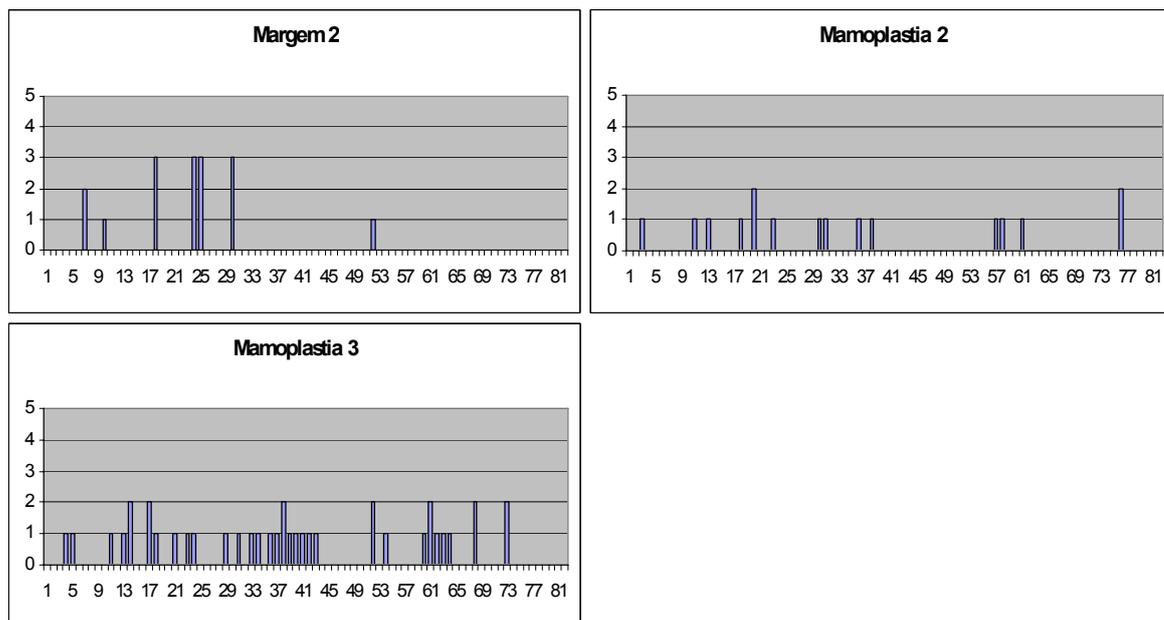
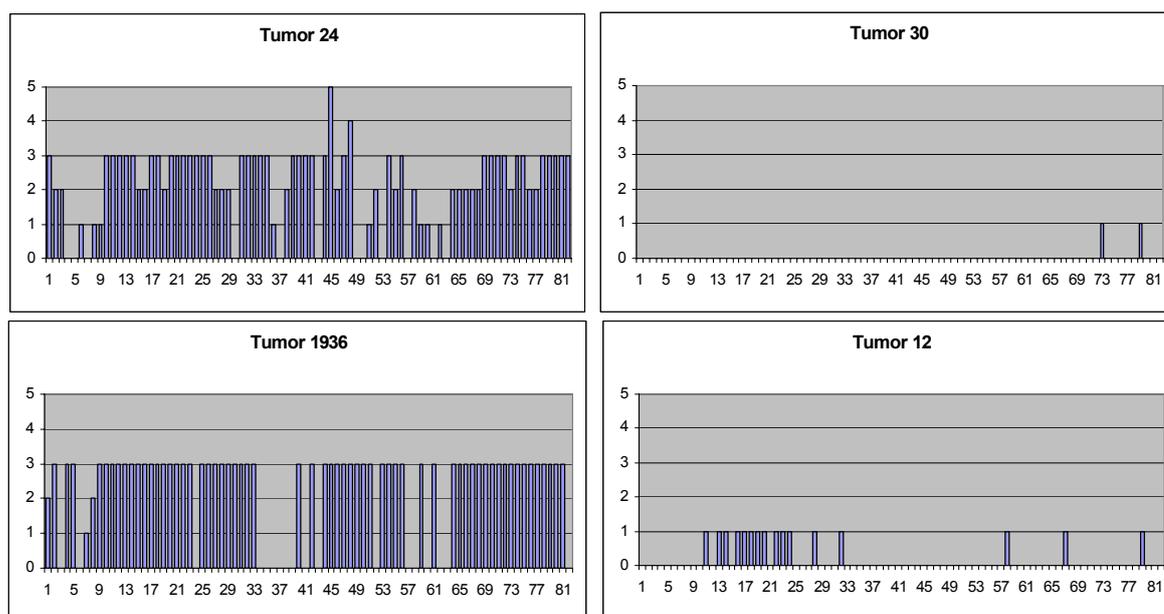
A**B**

Figura 4 - Frequência de metilação do gene *NDRG4* em tecidos mamários:

No eixo Y estão representados os clones seqüenciados (5 clones), no eixo X estão os dinucleotídeos CpG avaliados. **A**- tecidos normais apresentando baixa frequência de metilação. **B**- carcinomas ductais invasivos, onde as amostras 24 e 1936 apresentaram alta frequência de metilação (43 e 46% respectivamente).

4.2 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE MSP PARA A DETECÇÃO DE METILAÇÃO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *NDRG4*

Embora a quantidade de amostras analisadas inicialmente tenha sido pequena, foi observada a presença de metilação diferencial na região promotora do gene *NDRG4* em tumores primários de mama. Com o intuito de confirmar a presença de metilação diferencial em um número maior de amostras e correlacionar o *status* de metilação com parâmetros clínico-patológicos, optamos por analisar o perfil de metilação na região promotora do gene *NDRG4* em um painel maior de tumores de mama utilizando a técnica de *MSP* (*Methylation Specific PCR*).

A técnica de *MSP* (HERMAN et al. 1996) nos permite avaliar o *status* de metilação de um dado gene em uma grande quantidade de amostras, não havendo a necessidade de clonagem e sequenciamento para a obtenção do resultado, sendo portanto, menos laboriosa e de menor custo. Nesta técnica, dois pares de iniciadores são desenhados em regiões ricas em CGs. Estes dois pares de iniciadores são capazes de identificar amostras metiladas e não metiladas, levando-se em consideração a modificação dos nucleotídeos pelo bissulfato de sódio. No entanto, os resultados gerados se baseiam na análise de poucos dinucleotídeos CGs, os quais estão inseridos nas regiões de pareamento dos iniciadores. Dessa forma, a acurácia dos resultados depende da escolha dos dinucleotídeos a serem analisados.

Neste trabalho, a exemplo do estudo descrito por MELOTTE et al. (2009), decidimos usar a técnica de *Nested-MSP* a fim de aumentar a sensibilidade de detecção de metilação na região promotora do gene *NDRG4*. Para o ensaio de *Nested-MSP* foram usados na primeira reação de amplificação os iniciadores desenhados para o sequenciamento por bissulfito, F (*forward*) e R (*reverse*) (Figura 5 marcados em cinza). Estes iniciadores, por não possuírem dinucleotídeos CG em sua composição, amplificam o DNA independente do *status* de metilação do DNA convertido. Então, uma fração da primeira reação foi amplificada usando iniciadores desenhados para *MSP* (Figura 5).

O desenho dos iniciadores para avaliar a presença de metilação na região promotora do gene *NDRG4* através da técnica de *MSP*, envolveu uma análise criteriosa dos resultados do sequenciamento de sua ilha de CpG nas linhagens tratadas e não tratadas com agente desmetilante 5-AzaDc. O objetivo foi encontrar dinucleotídeos que quando desmetilados, após o tratamento, apresentassem uma correlação direta com a indução da expressão do gene *NDRG4*. Dessa forma, os dinucleotídeos: 24, 25, 26, 27, 28 e 29, foram selecionados para compor o iniciador sense, enquanto os dinucleotídeos 54, 55, 56 e 57 foram selecionados para compor o iniciador antisense (Figura 5). Estes dinucleotídeos apresentaram o *status* de metilação alterado após o tratamento com o agente desmetilante e, portanto, grande probabilidade de estar diretamente correlacionado com a indução da expressão do gene *NDRG4* (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequência de metilação nos dinucleotídeos presentes nos iniciadores para a técnica de *MSP* do gene *NDRG4*.

Genes/Linhagens	% Metilação Global	Número de clones metilados nos dinucleotídeos CpG									
		Iniciador Sense					Iniciador Antisense				
		24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
MCF7-Mock	54,63	5	5	5	5	5	5	1	3	4	3
MCF7-Aza	41,95	5	4	5	3	4	4	0	0	0	0
MDA-231-Mock	90	4	5	5	5	3	4	2	5	5	5
MDA-231-Aza	20,24	5	5	5	0	1	0	0	0	0	0
MDA435-Mock	92,43	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5
MDA435-Aza	0,48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A frequência de metilação foi baseada no sequenciamento de 5 clones provenientes das linhagens tumorais de mama submetidas ou não ao agente desmetilante 5-AzaDc. Os dinucleotídeos em vermelho estão na região 3' dos iniciadores, sendo por isso importantes para a especificidade da *MSP*. A localização do amplicon é -235 a -58, considerando o primeiro nucleotídeo de transcrição +1.

*Dados obtidos no projeto regular FAPESP 04/09088-9 ainda não publicados.

```

>hg17_cpgIslandExt_CpG: 186 range=chr16:57054185-57056446 5'pad=350
3'pad=350 revComp=FALSE strand=. repeatMasking=N
GGTTCCCCTTGGGAGTCTAAACAAGACTACGGCAGCGCCGTCCCCTCCCCCGGGAACCCGACCGCCGCGCG
      1      2 3      4      5 6 7 8 9
GCCACAGGGGGCCTGGAGGGGCGGGCAGGGCCTCGCAGCGCACCCAGCACAGTCCGCGCGCGGAGCGGGT
      10     11 12     13 14 15 16 17
GAGAAAGTCGGCGGGGGCGCGGATCGACCGGGGTGTCCCCAGGCTCCGGTCCGGTCCCCTCGCCCTC
      18 19 20 21 22 23     24 25 26 27 28 29
CCGCCCGCCCACCGGGCACCCAGCGCGCAGAAGCGGAAGCCAAGGGACCGCGGTCGTCGGG
      30 31 32     33 34 35     36 37 38 39 40 41 42
GACTAGCCCCAGGCCCGGCACCGCCCAGCGGGCGAGCGCCACACCCGCCAAACCCACCGCGGGCACCGCC
      43 44 45 46 47 48     49     50 51 52
CCGCGCGCACCGCCCCAGCCCGGCTCGCCCCCTGCAGCGCGGGCACCGCGGAGGGGGCTCTGGCTGCC
      53 54 55 56     57 58     59 60 61 62
CGCACCTGCACCAGCGCGTGGCGCGCGAAGCCCCTCCCCTGCGCGTCTGTCTCGTCGGCATCT
      63     64 65 66 67 68 69 70     71 72 73 74     75 76
CCGCGGTGAGTCGGCGCGCCCTCGCCCCTGAGCCAGGGCCAGCTT
      77 78     79 80 81     82

PCR 1 (548bp)
F 5' GGT Ttt ttT TGG GAG TtT AAA t 3'
R 5' AAa CTa aCC CTa aaC TCA aaa a 3'

Iniciadores Nested-MSP-PCR
Alelo metilado (193 bp)
Fow 5' GCG TCG CGG ttt tCG tTC 3'
Rev 5' CGa aCT aaa aaC GaT aCG CCG 3'

Alelo não metilado (200bp)
Fow 5' AGG tTt TGT GTT GTC Gtt ttT GtT T 3'
Rev 5' aaC Caa aCT aaa aaC aaT aCa CCa 3'

```

Figura 5 - Fragmento analisado da ilha de CpG do gene *NDRG4*. A sequência nucleotídica da ilha de CpG é original (<http://genome.ucsc.edu/>), enquanto as seqüências dos iniciadores foram convertidas (bases Cs para bases Ts) para amplificar o DNA tratado com bissulfato de sódio. Os iniciadores para a técnica de *Nested-MSP* foram desenhados com o auxílio do programa Oligotech® (Versão 1.0, 1995). A região marcada em cinza foi usada para desenhar os iniciadores para a técnica de sequenciamento por bissulfato descrita anteriormente (F e R). A região não sombreada contém os dinucleotídeos CG analisados por sequenciamento, onde observamos o mapeamento dos iniciadores para as condições metilada (vermelho) e não metilada (azul), pareando nos mesmos dinucleotídeos CpG da ilha (sense 24, 25, 26, 27, 28 e 29; e antisense 54, 55, 56 e 57).

Em um primeiro momento foi feito um teste de especificidade, no qual foi avaliada a capacidade dos iniciadores em detectar seqüências metiladas e não metiladas. Para tanto, foram usados DNA metilado *in vitro* (CpGenome™ Universal Methylated DNA Millipore S7821) como controle positivo de metilação e DNA totalmente desmetilado *in vitro* (DNA amplificado pela enzima GenomiPhy) como controle negativo (Figura 6). A enzima *GenomiPhi* (GenomiPhi V2 DNA Amplification kit GE Healthcare, Little chalfont UK) amplifica o DNA genômico apagando as marcas de metilação. Desta forma, o DNA amplificado pela enzima *GenomiPhi* será totalmente convertido durante o tratamento com bissulfito de sódio e conseqüentemente, não apresentará amplificação pela *Nested-MSP* específica para a condição metilada.

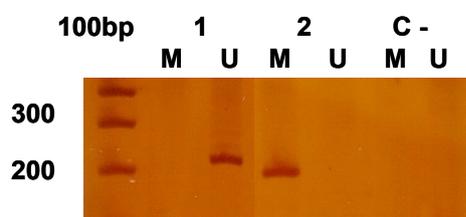


Figura 6 - Especificidade do conjunto de iniciadores para a técnica de *Nested-MSP*: **M** *Nested-MSP* (193bp) específica para condição metilada (*Meth*) e **U** *Nested-MSP* (200bp) específica para condição não metilada (*UnMeth*). Amostra 1, DNA de linfócito amplificado com a enzima *Genomiphi*, onde observamos amplificação apenas na *Nested-MSP* específica para a condição não metilada. Amostra 2, DNA metilado *in vitro* (Millipore) onde observamos amplificação apenas na *Nested-MSP* específica para a condição metilada (*Meth*). Por fim, C- corresponde aos controles sem DNA.

Em seguida, buscamos confirmar o padrão diferencial de metilação do gene *NDRG4* em amostras tumorais em relação a tecidos normais. Para tanto, usamos um painel de amostras contendo o DNA proveniente de 8 linhagens tumorais de mama, e 7 controles normais incluindo 6 margens de tumor de mama e uma redução de mama. Além disso, usamos também o DNA extraído de linfócitos coletados do sangue periférico de 10 doadores do banco de sangue do Hospital A.C. Camargo (Figuras 7A e 7B). Os dados gerados nesta etapa estão representados na Tabela 3, na qual podemos observar a presença de metilação em 6 das 8 linhagens tumorais (75%) avaliadas, enquanto nos controles normais apenas duas das 17 amostras apresentaram (11,7%) uma fraca amplificação na situação metilada (Figura 7A), confirmando o padrão diferencial de metilação da região promotora do gene *NDRG4* em linhagens provenientes de tumores de mama em relação aos tecidos normais.

Tabela 3 - Validação da *Nested-MSP* em linhagens tumorais de mama e controles normais.

<i>Nested-MSP</i>					
Linhagens	<i>NDRG4</i>		Controles normais	<i>NDRG4</i>	
	Met	UnMet		Met	UnMet
Hb4a	Neg	Pos	Margem Mama 1	Neg	Pos
GI-101	Neg	Pos	Margem Mama 2	Neg	Pos
MCF7	Pos	Fraco	Margem Mama 3	Neg	Pos
MDA-MB-231	Pos	Neg	Margem Mama 4	Neg	Pos
MDA-MB-435	Pos	Neg	Margem Mama 5	Neg	Pos
BT-20	Pos	Neg	Margem Mama 6	Neg	Pos
734B	Pos	Neg	Redução de Mama	Neg	Pos
MDA-MB-468	Pos	Neg	Linfócito 1	Neg	Pos
Total Linh/Positivos	8/6	8/3	Linfócito2	Neg	Pos
			Linfócito 3	Neg	Pos
			Linfócito 4	Neg	Pos
			Linfócito 5	Neg	Pos
			Linfócito 6	Neg	Pos
			Linfócito 7	Fraco	Pos
			Linfócito 8	Neg	Pos
			Linfócito 9	Neg	Pos
			Linfócito 10	Fraco	Pos
			Total Nor/Positivos	17/2	17/17

A frequência de metilação, dada pela técnica de *Nested-MSP*, nas linhagens tumorais foi de 75%; contra 11,7% nos controles normais. Com base nestes dados, os iniciadores para *Nested-MSP* para o gene *NDRG4* foram considerados validados.

