

**CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE  
EXPRESSÃO E METILAÇÃO DOS GENES ADAM  
12 E 33 EM TUMORES DE MAMA E SUA  
CORRELAÇÃO COM DADOS CLÍNICO-  
PATOLÓGICOS**

**DANIELA FILIPPINI IERARDI**

**Tese de Doutorado apresentada à Fundação  
Antônio Prudente para obtenção do grau de Doutor  
em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra. Anamaria Aranha Camargo**

**São Paulo**

**2005**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

**Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa  
Hospital do Câncer A.C. Camargo**

Ierardi, Daniela Filippini

**Caracterização do padrão de expressão e metilação dos genes  
ADAM 12 e 33 em tumores de mama e sua correlação com dados  
clínico-patológicos** / Daniela Filippini Ierardi – São Paulo, 2005.

138p.

Tese (doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Anamaria Aranha Camargo

Descritores: 1. METILAÇÃO DO DNA. 2. CÂNCER DA MAMA/genética.  
3. EXPRESSÃO GÊNICA. 4. FAMÍLIA ADAM.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais Maria Clara e Aldo pelo amor, carinho, apoio,  
dedicação, investimentos e por tudo que sempre fizeram por  
mim em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos Cesar e Rafael pela amizade e paciência, apoio  
e amizade sempre.

## **DEDICATÓRIA (in Memoriam)**

Á minha querida Avó Maria pela determinação, exemplo de vida  
e exemplo de vontade de viver mesmo no decorrer de  
tratamentos exaustivos contra o câncer de mama. (in memoriam).

## **DEDICATÓRIA**

A minha orientadora Anamaria pela paciência e pelos ensinamentos durante este longo trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Anamaria A. Camargo obrigada pela oportunidade de aprender a pesquisar em um centro de Pesquisa único no Brasil. Obrigada pela longa orientação e por acreditar na minha capacidade como pesquisadora. Parabéns pelas suas conquistas.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro e pela Bolsa de Doutorado direto concedida (processos# 02/03341-1 e #04/07272-7).

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer pelo apoio financeiro e suporte técnico durante todo o desenvolver do projeto.

Ao Departamento de Mastologia do Hospital do Câncer A. C. Camargo pelo fornecimento das amostras tumorais utilizadas em nossos estudos.

Ao Dr. Michael O'Hare pelas amostras de linhagens tumorais de mama cedidas.

Aos amigos: Ana Paula, Ricardo, Valéria, Newton, Murilo, Mônica e Fabrício pela ótima convivência, amizade e apoio que construímos durante todo esse período em São Paulo não só dentro do laboratório. E pelas discussões científicas que me auxiliaram muito no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada!

Á Dra. Gisele, pela ajuda com os MSPs e amostras de tumores de mama, e pelas palavras de apoio nos momentos difíceis. À Maria Cristina e Anna Christina pela ajuda no sequenciamento e Lilian pelas culturas.

Aos colegas Ana Paula, Anna Christina, Daniel, Elisa, Érico, Felícia, Fabiana, Fernando, Giseli, Lilian, Mariana, Maria Cristina, Murilo, Newton, Raphael, Ricardo, e Valéria do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica do Instituto Ludwig pela convivência todo esse tempo.

Aos amigos do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer pelo apoio e convivência durante todos esse tempo.

Às queridas amigas de infância Cristina (Fisioterapeuta), Liliane (Dentista), Tatiana (Veterinária), Laura (Engenheira), Júlia (Economista), Tânia (Atleta da Equipe Nacional de taichi-chuan), Junia (Geógrafa), Luciana C. (Administradora) e à amiga Luciana por tudo que vivemos até hoje sempre juntas.

Às amigas Ana Helena (LABRI), Juliana (INCOR), Fernanda (UniFESP) e Kathleen pelos momentos de descontração durante minha estadia na cidade de São Paulo e pelo apoio nos momentos difíceis.

Às amigas Flávia R. Carneiro, Flávia Nery, Sandra e Thais do LNLS, pela amizade cultivada e mantida por todos esses anos.

Às amigas Isabela (Departamento Anatomia Patológica) e Nadia (LGEA) pela amizade e carinho cultivados e estabelecidos neste período.

Ao Dr. Humberto Torloni e ao Dr. Fernando A. Soares pela disponibilização das amostras do Banco de Tumores do Hospital do Câncer/ Instituto Ludwig para a realização deste estudo.

Ao Dr. Fernando Soares e Dra. Isabela Werneck do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo pelas análises patológicas das amostras e auxílio no levantamento dos dados clínicos e patológicos dos prontuários das pacientes.

Ao Dr. Luiz Fernando Lima Reis pela competência na implantação, crescimento e nota 7 na CAPES da Pós Graduação da Fundação Antônio Prudente.

À Ana Maria Kuninari, Márcia Hirotoni e Luciana C. Pitombeira da Secretaria de Pós Graduação da Fundação Antônio Prudente por todo o suporte e organização da Pós Graduação.

Aos professores Dra. Vilma Martins, Dra. Sylvia Rogatto, Dr. Edgar Graner e Dr. Silvio Zanata pela correção, avaliação e críticas aos relatórios enviados e pela participação na banca de qualificação, possibilitando minha passagem para o doutorado direto e acreditando no meu potencial.

À Dra. Karina de C. B. Ribeiro do Registro Médico Hospitalar do Hospital do Câncer A. C. Camargo pelos ensinamentos em Bioestatística aplicados à pesquisa Clínica e pela grande ajuda nas análises estatísticas dos dados clínicos das pacientes.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico (SAME) do Hospital do Câncer A. C. Camargo pelo organização dos prontuários e auxílio na coleta dos dados clínicos deste estudo.

Aos Funcionários da Biblioteca da Fundação Antônio Prudente pelo auxílio e organização do material bibliográfico.

Aos meus pais Maria Clara e Aldo e irmãos Cesar e Rafael pelo apoio e incentivo sempre. Muito obrigada pela dedicação e paciência.

À todos meus familiares em especial à minha tia Patrícia e à minha madrinha Marcelina que sempre me apoiaram e acreditaram em meu potencial. Obrigada também e pelo incentivo profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP-RP por estar sempre presente na minha vida científica incentivando a crescer como pesquisadora e se dispor à me ajudar neste caminho.



## RESUMO

Ierardi DF. **Caracterização do padrão de expressão e metilação dos genes ADAM 12 e 33 em tumores de mama e sua correlação com dados clínico-patológicos.** São Paulo; 2005. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

As proteínas que fazem parte da Família ADAM são glicoproteínas transmembrânicas formadas por multidomínios. Entre eles estão os domínios de metaloproteinase, que tem a função de clivagem proteolítica, e o de desintegrina, que tem função de adesão celular. Sabe-se que as proteínas que fazem parte desta família são capazes de atuar na clivagem proteolítica de proteínas de superfície celular (moléculas de adesão, citocinas, fatores de crescimento e seus respectivos receptores) através de seu domínio de metaloproteinase e de promover interações célula-célula através de seu domínio de desintegrina. A disponibilidade de fatores de crescimento e seus receptores, assim como as interações célula-célula e célula matriz extracelular são importantes nos processos de proliferação celular, adesão e migração. Esses processos, por sua vez, estão diretamente relacionados com processos de formação e progressão tumoral e com a formação de metástases. Para melhor entender o papel dos diferentes membros da família ADAM na tumorigênese, este trabalho avaliou o padrão de expressão dos genes ADAM 8, 10, 12, 15, 17, 19, 22, 23 e 33 em tecido normal e linhagens tumorais de mama. Após a análises computacionais, verificou-se a presença de ilhas de CpG na região promotora destes genes sugerindo que a metilação poderia estar envolvida na regulação da expressão desses genes. A análise do padrão de expressão destes genes através de RT-PCR revelou uma redução significativa nos níveis de expressão dos genes ADAM 12 e 33 nas linhagens tumorais em relação ao tecido normal. Utilizando a metodologia de tratamento com bissulfito de sódio seguido de sequenciamento, foi possível verificar a existência de uma correlação direta para a maioria das linhagens tumorais analisadas entre a diminuição dos níveis de expressão dos genes ADAM12 e 33 e a presença de metilação na região promotora desses genes. A expressão dos genes ADAM 12 e 33 foi induzida em linhagens tumorais de mama através do tratamento com o agente

desmetilante 5-AZA-2'-deoxicitidina confirmando o envolvimento da metilação na regulação da expressão desses genes. Por fim o padrão de metilação da região promotora dos genes ADAM12 e 33 foi analisado através de MSP em 108 amostras de carcinomas ductais invasivos de mama. A presença de metilação na região promotora do gene ADAM 12 foi detectada 49,1% das amostras e a presença de metilação na região promotora do gene ADAM 33 foi detectada em 55,6% dos tumores analisados. A correlação entre o padrão de metilação e os dados clínico-patológicos das pacientes revelou uma associação estatisticamente significativa entre a presença de metilação na região promotora das ADAM12 e 33 com o estágio do tumor. Também foi observada uma associação positiva entre a metilação no gene ADAM 12, o tamanho do tumor e o status do linfonodo. No entanto, a hipermetilação da região promotora destes genes não mostrou estar estatisticamente correlacionada com a sobrevida global e com a sobrevida livre de doença.

## SUMMARY

Ierardi DF. [**Characterization of the expression pattern and methylation status of the ADAMs 12 and 33 genes in breast tumors and the correlation with clinical pathological data**]. São Paulo; 2005. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

The ADAMs (A Desintegrin And Metalloprotease domain) comprise a family of multidomain membrane-anchored cell surface proteins with a common structural organization. They are unique among cell surface proteins in possessing both a desintegrin domain, with adhesion properties, and a metalloprotease domain, with a protease activity. Members of this family play an important role in shedding of cell surface proteins (adhesion molecules, cytokines, growth factors and their receptors) and in process of cell-cell and cell-matrix interactions. The availability of growth factors and their receptors as well as the cell-cell and cell-matrix interactions are important in the process of cell proliferation, adhesion and migration. These processes are crucial in progression of tumor and metastasis. As a further contribution to investigate the role of ADAM family members in the tumorigenesis process, we have evaluated the expression pattern of the ADAMs 8, 10, 12, 15, 17, 19, 22 and 33. After a computational analysis using the CpG plot program, these members were shown to have a characteristic CpG island in their promoter region, suggesting that the regulation of these ADAMs could be controlled by methylation. Analysis of the expression pattern by RT-PCR, followed by Southern blot and densitometry showed a significant reduction of the ADAMs 12 and 33 in the breast cell lines relative to the normal tissue. By bisulfite treatment followed by DNA sequencing it was possible to verify a direct correlation between downregulation of the ADAMs 12 and 33 in the cell lines and the hypermethylation of the promoter regions of these genes in almost all cell lines analysed. Expression of these two genes was also activated through treatment of two different cell lines with the demethylating agent 5'-aza-2'-deoxycytidine. This fact confirmed the involvement of methylation in regulation of the expression of the ADAMs 12 and 33. As further contribution to

elucidate the role of ADAMs 12 and 33 in breast tumorigenesis, we evaluated the methylation status of the corresponding promoter region of these genes by bisulfite treatment followed by Methylation Specific PCR (MSP) in 108 breast ductal invasive primary tumors. We have detected ADAM12 promoter hypermethylation in 49.1% of the cases and ADAM33 promoter hypermethylation in 55.6% of the cases. The statistical analyses of the methylation pattern of the promoter regions of the ADAMs 12 and 33 and the clinical-pathological data of the patients revealed a significant association between both promoter regions hypermethylation with tumor stage ( $p=0.005$  and  $p=0.017$  respectively). We also observed a significant association between the hypermethylation of ADAM12 promoter region with tumor size ( $p=0.028$ ) and number of positive lymph nodes ( $p=0.038$ ). However, the hypermethylation of the both promoter regions were not significantly associated with overall and disease-free survival.

## LISTA DE FIGURAS

	Pg.
<b>Figura 1</b> Esquema de corte de mama.	6
<b>Figura 2</b> Esquema de progressão tumoral.	6
<b>Figura 3</b> Representação da metilação da molécula de citosina.	10
<b>Figura 4</b> Representação esquemática da metilação como mecanismo de inativação gênica.	10
<b>Figura 5</b> Representação esquemática de uma proteína da Família ADAM contendo seus domínios.	22
<b>Figura 6</b> Identificação de ilhas de CpG na região promotora e primeiros exons do gene ADAM8 através do programa <i>CpGplot</i> .	60
<b>Figura 7</b> Identificação de ilhas de CpG na região promotora e primeiros exons do gene ADAM10 através do programa <i>CpGplot</i> .	61
<b>Figura 8</b> Identificação de ilhas de CpG na região promotora e primeiros exons do gene ADAM12 através do programa <i>CpGplot</i> .	62
<b>Figura 9</b> Identificação de ilhas de CpG na região promotora e primeiros exons do gene ADAM15 através do programa <i>CpGplot</i> .	63
<b>Figura 10</b> Identificação de ilhas de CpG na região promotora e primeiros exons do gene ADAM17 através do programa <i>CpGplot</i> .	64
<b>Figura 11</b> Identificação de ilhas de CpG na região promotora e primeiros exons do gene ADAM19 através do programa <i>CpGplot</i> .	65
<b>Figura 12</b> Identificação de ilhas de CpG na região promotora e primeiros exons do gene ADAM22 através do programa <i>CpGplot</i> .	66
<b>Figura 13</b> Identificação de ilhas de CpG na região promotora e primeiros exons do gene ADAM23 através do programa <i>CpGplot</i> .	67
<b>Figura 15</b> RT-PCR semi-quantitativo. Géis de poliacrilamida representando a expressão dos diferentes genes da Família ADAM.	70

<b>Figura 16</b>	Representação gráfica das duas isoformas do gene ADAM12 e a posição da ilha de CpG na região promotora.	72
<b>Figura 17</b>	Southern Blot das reações de RT-PCR das diferentes isoformas da ADAM 12 e do gene constitutivo GAPDH no painel de linhagens tumorais de mama.	73
<b>Figura 18</b>	Representação gráfica das duas isoformas do gene ADAM 33 e a posição da ilha de CpG na região promotora.	74
<b>Figura 19</b>	Southern Blot das reações de RT-PCR da ADAM 33 e do gene constitutivo GAPDH no painel de linhagens tumorais de mama.	75
<b>Figura 20</b>	Seqüência de nucleotídeos da Ilha de CpG do gene ADAM 12.	77
<b>Figura 21</b>	Representação gráfica da porcentagem de metilação nos dinucleotídeos CG da Ilha de CpG do gene da ADAM 12 em tecido normal e nas diferentes linhagens tumorais de mama.	78
<b>Figura 22</b>	Seqüência de nucleotídeo da Ilha de CpG do gene ADAM 33.	80
<b>Figura 23</b>	Representação gráfica da porcentagem de metilação nos dinucleotídeos CG da Ilha de CpG do gene da ADAM 33 em tecido normal e nas diferentes linhagens tumorais de mama.	82
<b>Figura 24</b>	RT-PCR seguido de Southern blot mostrando a re-expressão do gene da ADAM 12 após o tratamento das linhagens MCF-7 e SKBR-3 com 1 $\mu$ M do agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicitidina .	84
<b>Figura 25</b>	RT-PCR seguido de Southern blot mostrando a re-expressão do gene da ADAM 33 após o tratamento das linhagens MCF-7 e SKBR-3 com 10 $\mu$ M e 0,75 $\mu$ M, respectivamente, do agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicitidina.	85
<b>Figura 26</b>	Eletroforese em gel de agarose 1% de 19 (1-19) amostras de DNA de tumores após a extração com Fenol/Clorofórmio.	87
<b>Figura 27</b>	Esquema da Ilha de CpG do gene ADAM 12.	92
<b>Figura 28</b>	Esquema da Ilha de CpG do gene ADAM 33.	92
<b>Figura 29</b>	Gel de acrilamida das reações de MSP com os diferentes	94

	iniciadores da ADAM 12 utilizando as amostras normais.	
<b>Figura 30</b>	Gel de acrilamida das reações de MSP com os iniciadores F3 e R2 da ADAM 33 utilizando as amostras normais.	95
<b>Figura 31</b>	Gel de acrilamida corado com prata das reações de MSP de 15 casos de tumores de mama com os iniciadores F2 e R1 da ADAM 12.	96
<b>Figura 32</b>	Gel de acrilamida corado com prata das reações de MSP de 15 casos de tumores de mama com os iniciadores F3 e R2 da ADAM 33.	96
<b>Figura 33</b>	Curva de Sobrevida Global das pacientes que apresentaram metilação no gene ADAM 12 e que não apresentaram metilação neste gene.	101
<b>Figura 34</b>	Curva de Sobrevida Livre de Doença das pacientes que apresentaram metilação no gene ADAM 12 e que não apresentaram metilação neste gene.	102
<b>Figura 35</b>	Curva de Sobrevida Global das pacientes que apresentaram metilação no gene ADAM 33 e que não apresentaram metilação neste gene.	103
<b>Figura 36</b>	Curva de Sobrevida Livre de Doença das pacientes que apresentaram metilação no gene ADAM 33 e que não apresentaram metilação neste gene.	104

## LISTA DE TABELAS

	Pg.
<b>Tabela 1</b>	Iniciadores para as reações de RT-PCR de cada um dos membros selecionados por apresentarem ilhas de CpG em suas regiões promotoras. 40
<b>Tabela 2</b>	Iniciadores para as reações de PCR com DNA tratado com Bissulfito de Sódio e o tamanho do fragmento a ser amplificado. 51
<b>Tabela 3</b>	Relação dos iniciadores para as reações de MSP. 55
<b>Tabela 4</b>	Membros da Família ADAM descritos em humanos, número de acesso no GenBank, localização cromossômica e o número de acesso do clone genômico no qual está localizado o primeiro nucleotídeo do mRNA. 59
<b>Tabela 5</b>	Características das ilhas de CpG identificadas na região genômica correspondente à região promotora e primeiros exons dos diferentes membros da família ADAM. 69
<b>Tabela 6</b>	Dados de densitometria utilizando o <i>software LabWorks</i> do gene ADAM 12 em painel de linhagem tumoral de mama. (N/T) número de vezes em que a expressão do gene está diminuída na linhagem tumoral em relação ao tecido normal. 73
<b>Tabela 7</b>	Dados de densitometria utilizando o <i>software LabWorks</i> do gene ADAM 33 em painel de linhagem tumoral de mama. (N/T) número de vezes em que a expressão do gene está diminuída na linhagem tumoral em relação ao tecido normal. 75
<b>Tabela 8</b>	Distribuição categórica dos dados clínicos das pacientes. 89
<b>Tabela 9</b>	Distribuição categórica dos dados clínicos das pacientes analisadas e a metilação das regiões promotoras dos genes ADAM 12 e 33. 100