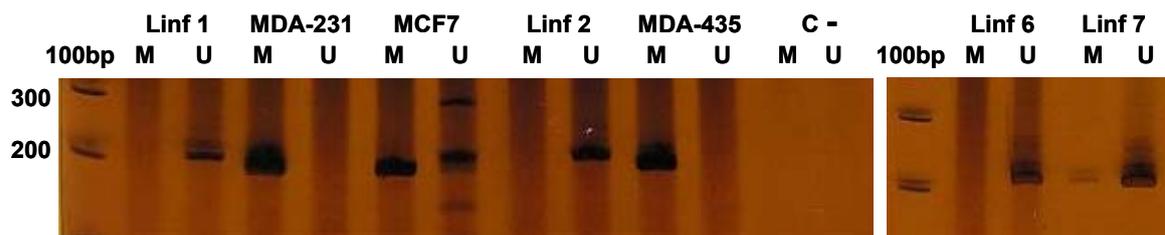


Figura 7A - Amplificação *por Nested-MSP* em linhagens de tumor de mama (MCF7, MDA-231 e MDA-435) e DNA de linfócitos (Linf). Cabe ressaltar que o linfócito 7 apresentou fraca amplificação para a situação metilada. O controle negativo (sem DNA) da reação foi representado por C-. Metilado (M) 193pb e não metilado (U) 200pb.

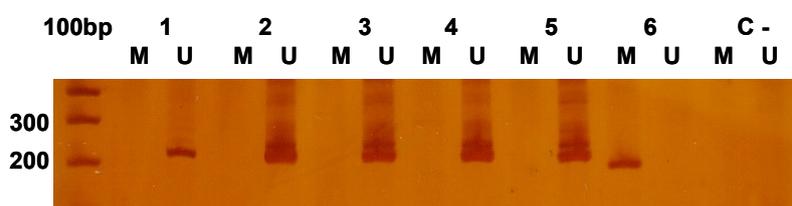


Figura 7B - Amplificação *por Nested-MSP* em tecidos normais de mama: amostras de 2 a 5 (margens de tumor de mama). Amostra 1, DNA de linfócito amplificado com a enzima Genomiphi. Amostra, 6 DNA metilado *in vitro* como controle positivo. Por fim, os controles sem DNA, representado por C-. condição metilada (M) e condição não metilada (U).

4.3 CORRELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE METILAÇÃO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *NDRG4* DETECTADA ATRAVÉS DE *NESTED-MSP* E A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA *NDRG4* DETECTADA ATRAVÉS DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Para avaliar a existência de correlação entre a presença de metilação avaliada pela *Nested-MSP* e a ausência de expressão da proteína *NDRG4*, usamos algumas amostras de tecido mamário normal e tumoral, disponibilizadas pelo Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo. Os resultados de imunohistoquímica foram gerados pelo próprio departamento de Anatomia Patológica usando o anticorpo monoclonal Anti-*NDRG4* (Novus Biologicals®). Dentre as amostras, foram avaliados um controle normal e 3 carcinomas ductais invasivos. O controle, tecido de mama normal, apresentou forte marcação citoplasmática, que pode ser visualizada pela coloração marrom (Figura 8, painel A), indicando a presença da proteína *NDRG4* bem como, uma das amostras tumorais, cujo *status* de metilação do gene *NDRG4* foi negativo (Figura 8, painel B). As outras duas amostras de carcinoma ductal invasivo apresentaram *status* de metilação positivo pela *Nested-MSP* e também diminuição ou ausência da proteína *NDRG4* (Figura 8, painel C e D), indicando assim, a existência de correlação entre o *status* de metilação e a expressão de proteína do gene *NDRG4*.

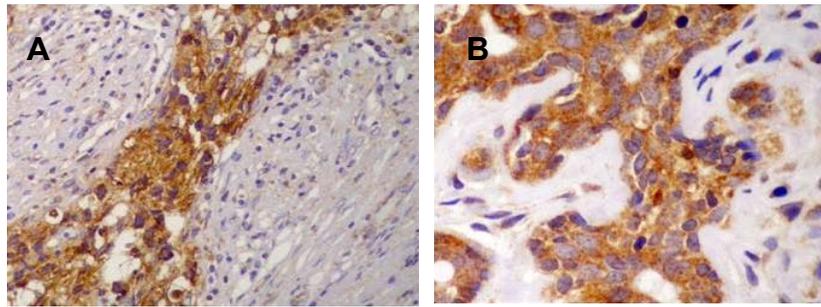
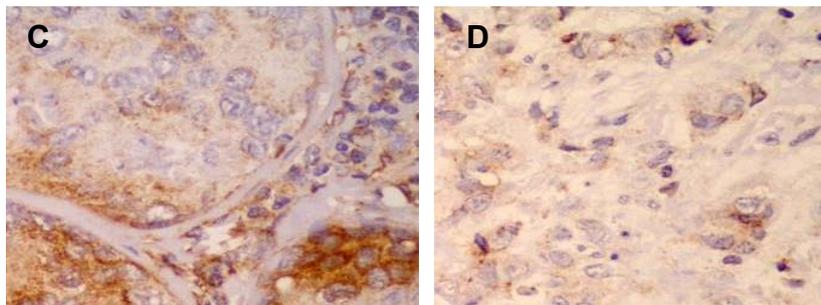
Nested-MSP-PCR Negativa***Nested-MSP-PCR Positiva***

Figura 8 - Imunohistoquímica anti-NDRG4. Os casos selecionados foram fotografados ao fotomicroscópio Olympus BX41 em aumento de 200x (painel A) e 400X (B, C e D). Dentre os casos selecionados, podemos observar a presença da proteína NDRG4 em um controle normal (A) e uma amostra tumoral (B) de mama que não apresentaram metilação pela técnica de *Nested-MSP*. A metilação positiva e portanto, ausência de proteína NDRG4, pode ser observada nas amostras tumorais de mama (C e D). Interessante observar a heterogeneidade presente no tumor C, o qual possui algumas células apresentando a proteína NDRG4 (coloração marrom) e outras não.

4.4 PRESENÇA DE METILAÇÃO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *NDRG4* EM TUMORES DE MAMA E CORRELAÇÃO COM DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS PACIENTES

Após a padronização do ensaio de *Nested-MSP* para avaliar a presença de metilação na região promotora do gene *NDRG4*, procedemos com o estudo da presença de metilação na região promotora deste gene em 73 amostras de carcinomas ductais invasivos da mama extraídos de pacientes tratadas no Hospital A.C. Camargo no período de 1998 a 2001. Foram excluídas dessa casuística, pacientes jovens (idade inferior a 35 anos) ou que tinham histórico familiar de câncer de mama, bem como pacientes submetidos a tratamento neoadjuvante com radio e quimioterapia. A presença de metilação na região promotora do gene *NDRG4* foi observada em 10 amostras.

Devido a presença de moléculas não metiladas provenientes de tecido normal contaminante ou linfócitos infiltrantes presentes nas amostras tumorais, observamos amplificação específica para a situação não metilada em 61 das 73 amostras avaliadas (Figura 9). A amplificação da reação para a situação não metilada, pode ser usada para indicar a integridade do DNA usado na reação, bem como a eficiência de conversão do mesmo, pelo tratamento com bissulfito de sódio. Assim, 12 amostras foram excluídas do estudo por não apresentarem amplificação tanto para a situação metilada como para a situação não metilada.

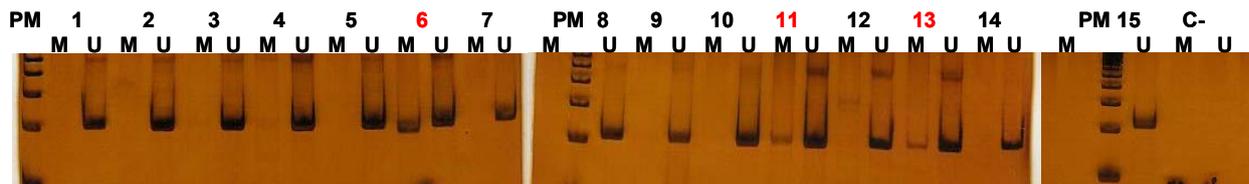


Figura 9 - *Nested-MSP* do gene *NDRG4* em amostras tumorais de mama.

Figura representativa do resultado da amplificação por *Nested-MSP* em 15 amostras tumorais de mama, onde **M** representa a *Nested-MSP* específica para a condição Metilada e **U** a *Nested-MSP* específica para a condição Não Metilada. Padrão de peso molecular 100bp *ladder* (PM). A amplificação pela *Nested-MSP* específica para a condição Não Metilada pode ser observada em todas as amostras. C- controle negativo da reação (sem DNA) para as duas condições. As amostras 6, 11 e 13 apresentaram *status* de metilação positivo para o gene *NDRG4*.

A presença de metilação na região promotora do gene *NDRG4* foi observada em 10 (16,4%) das 61 amostras de carcinoma ductal invasivo de mama. A associação entre a presença de metilação e os seguintes dados clínico-patológicos dos pacientes foi então analisada: estágio patológico, comprometimento linfonodal, o tamanho e o grau de diferenciação do tumor; invasão linfática e perineural, além de dados de expressão de marcadores tumorais já bem caracterizados, como a expressão de receptor de estrógeno e progesterona e níveis elevados da proteína do gene *p53*.

Tabela 4 - Descrição dos dados clínico-patológicos das pacientes com carcinoma ductal de mama incluídas nesse estudo.

Variável	Categoria	No. Pacientes	%
Idade	<=40	11	18
	>40	50	82
Estágio Patológico	1	8	13.1
	2	34	55.7
	3	19	31.1
Grau de diferenciação - SBR	1	15	24.6
	2	36	59
	3	8	13.1
	Não avaliado	2	3.3
Linfonodos Positivos	0	26	42.6
	1 a 3	19	31.1
	>4	16	26.2
Receptor de Estrogeno	Negativo	22	36.1
	Positivo	39	63.9
Receptor de Progesterona	Negativo	41	67.2
	Positivo	20	32.8
Receptor de estrógeno ou progesterona	Negativo	21	34,4
	Positivo	40	65,6
Níveis elevados da proteína p53	Negativo	41	67.2
	Positivo	17	27.9
	Não avaliado	3	4.9
Quimioterapia adjuvante	Não	19	31.1
	Sem Adria	25	41
	Com Adria	17	27.9
Radioterapia Adjuvante	Não	10	16.4
	Sim	51	83.6
Tratamento com Tamoxifeno	Não	26	42.6
	Sim	35	57.4
Tamanho do tumor	≤ 2cm	19	33.1
	> 2 < 5cm	36	59
	> 5cm	6	9.8
Invasão Linfática	Negativo	16	26.2
	Positivo	33	54.1
	Não avaliado	11	18
Invasão Perineural	Negativo	35	57.4
	Positivo	22	36.1
	Não avaliado	3	4.9
Status de metilação do gene <i>NDRG4</i>	Não Met	51	83.6
	Met	10	16.4
Total de Amostras		61	100

Total de 61 amostras de carcinoma ductal invasivo de mama foram avaliadas quanto ao *status* de metilação da região promotora do gene *NDRG4* por *Nested-MSP*.

Embora a frequência de metilação deste gene nos casos avaliados tenha sido relativamente baixa (16,4%), 6 das 10 pacientes que apresentaram *status* de metilação positivo, também apresentaram mais de 4 (>4) linfonodos comprometidos (37,5% e $p=0,025$). Da mesma forma, a associação entre a metilação do gene *NDRG4*, níveis elevados da proteína *p53* ($p=0,014$) e o tamanho do tumor ($p=0,036$) foram estatisticamente significativas (Tabela 5). Não foram observadas associações significativas para os demais parâmetros clínico-patológicos analisados.

Tabela 5 - Correlação entre o *status* de metilação no gene *NDRG4* e os parâmetros avaliados nas pacientes.

Variável	Categoria	NDRG4		P
		UnMeth	Meth	
Idade	<=40	8 (72.7%)	3 (27.3%)	0.367
	>40	43 (86%)	7 (14%)	
Estágio Clínico (Patológico)	1	7 (87.5%)	1 (12.5%)	0.095
	2	31 (91.2%)	3 (8.8%)	
	3	13 (68.4%)	6 (31.6%)	
Grau de diferenciação - SBR	1	13 (86.7%)	2 (13.3%)	0.373
	2	29 (80.6%)	7 (19.4%)	
	3	8 (100%)	0	
Linfonodos Positivos	0	23 (88.5%)	3 (11.5%)	0.025
	1 a 3	18 (94.7%)	1 (5.3%)	
	>4	10 (62.5%)	6 (37.5%)	
Receptor de Estrogeno	0	18 (81.8%)	4 (18.2%)	1.000
	1	33 (84.6%)	6 (15.4%)	
Receptor de Progesterona	0	35 (85.4%)	6 (14.6%)	0.716
	1	16 (80%)	4 (20%)	
Receptor de estrógeno ou progesterona	ER/PR neg	17 (81%)	4 (19%)	0.725
	ER ou PR +	34 (85%)	6 (15%)	
Níveis elevados da proteína p53	0	38 (92.7%)	3 (7.3%)	0.014
	1	11 (64.7%)	6 (35.3%)	
Tamanho do tumor	≤2cm	18 (94.7%)	1 (5.3%)	0.036
	>2<5cm	30 (83.3%)	6 (16.7%)	
	>5cm	3 (50%)	3 (50%)	
Invasão Linfática	0	15 (93.8%)	1 (6.3%)	0.199
	1	24 (72.7%)	9 (27.3%)	
Invasão Perineural	0	30 (85.7%)	5 (14.3%)	0.642
	1	17 (77.3%)	5 (22.7%)	

4.5 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE METILAÇÃO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *NDRG4* E SOBREVIDA LIVRE DE METÁSTASE À DISTÂNCIA

As análises de associação entre a presença de metilação na região promotora do gene *NDRG4* e a sobrevida livre de metástase a distância (partindo da data de diagnóstico da doença até a data do diagnóstico de metástase a distância ou último *follow-up*) foram realizadas através do método de *Kaplan-Meier*, seguido do teste de *Log-rank* para avaliar a significância estatística dos resultados obtidos. Como pode ser observado na Figura 10, cerca de 67% das pacientes estavam livre de doença metastática (43 pacientes) ao final de 10 anos de seguimento. A presença de metilação na região promotora do gene *NDRG4* se mostrou associada a uma menor taxa de sobrevida livre de doença metastática neste mesmo período. Das pacientes analisadas, 80% das que apresentaram metilação no gene *NDRG4* tiveram recidiva a distância da doença em um período de 10 anos, ao passo que apenas 23,9% das pacientes que não apresentaram metilação no gene *NDRG4* recidivaram no mesmo período ($p=0,001$) (Figura 11).

Dos demais parâmetros clínico-patológicos avaliados em nossa amostragem e descritos na literatura como de valor prognóstico, observamos correlação estatisticamente significativa entre o estágio patológico 3 ($p=0,001$), o tamanho do tumor ($p=0,02$), o número de linfonodos positivos ($p=0,001$), níveis elevados da proteína p53 ($p=0,009$), o uso de radioterapia adjuvante ($p=0,042$), o uso de tamoxifeno ($p=0,041$) e um pior prognóstico em termos de sobrevida livre de doença metastática. Não foi observada significância estatística para os demais parâmetros avaliados (Tabela 6).

Tabela 6 - Probabilidade acumulada de sobrevida livre de metástase e sobrevida global.

Variável	Categoria	Sobrevida livre de doença		Sobrevida global	
		prob (%)	P	prob (%)	P
Idade	>40	73.2		71,6	
	< =40	45.5	0.002	63,6	0,414
Estágio Patológico	1	80			
	2	79.4			
	3	42.1	0.001		
Tamanho do tumor	≤2cm	79.6		94,7	
	>2<5cm	66.9		59,7	
	>5cm	33.3	0.020	62,5	0,041
Grau de diferenciação - SBR	I	90.9		86,7	
	II	56.6		64,4	
	III	72.9	0.078	62,5	0,304
Linfonodos Positivos	0	80.5		79	
	1-3	75		78,9	
	≥4	37.5	0.001	30,9	0,117
Invasão Perineural	Ausente	69.9		76,7	
	Presente	61.4	0.261	64,6	0,425
Invasão Linfática	Negativo	79.3		73,9	
	Positivo	50.8	0.106	63,9	0,501
Receptor de Estrógeno	Negativo	67.9		68,2	
	Positivo	65.4	0.688	72,2	0,392
Receptor de Progesterona	Negativo	72.8		75,6	
	Positivo	54.3	0.217	61,4	0,718
Receptor de estrógeno ou progesterona	Negativo	66.3		66,7	
	Positivo	66.6	0.543	73,1	0,292
Níveis elevados da proteína p53	Negativo	72.6		75,1	
	Positivo	47.1	0.009	61,8	0,235
Quimioterapia adjuvante	Ausente	83.5		72,3	
	Sem antraciclina	70.1		56,1	
	Com antraciclina	49	0.142	82,1	0,188
Radioterapia adjuvante	Ausente	35		40	
	Presente	72.3	0.042	77,8	0,009
Tratamento com Tamoxifeno	Ausente	52.8		56,48	
	Presente	77.2	0.041	82,4	0,011
Status de metilação do gene <i>NDRG4</i>	Não metilado	76.1		73,5	
	Metilado	20	0.001	60	0,184
	Total	61		61	

Sobrevida livre de metástase e sobrevida global após 10 anos de seguimento, segundo o *status* de metilação no gene *NDRG4* e os parâmetros clínicos avaliados.