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Abs</b>	Absorbância
<b>ADAM</b>	do inglês A Desintegrin And Metaloproteinase
<b>AJCC</b>	do inglês The American Joint Committee on Cancer
<b>AML</b>	Leucemia mielóide aguda
<b>APC</b>	do inglês “Adenomatous Polyposis Coli”
<b>APS</b>	persulfato de amônio
<b>ArgBP1</b>	Arg binding protein 1
<b>BLAST</b>	do inglês Basic Local Alignment Search Tool
<b>B-Myb</b>	Membro da família dos fatores de transcrição MYB
<b>Bp</b>	pares de base
<b>BRCA1</b>	do inglês “Breast Cancer Gene 1”
<b>BRCA2</b>	do inglês “Breast Cancer Gene 2”
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>CAK</b>	do inglês Cyclin-dependent kinase Activating Kinase
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>c-erbB2</b>	do inglês “Human Epidermal Growth Factor Receptor”
<b>c-Kit</b>	do inglês stem cell factor receptor
<b>CML</b>	síndrome mielodisplásica
<b>CpG</b>	citosina- fosfato-guanidina
<b>CXCL1</b>	quimiocina, do inglês “CXC motif, ligand 1”
<b>CXCL16</b>	quimiocina, do inglês “CXC motif, ligand 16”
<b>DNA</b>	Ácido deoxirribonucléico
<b>DNMT3b</b>	DNA metiltransferases 3B
<b>DNMTs</b>	DNA metiltransferases
<b>DNTPs</b>	Deoxinucleotídeos Fosfato
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ácido Etileno Diamino Tetracético
<b>EGF</b>	do inglês “Epidermal Growth Factor”
<b>EGFR</b>	do inglês “Epidermal Growth Factor Receptor”

<b>EMBL</b>	do inglês “European Bioinformatics Institute”
<b>ER</b>	receptor de estrógeno
<b>ER</b>	receptor de estrógeno
<b>Erg2</b>	do inglês “Ether-a-Gogo-Related Gene-2”
<b>Erk</b>	do inglês “Extracellular Signal Regulated Kinase”
<b>Esp15</b>	do inglês “Enterococcal Surface Protein 15”
<b>ESTs</b>	do inglês “Expressed Sequence Tags”
<b>EVE-1</b>	do inglês “Even-Skipped Genes-1”
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
<b>Grb2</b>	do inglês “Growth Factor Receptor-Bound Protein 2”
<b>GSTP1</b>	do inglês “Glutathione S-transferase P1”
<b>HB-EGF</b>	do inglês “Heparin-Binding Epidermal Growth Factor”
<b>HCl</b>	ácido clorídrico
<b>HDACs</b>	histona deacetilases
<b>HER4/erbB4</b>	do inglês “Epithelial Growth Factor Receptor 4”
<b>HIN1</b>	do inglês “Harpin-Induced 1”
<b>HTGS</b>	do inglês “High Throughput Genome Sequences”
<b>ICF</b>	do inglês “Immunodeficiency, centromeric region instability and facial anomalies”
<b>IGFBP 3</b>	do inglês “Insulin-like growth factor-binding protein 3”
<b>IGFBP 5</b>	do inglês “Insulin-like growth factor-binding protein 5”
<b>IL-6R</b>	receptor de interleucina 6
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IRF-1</b>	do inglês “Interferon-regulating factor 1”
<b>Kb</b>	quilo bases
<b>KIT-1</b>	produto do oncogene c-Kit
<b>MAPK</b>	do inglês “Mitogen-Activated Protein Kinase”
<b>MBPs</b>	do inglês “Methylcytosine Binding Proteins”
<b>MDC</b>	do inglês “Metaloproteinase-like, Disintegrin-like, Cystein-rich”
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	cloreto de magnésio
<b>MIG-6</b>	do inglês “Mitogen-Inducibile Gene 6”
<b>MMP2</b>	metaloproteinase de matriz 2

<b>MMPs</b>	metaloproteinases de matriz
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>MSP</b>	do inglês “Methylation Specific PCR”
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	fosfato de sódio
<b>NaCl</b>	cloreto de sódio
<b>NaOH</b>	hidróxido de sódio
<b>NCBI</b>	do inglês “National Center of Biotechnology Info”
<b>nm</b>	nanometros
<b>Nr</b>	do inglês “Non-redundant”
<b>P15</b>	proteína de 15 kiloDaltons
<b>P16</b>	proteína de 16 kiloDaltons
<b>P53</b>	proteína de 53 kiloDaltons
<b>PCR</b>	Reação da polimerase em cadeia
<b>PDGF</b>	do inglês “Platlet derived Growth factor”
<b>PH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>PKC<math>\alpha</math></b>	do inglês “Protein Kinase C-alfa”
<b>PMA</b>	do inglês “Phorbol-Myristate-Acetate”
<b>RAR<math>\beta</math></b>	do inglês “Retinoic Acid Receptor $\beta$ ”
<b>RASSF1A</b>	do inglês “Ras-Association Domain Family 1A”
<b>RB1</b>	gene do retinoblastoma 1
<b>RGD</b>	Arginina-Glicina-Aspartato
<b>RhoA</b>	do inglês “Ras Homology Protein A”
<b>RNA</b>	ácido riboclético
<b>RT-PCR</b>	do inglês “Reverse Transcriptase PCR”
<b>SAGE</b>	do inglês “Serial Analysis of Gene Expression”
<b>SAME</b>	Serviço de Arquivo Médico
<b>SBR</b>	Sistema de Bloom & Richardson
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sódio
<b>SH2</b>	do inglês “Src Homology 2 Domain”
<b>SH3</b>	do inglês “Src Homology 3 Domain”
<b>SH3PX1</b>	do inglês “SH3 Domain- and Phox Homology Domain-Containing Protein”

<b>SNPs</b>	do inglês “Single Nucleotides Polymorphisms”
<b>SP1</b>	do inglês “Transcription Factor Specificity Protein 1”
<b>SPSS</b>	do inglês “Statistical Package for Social Science”
<b>SSH</b>	do inglês “Suppressive Subtractive Hybridization”
<b>SYK</b>	do inglês “Spleen tyrosine Kinase”
<b>TACE</b>	do inglês “TNF Converting Enzyme”/ADAM17
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametilenodiamina
<b>TES</b>	Tris-EDTA-SDS
<b>TESS</b>	do inglês “Transcription Element Search System”
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	do inglês “Transforming Growth Factor- $\alpha$ ”
<b>TGF-<math>\beta</math>3</b>	do inglês “Transforming Growth Factor- $\beta$ 3”
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	do inglês “Tumour Necrosis Factor- $\alpha$ ”
<b>TNFR1</b>	do inglês “Tumour Necrosis Factor Receptor-I”
<b>TNFR2</b>	do inglês “Tumour Necrosis Factor Receptor-II”
<b>TNM</b>	do inglês “Tumor Node Metastasis”- Sistema de classificação tumoral
<b>TRANCE</b>	do inglês “Tumor Necrosis Factor-Related Activation-Induced Cytokine”
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil) amino metano
<b>TrkA</b>	do inglês “Tyrosine Kinase A”
<b>Twist</b>	do ingles “a basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor”
<b>UICC</b>	União Internacional contra o Câncer
<b>UV</b>	Ultra-violeta
<b>VEGF</b>	do inglês “Vascular Endothelial Growth factor”
<b>VHL</b>	do inglês “Von Hippel Lindau”
<b>YES</b>	do inglês “Yamaguchi 73 and Esh Sarcoma Viruses”

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b>	<b>1</b>
1.1	Câncer de mama	2
1.2	A Metilação e o Câncer	8
1.3	A Família ADAM e o Câncer	16
1.3.1	O gene ADAM 12	26
1.3.2	O gene ADAM 33	30
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
2.1	Objetivos Gerais	34
2.2	Objetivos específicos	34
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
3.1	Material Biológico.	37
3.2	Identificação dos membros da Família ADAM que possuem ilhas de CpG em suas regiões promotoras.	38
3.3	Avaliação do padrão de expressão dos diferentes membros da família ADAM.	39
3.3.1	Desenho de iniciadores específicos.	38
3.3.2	Extração de RNA	41
3.3.3	Síntese de cDNA	41
3.3.4	RT-PCR semi quantitativo.	43
3.3.5	Eletrofores em géis de poliacrilamida 8%.	43
3.3.6	RT-PCR em painel de linhagens tumorais de mama.	44
3.3.7	Quantificação da expressão diferencial dos membros da família ADAM através de southern blot e densitometria.	45
3.4	Caracterização do padrão de metilação dos promotores dos membros da família ADAM diferencialmente expressos em linhagens tumorais de mama.	47
3.4.1	Extração de DNA.	47

3.4.2	Tratamento do DNA com Bissulfito de Sódio.	48
3.4.3	Análise do padrão de metilação pela técnica do tratamento do DNA com bissulfito de sódio seguida de seqüenciamento.	49
3.4.4	Tratamento das linhagens tumorais com o agente desmetilante 5'-AZA-2'-deoxicitidina.	52
3.4.5	Análise do padrão de metilação pela técnica do tratamento de DNA com bissulfito de sódio seguida de pcr específico para metilação (MSP).	53
3.5	Correlação entre o padrão de metilação nos tumores de mama e os dados clínico-patológicos das pacientes	55
3.5.1	Obtenção dos dados clínico-patológicos.	55
3.5.2	Análise estatística dos dados	56
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>57</b>
4.1	Identificação de ilhas de CpG na região promotora dos diferentes membros da Família ADAM.	58
4.2	Estudo do padrão de expressão dos diferentes membros da Família ADAM que apresentaram ilhas de CpG em suas regiões promotoras.	69
4.3	Análise do padrão de metilação da região promotora dos genes ADAM 12 e ADAM 33 em tecido normal e linhagens tumorais de mama	76
4.3.2	Indução da expressão dos genes ADAM 12 e ADAM 33 após o tratamento das linhagens tumorais de mama com o agente desmetilante 5'-AZA-2'-deoxicitidina	83
4.4	Análise do padrão de metilação da região promotora dos genes ADAM 12 e ADAM 33 em amostras de tumores primários de mama e correlação com os dados clínico-patológicos das pacientes.	86
4.4.1	Levantamento e processamento das amostras de tumores primários de mama do banco de tumores do Hospital do Câncer A.C. Camargo/Instituto Ludwig	86
4.4.2	Levantamento dos dados clínico-patológicos das pacientes junto ao Serviço de Arquivo Médico (SAME) do Hospital do Câncer A.C. Camargo.	87
4.4.3	Análise do padrão de metilação dos genes ADAM 12 e ADAM 33 nas	

amostras de tumores primários do banco de tumores do Hospital A.C. Camargo/Instituto Ludwig	90
4.4.4 Reações de PCR específico para metilação (MSP) nas amostras de tumores primários do banco de tumores do Hospital A.C. Camargo/ Instituto Ludwig.	95
4.4.5 Análise estatística dos dados clínico-patológicos e do padrão de metilação dos genes ADAM 12 e ADAM 33.	97
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>105</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>114</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>117</b>

## **ANEXOS**

- Anexo 1** Tabela de Dados Clínico-Patológicos das Pacientes
- Anexo 2** Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. Oncogene.2004
- Anexo 3** ADAM23 hypermethylation as an independent prognostic factor in breast cancer. (Artigo submetido)
- Anexo 4** Curriculum Vitae

## ***INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA***

---



# **1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

## **1.1 CÂNCER DE MAMA**

O câncer de mama tem ganhado cada vez mais atenção no cenário mundial devido ao aumento indiscriminado de sua incidência. Este aumento é resultado de mudanças socioeconômicas e de um melhor acesso aos serviços de saúde. No entanto, neste período, a mortalidade por este tipo de câncer diminuiu 2,3% ao ano devido a vários fatores, que incluem o avanço nos métodos diagnósticos e o desenvolvimento de regimes de tratamentos mais efetivos (DUMITRESCU e COTARLA 2005).

O câncer de mama é relativamente raro antes dos 35 anos, porém, acima dessa faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente alcançando seu pico na faixa etária de 65 a 70 anos. Estima-se que ele seja responsável por um quinto dos óbitos de mulheres entre 40 e 50 anos. No Brasil, o câncer de mama é o segundo tipo de câncer com maior incidência entre as mulheres e estimativas feitas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontam a ocorrência de aproximadamente 40.000 novos casos de câncer de mama e 9.000 óbitos decorrentes da doença por ano (Ministério da Saúde 2004).

A etiologia do câncer de mama é complexa, sendo influenciada tanto por fatores exógenos, como dieta, consumo de álcool, uso de contraceptivos orais entre outros, como por fatores endógenos, como as taxas hormonais e predisposição genética. Outros fatores de risco que influenciam o desenvolvimento desta doença

incluem: a idade avançada, a menarca precoce (antes dos 12 anos), a menopausa tardia (após os 50 anos), a nuliparidade ou a primeira gravidez após os 30 anos, a localização geográfica (país de origem) e o *status* socioeconômico (DUMITRESCU e COTARLA 2005).

O câncer de mama é uma doença extremamente heterogênea e apresenta uma grande variabilidade clínica e histopatológica. A maior parte dos casos de câncer de mama pertence à classe dos carcinomas que se originam do epitélio dos lóbulos e ductos da glândula mamária (Figura 1). Clinicamente, este tipo de câncer pode apresentar desde formas não invasivas, ou “in situ”, cuja proliferação celular está restrita à membrana basal, até formas em estádios mais avançados, ou invasivas, cuja proliferação invade a membrana basal e o tecido adjacente, e até formas altamente metastáticas, atingindo outros tecidos como os pulmões, os ossos e o fígado (Figura 2) (NAKHLIS e MORROW 2003).

O diagnóstico precoce do câncer de mama é fundamental para o sucesso do tratamento e a cura da doença. Quando o tumor é detectado em estágios iniciais a taxa de cura da doença é superior a 90%. Da mesma forma, o prognóstico desta doença é relativamente bom se diagnosticado em estágios iniciais, sendo a sobrevivência média após 5 anos na população mundial de 61% (Ministério da Saúde 2004). Infelizmente, no Brasil aproximadamente 70% dos casos de câncer de mama são diagnosticados tardiamente em estágios avançados (<http://www.hcanc.org.br>), havendo claramente a necessidade de desenvolvimento de métodos diagnósticos mais sensíveis e acessíveis.

Os métodos de detecção do câncer de mama incluem o auto-exame, o exame clínico palpatório e a mamografia. A realização de mamografias periódicas é

recomendada a partir dos 40 anos de idade, no entanto 10 a 15% dos tumores de mama não são detectados através desse exame e a ocorrência de resultados falso-positivos com base apenas nos dados da mamografia também é elevada. Assim sendo, após a detecção de uma massa sólida na mama, o paciente é normalmente submetido à biópsia e avaliação anatomo-patológica (VAN POZNAK e SEIDMAN 2002).

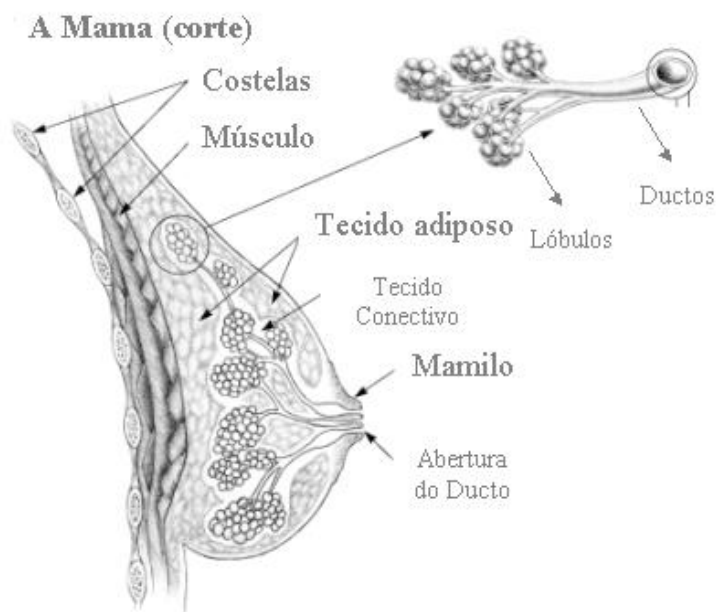
Após a confirmação anatomo-patológica de carcinoma de mama, exames complementares são realizados para se determinar o estadiamento clínico da doença o qual, por sua vez, definirá a conduta terapêutica a ser seguida. Exames complementares incluem o raio-X de tórax, a cintilografia óssea e a tomografia computadorizada e são geralmente realizados para avaliar a presença de doença metastática (VAN POZNAK e SEIDMAN 2002). O sistema de classificação mais utilizado para o estadiamento clínico do câncer de mama é o TNM criado pelo The American Joint Committee on Cancer (AJCC). Esse sistema se baseia especificamente no tamanho do tumor (T), no acometimento de linfonodos (N) e na presença de metástases à distância (M).

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, entre outros. As formas mais comuns de ressecção são a cirurgia conservadora com esvaziamento de linfonodos ou a mastectomia radical (VAN POZNAK e SEIDMAN 2002). 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.

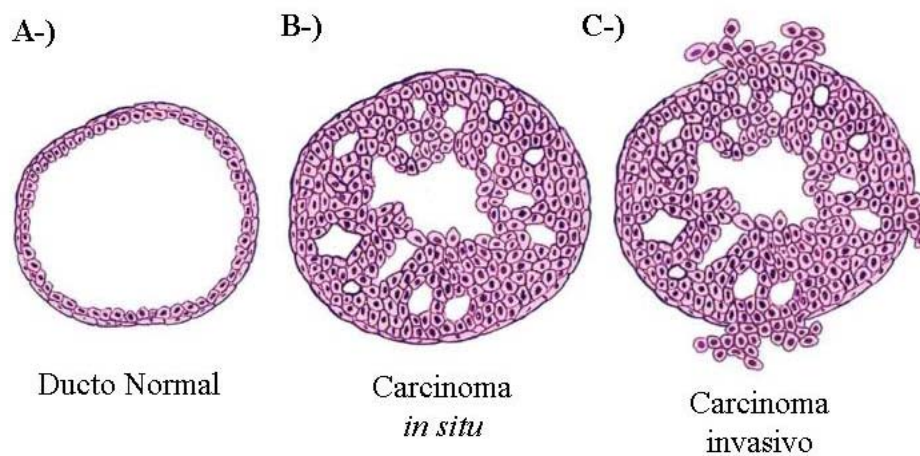
A presença de metástases em linfonodos axilares e o tamanho do tumor são os fatores prognósticos mais importantes para o câncer de mama e determinam, como mencionado anteriormente, a utilização de terapia adjuvante. No entanto, cerca de 30% das pacientes com tumores menores que 1cm e que não apresentam acometimento de linfonodos morrem em decorrência da doença. 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).

Uma das áreas mais promissoras na pesquisa sobre o câncer de mama é a identificação de marcadores moleculares que possam ser utilizados no diagnóstico precoce da doença, na avaliação do prognóstico do paciente ou mesmo no desenvolvimento de abordagens terapêuticas alternativas (SRINIVAS et al. 2001; NEGM et al. 2002).



**Fonte:** modificado de <http://www.cancervic.org.au/cancer1/prevent/breasthealth/dcis.gif>

**Figura 1** - Esquema de corte de mama, mostrando em destaque os lóbulos e ductos.



**Fonte:** modificado de [http://www.breastcancer.org/is\\_cancer\\_invasive.html](http://www.breastcancer.org/is_cancer_invasive.html)

**Legenda:** (A) Ducto normal; (B) Carcinoma ductal “in situ”; e (C) Carcinoma ductal invasivo.

**Figura 2** - Esquema de progressão tumoral.

Nos últimos 10 anos, avanços tecnológicos tem resultado na habilidade de examinar, a expressão de vários genes simultaneamente, permitindo a identificação de padrões de expressão gênica nos diferentes tumores e a identificação rápida de novos marcadores. Vários autores estão estudando o perfil de expressão gênica dos tumores de mama, o que pode elucidar a variabilidade biológica dos tumores e resultar em um novo sistema de classificação que correlacione melhor os parâmetros biológicos, clínicos e prognósticos (SORLIE et al. 2001; NEGM et al. 2002; RAMASWAMY e PEROU 2003; VAN'T VEER et al. 2005).

SHEN et al. (2004) combinando resultados de bancos de dados públicos de SAGE, ESTs e microarrays foram capazes de identificar e validar experimentalmente através de PCR em tempo real a expressão diferencial de 8 genes em amostras pareadas de tumores de mama. Com base nesses dados os autores sugeriram a utilização da combinação de várias técnicas de análise “high throughput” como uma estratégia eficiente na identificação de genes envolvidos no câncer.

AMATSCHEK et al. (2004) utilizando amostras de tumores de mama com linfonodos positivos e seguimento clínico conhecido e amostras de 16 tipos de tecidos normais combinaram técnicas de subtração de cDNA (SSH) com microarray e identificaram 42 genes correlacionados com a sobrevida global de pacientes com câncer de mama. Entre os genes mais expressos em tumores de pacientes com pior prognóstico foram encontrados os genes da ciclina B1, TGF- $\beta$ 3, B-Myb e o Erg2, e entre os genes com expressão reduzida nestes tumores foram encontrados os genes MIG-6, Esp15 e o CAK.

Vários marcadores moleculares já estão sendo usados no diagnóstico e prognóstico da doença e também como alvos de terapias alternativas. Entre estes

marcadores estão alguns receptores de hormônios esteróides (receptor de estrógeno e de progesterona), fatores de crescimento (*Platelet derived Growth factor*- PDGF; *Vascular Endothelial Growth factor*-VEGF), certos oncogenes (c-erbB2) e genes supressores de tumor (p53, BRCA1 e BRCA2) que podem estar desempenhando papéis fundamentais na transformação maligna da glândula mamária (KEEN e DAVIDSON 2003).

Outra característica molecular das células tumorais que está sendo estudada com interesse em determinar o risco de desenvolvimento da doença, o prognóstico global e a resposta aos diferentes tipos de tratamentos são as alterações no padrão de metilação que ocorrem durante a formação e a progressão tumoral.

## 1.2 A METILAÇÃO E CÂNCER

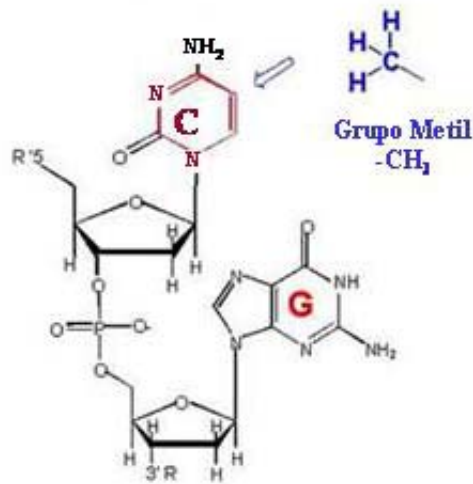
A metilação de citosinas no carbono 5 dos dinucleotídeos CpG (figura 3) é uma característica de genomas eucarióticos e é um dos principais mecanismos epigenéticos de regulação da expressão gênica. A transferência do grupo metil ao carbono 5 da citosina é catalisada pelas DNA metiltransferases (DNMTs) e a metilação ocorre em regiões ricas em dinucleotídeos CpG denominadas “Ilhas de CpG”. GARDINER-GARDEN e FROMMER (1987) definem uma ilha de CpG como uma região de DNA maior que 200bp que contém pelo menos 50% de G+C e uma razão entre a frequência observada e a esperada de dinucleotídeos CG maior ou igual a 0,6. Estima-se que existam no genoma humano em torno de 45 mil ilhas de CpG. A localização destas Ilhas de CpG não é randômica, localizando-se preferencialmente na região promotora dos genes. Sabe-se que estas ilhas são

encontradas nas proximidades de genes de expressão constitutiva e em 40% das regiões promotoras de genes que apresentam expressão tecido específico (ISSA 1999; NAKAO 2001).

A presença de ilhas de CpG foi correlacionada com a estrutura gênica quando se observou que as regiões do genoma acessíveis às nucleases, e, portanto, ativas transcricionalmente, continham DNA hipometilado. Este dado, associado ao fato de que estas ilhas se localizam preferencialmente na região promotora dos genes, sugeriu um papel importante destas regiões na regulação da expressão gênica. De modo geral, a presença de metilação nas ilhas de CpG das seqüências promotoras dos genes pode ser correlacionada com a inativação gênica (Figura 4).

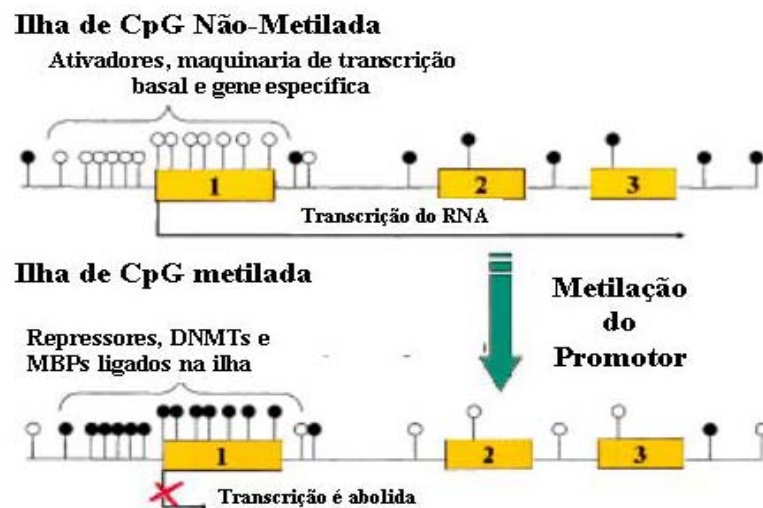


### Metilação da Ilha de CpG do DNA



Fonte: modificado de [http://www.designeduniverse.com/articles/Nobel\\_Prize/methylation.jpg](http://www.designeduniverse.com/articles/Nobel_Prize/methylation.jpg)

**Figura 3** - Representação da metilação da molécula de citosina.



Fonte: modificado de ESTELLER (2002)

**Figura 4** - Representação esquemática da metilação como mecanismo de inativação gênica.

Vários mecanismos foram propostos para explicar o papel da metilação na diminuição da atividade transcricional. Em um primeiro modelo foi proposto que os resíduos de citosina metilados poderiam interferir diretamente na interação de fatores de transcrição aos seus sítios de ligação, uma vez que o grupo metil se projeta no sulco maior da dupla fita de DNA. Além desta interferência direta, um segundo modelo propõe que a metilação dos dinucleotídeos CpG tenha consequência direta no posicionamento nucleossomal precedendo a montagem desta estrutura. Outra teoria da inativação da transcrição através da metilação indica o recrutamento de proteínas que se ligam a resíduos metilados (MBPs-*Methylcytosine Binding Proteins*) e competem diretamente com os fatores nucleares e tem um efeito direto na repressão da transcrição (ESTELLER 2005a e b). Atualmente, sabe-se que as MBPs podem recrutar complexos protéicos contendo co-repressores e histona deacetilases (HDACs) e, com base nessa interação, foi proposto que a ligação destes complexos ao DNA levaria a uma mudança na estrutura de cromatina impedindo a transcrição (YANG et al. 2001). Nenhum dos modelos propostos é exclusivo e, muito provavelmente, todos esses modelos estão atuando simultaneamente na repressão da expressão gênica pela metilação.

A metilação do DNA está envolvida em vários processos biológicos, como o “imprinting” genômico e a inativação do cromossomo X. Mutações em genes que afetam o padrão global de metilação podem dar origem a várias doenças, como é o caso da síndrome ICF (Immunodeficiency, centromeric region instability and facial anomalies) que é causada por mutações no gene da DNMT3b, uma enzima essencial no estabelecimento dos padrões de metilação. Alterações nos padrões normais de metilação também são aspectos comuns em células transformadas. Vários estudos

revelaram que alterações no padrão de metilação são eventos primários no processo de tumorigênese e contribuem diretamente para transformação das células normais (PRADHAN e ESTEVE 2003).

Dois tipos de alterações no padrão de metilação são freqüentemente encontradas em tumores: a hipometilação global do genoma e a hipermetilação localizada de ilhas de CpG presentes na região promotora de genes relacionados ao câncer. A hipometilação global do genoma de células tumorais foi inicialmente descrita em 1983 por GAMA-SOSA et al. que relataram uma redução global de 10-20% no conteúdo de 5-metilcitosina no genoma de vários tipos de tumores quando comparados aos tecidos normais correspondentes (GAMA-SOSA et al. 1983). Hoje, sabe-se que a perda de metilação ou a hipometilação do DNA pode afetar diferentes tipos de seqüências repetitivas, tais como os retrotransposons, os retrovírus endógenos e as seqüências satélites, induzindo a atividade transcricional dessas seqüências e favorecendo a ocorrência de instabilidade cromossômica nos tumores. A hipometilação também tem sido associada a expressão diferencial de oncogenes e antígenos tumorais (EHRLICH 2002).

A possível associação entre a hipermetilação do DNA e câncer surgiu da observação de que grande parte dos genes supressores de tumor continha ilhas de CpG nas suas regiões promotoras e geralmente apresentavam alterações nos padrões de metilação nas células transformadas em relação ao tecido normal (TEODORIDIS et al. 2004). A primeira constatação da presença de metilação em ilhas de CpG de um gene supressor de tumor humano foi feita por GREGER et al. em 1989, quando estudavam o gene de retinoblastoma. Desde então, as descrições de inativação gênica por metilação em células tumorais vêm crescendo na literatura. Entre os genes

normalmente metilados em células tumorais estão o gene RB1 em retinoblastomas (como citado anteriormente), o gene VHL em carcinomas esporádicos de células renais, o H19 em tumores de Wilm's, o p15 em leucemias e o p16 em várias linhagens tumorais (BEN-KASUS et al. 2005).

Análises do padrão global de metilação em células tumorais sugerem que diferentes tipos de tumores apresentam padrões de metilação específicos. Alterações no perfil de metilação durante a formação e progressão dos tumores de mama tem sido bastante estudadas. Entre os genes comumente metilados nestes tumores, podemos citar o receptor de estrógeno (ER), a E-caderina, o RASSF1A, o HIN1, o Twist, a ciclina D2, o RAR $\beta$ , o THR $\beta$ , o BRCA1 e o GSTP1 (BAE et al. 2004; ESTELLER 2005a e b).

A metilação do DNA presente nas células tumorais pode ser utilizada como marcador molecular no diagnóstico precoce da doença, na avaliação do prognóstico do paciente e da resposta ao tratamento (ESTELLER 2003; VERMA e SRIVASTAVA 2002). A utilização da metilação do DNA como marcador tumoral é vantajosa, já que ao contrário da molécula de RNA e de 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 ocorrem em diferentes regiões do gene e são de tipos diferentes, as alterações no padrão de metilação ocorrem sempre na mesma região, simplificando a metodologia de detecção (VERMA e SRIVASTAVA 2002; ESTELLER 2003).

A presença de metilação em genes específicos tem se mostrado promissora no que diz respeito a utilização como marcador molecular para o diagnóstico precoce do tumor de mama. A presença de metilação em genes específicos como, por exemplo, p16 tem sido detectada com sucesso em soro e em lavado ductal de pacientes com câncer de mama, oferecendo uma alternativa menos invasiva e mais sensível para o diagnóstico da doença (JOHNSON e LO 2002; KLEIN e LAWRENCE 2002; MULLER et al. 2003; KRASSENSTEIN et al. 2004).

Da mesma forma, a presença de metilação tem sido utilizada como fator prognóstico nos casos de câncer de mama. HU et al. (2003) mostraram que a presença de metilação na região promotora do gene p16 em tumores de mama está significativamente associada a um estadiamento mais avançado da doença, ao tamanho do tumor e à presença de linfonodos comprometidos, sugerindo que a presença de metilação em p16 possa ser utilizada como um marcador molecular em câncer de mama (HU et al. 2003). MULLER et al. (2004) analisaram a presença de metilação em um painel de 39 genes e correlacionaram os dados de metilação obtidos com a história clínica de 86 pacientes com tumores de mama. Os resultados da análise multivariada revelaram que a presença de metilação nos genes RASSF1A e/ou no gene APC está independentemente associada a um pior prognóstico e que pacientes que apresentaram metilação nesses genes possuíam um risco relativo 5,7 vezes maior de morrerem do que pacientes que não apresentaram metilação (MULLER et al. 2004). Recentemente, YUAN et al. (2005) relataram a correlação entre a inativação da expressão do gene SYK (Spleen tyrosine Kinase) por metilação de sua região promotora e a alta capacidade invasiva destes tumores, tornando desta

forma a metilação um potencial biomarcador de detecção de câncer de mama juntamente com outros marcadores usuais.

Diferente das mutações em ponto e cromossômicas, as mudanças no padrão de metilação são reversíveis, aumentando a possibilidade do desenvolvimento de terapias baseadas na restauração do estado normal de metilação de genes associados ao câncer. Tem sido proposto a ação anti-tumoral de agentes desmetilantes, principalmente os derivados da molécula 2'-deoxicitidina, partindo do princípio de que estes agentes podem reativar a expressão de genes supressores de tumor e da observação de que estes agentes podem restaurar a sensibilidade de tumores a alguns agentes quimioterápicos (EGGER et al. 2004). Os agentes desmetilantes são moléculas fosforiladas, análogas a nucleotídeos e são incorporados à fita do DNA durante a replicação. Uma vez incorporados eles formam um complexo com as DNMTs e as inativam impedindo a metilação do DNA (ESTELLER 2005a e b). A utilização do inibidor de DNA metiltransferases 5-azacitidina no tratamento de tumores tem sido extensivamente estudada e tem mostrado um grande sucesso no tratamento da síndrome mielodisplásica (CML) e na leucemia mielóide aguda (AML). Apesar deste sucesso, estudos clínicos de tratamento de tumores sólidos com inibidores de DNA metiltransferases, como o 5-azacitidina e o 5'-aza-2'-deoxicitidina, tem apresentado respostas baixas e/ou menores do que a de tratamentos convencionais (CHRISTMAN 2002).

### 1.3 A FAMÍLIA ADAM E O CÂNCER

A Família ADAM (*A Disintegrin And Metaloproteinase*), também chamada de MDC (*Metaloproteinase-like, Disintegrin-like, Cystein-rich*), é um subgrupo da superfamília de metaloproteinases dependentes de zinco e é composta, até o momento, por 40 membros que foram descritos em vertebrados e em várias outras espécies incluindo *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*.

As proteínas que fazem parte da Família ADAM são glicoproteínas transmembrânicas formadas por multidomínios. Entre eles estão os domínios: de metaloproteinase, que tem a função de clivagem proteolítica, e o de desintegrina, que tem função de adesão celular. Os outros domínios que formam a proteína são: uma seqüência sinal, que direciona a proteína ao seu sítio de atividade; um pró-domínio, que tem função de bloquear a atividade protease; uma região rica em cisteína, que também tem função de adesão; um domínio EGF-like, com função pouco caracterizada; um domínio transmembrana, que ancora a proteína à membrana da célula; e uma cauda citoplasmática, que atua como sinalizador intracelular (Figura 5) (PRIMAKOFF e MYLES 2000). Sabe-se que as proteínas que fazem parte desta família são capazes de promover interações célula-célula através de seu domínio de desintegrina e de atuar na clivagem proteolítica de proteínas de superfície celular (moléculas de adesão, citocinas, fatores de crescimento e seus respectivos receptores) através de seu domínio de metaloproteinase. As ADAMs também são capazes de interagir e clivar componentes da matriz extracelular. Os membros da família ADAM estão envolvidos em processos biológicos complexos como, por exemplo, a

miogênese, a adipogênese, a neurogênese e a fertilização (PRIMAKOFF e MYLES 2000; SEALS e COURTNEIDGE 2003).

O pró-domínio, como citado anteriormente, regula negativamente a atividade de protease destas enzimas, no entanto acredita-se que este domínio tenha também uma função secundária de chaperonina importante para o enovelamento correto da proteína e que este domínio deva direcionar e facilitar a passagem da proteína pelos pontos de verificação de qualidade na via de secreção. A remoção do pró-domínio é feita através da ação de convertases, como a furina, ou através de autocatálise. Para a ativação dependente de convertases as ADAMs devem conter entre seu pró-domínio e o domínio de metaloprotease, a seqüência consenso RX(K/R)R (SEALS e COURTNEIDGE 2003; HUOVILA et al. 2005).

O domínio de metaloproteinase para ser ativo depende da presença da seqüência consenso de aminoácidos HEXGHXXGXXHD. Em metaloproteinases de matriz (MMPs), os três resíduos de histidina (H) deste sítio constituem os três ligantes de zinco e o resíduo de ácido glutâmico (E) é o sítio ativo. Algumas proteínas da família ADAM possuem o domínio de metaloproteinase inativo por apresentarem um ou mais resíduos de aminoácidos incompatíveis com sua atividade enzimática. Esse é o caso das ADAMs 2-7, 11, 14, 16, 18, 22, 23, 27 e 29 que provavelmente atuam exclusivamente como moléculas de adesão. Como mencionado anteriormente, os membros, 1, 8-10, 12, 13, 15-17, 19-21, 24-26, 28, 30 e 33, que possuem a seqüência consenso ativa de metaloproteinase, têm um papel importante no processamento de proteínas da superfície celular como, por exemplo, no processamento da forma precursora de citocinas, como o TNF $\alpha$ , o CXCL1, o CXCL-16 e o TRANCE, de fatores de crescimento, como o HB-EGF, a anfiregulina e o



TGF $\alpha$  e de seus respectivos receptores, como o TNFR1, o TNFR2 e o IL-6R e na degradação de proteínas da matriz extracelular como, por exemplo, do colágeno tipo IV, gelatina e fibronectina (SEALS e COURTNEIDGE 2003; MOSS e BARTSCH 2004; HUOVILA et al. 2005).