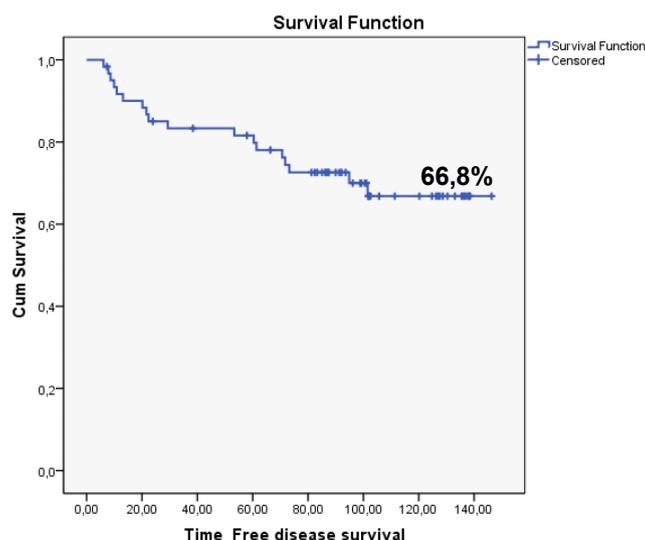


Figura 10 - Curva de sobrevida *Kaplan-Meier* com a análise cumulativa da sobrevida livre de metástases de 61 pacientes ao longo de 10 anos (120 meses). No eixo Y observamos a sobrevida cumulativa das pacientes e no eixo X, o tempo em meses.

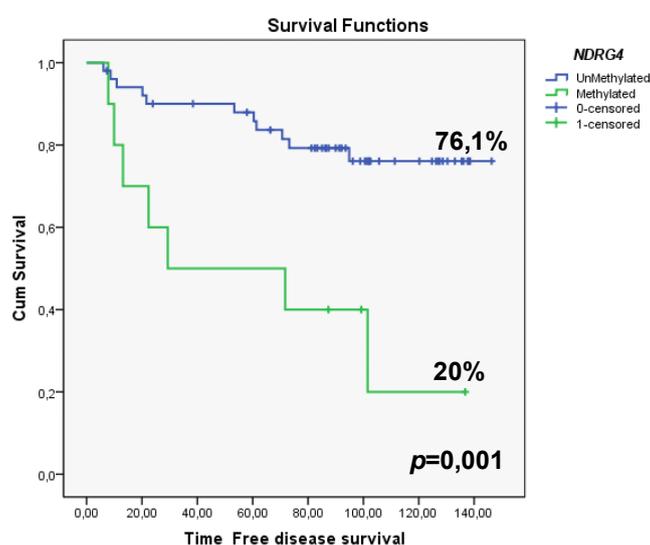


Figura 11 - Curva de sobrevida *Kaplan-Meier* com a análise cumulativa da sobrevida livre de metástase à distância de 61 pacientes durante o seguimento de 10 anos (120 meses). No eixo Y observamos a sobrevida cumulativa das pacientes e no eixo X, o tempo em meses. A linha contínua azul (*UnMethylated*) representa o grupo de pacientes negativos para metilação no gene *NDRG4* e a linha contínua verde (*Methylated*) o grupo de pacientes que apresentaram metilação, de acordo com os ensaios de *Nested-MSP*.

Em seguida, realizamos uma análise multivariada para verificar se a presença de metilação na região promotora do gene *NDRG4* constituía um fator prognóstico independente das demais variáveis clínico-patológicas para a sobrevida livre de metástase à distância. Esta análise foi ajustada pela modalidade terapêutica utilizada no tratamento da doença, sendo consideradas apenas as variáveis que apresentaram correlação estatística com um pior prognóstico na análise univariada ($p \leq 0,05$).

As variáveis que apresentaram valor prognóstico independente na análise multivariada para sobrevida livre de metástase à distância foram: a idade, sendo que as pacientes com mais de 40 anos apresentaram um risco diminuído de desenvolver metástase (HR=0.1 e $p=0,001$), linfonodos positivos, sendo que as pacientes com mais de 4 linfonodos acometidos apresentaram um risco aumentado para o desenvolvimento de metástases (HR=8.0 e $p=0.001$), radioterapia adjuvante que atuou como um fator protetor (HR=0.1 e $p=0.001$) e por fim o *status* de metilação do gene *NDRG4*, sendo que as pacientes que apresentaram o gene *NDRG4* metilado, também apresentaram um maior risco de desenvolver metástases (HR=5.5 e $p=0.006$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Análise multivariada de sobrevida livre de metástase à distância.

Variável	Categoria	*HR	**IC 5%	P
Idade	< =40	1.0	Ref	-
	>40	0.1	0.04 – 0.4	0.001
Linfonodos Positivos	0	1.0	Ref	-
	1-3	3.4	0.7 – 15.3	0.112
	≥4	8.0	2.3 – 28.4	0.001
RT adj	Ausente	1.0	Ref	-
	Presente	0.1	0.03 – 0.4	0.001
Status de metilação do gene <i>NDRG4</i>	Não metilado	1.0	Ref	-
	Metilado	5.5	1.6 – 18.6	0.006

*HR Risco (*hazardous*)

**IC 95% intervalo de confiança

4.6 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE METILAÇÃO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *NDRG4* E SOBREVIDA GLOBAL

As análises de sobrevida global (partindo da data do diagnóstico da doença até o óbito ou último *follow-up*), também foram realizadas através do método de *Kaplan-Meier*, seguido do teste de *Log-rank* para avaliar a significância estatística dos resultados obtidos. Cerca de 71% das pacientes estavam vivas ao final de 10 anos de seguimento (Figura 12). A presença de metilação na região promotora do gene *NDRG4* se mostrou associada a uma menor taxa de sobrevida global em 10 anos. Das pacientes analisadas, 40% das que apresentaram metilação na região promotora do gene *NDRG4* morreram em decorrência da doença em um período de até 10 anos, ao

passo que apenas 26,5% das pacientes que não apresentaram metilação no gene *NDRG4* morreram em decorrência da doença no mesmo período ($p=0,184$) (Figura 13). Embora a diferença observada entre os dois grupos não tenha sido estatisticamente significativa, observa-se um maior percentual de mortes ao final do período de seguimento, nas pacientes que apresentam o *NDRG4* metilado.

Dos demais parâmetros clínico-patológicos avaliados em nossa amostragem e descritos na literatura como de valor prognóstico, observamos correlação estatisticamente significativa entre a sobrevida global, o tamanho do tumor ($p=0,041$), o uso de radioterapia adjuvante ($p=0,009$), e o uso de tamoxifeno ($p=0,011$). Não foi observada significância estatística para os demais parâmetros avaliados (Tabela 6). As variáveis que apresentaram valor prognóstico independente na análise multivariada para sobrevida global foram: o tamanho do tumor $HR=6,8$ ($p= 0,066$) para T2 e $HR=15,8$ ($p=0,027$) para T3; e o uso de tamoxifeno foi considerado um fator protetor $HR=0,2$ com $p=0,008$ (Tabela 8).

Tabela 8 - Análise multivariada de sobrevida global.

Variável	Categoria	*HR	**IC 5%	P
Tamanho do tumor	T1	1.0	Ref	-
	T2	6.8	0.9-52.4	0.066
	T3	15.9	1.4-186.6	0.027
	0			-
Tamoxifeno	Ausente	1	Ref	
	Presente	0.2	0.07-	0.008

*HR Risco (*hazardous*)

**IC 5% intervalo de confiança

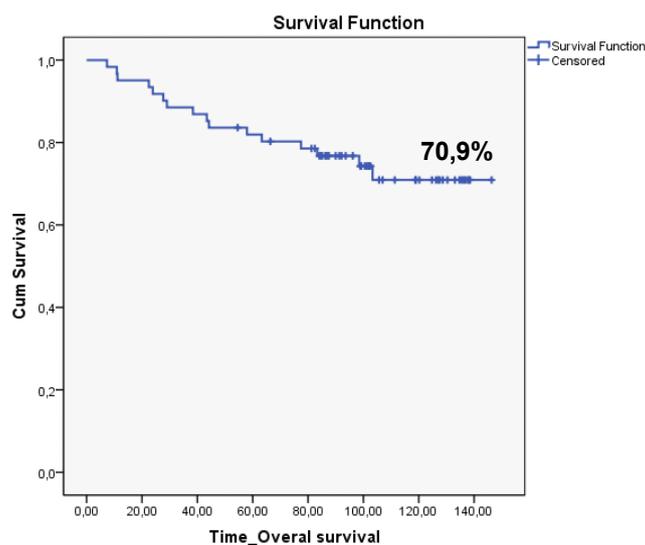


Figura 12 - Curva de sobrevida *Kaplan-Meier* com a análise cumulativa da sobrevida Global de 61 pacientes ao longo de 10 anos (120 meses). No eixo Y observamos a sobrevida cumulativa das pacientes e no eixo X, o tempo em meses.

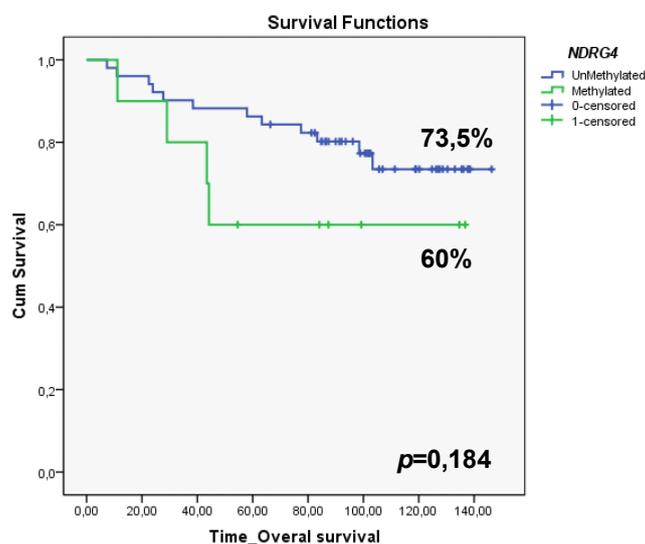


Figura 13 - Curva de sobrevida *Kaplan-Meier* com a análise cumulativa da sobrevida global de 61 pacientes durante o seguimento de 10 anos (120 meses). No eixo Y observamos a sobrevida cumulativa das pacientes e no eixo X o tempo em meses. A linha contínua azul (*UnMethylated*) representa o grupo de pacientes negativos para metilação no gene *NDRG4* e a linha contínua verde (*Methylated*) o grupo de pacientes que apresentaram metilação, de acordo com os ensaios de *Nested-MSP*.

4.7 ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE *NDRG4* EM LINHAGEM DE TUMOR DE MAMA MCF7

Os resultados obtidos nos estudos do padrão de metilação do gene *NDRG4* em pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama, mostraram uma associação entre o silenciamento epigenético do gene *NDRG4* e o desenvolvimento de metástases. Buscando mimetizar funcionalmente o silenciamento causado pela metilação desse gene nos tumores, optamos por realizar os ensaios *in vitro* utilizando a metodologia de RNAi para silenciar o gene *NDRG4* em linhagem tumoral de mama. A linhagem MCF7 foi selecionada como modelo experimental por apresentar o maior nível de expressão do gene *NDRG4* dentre as linhagens disponíveis em nosso laboratório e por não apresentar altos níveis de metilação na região promotora do gene *NDRG4* quando comparada com as linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-435 (Figura 3, Quadro 1). Além disso, a princípio, optamos por ensaios funcionais *in vitro* que ressaltassem informações relacionadas ao desenvolvimento e progressão tumoral.

4.7.1 Silenciamento Gênico por shRNA

Para o silenciamento pós-transcricional estável do gene *NDRG4* foi usado o kit para expressão de shRNA (*small hairpin RNA*) disponibilizado comercialmente pela OriGene Technologies®. Foram adquiridos 2 kits totalizando 8 construções contendo diferentes seqüências alvo, específicas para o gene *NDRG4*, além de construções controles (Vetor vazio e

Scrambled). Todas essas construções foram seqüenciadas com o intuito de confirmar a identidade do fragmento correspondente às diferentes seqüências alvo, bem como a integridade do cassete para a expressão dos shRNA (dado não mostrado).

Foi usado o método de lipotransfecção reversa, variando as concentrações de DNA e lipofectamina, o que resultou em diferentes eficiências de transfecção. Foram usadas três condições variando as quantidades de reagente de transfecção (μl) e de DNA (μg), as proporções foram respectivamente 3:2, 3:1 e 6:1. Após 48 horas do procedimento de transfecção, as populações foram tripsinizadas e uma alíquota foi utilizada para avaliar a eficiência de transfecção a partir do percentual de células contendo a proteína GFP detectadas por citometria de fluxo (FACs). Segundo a avaliação pelo FACs, a eficiência de transfecção variou entre 21,5% a 52,65% (Tabela 9). Dentre as condições usadas, a mais eficiente para a linhagem MCF7 foi a terceira condição (6 μl de lipofectamina e 1 μg de DNA) (Tabela 9).

Tabela 9 - Avaliação da eficiência de transfecção pela citometria de fluxo.

Amostra	Condição de transfecção	Eventos	% de células GFP positivas	Média intensidade GFP
Linhagem MCF7	Controle FACs	9472	0.35	19.45
Vetor vazio		25931	37.57	325
Scrambled		28112	48.20	561.48
NDRG-5	3µl Lipofec/:2µg DNA	11848	49.85	667
NDRG-6		26310	36.97	334
NDRG-7		26886	37.73	421
NDRG-8		26951	42.54	376.79
Vetor vazio		23594	25.55	225.46
Scrambled		25247	33.63	218.55
NDRG-5	3µl Lipofec/:1µg DNA	25564	34.18	188.21
NDRG-6		23402	21.50	113
NDRG-7		23973	23.34	217
NDRG-8		24806	31.01	193
Vetor vazio		26718	42.34	437
Scrambled		28392	50.26	788.33
NDRG-5	6µl Lipofec/:1µg DNA	30533	58.98	850
NDRG-6		29434	52.65	669
NDRG-7		29055	52.52	715
NDRG-8		27526	45.17	387.55

Na tabela estão os dados de uma alíquota de células MCF7, 24 horas após o procedimento de transfecção. A linhagem MCF7 (parental) foi usada para normalizar o equipamento. Na coluna Amostra, estão as amostras analisadas, o último número representa a construção usada para transfecção. Foram usadas três condições de transfecção variando as quantidades de reagente (µl) e DNA (µg), as proporções foram respectivamente 3:2, 3:1 e 6:1. Na coluna Eventos, está a quantidade total de células avaliadas pelo FACs. Na coluna % de células GFP positivas, esta a porcentagem de células que apresentaram GFP. Por fim, na coluna Média Intensidade GFP está a média geométrica da intensidade de GFP em relação à quantidade de eventos analisados.

Após o período de seleção (15 dias) usando 1µg/ml de puomicina, as populações de células MCF7 transfectadas com as diferentes construções foram avaliadas quanto ao nível de silenciamento do gene *NDRG4*. Para tanto, a quantidade de transcritos *NDRG4* foi avaliada através da metodologia de PCR em tempo real (qRT-PCR). A linhagem MCF7 foi usada como referência (100% de expressão) e o gene *GAPDH* como normalizador. Segundo esta análise, o silenciamento nas populações *NDRG4-6A*, *7A* e *8A*

variou de 70 a 75%. Já a construção NDRG4-5A apresentou eficiência de silenciamento inferior a 50%. A linhagem MDA-MB-435, que possui baixos níveis de expressão do gene *NDRG4*, apresentou menos de 10% dos transcritos desse gene quando comparado com a MCF7 (Figura 14A).

Devido a dificuldade de obtenção de silenciamento eficiente, decidimos acionar o fabricante para solicitar o envio do segundo kit contendo novas construções (OriGene). Quatro novas construções, com diferentes seqüências alvos, mais os controles Vetor vazio e *Scrambled* foram enviadas. O método de transfecção foi o mesmo, lembrando que a terceira condição foi a mais indicada para a linhagem MCF7 (6µl de reagente de transfecção e 1 µg de DNA). Os resultados da avaliação do percentual de células GFP positivas, por citometria de fluxo, foram semelhantes aos resultados obtidos na transfecção com o kit anterior (dado não mostrado). A avaliação do silenciamento nas populações, feita por qRT-PCR após o período de 15 dias de seleção com puromicina, revelou que nenhuma das construções apresentou silenciamento com eficiência superior a 50% nas populações (Figura 14B). Embora a eficiência de silenciamento obtida com as construções desse segundo kit também não tenha sido muito alta, decidimos investir na construção NDR6B, uma vez que SCHILLING et al. (2009), usando glioblastoma como modelo, conseguiram obter uma boa eficiência de silenciamento para o gene *NDRG4* usando uma seqüência alvo semelhante a da construção NDR-6B.