A ADAM com função de proteinase melhor caracterizada é a enzima conversora do TNF- $\alpha$  (TACE) ou ADAM 17 (BLACK 2002; SEALS e COURTNEIDGE 2003). Essa enzima foi inicialmente identificada através da sua habilidade de clivar a citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  do seu precursor ligado à membrana e a confirmação desta atividade surgiu da observação da ausência do processamento desta citocina em células contendo o gene ADAM 17 mutado (BLACK et al. 1997; MOSS et al. 1997; BAX et al. 2004). A ADAM 17 também está envolvida na clivagem proteolítica de outras citocinas e de fatores de crescimento, além do processamento de receptores de TNF, de receptores de interleucinas e de receptores de fatores de crescimento como o HER4/erbB4, assim como a clivagem de moléculas de adesão como a L-selectina (SEALS e COURTNEIDGE 2003). Outro membro desta família que possui sua atividade proteolítica bem caracterizada é a ADAM 10/Kuzbanian que atua na clivagem do precursor da proteína amilóide, no processamento da proteína prion celular, e no processamento do receptor Notch e de seu ligante delta1 (BLOBEL 1997; BUXBAUM et al. 1998; LAMMICH et al. 1999), entre outros.

O domínio de desintegrina, como já dito, tem função na adesão célula-célula e age como ligante de integrinas na superfície celular (SAGANE et al. 1999). As desintegrinas foram, inicialmente, descritas como proteínas solúveis e pequenas. Estas moléculas são componentes do veneno de cobra *Viperidae* que interferem

eficientemente com a agregação de plaquetas pela sua ligação com a integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , via seqüência RGD, resultando no impedimento da ligação das plaquetas com seus ligantes naturais, como o fibrinogênio.

O domínio de ligação à integrina nos membros da família ADAM possui aproximadamente 90 aminoácidos e é representado por uma seqüência de tripeptídeo característica que é exposta em um *loop* flexível da estrutura protéica e determina, junto com as regiões adjacentes, a especificidade e afinidade das ADAMs às diferentes integrinas (BECK et al. 2005). O único membro desta família que contém a seqüência RGD em seu domínio de desintegrina é a ADAM 15 humana, sendo neste sentido, antecipada sua interação com as integrinas (KRÄTZSCHMAR et al. 1996). ZHANG et al. (1998) através de ensaios de adesão e cromatografia de afinidade, utilizando o domínio de desintegrina recombinante da ADAM 15 expresso em bactéria e células de mamíferos expressando diferentes integrinas, determinaram a especificidade da interação desta ADAM com a integrina  $\alpha_v\beta_3$  dependente do domínio RGD. Posteriormente, NATH et al. (1999) sugeriram que esta ADAM pode mediar adesão celular pela sua ligação com diferentes integrinas dependendo do tipo celular envolvido. Além de demonstrar a ligação da ADAM 15 com a integrina  $\alpha_v\beta_3$  nas linhagens tumorais U937 de monócitos e A375M de melanoma, este grupo demonstrou a interação desta ADAM com a integrina  $\alpha_5\beta_1$  na linhagem celular MOLT-4 de células T. Mais recentemente, BECK et al. (2005) determinaram a ação da ADAM 15 como inibidora da interação célula-matriz mediada por integrina  $\alpha_v\beta_3$  em ensaios de adesão celular com linhagens tumorais de ovário.

As ADAMs, com função de desintegrinas celulares, que foram melhor caracterizadas são a fertilina  $\alpha$  (ADAM 1) e a fertilina  $\beta$  (ADAM 2) que interagem

com a integrina  $\alpha_6\beta_1$  e estão envolvidas na ligação e fusão das membranas dos gametas. Outros membros da família ADAM também envolvidos em interações com integrinas são a ADAM 9, que interage com as integrinas  $\alpha_6\beta_1$  e  $\alpha_v\beta_5$  (NATH et al. 1999), a ADAM 23, que interage com a integrina  $\alpha_v\beta_3$  (CAL et al. 2000), a ADAM 17 que interage com a integrina  $\alpha_5\beta_1$  (BAX et al. 2004), a ADAM 28 que interage com a  $\alpha_4\beta_1$  (BRIDGES et al. 2002) e vários membros da família que interagem com a integrina  $\alpha_9\beta_1$  (ETO et al. 2002).

Outro domínio que parece atuar em processos de adesão célula-célula e célula-matriz é o domínio rico em cisteína. Este fato foi inicialmente proposto pela similaridade de um motivo dentro deste domínio nas ADAMs 1, 3, 12 e 14 com peptídeos de fusão viral (BLOBEL e WHITE 1992) e das observações de que as ADAMs 1, 3 e 12 participam de processos de fusão celular. Outra evidência da atuação deste domínio em processos de adesão celular é a comprovada interação da ADAM 12 com moléculas de sindecans (IBA et al. 1999, 2000). É provável que este domínio complemente a capacidade de ligação do domínio de desintegrina e conceda a ele a especificidade das interações (SEALS e COURTNEIDGE 2003; WHITE 2003).

Outra função deste domínio parece ser a de regular a atividade proteolítica destas moléculas. Experimentos feitos com embriões de *Xenopus* transfectados com diferentes construções de quimeras das ADAMs 10 e 13 mostraram que a presença do domínio rico em cisteína da ADAM 13 é essencial para a atividade do domínio de metaloprotease no desenvolvimento da glândula de cimento (estrutura epitelial especializada encontrada na porção anterior dos embriões que marca a ligação axial dorso-ventral do animal) nestes embriões (SMITH et al. 2002; WHITE 2003).

O domínio EGF-like das proteínas da família ADAM é muito pouco estudado e até o momento não foi sugerida para ele nenhuma função específica. Este domínio é normalmente estrutural e parece estar envolvido, em outras proteínas, na interação entre ligante e receptor, na adesão celular e na quimiotaxia (SEALS e COURTNEIDGE 2003; MA et al. 2005).

O domínio citoplasmático dos membros da família ADAM parece estar envolvido na regulação da atividade de metaloprotease, na regulação da sinalização celular, no controle de maturação e na localização subcelular destas proteínas. Seu tamanho e seqüência são muito diferentes entre os diferentes membros, variando de 11 resíduos de aminoácidos na ADAM 11 até 197 na ADAM 13 de *Xenopus laevis* (WOLFSBERG e WHITE 1996; COUSIN et al. 2000; POGHOSYAN et al. 2002). Apesar disso, existe uma grande similaridade na seqüência deste domínio de membros específicos entre as espécies, sugerindo que os mesmos possuam importantes funções que foram conservadas durante a evolução (POGHOSYAN et al. 2002).

O motivo mais comum presente no domínio citoplasmático é a região rica em prolina (PxxP), sítio ligante de proteínas com domínios SH3. As primeiras proteínas contendo o domínio SH3 descritas como ligantes do domínio citoplasmático de ADAM foram identificadas através de experimentos de duplo híbrido e são a endofilina I e a SH3PX1 que interagem respectivamente com os domínios citoplasmáticos das ADAMs 9 e 15 (HOWARD et al. 1999). Outra proteína ligante do domínio citoplasmático de ADAM identificada através de ensaios de duplo híbrido foi a ArgBP1 que se liga à ADAM 19 através de sua região P4 (HUANG et al. 2000). Outros motivos encontrados na cauda citoplasmática destas proteínas

incluem sítios de fosforilação de serina/treonina e/ou de tirosina quinases, que podem não somente estar regulando a função das ADAMs como também, no caso do resíduo de tirosina fosforilada, pode ser alvo de proteínas com domínios SH2. DÍAZ-RODRÍGUEZ et al (2002) demonstraram que a MAPK Erk é capaz de fosforilar a treonina 735 da ADAM 17 regulando a atividade de metaloprotease desta ADAM na clivagem, induzida por PMA, de TrkA. Outra função do domínio citoplasmático dos membros da Família ADAMs é a de proteína adaptadora para a formação de complexos protéicos em sítios críticos para sua atividade (SEALS e COURTNEIDGE 2003).



**Fonte:** modificado de SEALS e COURTNEIDGE (2003)

**Figura 5** - Representação esquemática de uma proteína da Família ADAM contendo seus domínios.

A disponibilidade de fatores de crescimento e seus receptores, assim como as interações célula-célula e célula matriz extracelular são importantes nos processos de proliferação celular, adesão e migração (GIANCOTTI e RUOSLAHTI 1999). Esses processos, por sua vez, estão diretamente relacionados com processos de formação e progressão tumoral e com a formação de metástases. Devido às propriedades dos

membros da família ADAM, já descritas, observamos, atualmente, um aumento no número de trabalhos que relatam a participação de alguns membros da família ADAM no desenvolvimento e na progressão tumoral.

O gene ADAM 11 foi originalmente identificado como um gene supressor de tumor em câncer de mama (KATAGIRI et al. 1995) e a expressão de vários membros da família ADAM (ADAMs 9, 10, 11 e 15) parece estar diretamente relacionada com aspectos patológicos de tumores hematológicos (WU et al. 1997). O gene da ADAM 10 apresenta a sua expressão aumentada em feocromocitomas e neuroblastomas e a expressão dos genes das ADAMs 9, 10 e 17 é regulada por hormônios andrógenos na linhagem celular de tumor de próstata LNCaP (McCULLOCH et al. 2000). A ADAM 15 aparece mais expressa na frente de invasão de tumores de pulmão quando comparados com o centro do tumor, sugerindo uma atividade desta ADAM na invasão, migração e proliferação celular (SCHÜTZ et al. 2005). Outros membros desta família gênica, como a ADAM 17, têm um papel importante na progressão tumoral pela sua participação na ativação proteolítica de precursores de fatores de crescimento de relevância no câncer como, por exemplo, o TNF- $\alpha$  (MOSS 2001). Outro estudo realizado por FABRE-LAFAY et al. (2005) sugeriu o papel desta ADAM no processamento da Nectina-4, um novo marcador molecular sorológico de câncer de mama. Além disso, a ADAM 12 e a ADAM 9 foram correlacionadas com a agressividade de tumores de fígado e correlacionadas nestes tumores com a expressão e atividade da MMP2 (metaloproteinase de matriz 2) (LE PABIC et al. 2003).

Esses estudos iniciais sugerem uma importante participação das proteínas da família ADAM nos processos de formação e progressão tumoral. Apesar disso, até o

momento, não existe na literatura nenhum estudo que avalie de forma sistemática o padrão de expressão gênica dos diferentes membros da família ADAM em diferentes tipos de tumores e correlacione a expressão gênica com fatores reguladores de expressão como, por exemplo, a metilação.

Em um trabalho realizado em nosso laboratório, foi possível verificar que o promotor do gene ADAM 23 está diferencialmente metilado em 66,7% (8/12) das linhagens tumorais de mama. Nestas linhagens, foi verificado que a presença de metilação no promotor desse gene está diretamente associada com a ausência de expressão do RNA mensageiro e da proteína (COSTA et al. 2004) (Anexo 2). A presença de metilação na região promotora do gene ADAM 23 também foi observada em tumores primários de mama. No entanto, uma maior frequência de metilação foi observada nos tumores em estádios mais avançados, indicando que a expressão deste gene é inibida durante a progressão tumoral. Além disso, foi verificada a redução da expressão deste gene e sua correlação com a hipermetilação de seu promotores em 2 linhagens tumorais de glioblastoma (COSTA et al. 2005). A proteína ADAM 23 atua como uma molécula de adesão e é possível que o silenciamento deste gene altere as propriedades adesivas e migratórias das células tumorais.

Posteriormente em nosso laboratório, o valor prognóstico da hipermetilação no promotor do gene ADAM 23 foi avaliado em 106 amostras de tumores primários de mama. Neste estudo foi verificado que a hipermetilação deste gene está associada com o estágio do tumor ( $p=0,017$ ) e com o número de linfonodos positivos ( $p=0,012$ ). Além disso, foi detectada a hipermetilação da região promotora deste gene em 70% dos tumores primários de pacientes com metástase a distância e em apenas

25,6% dos tumores primários de pacientes sem metástases ( $p < 0,001$ ), sugerindo que a expressão deste gene tenha um papel protetor contra o desenvolvimento de metástases em tumores de mama. Através de análises de Kaplan-Meier foi estimada a relação entre o status de metilação da região promotora da ADAM 23 com a sobrevida global e a sobrevida livre de doença. Foi mostrado que pacientes que apresentaram hipermetilação na região analisada tiveram uma sobrevida global ( $p = 0,018$ ) e livre de doença ( $p < 0,001$ ) menor que as que não apresentaram hipermetilação no promotor deste gene. Foi observado também, em análise multivariada, que a hipermetilação deste gene é um fator independente para a sobrevida livre de doença ( $p = 0,007$  e Hazard ratio = 3,9), sendo o segundo melhor fator prognóstico entre os fatores analisados. Esses dados mostram que a hipermetilação deste gene pode ser usada como um novo marcador molecular em câncer de mama e sugere que esta hipermetilação deverá ter importantes implicações no monitoramento clínico e na avaliação do risco de metástases neste tipo de tumor (em fase de publicação COSTA et al. 2005) (Anexo 3).

A exemplo do trabalho desenvolvido em nosso laboratório para o gene ADAM23, este trabalho visou, em um primeiro momento, avaliar o padrão de expressão e de metilação de outros membros da família ADAM em tecido normal e linhagens tumorais de mama. Foi observada uma diferença de expressão entre as linhagens estudadas e o tecido normal de mama para os genes ADAM 12 e 33 e uma correlação inversa entre o padrão de expressão desses genes e o *status* de metilação de sua região promotora. Em um segundo momento, esse trabalho visou avaliar o potencial prognóstico da hipermetilação nos promotores dos genes ADAM 12 e 33 em tumores primários de mama. Para tanto o padrão de metilação das regiões



promotoras dos genes ADAM 12 e 33 foi analisado através da técnica de MSP (Methylation Specific PCR) e o dados de metilação foram associados com os dados clínico patológicos dos pacientes.

### **1.3.1 O gene ADAM 12**

O gene ADAM 12 foi inicialmente identificado em linhagem celular miogênica de camundongos, quando YAGAMI-HIROMASA et al. (1995) buscavam por homólogos das ADAMs 1 e 2 (envolvidas em processos de fusão de gametas) que poderiam estar envolvidos na fusão de mioblastos. Posteriormente, a ADAM 12 humana foi descrita e mapeada na região cromossômica 10q26 (GILPIN et al. 1998). Sua expressão é restrita temporal e espacialmente e é mais proeminente em regiões de formação de músculo esquelético e de osso. No adulto sua expressão é aumentada em músculos em regeneração e em carcinomas. Esta proteína é encontrada tanto em uma forma longa ancorada a membrana (ADAM 12L/NM\_003474), composta por 909 resíduos de aminoácidos, como em uma forma menor secretada (ADAM 12S/NM\_021641), composta por 738 resíduos de aminoácidos, que não possui os domínios transmembrana e citoplasmático e é originada a partir de splicing alternativo. As duas formas possuem atividade de metaloprotease e de desintegrina, porém apenas a forma longa atua como sinalizadora intracelular devido a presença do domínio citoplasmático (GILPIN et al. 1998; TIAN et al. 2002).

Sua atividade de metaloprotease é regulada como nas outras ADAMs que possuem este domínio ativo pela clivagem de seu pró-domínio. Apesar da presença da seqüência consenso de clivagem por furinas (RX(R/K)R) entre o pró-domínio e o domínio de metaloprotease, foi mostrado que esta proteína é dispensável no processo

de clivagem da ADAM 12. Porém, ainda não foi determinada a proteína responsável por este processo. O pró-domínio da ADAM 12 também foi mostrado como essencial no enovelamento correto da proteína e no seu transporte para a superfície celular, assim como em outras ADAMs (CAO et al. 2002)

A ADAM 12 está envolvida no processamento de várias proteínas de matriz extra-celular, como a gelatina, o colágeno tipo IV e a fibronectina, sugerindo seu papel no remodelamento da matriz extra-celular, uma potente marca das neoplasias. Além disso, foi demonstrada a atividade proteolítica desta proteína na clivagem de fatores de crescimento. A proteína ADAM 12 é capaz de realizar a clivagem proteolítica de IGFBP 3 e 5 (*Insulin-like growth factor-binding proteins*). Essas proteínas são capazes de se ligar e seqüestrar os fatores de crescimento IGF e possuem, portanto, atividade anti-mitogênica. Sendo o IGFBP-3 o maior seqüestrador de IGF, a regulação da ADAM 12S possui implicações nas doenças relacionadas com os baixos níveis de IGF como a osteoartrite e diabetes, assim como nas relacionadas com os altos níveis de IGF como em alguns tumores, inclusive tumores de mama (SHI et al. 2000).

O envolvimento da proteína ADAM 12 no processamento de HB-EGF (*Heparin binding-EGF*) também foi proposto por ASAKURA et al. (2002). O HB-EGF, assim como os demais ligantes de EGFR, é expresso como precursor transmembrânico que se liga a receptores  $\alpha_3\beta_1$  e transmite sinais anti-proliferativos. Esses fatores são liberados da superfície celular através de clivagem proteolítica do seu domínio extracelular gerando uma forma solúvel mitoticamente ativa. Vários estudos correlacionaram a regulação da atividade proteolítica da ADAM 12 na clivagem do proHB-EGF com ligantes citoplasmáticos da ADAM 12. Estes ligantes

incluem as proteínas ligantes de SH3, que são a proteína EVE-1 e a proteína PACSIN3 (MORI et al. 2003; TANAKA et al. 2004).

A atividade de adesão da proteína ADAM 12 é realizada tanto pelo domínio de desintegrina como pelo domínio rico em cisteína e é sustentada pela existência de interações com integrinas e moléculas de sindecans (IBA et al. 1999; 2000; ETO et al. 2000). ETO et al. (2000) demonstraram que a ligação da ADAM 12 à integrina  $\alpha_9\beta_1$  media interações célula-célula e deve possuir um papel importante no desenvolvimento e em condições patológicas. Mais recentemente, THODETI et al. (2003) demonstraram que a interação de sindecán-4 com a ADAM 12 promove espalhamento celular e a formação de fibras de estresse pela ativação de duas vias distintas em diferentes estágios da adesão celular, uma envolvendo PKC $\alpha$  e integrina  $\beta_1$  e a outra envolvendo a proteína RhoA. A proteína ADAM 12 foi correlacionada de maneira positiva com a diferenciação de mioblastos. Esta correlação parecer estar associada exclusivamente com os domínios de desintegrina, o domínio rico em cisteína e EGF-like, uma vez que construções dessa proteína contendo o domínio de metaloprotease inibem a fusão dos mioblastos durante o processo de diferenciação. Foi sugerido que o impacto negativo do domínio de metaloprotease da ADAM 12 durante a miogênese estaria associado ao processamento do fator de crescimento denominado miostatina, que inibe o desenvolvimento muscular. Modelos de animais *knock-out* para o gene ADAM 12 suportam o papel deste gene nos processos de diferenciação e regeneração muscular e sugerem também um envolvimento deste gene na adipogênese (KURISAKI et al. 2003).

O domínio citoplasmático da ADAM 12 possui 10 possíveis domínios ligantes de SH3 e 2 sítios de fosforilação de tirosinas (SEALS e COURTNEIDGE

2003). Associações da ADAM 12 com as proteínas, SRC, quinase relacionada YES, FISH e Grb2 foram descritas (SUZUKI et al. 2000; ABRAM et al. 2003) comprovando sua atividade na sinalização intracelular.

A ADAM 12 está relacionada com processos patológicos como distrofia muscular, hipertrofia cardíaca e câncer. Vários estudos independente sugeriram a correlação entre a ADAM 12 e o câncer. O aumento da expressão da ADAM 12 foi verificado em tumores de mama, cólon e tumores de células escamosas de pulmão (IBA et al. 1999). Posteriormente, TIAN et al. (2002), demonstraram que a ADAM 12 está associada à fusão de células mononucleares estromais na formação de células gigantes multinucleadas em tumores de células gigantes de osso. O aumento da expressão do gene ADAM12 foi observado em carcinoma hepatocelular e correlacionado com a agressividade e a progressão destes tumores (LE PABIC et al. 2003). Também foi verificada a superexpressão desta proteína em glioblastomas e a mesma foi associada à atividade proteolítica da proteína na clivagem de proHB-EGF (KODAMA et al. 2004). ROY et al. (2004) detectaram pela primeira vez a altos níveis da proteína ADAM 12S em urina de pacientes com câncer de mama e mostraram que esta detecção é preditiva do status da doença. A correlação entre o nível da proteína na urina das pacientes e o estágio da doença reflete o papel da atividade desta proteína na progressão tumoral *in vivo*. Sugere-se que a exemplo de tumores de mama, os níveis de ADAM 12 possam ser preditivos em outros tipos de câncer, como próstata e bexiga, e que a sua detecção na urina possa ser útil no desenvolvimento de diagnósticos não invasivos e terapias mais eficientes em vários tipos de tumores.

### 1.3.2 O gene ADAM 33

O gene ADAM 33 humano foi inicialmente descrito por YOSHINAKA et al. em 2002. Este gene está localizado no cromossomo 20p13, possui 22 exons e apresenta duas variantes de splicing, sendo a isoforma mais longa (variante 1/ NM\_025220) composta por 813 aminoácidos e a mais curta (variante 2/ NM\_153202), que exclui o exon 17, composta por 787 aminoácidos (YOSHINAKA et al. 2002; GARLISI et al. 2003). Ambas isoformas possuem todos os domínios que caracterizam os membros desta família, incluindo a seqüência consenso do sítio catalítico de ligação ao zinco (YOSHINAKA et al. 2002).

Esta ADAM é expressa em vários tecidos adultos normais como fibroblastos pulmonares, coração, músculo liso de brônquios, no sistema nervoso central, placenta, pulmão, bexiga e veias. Além disso, não foi observada a expressão deste gene em tecidos normais de rim, fígado, pâncreas e medula óssea, e em linhagens tumorais de cólon, mama, próstata, gliomas e melanomas (UMLAND et al. 2003). A ADAM33 de camundongo assim como seu ortólogo de *Xenopus laevis* foram relacionados com o desenvolvimento embrionário, sugerindo uma papel da ADAM33 humana na embriogênese (GUNN et al. 2002; YOSHINAKA et al. 2002).

A ativação de seu domínio catalítico através da clivagem do pró-domínio é realizada por mecanismos dependente de catálise por furinas. E a presença deste sítio ativo tanto em humanos como em camundongos sugere que esta molécula tenha papel na regulação de eventos fisiológicos e patológicos (GARLISI et al. 2002).

Recentemente, ZOU et al. (2004) caracterizaram bioquimicamente pela primeira vez a atividade catalítica da ADAM 33. Neste trabalho, foi demonstrado, através de experimentos envolvendo o sítio catalítico da ADAM 33 e algumas

seqüências de peptídeos como substratos, que esta proteína está envolvida mais especificamente no processamento da proteína ligante de KIT-1. O gene c-Kit é um oncogene altamente expresso em AML (Leucemia mieloide aguda) e é ativado pela interação com seu ligante, principalmente, quando este está ancorado à membrana plasmática das células (ASHMAN et al. 1999).

Assim como outras ADAMs, a ADAM33 parece estar relacionada com adesão celular. BRIDGES et al. (2005) mostraram em um estudo com as integrinas  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_7$ , e  $\alpha_9\beta_1$ , a interação exclusiva da ADAM33 com a integrina  $\alpha_9\beta_1$ . Esta integrina é expressa em neutrófilos e media eventos de adesão que facilitam a migração transendotelial destas células. Apesar da caracterização desta interação, são necessários mais estudos envolvendo a ADAM33 em eventos de adesão para esclarecer seu papel nestes processos.

Não existem, até o momento, estudos que correlacionam o gene ADAM33 e o câncer. No entanto, polimorfismos encontrados no gene ADAM33 parecem estar significativamente associados com a suscetibilidade ao desenvolvimento de asma e à hiperresponsividade dos brônquios. Acredita-se que tais polimorfismos afetem a atividade proteolítica da proteína ADAM33 alterando dessa forma a clivagem proteolítica de citocinas e fatores de crescimentos (SHAPIRO e OWEN 2002). Vários SNPs foram encontrados no gene ADAM33 afetando tanto regiões não traduzidas como regiões codificantes. Um dos polimorfismos que afetam a região codificante foi localizado no sítio catalítico do domínio de metaloproteinase e pode afetar a ligação ao substrato e os parâmetros enzimáticos dessa proteína. Outro SNP presente na região codificante e que pode afetar a atividade enzimática da ADAM 33 está localizado no pró-domínio e pode interferir na a ativação do sítio catalítico

(VAN EERDEWEGH et al. 2002; CHAE et al. 2003). Os SNPs localizados nos introns e na região 3' não traduzida parecem afetar o padrão de *splicing* e o *turnover* do mRNA.

## ***OBJETIVOS***

---



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar a participação de diferentes membros da família ADAM no processo de formação e progressão de tumores de mama através do estudo do padrão de expressão e de metilação da região promotora dos diferentes membros em linhagens tumorais de mama. Avaliar também o valor prognóstico da presença de metilação na região promotora dos membros que se mostrarem diferencialmente metilados nas linhagens tumorais através da análise do perfil de metilação em tumores de mama e correlação com os dados clínico-patológicos das pacientes.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar entre os membros que fazem a parte da família ADAM aqueles que possuam ilhas CpG em suas regiões promotoras e que possam em teoria ter seu padrão de expressão regulado por metilação.
- Avaliar o padrão de expressão dos diferentes membros da família ADAM em linhagens tumorais e tecido normal de mama através de RT-PCR.
- Correlacionar para os diferentes membros da família ADAM que apresentaram expressão diferencial (ADAM 12 e 33) nas linhagens tumorais de mama o padrão de metilação da região promotora com o padrão de expressão gênica observado.

- Confirmar o papel da metilação na regulação da expressão dos membros diferencialmente expressos nas linhagens tumorais de mama, ADAMs 12 e 33, através de ensaios com agentes desmetilantes.
- Avaliar o padrão de metilação dos membros diferencialmente expressos e metilados, ADAMs 12 e 33, em amostras de tumores primários de mama através da técnica de MSP (Methylation Specific PCR).
- Correlacionar os dados de metilação das amostras tumorais com os dados clínico-patológicos das pacientes a fim de avaliar a utilização da metilação na região promotora desses genes como marcador molecular para o câncer de mama.

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

---

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Neste estudo foram utilizadas as linhagens tumorais de mama MCF-7, MDA-MB-436 e SKBR3 obtidas comercialmente através da ATCC (*American Type Culture Collection*) e a linhagem HB4a cedida pelo Dr. Michael O'Hare do Instituto Ludwig de Londres-Inglaterra. Também foram utilizados o DNA e mRNA gentilmente cedidos pelo Dr. Michael O'Hare de um painel de 20 linhagens tumorais de mama. As linhagens foram: MDA-MB-134, MDA-MB-415, MDA-MB-175, MDA-MB-436, MDA-MB-435, MDA-MB-468, MDA-MB-453, BT-20, ZR-75-30, ZR-75-1, CAMA-1, GI-101, 734b, CAL-51, MCF-7, SKBR-7, SKBR-5, SKBR-3, PMC42 e DU4475. O DNA de mama normal foi obtido de peça de borda de tumor considerada normal pelo patologista. O RNA mensageiro de tecido normal de mama foi obtido comercialmente da *Clontech* e mantido à -70°C.

Além disso, foram utilizadas 108 amostras de tumores de carcinomas ductais invasivos com pelo menos 3 anos de seguimento que estão disponíveis no Banco de Tumores do Hospital do Câncer A.C. Camargo/ Instituto Ludwig. Todas as amostras catalogadas no Banco de Tumores foram obtidas mediante consentimento informado dos pacientes e aprovação do comitê de ética da Instituição.

As amostras obtidas do banco de tumores foram submetidas à nova avaliação patológica, com o auxílio do Dr. Fernando A. Soares e da Dra. Isabela W. Cunha do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo, e

macrodissecadas para separar áreas normais e de carcinoma “in situ” presentes na peça. Foram utilizadas neste estudo apenas as áreas de carcinoma ductal invasivo e as bordas consideradas normais pelo patologista.

### **3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MEMBROS DA FAMÍLIA ADAM QUE POSSUEM ILHAS DE CpG EM SUAS REGIÕES PROMOTORAS**

Para a identificação da região promotora dos diferentes membros da família ADAM, as seqüências de mRNA de cada um dos membros descritos para humanos foram alinhadas contra a seqüência genômica humana, utilizando o programa BLAST N e os bancos de dados Nr (*Non-redundant*) e/ou *High Throughput Genome Sequences* (HTGS) do *National Center of Biotechnology Info* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). O nucleotídeo inicial de cada alinhamento foi determinado e, a partir deste, foram isolados fragmentos de aproximadamente 10kb representando a região promotora e os primeiros exons de cada um dos genes. Estes fragmentos foram isolados obtendo-se aproximadamente 5kb anteriores e 5kb posteriores ao primeiro nucleotídeo alinhado. Estes fragmentos foram submetidos à análise da presença de ilhas de CpG no programa *CpGplot* disponível na página do grupo *European Bioinformatics Institute* (EMBL) (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>). Esta análise seguiu os parâmetros estipulados pelo *CpGplot* que compreendem uma região de DNA maior que 200bp contendo pelo menos 50% de G+C e uma razão entre a frequência observada e a esperada de dinucleotídeos CG maior ou igual a 0,6.

### **3.3 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DOS DIFERENTES MEMBROS DA FAMÍLIA ADAM**

#### **3.3.1 Desenho de iniciadores específicos**

Neste trabalho foram selecionados para análise de expressão diferencial apenas os membros da Família ADAM que apresentaram em sua região promotora uma ilha de CpG. Iniciadores específicos para cada um dos membros da família ADAM foram desenhados na região 3' da molécula de mRNA e utilizados em reações de RT-PCR para avaliar o padrão de expressão gênica em tecido normal e nas linhagens tumorais. Os iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa Oligotech e posicionados em exons diferentes para que uma eventual contaminação com DNA genômico pudesse ser detectada. As seqüências dos iniciadores e o tamanho dos fragmentos esperados na amplificação são mostradas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Iniciadores para as reações de RT-PCR de cada um dos membros selecionados por apresentarem ilhas de CpG em suas regiões promotoras.

ADAM/Iniciadores	Seqüência dos iniciadores	Tamanho
ADAM 8 RTP81F RTP81R	5' GGT CAT CAA GCC AAC GTT CG 3' 5' CAA GGC GGG GAG AAG GAA TTG 3'	357 pb
ADAM 10 RTP101F RTP101R	5' GGG CAG TAT TAC TTA TGG G 3' 5' TTT AAG TAA TTC CAC CTG G 3'	354 pb
ADAM 12 L RTP121F RTP121R	5' AGA ACA ACT CGG CTC ACT C 3' 5' TTT ACA AGT ACC TGT GCA AG 3'	331 pb
ADAM 12 S RTP12SF RTP12SF	5' TGG AGG AAG CAC AGA CAG C 3' 5' CTG ACC GTC GTA ACT GAG ACA 3'	234 pb
ADAM 15 RTP151F RTP151R	5' AAG CCA CTG CCT GCC GAC C 3' 5' CTT CAG TCA TGG TAG GGG AC 3'	223 pb
ADAM 17 RTP171F RTP171R	5' GGA TAA GAA ATT GGA TAA AC 3' 5' GTC CTT CTC AAA CCC ATC C 3'	259 pb
ADAM 19 RTP191F RTP191R	5' AGA AGG CAC TCC CGG CAA AC 3' 5' CCT GGG GCT GTA TAT TGC AC 3'	423 pb
ADAM 22 RTP222F RTP222R	5' AAA ATA CCC TTA CCA ATG 3' 5' ATA TTT CAG TAG TTC TTT TC 3'	308 pb
ADAM 33 RTP331F RTP331R	5' TTC CTG CTG GCC ATG CTC C 3' 5' ATC TTG GCA TCT GGA CTT G 3'	328 pb

### 3.3.2 Extração de RNA

O RNA total das diferentes linhagens celulares utilizadas neste estudo foi isolado utilizando TRIzol Reagent (*Life Technologies USA*), segundo especificações do fabricante. A extração do RNA utilizando esse reagente é uma adaptação do método desenvolvido por CHOMCZYNSKI e SACCHI (1987).

A integridade dos RNAs foi visualizada aplicando-se 1 $\mu$ g do RNA total em gel de agarose 1%. Antes de ser aplicado, o RNA foi desnaturado a 65°C por 5 minutos, sendo mantido em condição desnaturante em tampão de amostra contendo uréia (7 M uréia e 30% glicerol). Todos os procedimentos foram feitos com material para uso exclusivo de RNA. A coloração foi feita com brometo de etídeo e o gel visualizado em luz UV. Desta maneira, foram considerados íntegros os RNAs que apresentaram as bandas correspondentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S bem evidentes, tendo a primeira o dobro da intensidade da segunda.

A quantificação do RNA foi feita através da leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando-se que 1 Abs<sub>260nm</sub> equivale a 40  $\mu$ g/ml de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas.

### 3.3.3 Síntese de cDNA

Um micrograma de RNA total foi transcrito reversamente à primeira fita de cDNA na presença de 200 U da enzima transcriptase reversa (Superscript II, Gibco-BRL), utilizando 25 pmoles do iniciador OLIGO dT em uma reação com volume final de 20  $\mu$ l contendo tampão 1X, 25 U de inibidor de RNase (RNAsin, Promega)



e 200  $\mu\text{M}$  da mistura de todos os dNTPs. Inicialmente, a mistura de RNA, água e iniciadores foi incubada a 65°C por 5 minutos para abertura de possíveis estruturas secundárias. A síntese de cDNA foi realizada a 42°C por 60 minutos e a enzima foi inativada a 72°C por 15 minutos.

O gene constitutivo GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) foi utilizado como controle para analisar a qualidade do cDNA nas amostras e comprovar a eficiência de síntese do mesmo. Uma alíquota de 1  $\mu\text{l}$  do cDNA foi utilizada em reações de amplificação com volume final de 20  $\mu\text{l}$  contendo 1X tampão de Taq Polimerase (Invitrogen), 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  dNTPs, 0,5 U Taq polimerase (Invitrogen) e 20 pmoles de iniciadores específicos. As condições de amplificação do gene constitutivo GAPDH foram: desnaturação do cDNA por 5 minutos a 94°C e, em seguida, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 62°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final da ciclagem, as moléculas foram estendidas por 6 minutos a 72°C. As seqüências correspondentes aos iniciadores utilizados para o gene constitutivo GAPDH foram: GAPDH F (5' CTG CAC CAC CAA CTG CTT A 3') e GAPDH R (5' CAT GAC GGC AGG TCA GGT C 3').

### 3.3.4 RT-PCR semi quantitativo

Para o estudo preliminar dos padrões de expressão gênica dos diferentes membros da Família ADAM, que possuem ilhas de CpG em suas regiões promotoras, foram utilizadas reações de RT-PCR semi-quantitativo. Para tanto, as reações foram feitas em triplicatas para o gene em estudo, usando com controle normalizador o gene constitutivo GAPDH. As reações foram realizadas em um volume final de 20  $\mu$ l contendo 1  $\mu$ l do cDNA sintetizado, 1X tampão de Taq Polimerase (Invitrogen), 1,5 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M dNTPs, 0,5 U Taq polimerase (Invitrogen) e 20 pmoles de iniciadores específicos. As condições da reação foram: o cDNA foi desnaturado por 5 minutos a 94°C e, em seguida, submetido a ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a temperatura específica dos iniciadores por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Alíquotas da reação foram retiradas em diferentes ciclos, no caso das ADAMs 8, 10, 15, 17, 19 e 22, os ciclos de retirada foram: 28, 30 e 35; para as ADAMs 12 e 33 os ciclos de retirada foram 30, 35 e 38 e, no caso do gene constitutivo GAPDH, os ciclos de retirada foram: 16, 19 e 22. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata.

### 3.3.5 Eletrofores em géis de poliacrilamida 8%

Os produtos das reações de RT-PCR foram analisados em gel de poliacrilamida 8%. Estes géis foram feitos utilizando-se uma solução de poliacrilamida e bis-acrilamida na proporção 29:1, TEMED (*Life Technologies USA*), como catalisador da reação e persulfato de amônio (APS) 10%, como doador de elétrons. A eletroforese foi conduzida em aparato de gel médio a 100 V por

aproximadamente 1 hora. O gel foi incubado em cuba de vidro por 10 minutos em solução fixadora (0,5% de ácido acético glacial, 10% de etanol absoluto), sob agitação, à temperatura ambiente. Esta solução foi substituída pela de nitrato de prata (0,2% de nitrato de prata) e o gel foi incubado por mais 6 minutos. Após impregnação do DNA com prata, o gel foi lavado com água deionizada e a este foi adicionado o revelador (30% de hidróxido de sódio e de 0,5% formaldeído) por mais 15 minutos, sob agitação, à temperatura ambiente. Após a revelação, o gel foi incubado em solução fixadora e seco em papel celofane.

### **3.3.6 RT-PCR em painel de linhagens tumorais de mama**

O padrão de expressão dos genes ADAMs 12 e 33 foi também verificado através de RT-PCR em um painel de 20 linhagens tumorais de mama gentilmente cedido pelo Dr. Michael O'Hare do Instituto Ludwig de Londres-Inglaterra. As linhagens utilizadas foram: MDA-MB-134, MDA-MB-415, MDA-MB-175, MDA-MB-436, MDA-MB-435, MDA-MB-468, MDA-MB-456, BT-20, ZR-75-30, ZR-75-1, CAMA-1, GI-101, 734b, CAL-51, MCF-7, SKBR-7, SKBR-5, SKBR-3, PMC42 E DU4475. A reação de PCR foi realizada conforme descrito no item **3.3.4** em um único tubo, retirado ao final de 38 ciclos. A visualização da amplificação foi feita em gel de agarose 1% e quantificada através de Southern Blot seguido de densitometria utilizando o *software LabWorks* conforme descrito nos item **3.3.7**.

### 3.3.7 Quantificação da expressão diferencial dos membros da família ADAM através de Southern blot e densitometria

A quantificação da expressão diferencial foi realizada através de Southern Blot e densitometria apenas para aqueles membros que apresentaram alterações aparentes no padrão de expressão nas linhagens tumorais em relação ao tecido normal.