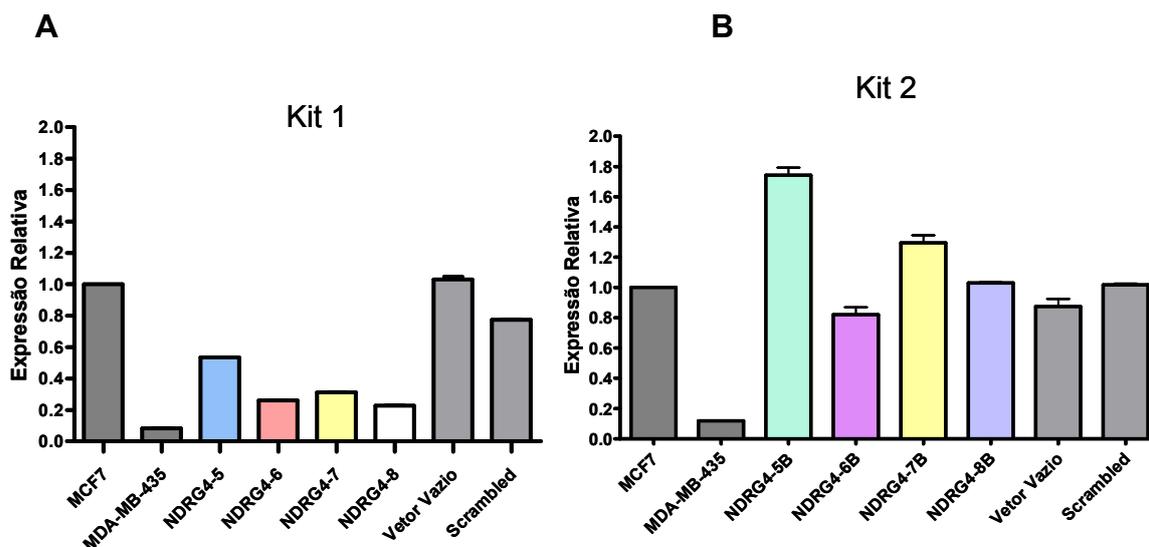


Figura 14 - Avaliação da eficiência de silenciamento do gene *NDRG4* por qRT-PCR. Experimento único de qRT-PCR após o período de 15 dias de seleção com puromicina. **A** Primeiro kit: no gráfico está representada a quantidade relativa de transcritos *NDRG4* na linhagem MCF7 transfectada com quatro diferentes construções de shRNA e os controles Vetor Vazio e Scrambled. **B**: segundo kit: no gráfico está representada a quantidade relativa de transcritos *NDRG4* na linhagem MCF7 transfectada com mais quatro diferentes construções de shRNA e os controles Vetor Vazio e Scrambled. A linhagem MCF7 (parental) foi usada como referência, o gene normalizador foi o *GAPDH*. No gráfico as barras representam a média do erro padrão com base na duplicata experimental da reação de qRT-PCR (Mean & SEM) (GraphPad Prism® versão 4.03).

4.7.2 Seleção de Clones Celulares com Silenciamento estável do Gene *NDRG4*

Para a obtenção de níveis de silenciamento mais elevados e estáveis decidimos isolar clones celulares a partir da população transfectada para posterior realização dos ensaios funcionais. Para tanto, as populações transfectadas foram semeadas em baixa densidade e incubadas sob condições normais de cultivo até a formação de colônias isoladas. Estas colônias foram coletadas e expandidas para avaliar a eficiência de silenciamento do gene *NDRG4* por qRT-PCR. Foram avaliados cerca de 30 clones para as construções NDR5A, NDR6A, NDR7A, NDR8A e NDR6B. A análise de eficiência de silenciamento de alguns clones (qRT-PCR) foi representada na Figura 15, na qual destacamos os clones com maior nível de silenciamento e que foram selecionados para avaliação da estabilidade do silenciamento (indicados por setas) e posterior realização dos ensaios funcionais.

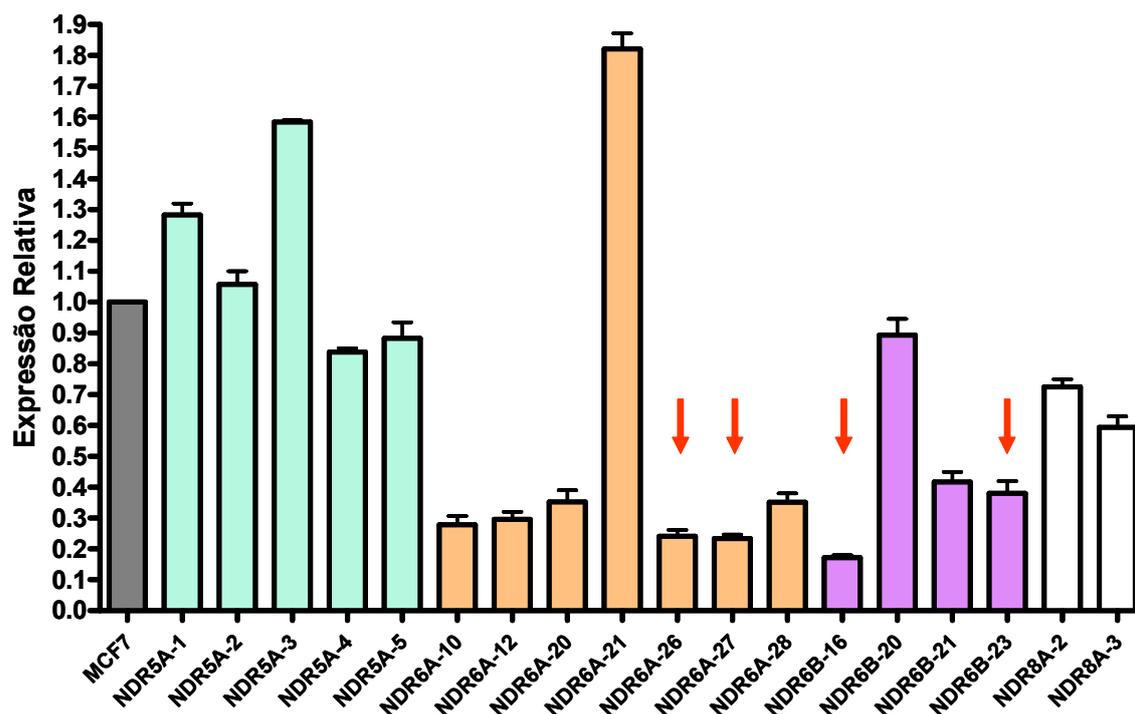


Figura 15 - Seleção dos clones com maior eficiência de silenciamento. Figura representativa de alguns clones avaliados em um único experimento por qRT-PCR: no gráfico cada barra representa um clone e as diferentes construções foram marcadas com cores distintas. A linhagem MCF7 (parental) foi usada como referência, o gene normalizador foi o *GAPDH*. As setas indicam os clones que foram selecionados para novas análises para avaliação da estabilidade do silenciamento. No gráfico, as barras representam a média do erro padrão com base na duplicata experimental da reação de qRT-PCR (Mean & SEM) (GraphPad Prism® versão 4.03).

4.7.3 Avaliação do Nível de Expressão de Transcritos e da Proteína *NDRG4* nos Clones Selecionados para a Realização dos Ensaios Funcionais

Os clones NDR6A-CI26 e CI27 e NDR6B-CI16 e CI23 selecionados a partir das populações transfectadas com as construções NDR6A e NDR6B, respectivamente, foram os clones que apresentaram maior eficiência de silenciamento avaliados por qRT-PCR. Como controle, foi selecionado um clone da população transfectada com a construção *scrambled*, denominado Scr7, que apresentou expressão do gene *NDRG4* comparável com a linhagem MCF7 (parental) (Figura 16).

O silenciamento do gene *NDRG4* nos clones selecionados para a realização dos ensaios funcionais, também foram avaliados quanto ao nível de expressão de proteínas através de ensaios de *Western blot*. SCHILLING et al. (2009) avaliaram o nível de expressão da proteína *NDRG4* através da técnica de *Western blot* usando o anticorpo anti-*NDRG4* Prestige® HPA015313 (Sigma) e lisado celular fracionado (linhagem U251 Glioblastoma). Uma vez que a proteína *NDRG4* está localizada no citoplasma, o fracionamento de proteínas citoplasmáticas e nucleares permite maior especificidade ao ensaio. Assim, a expressão da proteína *NDRG4* em extratos citoplasmáticos das linhagens MCF7 e MDA-MB-435 e dos clones selecionados para a realização dos ensaios funcionais, foi avaliada por *Western blot*. Desta forma, foi observada uma redução dos níveis de expressão da proteína *NDRG4* nos clones silenciados. Na Figura 17 pode ser observada a diminuição de intensidade em duas bandas acima de 37Kda, quando comparamos a linhagem MDA-MB-435 e os clones contra

a linhagem MCF7 e o controle *scrambled*. A diminuição de intensidade destas bandas foi quantificada através do programa Image J (*Image Processing and analysis in Java* 1.43u). Segundo a densitometria, apenas das bandas acima de 37Kda, que provavelmente correspondem às isoformas NDRG4-B^{VAR} (37.089da), NDRG4-B (38.458da) e NDRG4-H (40.644da), a quantidade de proteína observada nos clones variou de 30 a 50%, quando comparado com a linhagem MCF7 (Figura 16). Embora o silenciamento nos quatro clones tenha sido semelhante, o clone NDR6B-16 apresentou menor quantidade de proteína NDRG4, variando de 20 a 30% em relação a linhagem MCF7. No entanto, mesmo usando apenas a fração citoplasmática, uma banda inespecífica abaixo de 37Kda foi observada. Podemos considerar esta banda inespecífica porque mesmo na linhagem MDA-MB-435, que apresenta baixos níveis de transcritos do gene *NDRG4*, a mesma banda pode ser observada (Figura 16). Além disso, esta banda também é observada no extrato nuclear das linhagen MCF7 e MDA-435 (Figura 17).

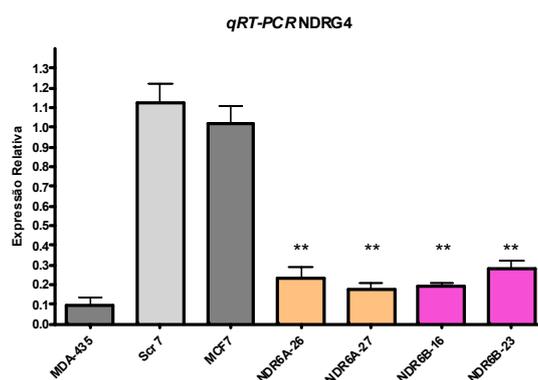


Figura 16 - Clones selecionados por qRT-PCR (NDR6A-CI26 e CI27 e NDR6B-CI16 e CI23). Estes dados foram baseados em 4 experimentos de qRT-PCR independentes. O clone controle Scr7 (*Scrambled*) apresentou variação de expressão do gene *NDRG4* similar à MCF7. A linhagem MCF7 (parental) foi usada como referência, o gene normalizador foi o *GAPDH*. Os quatro clones apresentaram diminuição de expressão do gene *NDRG4* com significância estatística pelo ANOVA seguido de *Tukey's Multiple Comparison Test* ($p < 0,001$), no gráfico as barras representam a média do erro padrão (Mean & SEM) (GraphPad Prism® versão 4.03).

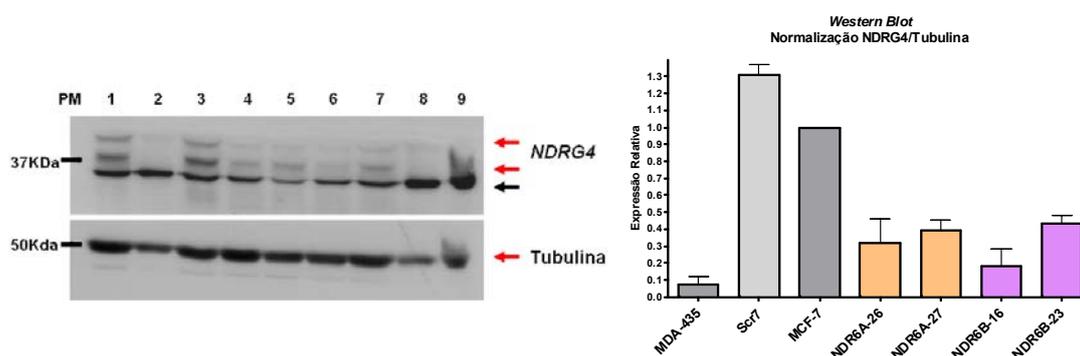


Figura 17 - *Western-blot* fracionado dos clones apresentando silenciamento estável. Foram usados como controles as linhagens MCF7, MDA-435 e Scr7 (*scrambled*), canaletas 1 2 e 3, respectivamente. Os clones NDR6A (NDR6A-CI26 e 27) e NDR-6B (NDR6B-CI16 e 23) foram aplicados nas canaletas 4, 5, 6 e 7, respectivamente. O produto do gene α - β -*tubulina* (50KDa) foi usado como normalizador. Nas canaletas 8 e 9 foram aplicados os extratos nucleares das linhagens MCF7 e MDA-435, respectivamente. Cerca de 30ug dos extratos citoplasmático ou nuclear foram aplicados no gel. O tempo de exposição para a proteína NDRG4 foi de 10 minutos, já para a α - β -*tubulina* foi de 1 minuto. As setas vermelhas indicam as bandas referentes aos produtos do gene *NDRG4* (acima de 37KDa), já a preta indica uma provável banda inespecífica (abaixo de 37Kda). No gráfico está representada a leitura densitométrica (Image J) das bandas correspondentes às isoformas de *splicing* do gene *NDRG4*, normalizadas em relação à banda do gene da *tubulina*. Não houve detecção da proteína NDRG4 nos extratos nucleares. A figura representa um experimento típico, já a quantificação foi baseada em dois experimentos independentes. No gráfico as barras representam a média do erro padrão (Mean & SEM) (GraphPad Prism® versão 4.03).

4.7.4 Caracterização Morfológica dos Clones Selecionados

A caracterização morfológica de cada clone foi realizada em condições normais de crescimento. Esse experimento nos permitiu observar que todos os clones selecionados, apresentaram características morfológicas epiteliais, assim como a linhagem parental MCF7, crescendo na forma de colônias de células poligonais interconectadas (Figura 18).

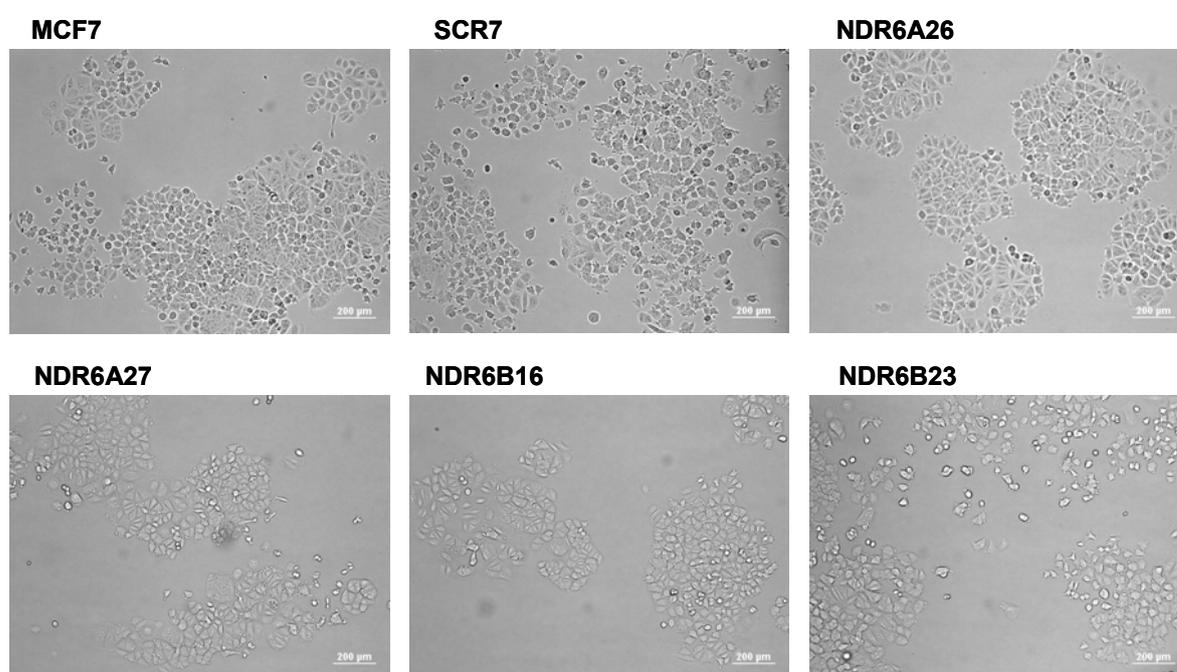


Figura 18 - Morfologia dos diferentes clones selecionados: linhagem MCF7 transfectada com duas diferentes construções de shRNA (NDR6A e NDR6B). As células foram plaqueadas em placas de 60mm mantidas em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Fotomicrografias em aumento de 100X.

4.8 ENSAIOS FUNCIONAIS PARA AVALIAR O PAPEL BIOLÓGICO DO GENE *NDRG4*

Na tentativa de elucidar a função biológica da proteína *NDRG4*, realizamos ensaios funcionais clássicos que nos permitissem avaliar as características de uma célula tumoral, tais como: proliferação, capacidade clonogênica, migração e de adesão em diferentes substratos *in vitro*. Além disso, foi realizado ensaio de quimioresistência, no qual buscamos avaliar a relação entre o silenciamento desse gene e o desenvolvimento de resistência aos quimioterápicos do grupo dos taxanos (Paclitaxel e Docetaxel).

O nível de expressão do gene *NDRG4* foi avaliado através de qRT-PCR (mRNA) e *Western blot* (proteína). Os resultados obtidos nesses experimentos revelaram não haver diferença no nível de expressão desse gene entre os controles (MCF7 e Scr7). Além disso, foram observadas reduções de 70 a 80% por qRT-PCR e de 50 a 70% por *Western blot* nos clones silenciados em relação aos controles (figura 16 e 17). Em todos os ensaios funcionais realizados nesse estudo, os controles (MCF7 e Scr7) apresentaram comportamento similar, bem como os clones silenciados (NDR6A-26 e 27, e NDR6B16 e 23) provenientes das mesmas construções (NDR6A e NDR6B). Assim sendo, para facilitar a interpretação dos resultados e aumentar o poder estatístico de nossas análises, optamos por agrupar os resultados obtidos das amostras do grupo controle (MCF7 e

Scr7), bem como, dos clones silenciados, de acordo com sua construção de origem (NDR6A e NDR6B).

4.8.1 Efeito do Silenciamento do Gene *NDRG4* na Taxa de Proliferação Celular

Uma das características principais de uma célula tumoral é o desequilíbrio na taxa de proliferação celular. Para avaliar o efeito do silenciamento do gene *NDRG4* na taxa de proliferação celular, os dados de crescimento celular da linhagem MCF7 e dos clones silenciados para o gene *NDRG4* foram analisados em uma curva de crescimento. Para tanto, cerca de 1×10^4 células foram semeadas em duplicata em placas de 6 poços (35mm^3 Costar®). As contagens foram feitas no primeiro dia após o plaqueamento (dia 0) e a partir do terceiro ao oitavo dia (1 – 8).

Foram realizados 3 ensaios independentes, em duplicata. Após o agrupamento dos clones (quadruplicata), totalizando 12 réplicas, foi feita a avaliação estatística pelo método de *Dunn's Multiple Comparison Test*. Assim, foi observado que os dois grupos apresentaram uma diminuição na velocidade de crescimento quando comparado com os controles. O agrupamento dos clones da construção NDR6A (26A e 27A) apresentou significativa diminuição proliferativa com valor de $p < 0,05$ (Figura 19).

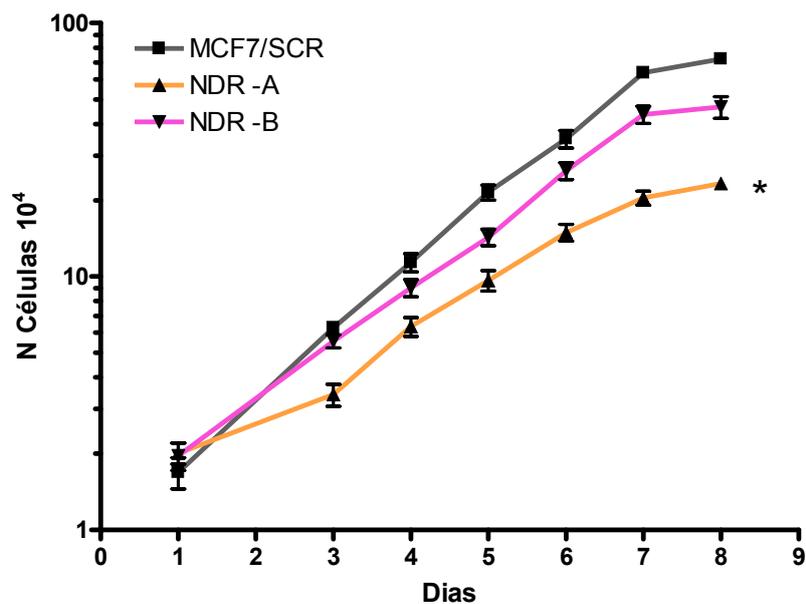


Figura 19 - Efeito do silenciamento do gene *NDRG4* na taxa de proliferação celular. Foram semeadas 1×10^4 células/poço em placas de 6 poços em duplicata. No gráfico está representado o resultado da contagem de células por 8 dias em três experimentos independentes. Os clones silenciados apresentaram diminuição na taxa de crescimento quando comparados ao grupo controle. Os clones da construção NDR6A (*) apresentou diminuição no crescimento em relação aos controles com o valor de $p < 0,05$. O teste estatístico aplicado foi o ANOVA seguido do *Dunn's Multiple Comparison Test*. No gráfico, as barras representam a média do erro padrão (Mean & SEM) (*GraphPad Prism*® versão 4.03).

4.8.2 Efeito do Silenciamento do Gene *NDRG4* na Capacidade de Sobrevivência e Proliferação Celular

Ensaio de formação de colônias *in vitro* avaliam a capacidade de uma única célula isolada gerar uma colônia, permitindo a comparação do potencial clonogênico entre os clones silenciados e seus controles. A quantidade de colônias indica a capacidade clonogênica das células em baixa densidade (FRESHNEY 2000).

Assim, buscamos comparar a capacidade de sobrevivência e proliferação entre os clones silenciados para o gene *NDRG4* e os controles através de ensaio clonogênico bidimensional. No grupo controle observamos a formação de uma média de $63,3 \pm 1,30$ colônias, já nos grupos NDR6A e NDR6B observamos a formação em média de $27 \pm 1,30$ e $40,25 \pm 0,96$ colônias, respectivamente (Figura 20). Os clones silenciados apresentaram portanto, uma menor capacidade de formação de colônias quando comparados com os controles ($p < 0.001$). Esse dado indica uma menor capacidade de proliferação em baixa densidade, corroborando o resultado observado na curva de crescimento.

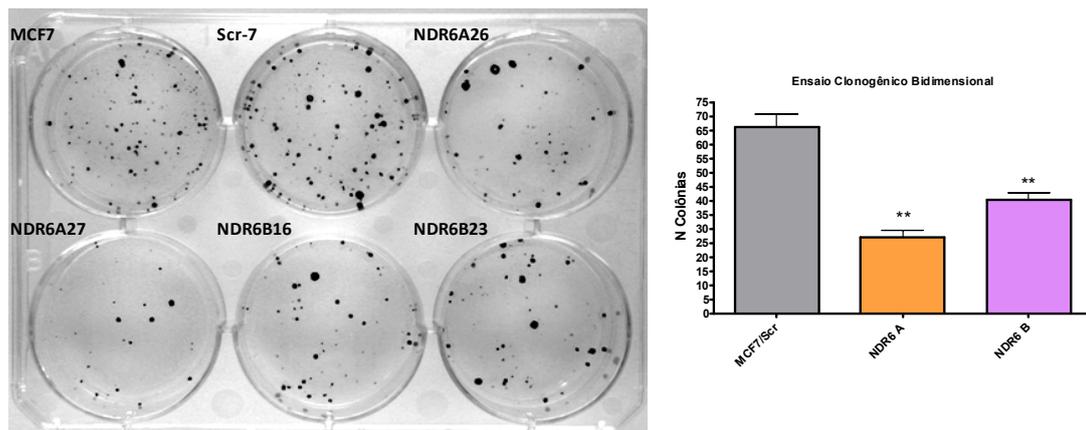


Figura 20 - Efeito do silenciamento do gene *NDRG4* na capacidade de sobrevivência e proliferação celular. Foram semeadas 250 células por poço e a formação de colônias ocorreu por 15 dias. No gráfico está representado o resultado da quantidade de colônias formadas em três experimentos independentes. O asterisco indica significância estatística com $p < 0.001$, tendo como referência os controles (MCF7/Scr7). A análise estatística foi feita pelo ANOVA seguido de *Tukey's Multiple Comparison Test*. No gráfico, as barras representam a média do erro padrão (Mean & SEM) (*GraphPad Prism*® versão 4.03).

4.8.3 Efeito do Silenciamento do Gene *NDRG4* na Migração Celular

A migração celular desempenha um papel importante em vários processos biológicos normais incluindo, embriogênese, morfogênese (JULIANO e HASKILL 1993), cicatrização de feridas (MARTIN 1997), dentre outros, bem como em processos patológicos, como o desenvolvimento de metástases (BERNSTEIN e LIOTTA 1994). Para investigar a capacidade de migração *in vitro* dos clones com gene *NDRG4* silenciados, usamos o soro fetal bovino como fator quimiotático. Como fator haptotático, foi usado o colágeno tipo I. Ambos os fatores quimioatraentes foram utilizados em sistema de câmara tipo *transwell*.

- **Migração celular quimiotática**

Neste ensaio, foi usado o soro fetal bovino como fator quimiotático. Para tanto, os clones silenciados e os controles foram carenciados para soro fetal bovino por 24 horas. Meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino foi usado como agente quimioatraente, adicionado na câmara inferior do *transwell* e o tempo de migração foi de 24 horas. Devido a baixa capacidade de migração da linhagem MCF7, foi observado uma pequena quantidade de células que migraram para a superfície inferior da membrana, média de $12,7 \pm 1,16$ células por campo no grupo controle (MCF7 e Scr7). Já nos clones com o gene *NDRG4* silenciado, observamos um aumento significativo na capacidade de migração, média de $29,22 \pm 2,13$ células por campo com $p < 0,05$ para os clones da construção NDR6-A e $38,38 \pm 4,05$ células por campo com $p < 0,001$ para os clones da construção NDR6-B (Figura 21). O

aumento na capacidade de migração dos clones silenciados foi observado em 6 experimentos independentes, sugerindo o envolvimento do gene *NDRG4* na capacidade de migração celular. Este resultado vai de encontro aos dados de análise de metilação dos pacientes com tumores primários, uma vez que os pacientes que apresentaram metilação no gene *NDRG4*, apresentaram uma probabilidade maior de desenvolver metástases à distância.

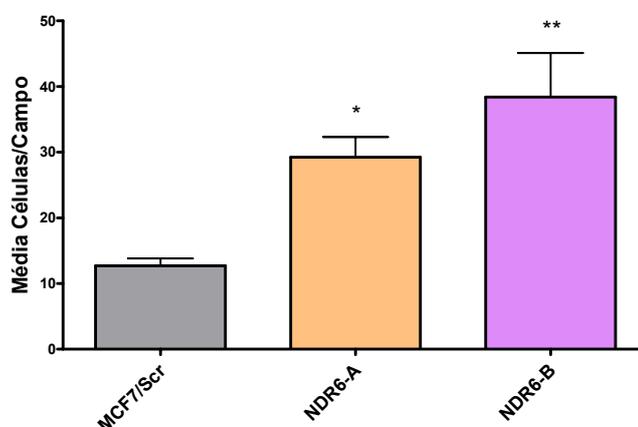


Figura 21 - Efeito do silenciamento do gene *NDRG4* na migração celular (Quimiotática). Após o careciamento de soro fetal bovino por 24 horas, 10^5 células em suspensão (RPMI 0% SFB) foram semeadas na parte superior da câmara de transwell e incubadas por 24 horas para permitir a migração para a superfície inferior da câmara, onde foi colocado meio RPMI com 10% de SFB como fator quimioatraente. O aumento na capacidade de migração observado teve significância estatística $< 0,05$ para os clones da construção NDR6-A (*); e $< 0,001$ para os clones da construção NDR6-B (**). A análise estatística foi feita pelo ANOVA seguido de *Tukey's Multiple Comparison Test*. No gráfico, as barras representam a média do erro padrão (Mean & SEM) (*GraphPad Prism®* versão 4.03).

- **Migração celular haptotática**

Foi avaliado também a capacidade de migração haptotática em câmara de *transwell* usando colágeno tipo I como fator haptotraente. Esse ensaio foi realizado de forma semelhante ao ensaio de migração quimiotática, com exceção do soro fetal bovino na câmara inferior do *transwell* e do tempo de migração, nesse caso 12 horas. Embora o número de células que migraram para a superfície inferior da câmara tenha sido maior, não foram observadas diferenças entre a capacidade de migração dos clones silenciados e o grupo controle (Figura 22). Neste ensaio, foi observado a migração de cerca de $300 \pm 2,66$ células por campo no grupo controle (MCF7/Scr7). Nos clones com o gene *NDRG4* silenciado, a média de células que migraram foi de $274 \pm 9,41$ para os clones da construção NDR6-A e de $300 \pm 6,59$ para os clones da construção NDR6-B (Figura 23). Este resultado foi observado em três ensaios independentes, sugerindo que especificamente o colágeno tipo I não afeta a capacidade de migração dos clones silenciados.

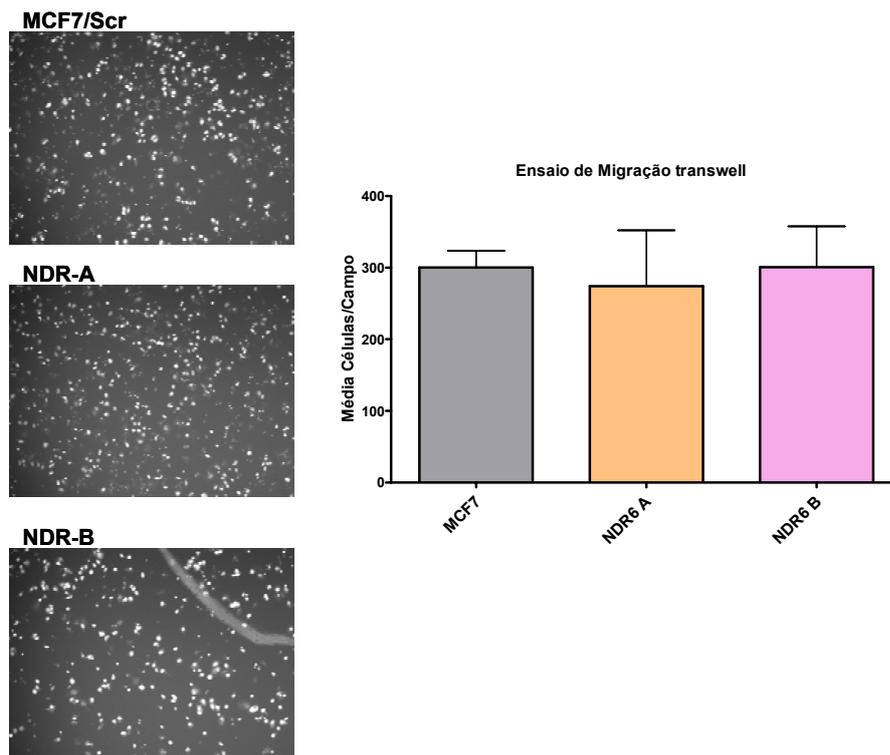


Figura 22 - Efeito do silenciamento do gene *NDRG4* na migração celular (haptotática). 10^5 células em suspensão (RPMI 0% SFB) foram semeadas na parte superior da câmara de transwell e incubadas por 12 horas para permitir a migração para a superfície inferior da câmara, onde foi feito o “coating” com colágeno tipo I ($5\mu\text{g/ml}$). Neste caso, não foram observadas diferenças na capacidade de migração dos clones contendo o gene *NDRG4* silenciado, quando comparado com os controles MCF7/Scr7. A análise estatística foi feita pelo ANOVA seguido de *Tukey's Multiple Comparison Test*. No gráfico, as barras representam a média do erro padrão (Mean & SEM) (*GraphPad Prism*® versão 4.03).

4.8.4 Efeito do Silenciamento do Gene *NDRG4* na Adesão Celular

A adesão celular depende de uma regulação dinâmica de várias estruturas que promovem a plasticidade e reorganização dos tecidos durante os processos de desenvolvimento normal. Esta capacidade de regulação dinâmica pode ser perdida durante a evolução de vários tipos de tumores, promovendo um aumento na capacidade de disseminação das células tumorais. A capacidade de adesão celular é mediada pela ocorrência de interações específicas entre receptores da superfície celular e glicoproteínas extracelulares envolvendo ainda, caderinas, proteínas componentes da matriz extracelular e integrinas (AKIYAMA 1996; FOTY e STEINBERG 2004).