Para a confirmação e quantificação do padrão de expressão das ADAMs 12 e 33, que apresentaram alterações no padrão de expressão, foi feito Southern Blot dos produtos da reação de RT-PCR. Para tanto, os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose 1,0 % com brometo de etídeo e depois transferidos para membranas de *nylon* (*Hybond-N<sup>+</sup>-Amersham Pharmacia Biotech*). Antes da transferência, os fragmentos de DNA foram quebrados através de exposição à luz ultra-violeta ( $60 \text{ mJ/cm}^2$ ), e o gel foi, então, incubado em solução desnaturante (1,5 M NaCl e 1,0 M NaOH) por 45 minutos e, em seguida, duas vezes em solução de neutralização (0,5 M Tris/HCl pH 7,5 e 1,5 M NaCl) por 30 minutos, sob agitação constante. A transferência foi feita conforme descrito por SOUTHERN (1975). Após a transferência, as membranas foram lavadas em tampão apropriado (SSC 2X: 0,6 M NaCl e 60 mM de Citrato de Sódio) e, em seguida, foi feito o *cross-link* em luz ultra-violeta ( $120 \text{ mJ/cm}^2$ ).

As sondas referentes aos fragmentos das ADAMs 12, 33 e GAPDH foram marcadas com fósforo radioativo através da incorporação de nucleotídeo [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP. A marcação foi feita com o *Random Primers Labeling System* (Gibco-BRL), seguindo-se as instruções do fabricante. As membranas foram hibridizadas com as respectivas sondas radioativas no forno de hibridização a  $65^\circ\text{C}$  *overnight* em

solução de hibridização (0,25 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 7% SDS, 1% BSA, 1 mM EDTA) (CHURCH e GILBERT 1984). Após a incubação, as membranas foram lavadas em solução de lavagem (0,25 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1% SDS, 1 mM EDTA) durante 30 minutos a 65°C, por duas vezes. Finalmente, as mesmas foram expostas ao filme fotográfico (*Kodak*) a -80°C por períodos que variaram de 5 minutos a 24 horas e, depois, revelados utilizando-se soluções reveladoras e fixadoras conforme as especificações do fabricante (*Kodak*).

A quantificação da alteração do padrão de expressão nas linhagens tumorais em relação ao tecido normal dos genes das ADAMs 12 e 33 foi realizada utilizando o *software LabWorks (UPV Bioimaging Systems)*. Este *software* obtém a imagem a partir da digitalização dos filmes fotográficos referentes a cada gene. A intensidade de cada banda foi obtida após a delimitação da área da mesma por inteiro levando em consideração a espessura total das mesmas.

Após a obtenção da intensidade das bandas, o nível de expressão de cada uma das ADAMs nas diferentes amostras foi normalizado pelo nível de expressão do gene constitutivo GAPDH. Para tanto, o valor da intensidade de cada banda correspondente ao membro da família ADAM foi dividido pelo valor da intensidade da banda correspondente do gene constitutivo GAPDH. Após a normalização, foi feito o cálculo para quantificar a expressão de cada gene nas linhagens tumorais em relação ao tecido normal. Quando nos filmes fotográficos foi observada a diminuição da expressão nas linhagens tumorais em relação ao tecido normal, este cálculo foi feito pela divisão da razão do tecido normal pela razão da linhagem tumoral. E nos casos em que foi observado o aumento da expressão em linhagens tumorais, o cálculo foi feito pela divisão da razão da linhagem tumoral pela razão do tecido

normal. Amostras com razões superiores a 3 foram consideradas diferencialmente expressas.

### **3.4 CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DOS PROMOTORES DOS MEMBROS DA FAMÍLIA ADAM DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA**

#### **3.4.1 Extração de DNA**

Para a extração do DNA genômico tanto das linhagens tumorais quanto dos tecidos normais e tumorais obtidos do Banco de tumores do Hospital do Câncer A.C. Camargo/Instituto Ludwig foi utilizado o método convencional de fenol/clorofórmio. Resumidamente, as amostras foram digeridas durante toda a noite em tampão TES (1 M Tris/HCl pH 8,0, 0,5 M EDTA e 10% SDS) contendo 100 µg/ml de Proteinase K e extraídas com o mesmo volume de fenol/clorofórmio até a obtenção de uma fase aquosa transparente livre de proteínas. Após recuperação da fase aquosa, o DNA foi precipitado com 1/10 do volume de 3M Acetato de Sódio, pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto. Após centrifugação, o precipitado de DNA foi lavado com etanol 70% e ressuspensionado em TE (10 mM de Tris/HCl e 50 mM de EDTA pH 8,0) e armazenado a 4°C. A qualidade e quantidade do DNA obtido foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo e de leituras em espectrofotômetro, respectivamente.

### 3.4.2 Tratamento do DNA com Bissulfito de Sódio

Os DNAs das linhagens, do tecido normal e das 108 amostras de tumores primários de mama do Banco de tumores do Hospital do Câncer A.C. Camargo/Instituto Ludwig devidamente quantificados foram submetidos ao tratamento com o bissulfito de sódio de acordo com HERMAN et al. (1996). Para tanto, foi utilizado o Kit de tratamento “*CpG Genome Modification Kit*” da empresa *Intergen*. O tratamento foi iniciado pela desnaturação de 1 µg de DNA genômico com 0,21 M de NaOH por 10 minutos seguido do tratamento do DNA com bissulfito de sódio durante um período que variou de 16 a 20 horas a 55°C. Após o tratamento, o DNA foi purificado através de sua ligação à uma sílica de carga positiva seguido de várias lavagens com etanol e finalmente desligado da sílica e recuperado pela ressuspensão em 40 µl de TE (10 mM Tris/HCl e 1 mM EDTA pH 8,0). Os DNAs tratado foram armazenados em freezer -70°C.

### **3.4.3 Análise do padrão de metilação pela técnica do tratamento do DNA com bissulfito de sódio seguida de seqüenciamento**

Para a análise do padrão de metilação, das ADAMs que apresentaram expressão diferencial, pela técnica do tratamento do DNA com bissulfito de sódio seguida de seqüenciamento foram utilizados o tecido normal de borda de tumor e linhagens tumorais que apresentaram e linhagens tumorais que não apresentaram a expressão dos genes ADAM 12 e 33, diferencialmente expressos nas análises de expressão. As linhagens foram selecionadas analisando-se o padrão de expressão dos 2 genes e pela disponibilidade de material em nosso laboratório. As linhagens selecionadas para essa análise foram: PMC-42, BT20, MCF-7, MDA-MB-435, MDA-MB-468, SKBR5 e 734B.

Para tanto foram desenhados iniciadores para amplificação das ilhas de CpG dos genes ADAM 12 e 33. As seqüências dos iniciadores para a análise do padrão de metilação deste genes e os respectivos tamanhos dos fragmentos a serem amplificados estão mostrados na tabela 2. O desenho dos iniciadores é um passo de fundamental importância neste processo, pois a região onde os iniciadores foram desenhados não deveriam conter nenhum dinucleotídeo CG para que o anelamento específico dos iniciadores pudesse ocorrer independentemente do perfil de metilação da região. As reações de PCR de cada fragmento a ser amplificado foram padronizadas e uma reação de PCR *nested* foi utilizada na intenção de aumentar a especificidade e o rendimento da reação.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl por tubo contendo 1x tampão AmpliTaq Polimerase (*Perkin Elmer*), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, 0,5 U de AmpliTaq Gold (*Perkin Elmer*), 20 pmoles de iniciadores e 1-5 µl



de DNA (0,02-0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) previamente tratado com bissulfito de sódio. As reações *nested* foram realizadas nas mesmas condições utilizando de 1-5  $\mu\text{l}$  do produto da primeira reação. As reações foram realizadas com incremento de 2°C na temperatura de anelamento após o primeiro ciclo e com aumento de mais 2°C após o sexto ciclo, seguindo com esta temperatura de anelamento até o final da reação. Para a primeira reação de todos os fragmentos, a temperatura inicial de anelamento foi 48°C e para a reações *nested* foi de 46°C. As condições de amplificação de cada fragmento, tanto na primeira reação como na reação *nested*, foram: desnaturação inicial do DNA por 12 minutos a 94°C, seguida por 1 ciclo de desnaturação a 94°C por 3 minutos, temperatura inicial de anelamento por 3 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos, seguida por 5 ciclos de desnaturação a 94°C por 3 minutos, segunda temperatura de anelamento por 3 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos e, por fim, seguida de 35 ciclos sucessivos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, temperatura final de anelamento por 1 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final da ciclagem, as moléculas foram estendidas por 7 minutos a 72°C. A análise da amplificação foi feita sempre para as reações *nested* em gel de poliacrilamida 8%.

**Tabela 2** - Iniciadores para as reações de PCR com DNA tratado com Bissulfito de Sódio e o tamanho do fragmento a ser amplificado

Ilha	Iniciador	Seqüência	Tamanho
12	B12.2.1F B12.2.1R B12.2.2F B12.2.2R	5' GGT TTT TAG TGT AGT AGT TTT 3' 5' AAC CCA AAT ACT TCT TAC AAT C 3' 5' TTG AGT TTT TTT AGT TTT TTA TTT TTA A 3' 5' ACC CTT TTC TAA ATC CAA ATC 3'	715pb
33	B33.1F B33.1R B33.2F B33.2R	5' AGG GAG TTA TGT TTT TTG TTT TGT TAG 3' 5' ATT ACC TAA ACC TTC CTA TCC TTA 3' 5' TTG ATT TGA GTT TTG AGT AGA ATT TAT 3' 5' ACA CCC AAT ACA AAT AAA TAA CC 3'	742 pb

Os fragmentos amplificados foram purificados em gel de agarose 1,0% utilizando *QIAquick gel Extraction Kit (Qiagen)*, seguindo as especificações do fabricante, e clonados. Para a clonagem dos fragmentos foi utilizado o pGEM-T-Easy (Promega) segundo instruções do fornecedor. O produto de ligação foi utilizado para transformação de bactérias *E. coli* (JM109 ou DH5 $\alpha$ ) eletrocompetentes tratadas com glicerol 10%, que após a transformação foram selecionadas em placa de petri contendo meio Circle Grow e ampicilina. Para a seleção dos clones a serem seqüenciados foi realizado um *screening* de 12 colônias de cada placa através de uma reação de PCR, onde em cada tubo uma colônia selecionada foi palitada. As reações foram realizadas em um volume final de 20  $\mu$ l contendo 1X tampão de Taq Polimerase (Invitrogen), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTPs, 0,5 U Taq polimerase (Invitrogen) e 20 pmoles de iniciadores específicos para o plasmídeo (*FOWARD*: 5'CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC 3' e *REVERSE*: 5'TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C 3'). As condições da reação foram: desnaturação por 4 minutos a 94°C e em seguida submetido a 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final da ciclagem as moléculas foram estendidas por 7 minutos a 72°C.

O seqüenciamento dos fragmentos de DNA tratados com bissulfito de sódio foi realizado segundo a técnica de terminação com dideoxynucleotídeos descrita por SANGER et al. (1977), utilizando-se o *Kit Big Dye terminator (Applied Biosystems)* seguindo as instruções do fornecedor. Os produtos do seqüenciamento foram submetidos à eletroforese por capilaridade no seqüenciador automático de DNA ABI 3100 (*Applied Biosystems*). Para cada fragmento clonado, foram seqüenciadas 5 colônias, cada uma representando um alelo.

#### **3.4.4 Tratamento das linhagens tumorais com o agente desmetilante 5'-AZA-2'-deoxicitidina.**

Para confirmar o papel da metilação na regulação da expressão dos genes ADAM 12 e 33, as linhagens MCF-7 e SKBR-3, que normalmente não expressam estes genes, foram tratadas com o agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina. Uma quantidade de  $10^6$  células foi adicionada a placas de 100mm e cultivada por 48 horas. Após este período as linhagens foram tratadas com o agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicitidina. A linhagem tumoral MCF-7 foi tratada com 1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M e a linhagem SKBR3 com 0,75  $\mu$ M e 1  $\mu$ M da droga. Após um período de 2 a 6 dias as células foram lavadas com PBS e o DNA e o RNA total foram extraídos.

A partir do RNA obtido das linhagens tratadas o cDNA foi sintetizado e reações de RT-PCR para as ADAMs 12 e 33 foram realizadas conforme descrito no item 3.3.4. Os produtos foram inicialmente visualizados em gel de poliacrilamida 8% conforme descrito no item 3.3.5. Para a confirmação da re-expressão os produtos de PCR foram então transferidos para uma membrana de Nylon conforme descrito no item 3.3.6 e hibridizados com as sondas específicas para estes genes.

### **3.4.5 Análise do padrão de metilação pela técnica do tratamento de dna com bissulfito de sódio seguida de pcr específico para metilação (MSP).**

Os DNAs das 108 amostras tumorais e 10 tecidos normais de borda de tumor previamente tratados com bissulfito de sódio foram utilizados para a análise do padrão de metilação das ADAMs 12 e 33 através da técnica de PCR específico para Metilação (MSP). Esta técnica consiste na amplificação de fragmentos utilizando iniciadores específicos para as situações metiladas (M) e não metiladas (U).

Um passo muito importante nesta técnica é o desenho dos iniciadores específicos, que devem ser posicionados englobando dinucleotídeos presentes em sítios de ligação de fatores de transcrição e que sejam importantes no processo de regulação da expressão nestes genes. Para tanto, as ilhas de CpG de cada gene foram analisadas quanto a presença de sítios de ligação do fator de transcrição SP1 através da ferramenta TESS (*Transcription Element Search System*) disponibilizada na Internet pelo Laboratório de Biologia Computacional e Informática da Universidade da Pensilvânia (<http://www.cbil.upenn.edu/tess>) e os dinucleotídeos englobados por estes sítios foram localizados.

Analisando a localização dos dinucleotídeos CpG presentes em sítios de ligação do fator de transcrição SP1 e os padrões de metilação das regiões de interesse em tecido normal e nas diferentes linhagens tumorais analisadas, foram selecionados aqueles dinucleotídeos em sítios do fator de transcrição que se apresentavam diferencialmente metilados no tecido normal e nas linhagens tumorais. Desta forma, evitando a formação de tetraplex de guanidina (devido a grande concentração de CG da área) e observando a homogeneidade entre as temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos, os iniciadores foram desenhados englobando estes dinucleotídeos.

A seqüência dos iniciadores, a temperatura de anelamento e os dinucleotídeos englobados por cada iniciador estão resumidos na tabela 3

As reações de MSP foram então padronizadas variando-se a temperatura de anelamento, a concentração final de  $MgCl_2$  na reação e o tempo de duração dos ciclos. As reações de MSP foram realizadas em um volume final de 25  $\mu$ l com os seguintes reagentes: 0,24 mM de dNTPs (*Amersham Bioscience*); 0,32  $\mu$ M de cada iniciador (*Forward e Reverse*); 1,5 mM de  $MgCl_2$  (*Applied Biosystem*); 1U de Taq Platinum (*Invitrogen*) e 1 $\mu$ l de DNA tratado com bissulfito de sódio. As condições de amplificação foram: 95°C por 10 minutos para a ativação da enzima seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundo, seguidos de 30 segundos de anelamento a 65°C e por 30 segundos a 72°C de extensão, e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Como controles positivos para as situações metiladas foi utilizada a linhagem MCF-7 e para a situação não metilada a linhagem HB4a. As reação de MSP foram analisadas em géis de poliacrilamida 8%.

**Tabela 3:** Relação dos iniciadores para as reações de MSP

Nome	Seqüência	TM	CpGs
Situação Metilada			
12.2MF2	5' TTT GGG CGT TTA GGG TCG G 3'	69,7°C	6/7
12.2MF3	5' AAA AGT TGG ATC GTG TCG TCG 3'	68,9°C	20/21/22
12.2MR1	5' CCA AAA TCC CGC CCC GAA 3'	69,1°C	41/42
12.2MR2	5' ACC AAA CGC ACA TAC GAC GA 3'	68,3°C	6/7
332MF2	5' TTT ATC GTT TTA TTT TAT TAC GTC GCG GT 3'	70,9°C	10/11/12/13
33MF3	5' GTT CGG GTC GGT TAT TCG AGG 3'	72,8°C	17/18/19
33MR1	5' CCA CCT CCC ACC GCC CG 3'	75,6°C	40/41
33MR2	5' CCT CCC CTC CCC GCC AA 3'	73,1°C	37
Situação Não Metilada			
12.2UF2	5' TTT TTT GGG TGT TTA GGG TTG G 3'	67,6°C	6/7
12.2UF3	5' TGA AAA GTT GGA TTG TGT TGTT G 3'	67,0°C	22/21/22
12.2UR1	5' CCA AAA TCC CAC CCC AAA C 3'	68,3°C	41/42
12.2UR2	5' CTA CCA AAC ACA CAT ACA ACA AC 3'	68,2°C	6/7
33UF2	5' TGT TTA TTG TTT TAT TTT ATT ATG TTG TGG T 3'	67,7°C	10/11/12/13
33UF3	5' AGG GAT GGT TTG GGT TGG TTA TTT G 3'	72,5°C	17/18/19
33UR1	5' CCC ACC TCC CAC CAC CCA 3'	73,6°C	40/41
33UR2	5' ACC TCC CCT CCC CAC CAA 3'	71,3°C	37

### 3.5 CORRELAÇÃO ENTRE O PADRÃO DE METILAÇÃO NOS TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA E OS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS PACIENTES.

#### 3.5.1 Obtenção dos dados clínico-patológicos.

Para cada um dos casos foram levantados os dados clínico-patológicos referentes às pacientes através da análise dos prontuários arquivados no “Serviço de Arquivo Médico” (SAME) do Hospital do Câncer A.C. Camargo com o auxílio da Dra. Isabela W. Cunha do Departamento de Anatomia-Patológica e do Dr. José A. Rinck do Departamento de Oncologia Clínica do mesmo hospital.

Os dados clínicos levantados incluem: a data de nascimento, a data do diagnóstico da doença, realização de quimioterapia neoadjuvante antes da cirurgia, estágio da doença no momento da avaliação clínica, o estadiamento do tumor

segundo a Classificação TNM da União Internacional contra o Câncer (UICC), tamanho do tumor, classificação do grau histológico conforme o SBR (Sistema de Bloom & Richardson), a presença de linfonodos positivos, presença dos marcadores moleculares ER (receptor de estrógeno), c-erbB2 e p53, a presença de metástases no momento da cirurgia, a presença de recidivas a distância e a sobrevida da paciente. O tempo mínimo de seguimento das pacientes foi de 3 anos. As estratégias para a detecção de metástases à distância incluíram: cintilografia óssea, ultra-sonografia de fígado, tomografia computadorizada e radiografia da região torácica.

### **3.5.2 Análise estatística dos dados.**

A análise estatística da associação entre as variáveis qualitativas foi realizada utilizando o programa SPSS 12.0 (*Statistical Package for Social Science*) através do teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher e a análise de sobrevida foi realizada pelo método de Kaplan-Meier, com o teste de log-rank para a comparação das curvas. Para todos os teste estabeleceu-se um erro  $\alpha= 5\%$ , ou seja, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p<0,05$ . Estas análises foram realizadas com o auxílio da Dra. Karina B. Ribeiro do Departamento de Registro Médico Hospitalar do Hospital do Câncer A.C. Camargo.