Assim, foi avaliado o efeito do silenciamento do gene *NDRG4* na adesão celular através de ensaios de adesão usando como substrato o colágeno do tipo I, que é um dos componentes da matriz extracelular; bem como, o soro fetal bovino, que possui várias proteínas que promovem a adesão celular, tais como: fibronectina, vitronectina, colágeno dentre outras ainda não caracterizadas (FRESHNEY 2000). Neste ensaio além do substrato, também foram usados a Albumina bovina (*BSA-Albumin from bovine serum* sigma A3311) como controle negativo, e a poli-lisina (*Poly-L-Lysine* Sigma P4832) e meio suplementado com soro fetal bovino, como controles positivos. A adesão das células MCF7 sobre o colágeno tipo I foi abundante, bem como nos controles positivos (Poli-lisina e Soro fetal bovino). Enquanto poucas células aderiram ao substrato recoberto apenas com o agente bloqueador do plástico (BSA). Porém, não foram observadas

diferenças significativas entre o grupo controle (Scr/MCF7) e os clones silenciados (NDR6A/NDR6B), sendo os valores de absorvância em leitor de ELISA (595nm) semelhantes entre eles, média de 1 a 1,3 (Figura 23). Este resultado foi observado em 3 experimentos independentes.

Da mesma forma foram realizados ensaios usando soro fetal bovino como substrato de adesão (*coating* feito com meio RPMI com 10% de soro fetal bovino). Não foram observadas diferenças entre o grupo controle (MCF7/Scr) e os clones silenciados (NDR6A e NDR6B). Com exceção do controle negativo BSA (0,2), os valores de absorvância em leitor de ELISA (595nm) variaram de 0,9 a 1,1 para todas as amostras (dado não mostrado). Assim, os resultados dos ensaios usando colágeno tipo I e o soro fetal bovino como substrato de adesão, sugerem a inexistência de uma relação direta entre o silenciamento do gene *NDRG4* e os mecanismos de adesão celular.

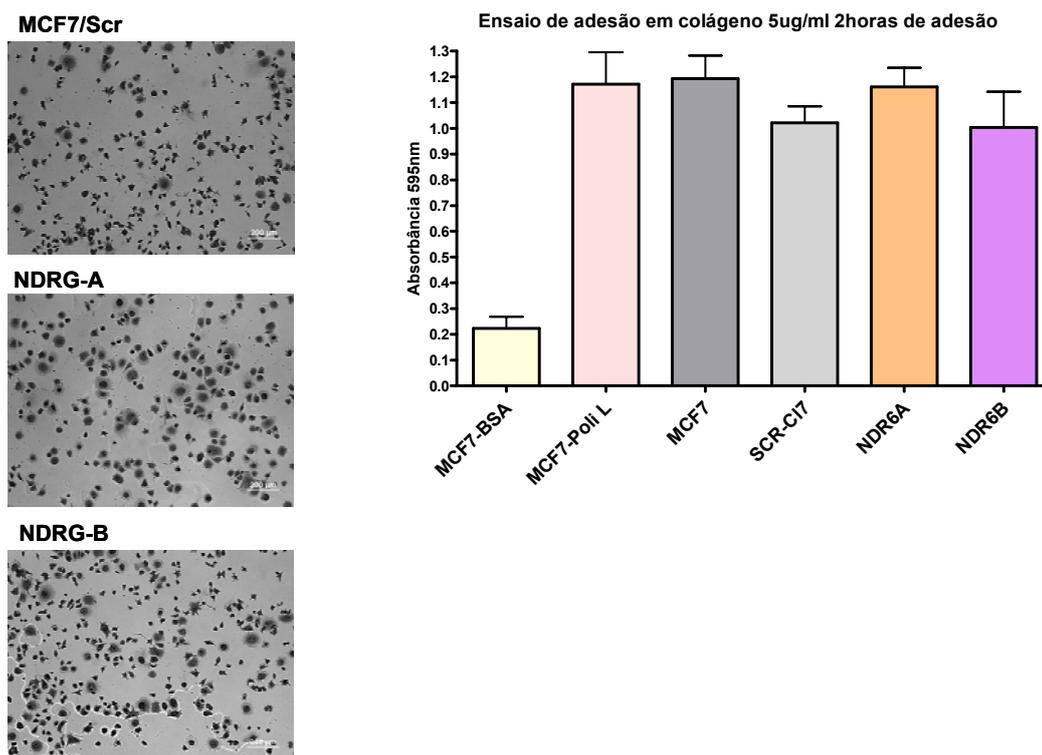


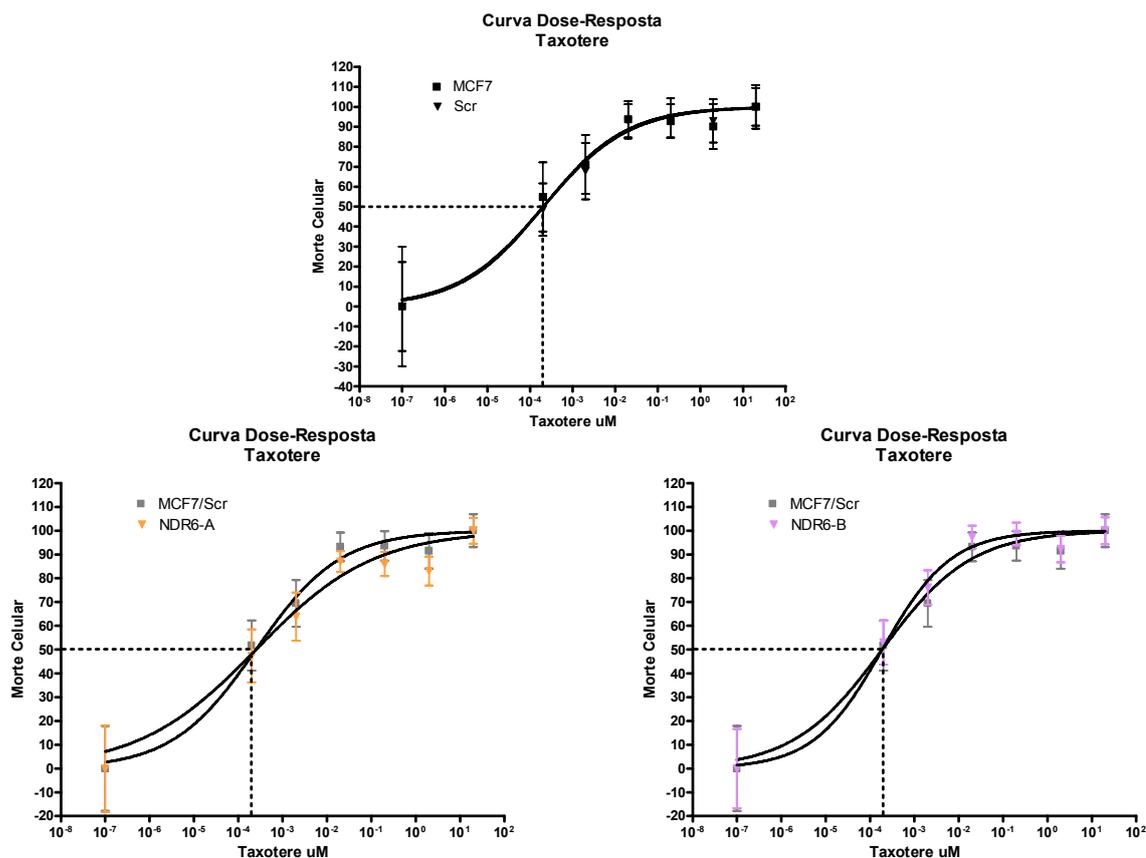
Figura 23 - Efeito do silenciamento do gene *NDRG4* no processo de adesão. O ensaio de adesão foi feito em colágeno do tipo I (5µg/mL). Para tanto, 10×10^4 células/poço ressuspendidas em meio sem soro foram plaqueadas e incubadas (placa de 6 poços). Após 2 horas de incubação, as células foram lavadas (remoção das células não aderidas), coradas e em seguida fotografadas (aumento 100X). Na figura, podemos visualizar campos representativos do controle Scr7, dos clones silenciados NDR27A; NDR16B. Os valores de absorbância em leitor de ELISA (595nm) foram usados no gráfico, a análise estatística foi feita pelo ANOVA seguido de *Tukey's Multiple Comparison Test* (*GraphPad Prism*® versão 4.03). No gráfico, as barras representam a média do erro padrão (Mean & SEM).

4.8.5 Efeito do Silenciamento do Gene *NDRG4* na Quimiosensibilidade aos Taxanos

Recentemente, CHANG et al. (2011) publicaram um estudo no qual foi observado o efeito sinérgico citotóxico da combinação de duas drogas, um inibidor de histona deacetilase SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*) e quimioterápicos do grupo dos taxanos (Paclitaxel e Docetaxel) em linhagens tumorais de mama resistentes aos taxanos. De acordo com o racional desse trabalho, o tratamento com inibidor de histona deacetilase (SAHA-*suberoylanilide hydroxamic acid*) induziria a expressão de genes associados à sensibilidade das células aos taxanos ocasionando o efeito sinérgico citotóxico do tratamento combinado. Assim, usando a técnica de *microarray* de oligonucleotídeos, foram identificados 28 genes cuja expressão foi correlacionada com o efeito combinado dos taxanos e SAHA. Doze destes genes foram induzidos após o tratamento com SAHA nas linhagens resistentes, dentre eles o *NDRG4*, indicando um possível envolvimento entre o seu silenciamento com o desenvolvimento de resistência aos quimioterápicos do grupo dos taxanos (CHANG et al. 2011).

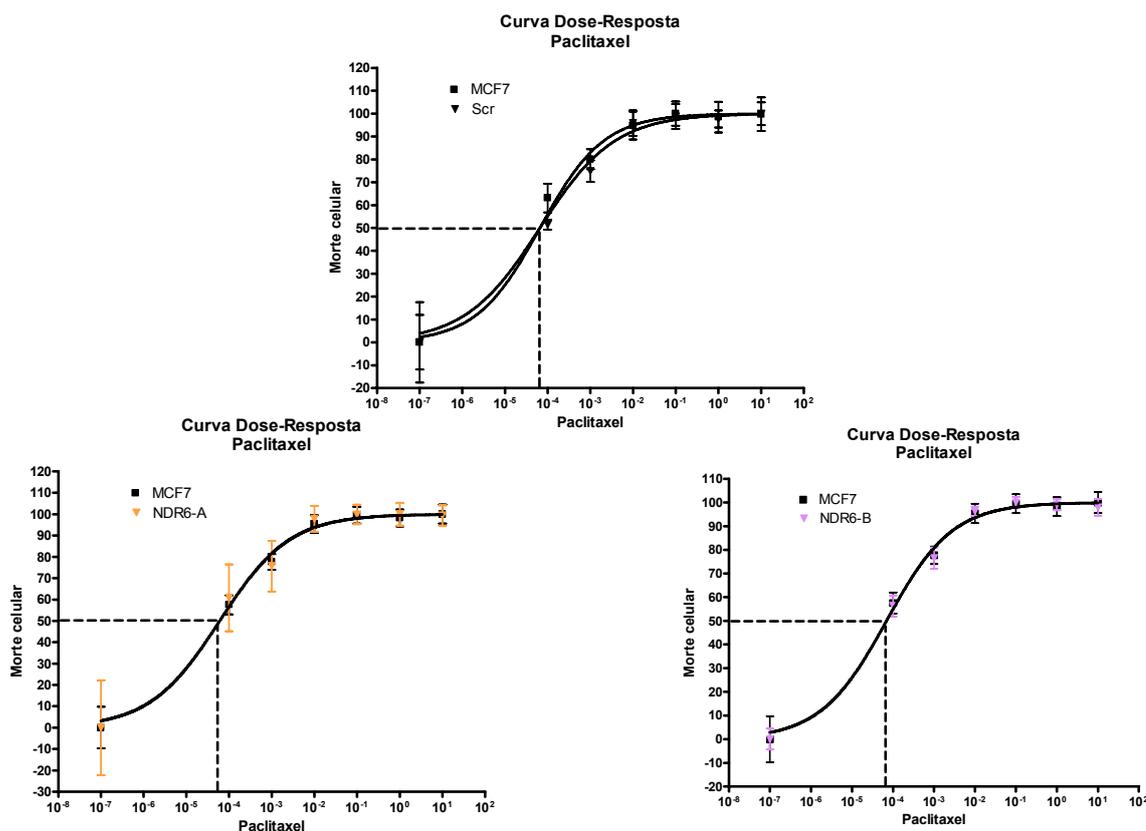
De posse dessa informação e dos clones silenciados para o gene *NDRG4* provenientes da linhagem MCF7, decidimos realizar os ensaios de dose resposta aos quimioterápicos Paclitaxel e Docetaxel, usando o método de MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*, a *yellow tetrazole*) para avaliar a viabilidade celular após o tratamento. Este ensaio é baseado na atividade das enzimas que reduzem o MTT (amarelo) em sais de formazan, de coloração roxa, em células vivas. A intensidade dessa coloração roxa é avaliada em espectrofotômetro.

Assim, foram realizados ensaios de quimiorresistência usando diluições seriadas e incubando os diferentes grupos celulares por um período de 48 horas na presença de Docetaxel partindo de 20 μ M diluindo em escalas de 10x até 2X10⁻⁵ μ M; e de Paclitaxel partindo de 10 μ M diluindo em escalas 10x até 10⁻⁵ μ M para o cálculo do valor de IC₅₀. O IC₅₀ (índice de citotoxicidade) se refere a 50% de toxicidade celular causada pelas drogas usadas e foi determinado através do programa *GraphPad Prism*® versão 4.03. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços em quadruplicatas. A média do índice de citotoxicidade (IC₅₀) observado para as duas drogas foi de 0,23nM para o Docetaxel (Figura 24), e de 0,068nM para o Paclitaxel (Figura 25). Não houve diferenças significativas entre os grupos celulares, controle e *NDRG4* silenciado, para ambas as drogas. Os dados obtidos de três ensaios independentes não mostraram evidências de relação direta entre o silenciamento do gene *NDRG4* e o desenvolvimento de resistência aos taxanos.



Taxotere 48horas 20µM diluição 1:10				
	IC ₅₀	Range IC ₅₀	p value	Hipótese nula
MCF7	0,0001580	1.163e-005 - 0.002148		
Scr	0,0002667	4.080e-005 - 0.001744	0,7304	Não rejeitada
Cont/NDR6-A	0,0003253	6.283e-005 - 0.001684	0,6724	Não rejeitada
Cont/NDR6-B	0,0001746	5.157e-005 - 0.0005909	0,8652	Não rejeitada

Figura 24 - Efeito do silenciamento do gene *NDRG4* no processo de quimiorresistência ao Taxotere (Docetaxel). 3×10^3 células foram semeadas em quadruplicatas em placas de 96 poços e foram incubadas por 48 horas na presença da droga. A diluição da droga (10X) partiu de $20 \mu\text{M}$ até $0,0002 \mu\text{M}$. Como controle positivo foi usado a menor diluição ($20 \mu\text{M}$) e como controle negativo foi usado meio sem droga. Os valores de absorbância em leitor de ELISA (595nm) foram usados no gráfico, a análise estatística foi feita por regressão não linear. Para determinar a existência de diferenças entre os grupos foi usado o teste de ANOVA seguido de Newman-Keuls test ($p < 0,05$) (*GraphPad Prism®* versão 4.03). No gráfico, as barras representam a média do erro padrão (Mean & SEM).



Paclitaxel 48horas 10 μ M diluição 1:10				
	IC ₅₀	Range IC ₅₀	p value	Hipótese nula
MCF7	0,00004454	1.330e-005 - 0.0001491		
Scr	0,0001006	3.692e-005 - 0.0002739	0,2625	Não rejeitada
Cont/NDR6-A	0,00005577	8.251e-006 - 0.0003770	0,8599	Não rejeitada
Cont/NDR6-B	0,00007305	4.299e-005 - 0.0001241	0,8170	Não rejeitada

Figura 25 - Efeito do silenciamento do gene *NDRG4* no processo de quimiorresistência ao Paclitaxel. 3×10^3 células foram semeadas em quadruplicatas em placas de 96 poços e foram incubadas por 48 horas na presença da droga. A diluição da droga (10X) partiu de $10 \mu\text{M}$ até $0,0001 \mu\text{M}$. Como controle positivo foi usado a menor diluição ($10 \mu\text{M}$) e como controle negativo foi usado meio sem droga. Os valores de absorbância em leitor de ELISA (595nm) foram usados no gráfico, a análise estatística foi feita por regressão não linear. Para determinar a existência de diferenças entre os grupos foi usado o teste de ANOVA seguido de Newman-Keuls test ($p < 0,05$) (*GraphPad Prism*® versão 4.03). No gráfico, as barras representam a média do erro padrão (Mean & SEM).

5 DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma doença heterogênea e existe uma grande necessidade de identificação de marcadores que possam auxiliar no diagnóstico precoce, no prognóstico e na resposta ao tratamento. A hipermetilação aberrante em vários genes tem sido descrita em câncer de mama, bem como o *status* de metilação de genes específicos tem sido associada ao prognóstico da doença (LO e SUKUMAR 2008). Assim, a identificação de regiões diferencialmente metiladas no genoma tumoral é um passo importante para se entender o papel da metilação na tumorigênese, bem como pode contribuir para o desenvolvimento de novos marcadores tumorais.

Uma das vantagens do uso da metilação do DNA como marcador tumoral reside na estabilidade e na fácil manipulação da molécula de DNA, viabilizando a implantação de testes de detecção na rotina clínica. Além disso, a seqüência hipermetilada forma um sinal positivo contra um fundo não metilado, tornando esse tipo de alteração facilmente detectável (VERMA e SRIVASTAVA 2002; ESTELLER 2003; PATEL et al. 2003; SUIJKERBUIJK et al. 2010).

Em uma análise conduzida em nosso laboratório, combinando o agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina (5-AzaDc) e microarray de cDNA, verificamos que os níveis de expressão do gene *NDRG4* estão significativamente diminuídos em linhagens tumorais de mama (MDA-MB-

231 e MDA-MB-435) e essa diminuição de expressão está diretamente relacionada com a presença de metilação na região promotora do gene.

No presente estudo, foi avaliado o uso da hipermetilação do gene *NDRG4* como um potencial marcador de prognóstico em câncer de mama. A frequência de metilação da região promotora desse gene foi testada através de *Nested-MSP* em uma casuística contendo 61 carcinomas ductais invasivos de mama. Os resultados obtidos foram correlacionados com os dados clínico-patológicos dos pacientes (Hospital A.C. Camargo). A presença de metilação no gene *NDRG4* foi associada à presença de linfonodos comprometidos (37,5% e $p=0,025$), níveis elevados da proteína p53 ($p=0,014$) e maior tamanho do tumor ($p=0,036$). Na análise de sobrevida livre de metástase a distância, o índice de recidiva das pacientes que apresentaram metilação no gene *NDRG4* no período de 10 anos de seguimento, foi de 80%. Por outro lado, apenas 23,9% das pacientes que não apresentaram metilação no gene *NDRG4* recidivaram nesse mesmo período ($p=0,001$). Para verificar se a presença de metilação na região promotora do gene *NDRG4* constituía um fator prognóstico independente das demais variáveis clínico-patológicas, foi feita a análise multivariada. Esta análise revelou um risco de desenvolvimento de metástases aumentado em 5,5X (HR=5.5 IC95%) nas pacientes com tumores que apresentaram metilação na região promotora do gene *NDRG4*. Na análise de sobrevida global, embora sem significância estatística, foi observado um maior percentual de mortes nas pacientes que apresentam o *NDRG4* metilado.

A metilação aberrante resultando em diminuição de expressão (mRNA e proteína) em vários tipos de tumores, também foi observada em outros membros da família NDRG. Neste sentido, a diminuição da expressão (mRNA e proteína) do gene *NDRG1* foi observada em tumores de cólon, próstata, mama, esôfago e glioma (MELOTTE et al. 2010). A diminuição de expressão de outro membro da família, o gene *NDRG2* (mRNA e proteína), foi observada em várias linhagens tumorais e também em tumores primários de cólon, mama, glioblastomas, meningiomas e fígado. Existem poucos dados envolvendo metilação na região promotora dos genes *NDRG3* e *NDRG4* em câncer (MELOTTE et al. 2010). No entanto, a metilação na região promotora do gene *NDRG4* foi descrita primeiramente em tumores de cólon por MELOTTE et al. (2009), que observaram que cerca de 80% das amostras avaliadas estavam metiladas. Além disso, a presença de metilação nesse gene foi avaliada em fezes de 75 pacientes com tumor de cólon e a frequência encontrada foi superior a 50%; contra 7% em indivíduos normais, indicando a possibilidade de desenvolvimento de um exame menos invasivo para detecção de tumores coloretais, com base na hipermetilação do gene *NDRG4*.

Além disso, as análises de sobrevida global revelaram que cerca de 71% das pacientes estavam vivas ao final de 10 anos de seguimento (Figura 12). E embora sem correlação estatisticamente significativa, a presença de metilação na região promotora do gene *NDRG4* se mostrou associada a uma menor taxa de sobrevida global em 10 anos, onde 40% das pacientes que apresentaram metilação na região promotora do gene *NDRG4* morreram

em decorrência da doença, ao passo que apenas 26,5% das pacientes que não apresentaram metilação no gene *NDRG4* morreram em decorrência da doença ($p=0,184$) (Figura 13). Provavelmente não houve significância estatística devido ao tamanho da casuística, apenas 61 pacientes.

Os pacientes com câncer de mama sem acometimento linfonodal apresentam bom prognóstico porém, cerca de 25% a 30% deles desenvolvem recidivas locais ou metástases à distância. Estudos têm sugerido que este resultado desfavorável pode ser devido a falhas na detecção de metástases nos linfonodos axilares (STYBLO e WOOD 1998; AYSEGUL et al. 2009). Segundo os resultados obtidos neste trabalho, a metilação na região promotora do gene *NDRG4* está associada ao comprometimento linfonodal e ao desenvolvimento de metástases, podendo ser utilizada como marcador de prognóstico para o câncer de mama.

Um passo importante para tornar isso realidade é o estudo do padrão de expressão desse gene em um número maior de amostras de tumores de mama. Neste sentido, observamos nesse estudo a existência de correlação entre a presença de metilação e a diminuição do nível de expressão da proteína *NDRG4* em amostras tumorais de tecido mamário testadas por imunohistoquímica. Este dado é interessante, uma vez que abre a possibilidade de avaliar o nível de expressão da proteína *NDRG4* em um número maior de tumores através da metodologia de *tissue microarray* (TMA). A técnica de TMA permite a realização de experimentos nas mesmas condições técnicas com economia de tempo e de recursos revelando o perfil de expressão protéica em um grande número de amostras de tecidos. Desta

forma, o TMA é uma ferramenta interessante para a validação de dados provenientes de expressão aberrante em uma coleção de tumores de mama em pacientes com pelo menos 5 anos de seguimento (BERTUCCI et al. 2006).

A função exata dos membros da família NDRG ainda não é muito clara, algumas evidências sugerem que mutações nestes genes estão associadas com doenças neurológicas. Em carcinomas de cólon, nenhuma mutação envolvendo a região codificadora do gene *NDRG4* foi encontrada, porém 31% dos tumores avaliados apresentaram perda de heterozigose (LOH) no cromossomo 16q, *locus* onde o gene *NDRG4* está localizado (MELOTTE et al. 2009, 2010). Neste contexto, a perda de heterozigose no braço longo do cromossomo 16 é um dos eventos mais freqüentes na genética no câncer de mama, sugerindo a presença de um ou mais genes supressores de tumor nessa região (RAKHA et al. 2006). Além disso, alguns trabalhos vêm relatando o envolvimento da expressão aberrante dos genes da família *NDRG* com eventos fundamentais no processo de tumorigênese, como a proliferação celular, migração, diferenciação e invasão (Mellote et al, 2010). A função dos membros da família NDRG no câncer tem sido investigada por super-expressão e/ou silenciamento *in vitro* e/ou *in vivo*.

Neste contexto, a super-expressão do gene *NDRG1* em linhagem celular de carcinoma de próstata humano (ALVA) e de ratos (AT6.1) não afetou a taxa de crescimento, morfologia ou motilidade das células, mas reduziu a capacidade de invasão *in vitro*. Experimentos baseados na super-expressão de *NDRG1 in vivo*, inibiu quase que completamente a formação

de metástases em pulmão sem afetar o crescimento do tumor primário em animais (BANDYOPADHYAY et al. 2003). Resultados semelhantes, relacionando super-expressão com diminuição do potencial agressivo, também foram observados em tumores de mama, pâncreas e coloretal. Em contraste, o silenciamento de *NDRG1* por RNA de interferência em linhagens de hepatocarcinoma humano (Hep3B e HepG2), reduziu significativamente a proliferação celular, invasão, e apoptose (Yan chen 2008). A inativação de *NDRG2* pode aumentar resistência à Cisplatina em células SNU-620 (câncer gástrico). Já a super-expressão de *NDRG2* em linhagem de glioblastoma humano suprime o crescimento, sem afetar a apoptose *in vitro*. A super-expressão de *NDRG3* aumenta a taxa de crescimento e migração em células de câncer de próstata *in vitro*. Já *in vivo*, a super-expressão de *NDRG3* promove o crescimento do tumor em camundongos (MELOTTE et al. 2010).

O silenciamento do gene *NDRG4* em embriões de *zebrafish* resultou em uma redução acentuada na proliferação dos miócitos gerando hipoplasia, acompanhada de disfunção cardíaca devido a circulação ineficiente e fraca contração, além de comprometer a morfologia cardíaca (QU et al. 2008).

No trabalho aqui desenvolvido, observamos uma forte associação entre a presença de metilação na região promotora do gene *NDRG4*, o acometimento linfonodal e o desenvolvimento de metástases em pacientes com carcinoma ductal de mama. Para mimetizar o silenciamento causado pela metilação desse gene nos tumores, o gene *NDRG4* foi silenciado por shRNA na linhagem tumoral de mama MCF7. O silenciamento do gene

NDRG4 nos clones foi avaliado através de ensaios para quantificação de transcritos (qRT-PCR) e proteínas (*Western-Blot*), nos quais constatamos níveis de silenciamento entre 60 e 70%. As conseqüências funcionais do silenciamento nesses clones foram avaliadas através de ensaios *in vitro* que evidenciassem alguns aspectos básicos da formação e progressão tumoral, tais como: cinética de crescimento, capacidade de formação de colônias, migração e capacidade de adesão, bem como quimiorresistência.

Nestes ensaios, apesar dos dois controles positivos para a expressão de *NDRG4* (MCF7 e Scr7) e dos dois clones silenciados para cada construção (construção NDR6A ou NDR6B) apresentarem pequenas variações nos níveis de expressão dos produtos do gene *NDRG4* entre si (RNA e proteína) (Figura 16 e 17, respectivamente), as respostas observadas em nossos estudos funcionais foram bem homogêneas dentro de cada grupo. Assim, descartamos, primeiramente, a possibilidade de que os resultados observados possam refletir características exclusivas de um clone (efeito clonal). Além disso, essa homogeneidade nos permitiu agrupar os dados obtidos para cada um dos grupos experimentais, facilitando a interpretação e conferindo um maior poder estatístico aos resultados finais.

Em um primeiro ensaio avaliamos o envolvimento do gene *NDRG4* no controle da proliferação celular através do ensaio de curva de crescimento por contagem na câmara de Neubauer. Nesse ensaio foi observado uma menor taxa de proliferação nos clones silenciados em comparação com os controles, sendo que os dois clones da construção NDR6A apresentaram redução de proliferação com significância estatística (Figura 19, $p < 0,05$). Em

seguida, foram feitos ensaios clonogênicos bidimensionais, nos quais observamos uma capacidade de formação de colônias 2x menor nos clones silenciados para *NDRG4* quando comparados ao grupo controle (Figura 20, $p < 0,001$). Os dados obtidos em nossos ensaios clonogênicos complementam os resultados observados nas curvas de crescimento, sugerindo que a expressão de *NDRG4* está relacionada com um ganho da capacidade de sobreviver e/ou proliferar em condições ideais de cultivo *in vitro*.

Indo de encontro aos nossos dados, a diminuição da taxa de proliferação causada pelo silenciamento do gene *NDRG4* também foi observada em células de glioblastoma (SCHILLING et al. 2009). Neste caso, mostrou-se que o gene *NDRG4* é necessário para a progressão do ciclo celular e sobrevivência em glioblastomas, uma vez que o silenciamento provoca a parada do ciclo celular em G1 seguido por apoptose. Em contraste, a super-expressão de *NDRG4* em linhagens celulares de câncer colorretal revelou uma redução na taxa de proliferação celular (Mellote et al. 2009). Estes dados sugerem que o efeito de *NDRG4* no controle proliferativo pode ser linhagem dependente.

Este paradoxo também pode estar refletido *in vivo*. O outro membro da família NDR, o *NDRG1* aparece com expressão diminuída em tumores de mama, colorretal e gliomas, ao passo que a super-expressão foi observada em carcinoma hepatocelular, câncer cervical, e câncer renal. Estes dados, sugerem que os genes dessa família têm funções específicas em diferentes tecidos. Além disso, fatores como por exemplo os hormonais, podem exercer

algum impacto sobre a expressão destes genes modulando a sua função em diferentes tumores (QU et al. 2002; MELOTTE et al. 2010).

Em seguida, foram realizados ensaios de migração celular em câmara de *transwell* usando o colágeno tipo I como fator haptotático, nos quais não foram observadas diferenças de migração entre os clones silenciados e os controles (Figura 22, $p > 0.05$). Usando este mesmo sistema, investigamos o potencial de migração usando o soro fetal bovino (SFB) como fator quimiotático. O SFB é rico em vários fatores de crescimento e componentes da MEC (Matriz extracelular) que podem funcionar como fatores quimioatraentes, tais como: EGF, PDGF, FGF, vitronectina, fibronectina, colágenos, dentre outros. Os ensaios de migração quimiotática com SFB revelaram um potencial 2-3x maior de migração dos clones silenciados (NDRGA e NDRGB) em relação às células que expressam *NDRG4* (Figura 21, $p < 0.05$ e 0.001 respectivamente para cada construção). Estes resultados indicam que o gene *NDRG4* pode atuar como modulador da migração celular em resposta à fatores solúveis ainda não identificados presentes no SFB.

NISHIMOTO et al. (2003), estudando a função do gene *smap8* (*smooth muscle-associated protein 8*), que possui 99% de identidade com o mRNA e 100% com a proteína NDRG4, observaram diminuição de migração, da proliferação e na formação de colônias de células musculares vasculares murinas após a super-expressão de *smap8*. Este gene mostrou-se capaz de modular a sensibilidade da resposta celular à tratamentos com PDGF (*Platelet derived growth factor*), de forma que células que super-

expressam *smap8* apresentaram um aumento da ativação de componentes da via de MAPK (*mitogen-activated protein kinase cascade*), acionados por tratamentos de PDGF, embora curiosamente, isso resultasse em uma diminuição da resposta proliferativa induzida por PDGF. Estes dados mostram uma associação funcional entre o gene murino *smap8* e o PDGF.

DE DONATIS et al. (2010) utilizando células NIH3T3 (fibroblastos de camundongos imortalizados) observaram que o mecanismo de sinalização do PDGF é capaz de induzir dois eventos fenotípicos radicalmente diferentes e mutuamente exclusivos: migração e proliferação. A hipótese levantada por este grupo se baseia na dependência da concentração PDGF no meio ambiente, para que uma célula decida entre proliferar ou migrar. Assim, segundo esse grupo a indução de proliferação celular é ativada somente com altas concentrações de PDGF (>5 ng/ml), já a resposta para migração de células ocorre a partir de 1 ng/ml e é insignificante em concentrações mais elevadas de PDGF.

Vale enfatizar nesse momento a coerência entre os dados clínicos e os ensaios de migração *in vitro*. Baseado nestes dados e considerando o alto percentual de identidade entre *smap8* e *NDRG4*, assim como, o efeito dual de *NDRG4* sobre o controle de proliferação e migração de células MCF7, ambos na presença de SFB no meio de cultivo, especulamos se o gene *NDRG4* atua como um modulador de sensibilidade a algum fator solúvel presente no SFB e que, desta forma, atue regulando a resposta celular a este (por exemplo. PDGF). Embora especulativo, esse raciocínio levanta uma hipótese que abre perspectivas para a realização de ensaios

mais elaborados que permitam isolar os fatores responsáveis pelo aumento de mobilidade das células MCF7 modulado pelo silenciamento do gene *NDRG4*.

Para avaliar se o ganho de migração celular induzido pelo silenciamento de *NDRG4* pudesse ser reflexo de mudanças no padrão de ligação ou de adesão celular a componentes do SFB, os clones selecionados foram submetidos a ensaios de adesão utilizando SFB (rico em diversos componentes da MEC) e o colágeno tipo-1. Porém, tanto os clones silenciados (NDR6A e NDR6B), como os controles (Scr7 e MCF7) aderiram de forma semelhante aos dois tipos de substratos utilizados. Assim, esse resultado indica que o silenciamento do gene *NDRG4*, apesar de modular o comportamento migratório celular, não está atuando diretamente na capacidade destas células ligarem-se a componentes da MEC, como o colágeno e outros presentes no SFB.