## ***RESULTADOS***

---



## 4 RESULTADOS

### 4.1 IDENTIFICAÇÃO DE ILHAS DE CpG NA REGIÃO PROMOTORA DOS DIFERENTES MEMBROS DA FAMÍLIA ADAM.

Para a identificação de ilhas CpG na região promotora dos diferentes membros da família ADAM descritos em humanos, as respectivas seqüências de mRNAs foram alinhadas contra a seqüência do genoma humano utilizando o programa BLAST N, como descrito no item 3.2 do *Material e Métodos*.

Os membros da família ADAM descritos em humanos estão listado na tabela 4 juntamente com os números de acesso no GenBank das seqüências de mRNA, a localização cromossômica e o número de acesso no GenBank do clone genômico em que o início da seqüência do mRNA foi alinhado. Através dessas análises foi possível mapear na seqüência genômica humana todos os 21 membros descritos para humanos.

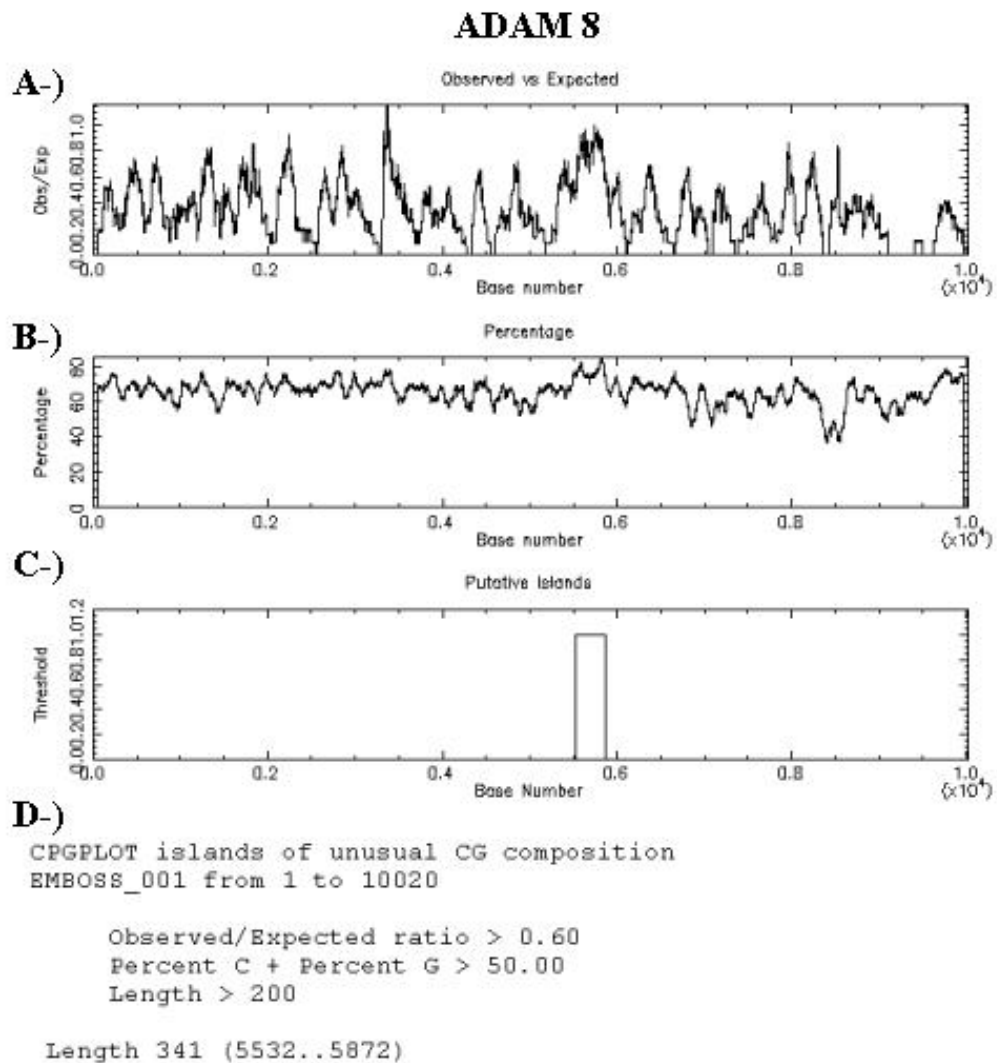
A partir destes alinhamentos foi selecionada na seqüência genômica uma região de 5Kb *upstream* e 5Kb *downstream* do primeiro nucleotídeo alinhado com a seqüência de mRNA. A região genômica de 10Kb, que compreende a região promotora e os primeiros exons dos diferentes membros, foi então utilizada para a identificação das ilhas de CpG através do programa *CpGplot*. Esse programa analisa os parâmetros que definem uma ilha de CpG. Esses parâmetros são uma região maior que 200bp, ter uma razão entre a freqüência observada e esperada de dinucleotídeos

CpG maior ou igual a 0,6 e conter pelo menos 50% de C+G (GARDINER-GARDEN e FROMMER 1987).

Foi possível identificar ilhas de CpG nos fragmentos genômicos correspondentes a 9 dos 21 membros analisados. Os resultados obtidos utilizando o programa CpG plot estão representados nas figuras 6 a 14. Os membros que apresentaram ilhas de CpG em sua região promotora e/ou nos primeiros exons foram: ADAMs 8, 10, 12, 15, 17, 19, 22, 23 e 33. Como mencionado anteriormente, foi demonstrado em nosso laboratório que o gene ADAM 23 apresenta ilha de CpG em sua região promotora e a análise do padrão de expressão e metilação deste membro foi realizada paralelamente a este projeto, e excluída de nossas análises.

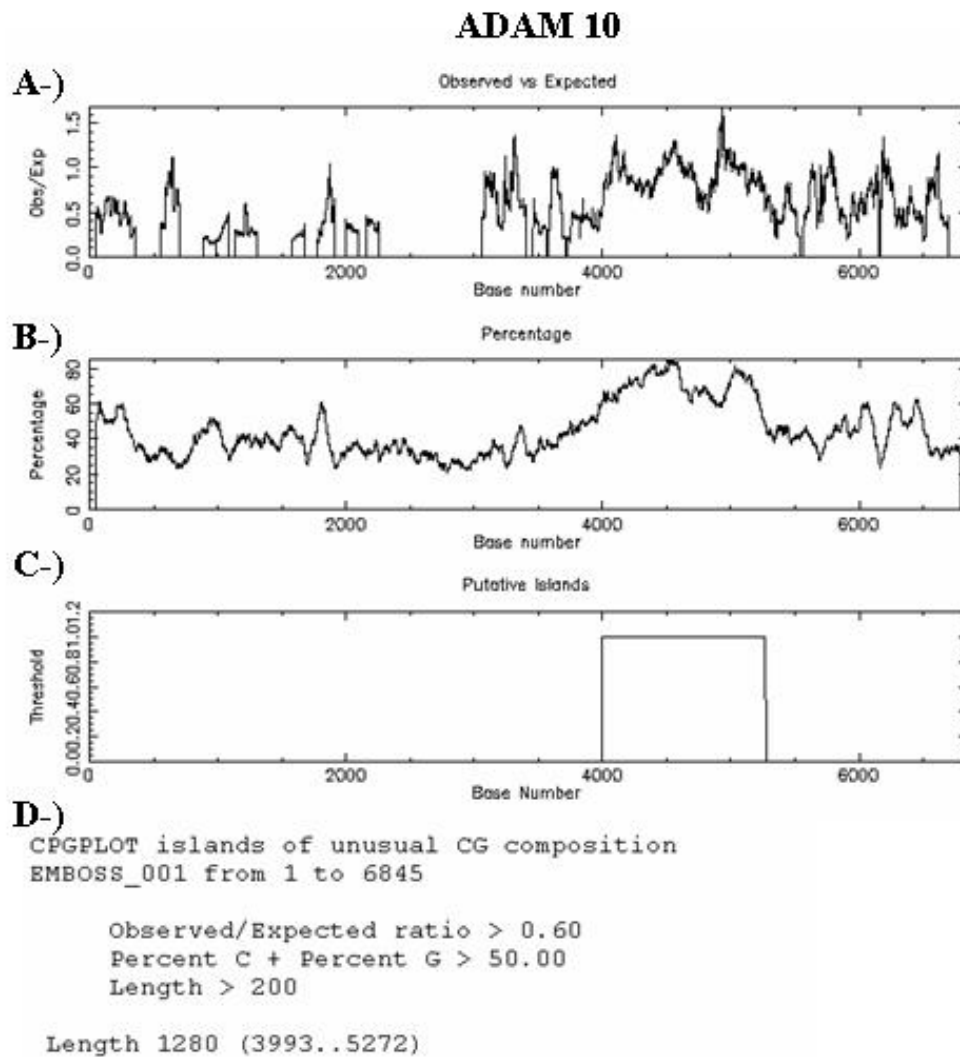
**Tabela 4:** Membros da Família ADAM descritos em humanos, número de acesso no GenBank, localização cromossômica e o número de acesso do clone genômico no qual está localizado o primeiro nucleotídeo do mRNA.

ADAM	Número de acesso do mRNA	Localização Cromossômica	Número de acesso do clone genômico
1	Y09232	12q24	AC003029
2	U52370	8p11.2	AC 136365
3	X89657	8p21-p12	AC007861
7	AF215824	8p21.1	AC024958
8	D26579	10q26	AL592071
9	U41766	8p11.21	AC105089
10	AF009615	15q21	AC091046
11	D17390	17q21.3	AC005180
12	AF023476	10q26	AL589787
15	U41767	1q21.3	AC021890
17	U69611	2q25	AC073195
18	AJ133004	8p11.22	AC104998
19	Y13786	5q32	AC008676
20	AF029899	14q24.1	AL357153
21	AF158644	14	AI391223
22	AF073291	7q21	AC005075
23	AB009672	2q33	AC009225
28	AJ242015	8p21.1	AC044891
29	AF171929	4q343	AC105914
30	AF171933	1p13-p11	AL359752
33	AB055891	20p13	AP002898



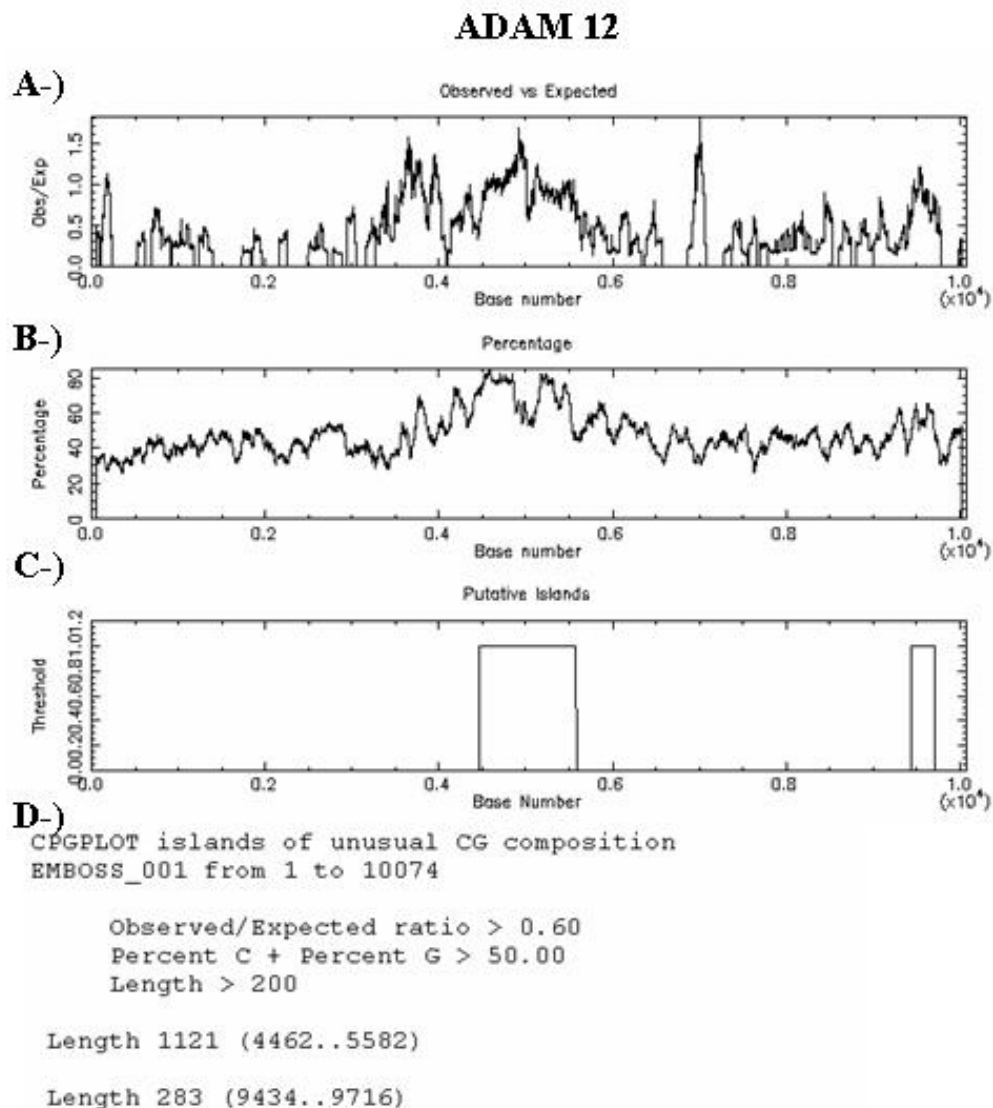
**Legenda:** (A) representação gráfica da razão entre o observado/esperado da frequência de dinucleotídeos CG em toda a extensão do fragmento genômico; (B) representação gráfica da porcentagem de CG em toda a extensão do fragmento genômico; (C) representação gráfica da localização da Ilha de CpG no fragmento genômico; e (D) resultado contendo o tamanho e a localização da ilha de CpG em relação ao fragmento genômico e os parâmetros utilizados pelo programa *CpGplot*.

**Figura 6** - Identificação de ilhas de CpG na região promotora e primeiros exons do gene ADAM8 através do programa *CpGplot*.



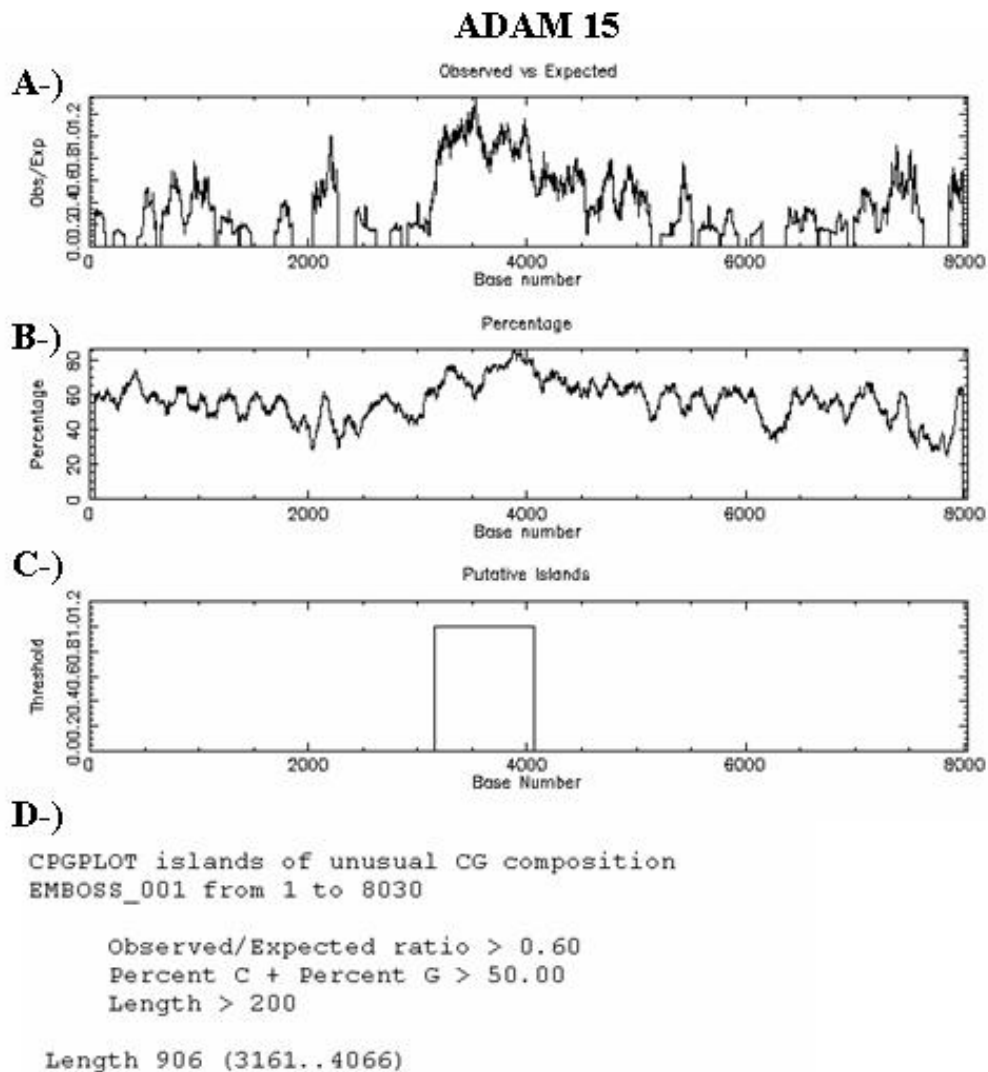
**Legenda:** (A) representação gráfica da razão entre o observado/esperado da frequência de dinucleotídeos CG em toda a extensão do fragmento genômico; (B) representação gráfica da porcentagem de CG em toda a extensão do fragmento genômico; (C) representação gráfica da localização da Ilha de CpG no fragmento genômico; e (D) resultado contendo o tamanho e a localização da ilha de CpG em relação ao fragmento genômico e os parâmetros utilizados pelo programa *CpGplot*.

**Figura 7** - Identificação de ilhas de CpG na região promotora e primeiros exons do gene ADAM10 através do programa *CpGplot*.