O padrão de metilação da região promotora de genes envolvidos com a progressão tumoral, além de funcionar como biomarcador para detecção, classificação de subtipos, predição de risco e acompanhamento de prognóstico, também podem funcionar como indicadores de resposta ao tratamento (LO e SUKUMAR 2008). Neste sentido, CHANG et al. (2011) publicaram um estudo no qual linhagens tumorais de mama resistentes a taxanos foram tratadas com um inibidor de histona deacetilase SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*) em combinação com quimioterápicos do grupo dos taxanos (Paclitaxel e Docetaxel) a fim de se observar o efeito citotóxico sinérgico das duas drogas e identificar genes induzidos pelo

tratamento com SAHA que conferissem sensibilidade aos taxanos. Este estudo deixa claro a necessidade de ensaios que envolvam o uso de drogas que afetam a acetilação de histonas ou a hipermetilação do DNA, restaurando a expressão de genes epigeneticamente silenciados e abrindo novas abordagens terapêuticas, aumentando a sensibilidade das células resistentes a esquemas terapêuticos regulares. Assim, usando a técnica de *microarray* de oligonucleotídeos, foram identificados 12 genes silenciados (*down-regulados*) cuja expressão foi correlacionada com o efeito sinérgico, combinando as drogas SAHA e os taxanos em linhagens celulares taxanos-resistentes. Dentre estes genes, o *NDRG4* estava presente, indicando a existência de alguma correlação com resistência a drogas. Entretanto, a diminuição da expressão do gene *NDRG4* não foi validada pelos autores através de qRT-PCR em linhagem resistente aos taxanos. Contudo, decidimos realizar ensaios de dose resposta aos quimioterápicos Paclitaxel e Docetaxel nos clones *NDRG4* silenciados. Porém, os resultados não mostraram correlação direta entre o silenciamento do gene *NDRG4* e resistência aos quimioterápicos do grupo dos taxanos, uma vez que o valor do IC50 foi semelhante entre os clones silenciados (NDR6A e NDR6B) e o grupo controle (MCF7 e Scr).

De maneira geral, considerando os efeitos de *NDRG4* sobre células MCF7 e a importância do controle da migração celular sobre a regulação das taxas de disseminação de células neoplásicas, nossos resultados de migração vão de encontro aos nossos dados clínicos, nos quais observamos uma correlação entre a presença de metilação na região promotora do gene

NDRG4 e metástase, bem como acometimento linfonodal. Neste sentido, embora nossos dados *in vitro* estejam fisiologicamente bem distantes da realidade clínica, eles nos permitem questionar, pela primeira vez, se o silenciamento epigenético do gene *NDRG4* pode conferir ganho de mobilidade em células tumorais metiladas para o gene *NDRG4*, culminando com o aumento do potencial metastático nestes tumores de mama.

Contudo, é importante salientar que ensaios adicionais são necessários, uma vez que os dados gerados com base nos estudos funcionais silenciando o gene *NDRG4* foram feitos apenas na linhagem MCF7 e *in vitro*, sendo portanto, limitados. Para vencer essas limitações, é necessário realizar ensaios funcionais *in vivo*, os quais permitam observar os efeitos da diminuição dos produtos do gene *NDRG4* de forma inequívoca.

6 CONCLUSÕES

1. A presença de metilação na região promotora do gene *NDRG4* observada nas três linhagens tumorais de mama, também foi observada em tumores primários de mama.
2. Foi confirmada a correlação entre a presença de metilação na região promotora do gene *NDRG4* e a ausência da proteína NDRG4 em amostras tumorais de mama.
3. Os dados obtidos nesse estudo indicaram uma associação estatisticamente significativa entre a presença de metilação na região promotora do gene *NDRG4* e acometimento linfonodal, níveis elevados da proteína *p53*, maior tamanho do tumor.
4. Em análise multivariada de sobrevida livre de metástases, a presença de metilação na região promotora do gene *NDRG4* se mostrou um fator de pior prognóstico independente das demais variáveis clínico-patológicas analisadas. Pacientes que apresentaram metilação na região promotora do gene *NDRG4* apresentaram um risco aumentado (5.5X) de desenvolver metástase em 10 anos.
5. Foi observada uma diminuição significativa na taxa de proliferação de clones celulares da linhagem MCF-7 silenciados para o gene *NDRG4*, bem como menor capacidade de formação de colônias isoladas.

6. Os clones celulares da linhagem MCF-7 silenciados para o gene *NDRG4*, mostraram maior capacidade de migração usando soro fetal bovino como fator quimiotático.
7. Não foram observadas alterações na capacidade de adesão dos clones celulares da linhagem MCF-7 silenciados para o gene *NDRG4*, usando soro fetal bovino e colágeno tipo I como substrato de adesão.
8. Por fim, os clones celulares da linhagem MCF-7 silenciados para o gene *NDRG4* não apresentaram maior resistência aos quimioterápicos do grupo dos taxanos quando comparados a célula parental MCF-7 e às variantes transfectadas com sequência inespecífica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akiyama SK. Integrins in cell adhesion and signaling. **Hum Cell** 1996; 9:181-6.

Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cell Mol Life Sci** 2002; 59:241-57.

Aysegul A, Sahin MG, KH. Identification and biologic significance of micrometastases in axillary lymph nodes in patients with invasive breast cancer. **Arch Pathol Lab Med** 2009; 133:6:869-78.

Bandyopadhyay S, Pai SK, Gross SC, et al. The Drg-1 gene suppresses tumor metastasis in prostate cancer. **Cancer Res** 2003; 63:1731-6.

Bandyopadhyay S, Pai SK, Hirota S, et al. Role of the putative tumor metastasis suppressor gene Drg-1 in breast cancer progression. **Oncogene** 2004; 23:5675-81.

Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. **Adv Cancer Res** 1998; 72:141-96.

Bernstein LR, Liotta LA. Molecular mediators of interactions with extracellular matrix components in metastasis and angiogenesis. **Curr Opin Oncol** 1994; 6:106-13.

Bertucci F, Birnbaum D, Goncalves A. Proteomics of breast cancer: principles and potential clinical applications. **Mol Cell Proteomics** 2006; 5:1772-86.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 1976; 7:248-54.

Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. **Trends Cell Biol** 1999; 9:M57-60.

Calmon MF, Rodrigues RV, Kaneto CM, et al. Epigenetic silencing of CRABP2 and MX1 in head and neck tumors. **Neoplasia** 2009; 11:1329-39

Chang H, Jeung HC, Jung JJ, Kim TS, Rha SY, Chung HC. Identification of genes associated with chemosensitivity to SAHA/taxane combination treatment in taxane-resistant breast cancer cells. **Breast Cancer Res Treat** 2011; 125:55-63.

Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. **Oncogene** 2002; 21:5483-95.

Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. **Nucleic Acids Res** 1994; 22:2990-7.

De Donatis A, Ranaldi F, Cirri P. Reciprocal control of cell proliferation and migration. **Cell Commun Signal** 2010; 8:20.

Deng Y, Yao L, Chau L, et al. N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) inhibits glioblastoma cell proliferation. **Int J Cancer** 2003; 106:342-7

Ding W, Zhang J, Yoon JG, Shi D, Foltz G, Lin B. NDRG4 is Downregulated in Glioblastoma and Inhibits Cell Proliferation. **OMICS** 2012; 16:263-7.

Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? **J Cell Mol Med** 2005; 9:208-21.

Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. **Oncogene** 2002; 21:5400-13.

Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. **Oncogene** 2002; 21:5427-40.

Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. **Lancet Oncol** 2003; 4:351-8.

Etzioni R, Urban N, Ramsey S, et al. The case for early detection. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:243-52.

Fackler MJ, McVeigh M, Mehrotra J, et al. Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer. **Cancer Res** 2004; 64:4442-52.

Foty RA, Steinberg MS. Cadherin-mediated cell-cell adhesion and tissue segregation in relation to malignancy. **Int J Dev Biol** 2004; 48:397-409.

Freshney RL. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 4th ed. New York: Wiley-Liss; 2000. Cell proliferation; p.11-50.

Galante PA, Parmigiani RB, Zhao Q, et al. Distinct patterns of somatic alterations in a lymphoblastoid and a tumor genome derived from the same individual. **Nucleic Acids Res** 2011; 39:6056-68.

Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. **J Mol Biol** 1987; 196:261-82.

Goldenberg D, Harden S, Masayeva BG, et al. Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2004; 130:39-44.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-74.

Herman JG, Graff JR, Myöhänen 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; 93:9821-6.

Iwasa Y, Michor F. Evolutionary dynamics of intratumor heterogeneity. **PLoS One** 2011; 6:e17866.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet** 2002; 3:415-28.

Jones RL, Salter J, A'Hern R, et al. The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2009; 116:53-68.

Juliano RL, Haskill S. Signal transduction from the extracellular matrix. **J Cell Biol** 1993; 120:577-85.

Kim MS, Yamashita K, Baek JH, et al. N-methyl-D-aspartate receptor type 2B is epigenetically inactivated and exhibits tumor-suppressive activity in human esophageal cancer. **Cancer Res** 2006; 66:3409-18.

Kovacevic Z, Richardson DR. The metastasis suppressor, Ndrp-1: a new ally in the fight against cancer. **Carcinogenesis** 2006; 27:2355-66.

Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:253-66.

Li J, Kretzner L. The growth-inhibitory NdrG1 gene is a Myc negative target in human neuroblastomas and other cell types with overexpressed N- or c-myc. **Mol Cell Biochem** 2003; 250:91-105.

Li S, Yang B, Li G, He S, Li Y. Downregulation of N-Myc downstream-regulated gene 4 influences patient survival in gliomas. **Brain Tumor Pathol** 2012 Mar 8.

Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science** 1992; 257:967-71.

Lo PK, Sukumar S. Epigenomics and breast cancer. **Pharmacogenomics** 2008; 9:1879-902.

Lusis EA, Watson MA, Chicoine MR, et al. Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. **Cancer Res** 2005; 65:7121-6.

Marchionni L, Wilson RF, Marinopoulos SS, et al. Impact of gene expression profiling tests on breast cancer outcomes. **Evid Rep Technol Assess** 2007; (160):1-105.

Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. **Science** 1997; 276:75-81.

Martín-Subero JI, Esteller M. Profiling epigenetic alterations in disease. **Adv Exp Med Biol** 2011; 711:162-77.

Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. **Biochim Biophys Acta** 2010; 1805:105-17.

McClelland M, Ivarie R. Asymmetrical distribution of CpG in an 'average' mammalian gene. **Nucleic Acids Res** 1982; 10:7865-77.

Melotte V, Lentjes MH, van den Bosch SM, et al. N-Myc downstream-regulated gene 4 (NDRG4): a candidate tumor suppressor gene and potential biomarker for colorectal cancer. **J Natl Cancer Inst** 2009; 101:916-27.

Melotte V, Qu X, Ongenaert M, et al. The N-myc downstream regulated gene (NDRG) family: diverse functions, multiple applications. **FASEB J** 2010; 24:4153-66.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa/2012 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

Negm RS, Verma M, Srivastava S. The promise of biomarkers in cancer screening and detection. **Trends Mol Med** 2002; 8:288-93.

Nishimoto S, Tawara J, Toyoda H, Kitamura K, Komurasaki T. A novel homocysteine-responsive gene, smap8, modulates mitogenesis in rat vascular smooth muscle cells. **Eur J Biochem** 2003; 270:2521-31.

Ohki T, Hongo S, Nakada N, Maeda A, Takeda M. Inhibition of neurite outgrowth by reduced level of NDRG4 protein in antisense transfected PC12 cells. **Brain Res Dev Brain Res** 2002; 135:55-63.

Patel A, Groopman JD, Umar A. DNA methylation as a cancer-specific biomarker: from molecules to populations. **Ann N Y Acad Sci** 2003; 983:286-97.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res** 2001; 29:e45.

Qu X, Zhai Y, Wei H, et al. Characterization and expression of three novel differentiation-related genes belong to the human NDRG gene family. **Mol Cell Biochem** 2002; 229:35-44.

Qu X, Jia H, Garrity DM, et al. NdrG4 is required for normal myocyte proliferation during early cardiac development in zebrafish. **Dev Biol** 2008; 317:486-96.

Radpour R, Barekati Z, Kohler C, et al. Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer. **PLoS One** 2011; 6:e16080.

Rakha EA, Green AR, Powe DG, Roylance R, Ellis IO. Chromosome 16 tumor-suppressor genes in breast cancer. **Genes Chromosomes Cancer** 2006; 45:527-35.

Razin A, Cedar H. Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1977; 74:2725-8.

Razin A, Shemer R. Epigenetic control of gene expression. **Results Probl Cell Differ** 1999; 25:189-204.

Roy V, Perez EA. Beyond trastuzumab: small molecule tyrosine kinase inhibitors in HER-2-positive breast cancer. **Oncologist** 2009; 14:1061-9.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. **Molecular cloning, a laboratory manual**, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells using proteinase K and phenol; p.6.4-6.11

Schilling SH, Hjelmeland AB, Radloff DR, et al. NDRG4 is required for cell cycle progression and survival in glioblastoma cells. **J Biol Chem** 2009; 284:25160-9.

Schmutte C, Jones PA. Involvement of DNA methylation in human carcinogenesis. **Biol Chem** 1998; 379:377-88.

Shaw E, McCue LA, Lawrence CE, Dordick JS. Identification of a novel class in the alpha/beta hydrolase fold superfamily: the N-myc differentiation-related proteins. **Proteins** 2002; 47:163-8.

Srinivas PR, Kramer BS, Srivastava S. Trends in biomarker research for cancer detection. **Lancet Oncol** 2001; 2:698-704.

Styblo MT, Wood WC. Traditional prognostic factors for breast cancer. In: Bland KI, Copeland EM, editors. **The breast: comprehensive management of benign and malignant diseases**. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1998. p.419-25.

Suijkerbuijk KP, Pan X, van der Wall E, van Diest PJ, Vooijs M. Comparison of different promoter methylation assays in breast cancer. **Anal Cell Pathol** 2010; 33:133-41.

Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002; 99:3740-5.

Thompson EW, Paik S, Br nner N, et al. Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. **J Cell Physiol** 1992; 150:534-44.

Thomssen C, Jänicke F, Harbeck N. Clinical relevance of prognostic factors in axillary node-negative breast cancer. **Onkologie** 2003; 26:438-45.

Toikkanen S, Pylkkänen L, Joensuu H. Invasive lobular carcinoma of the breast has better short- and long-term survival than invasive ductal carcinoma. **Br J Cancer** 1997; 76:1234-40.

Van Poznak C, Seidman AD. Breast cancer. In: Bertino JR, editor. **Encyclopedia of cancer**. San Diego: Academic Press; 2002. p.287-99.

Verbisck NV, Costa ET, Costa FF, et al. ADAM23 Negatively Modulates $\alpha_v\beta_3$ Integrin Activation during Metastasis. **Cancer Res** 2009; 69:5546-52.

Verma M, Srivastava S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. **Lancet Oncol** 2002; 3:755-63.

Viale G, Regan MM, Maiorano E, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. **J Clin Oncol** 2007; 25:3846-52.

Wang W, Li Y, Li Y, et al. NDRG3 is an androgen regulated and prostate enriched gene that promotes in vitro and in vivo prostate cancer cell growth. **Int J Cancer** 2009; 124:521-30.

Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. **Endocr Relat Cancer** 2010; 17:R245-62.

Widschwendter M, Jones PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. **Oncogene** 2002; 21:5462-82.

Yamamoto H, Kokame K, Okuda T, Nakajo Y, Yanamoto H, Miyata T. NDRG4 protein-deficient mice exhibit spatial learning deficits and vulnerabilities to cerebral ischemia. **J Biol Chem** 2011; 286:26158-65.

Yamashita K, Upadhyay S, Osada M, et al. Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Cell** 2002; 2:485-95.

Yamashita K, Kim MS, Park HL, et al. HOP/OB1/NECC1 promoter DNA is frequently hypermethylated and involved in tumorigenic ability in esophageal squamous cell carcinoma. **Mol Cancer Res** 2008; 6:31-41.

Yamauchi Y, Hongo S, Ohashi T, et al. Molecular cloning and characterization of a novel developmentally regulated gene, Bdm1, showing predominant expression in postnatal rat brain. **Brain Res Mol Brain Res** 1999; 68:149-58.

Yao L, Zhang J, Liu X. NDRG2: a Myc-repressed gene involved in cancer and cell stress. **Acta Biochim Biophys Sin** 2008; 40:625-35.

Zhao W, Tang R, Huang Y, et al. Cloning and expression pattern of the human NDRG3 gene. **Biochim Biophys Acta** 2001; 1519:134-8.

Zhou RH, Kokame K, Tsukamoto Y, Yutani C, Kato H, Miyata T. Characterization of the human NDRG gene family: a newly identified member, NDRG4, is specifically expressed in brain and heart. **Genomics** 2001; 73:86-97.