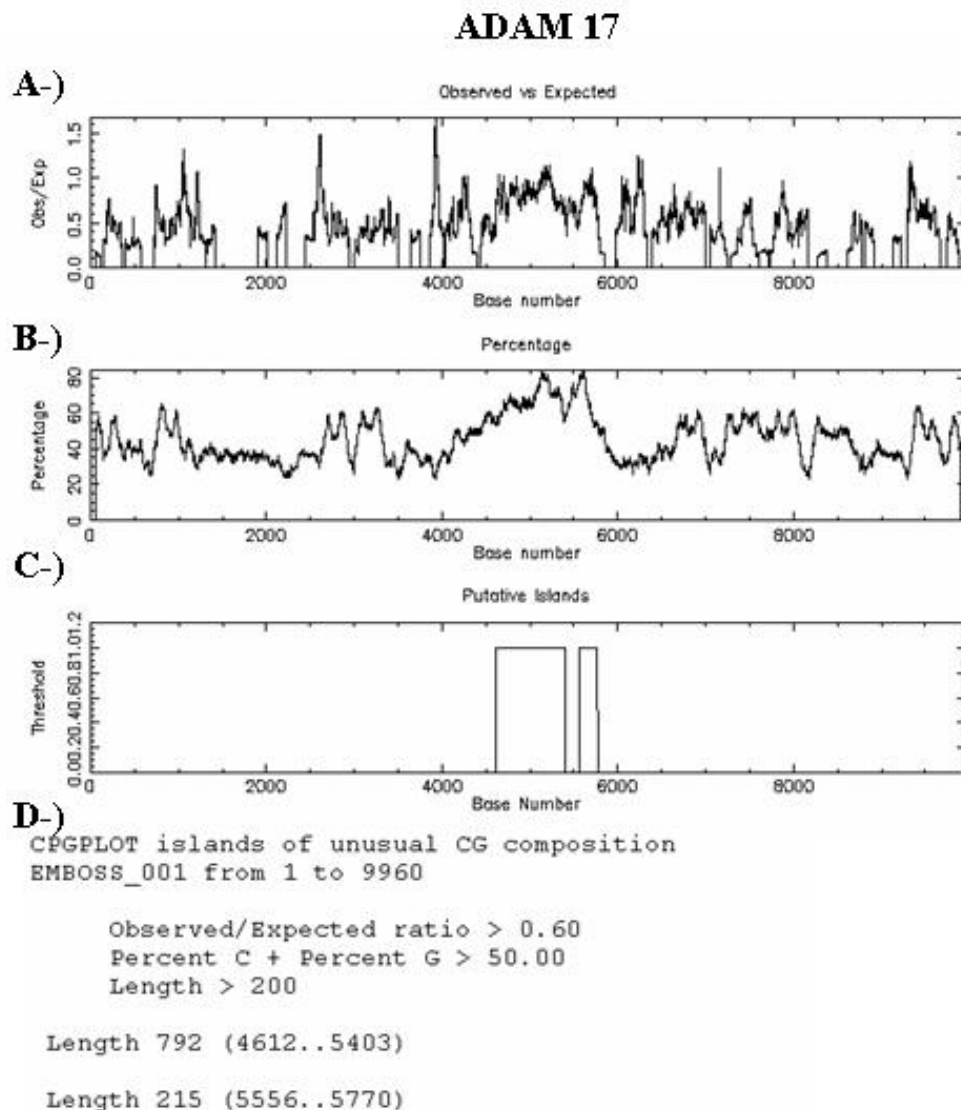
**Legenda:** (A) representação gráfica da razão entre o observado/esperado da frequência de dinucleotídeos CG em toda a extensão do fragmento genômico; (B) representação gráfica da porcentagem de CG em toda a extensão do fragmento genômico; (C) representação gráfica da localização da Ilha de CpG no fragmento genômico; e (D) resultado contendo o tamanho e a localização da ilha de CpG em relação ao fragmento genômico e os parâmetros utilizados pelo programa *CpGplot*.

**Figura 8** - Identificação de ilhas de CpG na região promotora e primeiros exons do gene ADAM12 através do programa *CpGplot*.



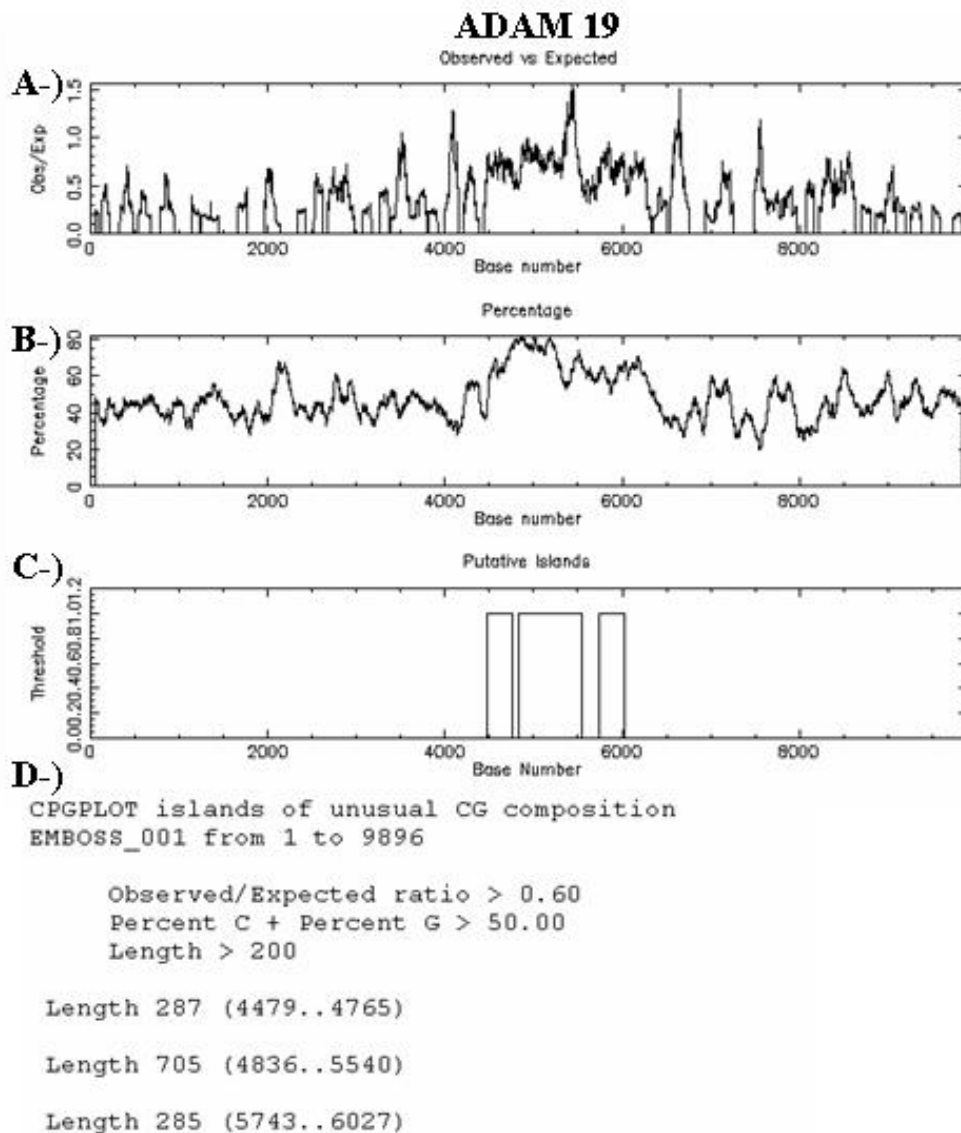
**Legenda:** (A) representação gráfica da razão entre o observado/esperado da frequência de dinucleotídeos CG em toda a extensão do fragmento genômico; (B) representação gráfica da porcentagem de CG em toda a extensão do fragmento genômico; (C) representação gráfica da localização da Ilha de CpG no fragmento genômico; e (D) resultado contendo o tamanho e a localização da ilha de CpG em relação ao fragmento genômico e os parâmetros utilizados pelo programa *CpGplot*.

**Figura 9** - Identificação de ilhas de CpG na região promotora e primeiros exons do gene ADAM15 através do programa *CpGplot*.



**Legenda:** (A) representação gráfica da razão entre o observado/esperado da frequência de dinucleotídeos CG em toda a extensão do fragmento genômico; (B) representação gráfica da porcentagem de CG em toda a extensão do fragmento genômico; (C) representação gráfica da localização da Ilha de CpG no fragmento genômico; e (D) resultado contendo o tamanho e a localização da ilha de CpG em relação ao fragmento genômico e os parâmetros utilizados pelo programa *CpGplot*.

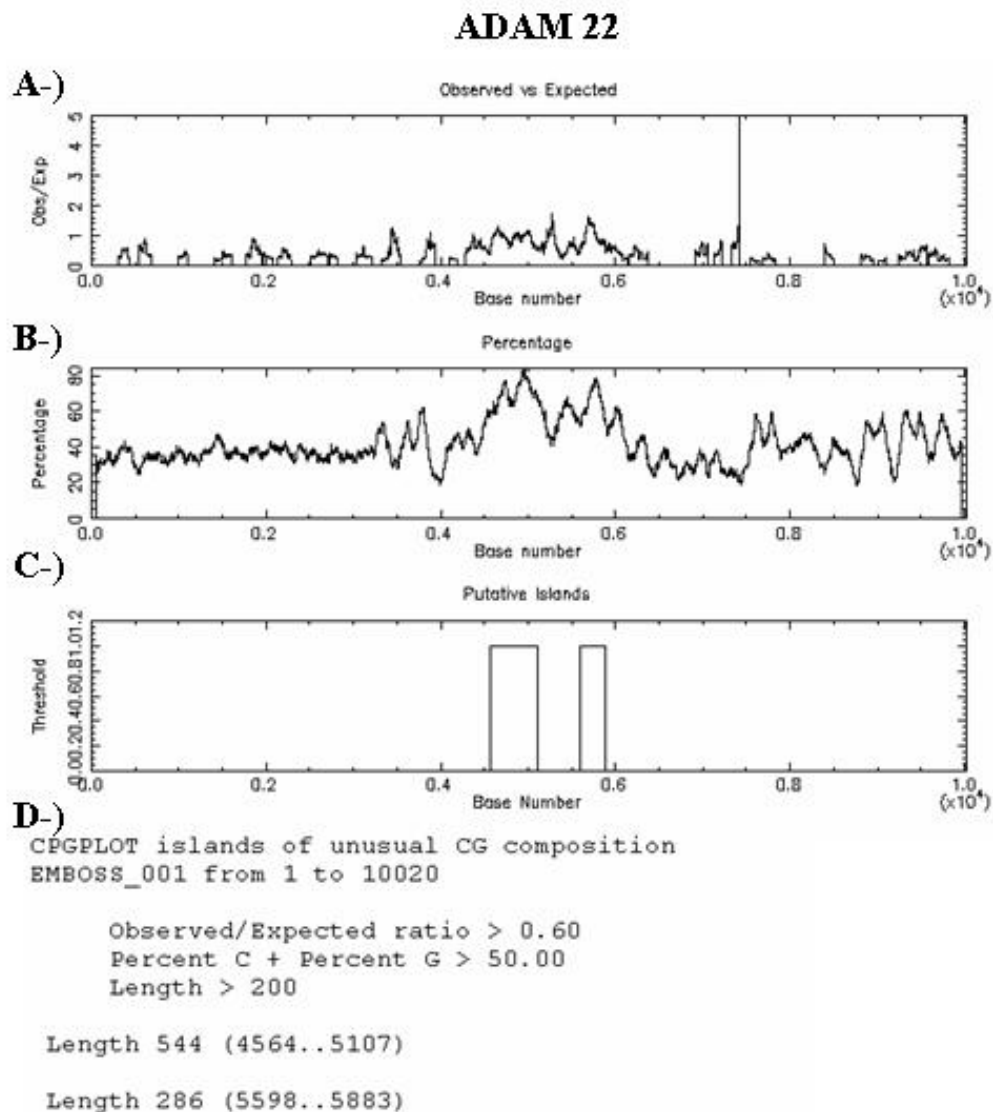
**Figura 10** - Identificação de ilhas de CpG na região promotora e primeiros exons do gene ADAM17 através do programa *CpGplot*.



**Legenda:** (A) representação gráfica da razão entre o observado/esperado da frequência de dinucleotídeos CG em toda a extensão do fragmento genômico; (B) representação gráfica da porcentagem de CG em toda a extensão do fragmento genômico; (C) representação gráfica da localização da Ilha de CpG no fragmento genômico; e (D) resultado contendo o tamanho e a localização da ilha de CpG em relação ao fragmento genômico e os parâmetros utilizados pelo programa *CpGplot*.

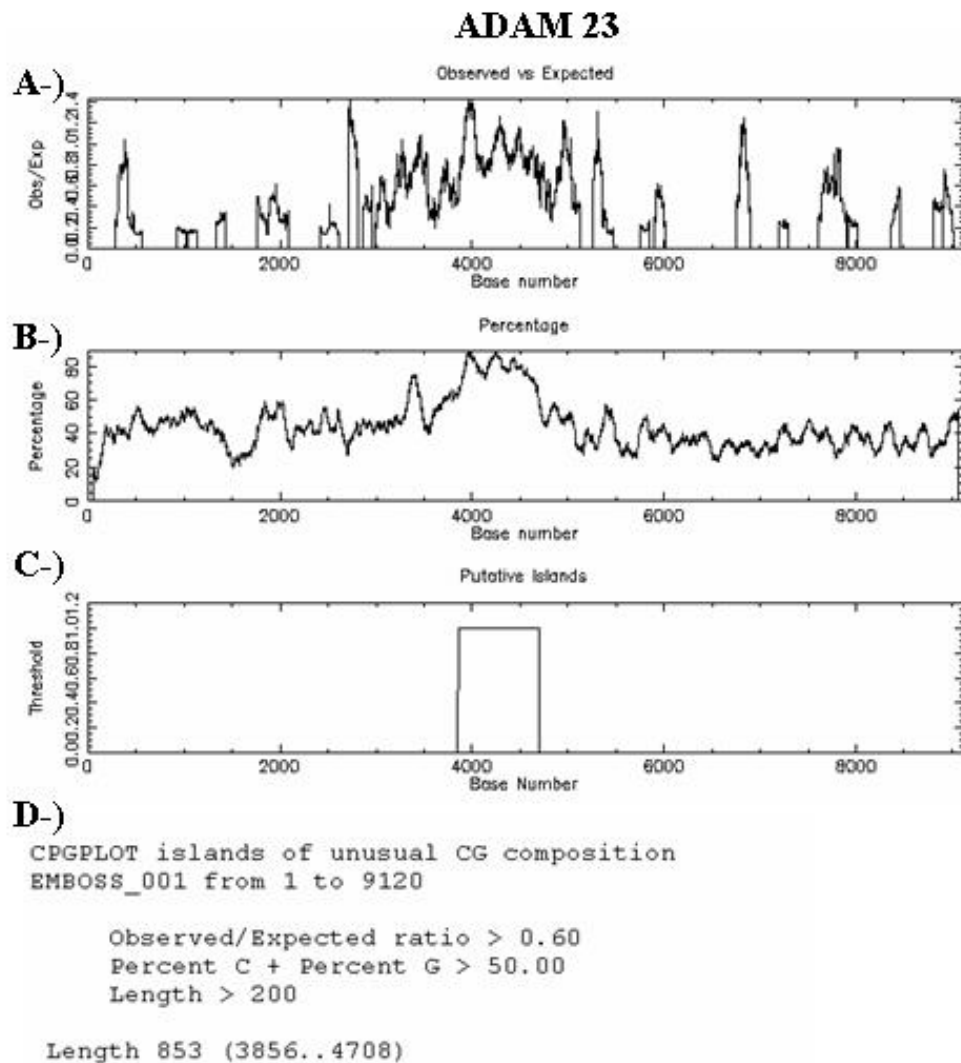
**Figura 11** - Identificação de ilhas de CpG na região promotora e primeiros exons do gene ADAM19 através do programa *CpGplot*.





**Legenda:** (A) representação gráfica da razão entre o observado/esperado da frequência de dinucleotídeos CG em toda a extensão do fragmento genômico; (B) representação gráfica da porcentagem de CG em toda a extensão do fragmento genômico; (C) representação gráfica da localização da Ilha de CpG no fragmento genômico; e (D) resultado contendo o tamanho e a localização da ilha de CpG em relação ao fragmento genômico e os parâmetros utilizados pelo programa *CpGplot*.

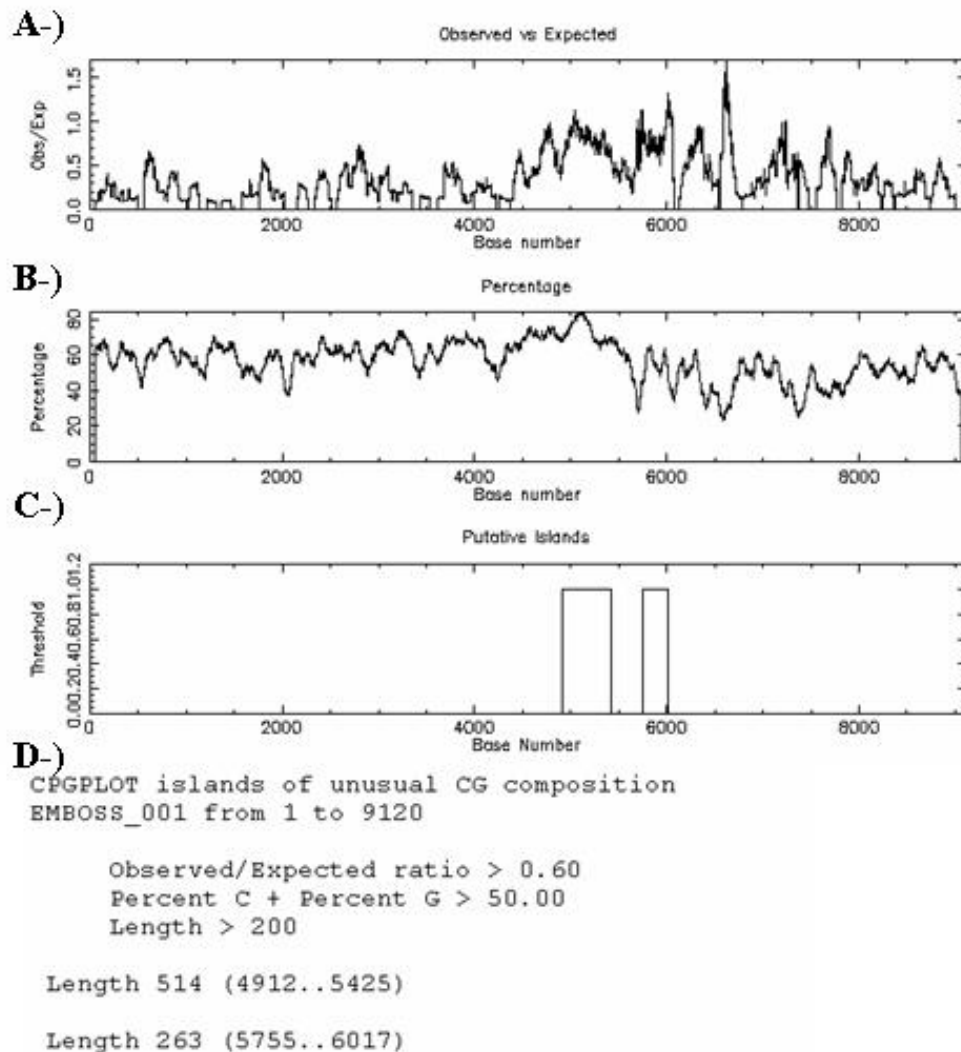
**Figura 12** - Identificação de ilhas de CpG na região promotora e primeiros exons do gene ADAM22 através do programa *CpGplot*.



**Legenda:** (A) representação gráfica da razão entre o observado/esperado da frequência de dinucleotídeos CG em toda a extensão do fragmento genômico; (B) representação gráfica da porcentagem de CG em toda a extensão do fragmento genômico; (C) representação gráfica da localização da Ilha de CpG no fragmento genômico; e (D) resultado contendo o tamanho e a localização da ilha de CpG em relação ao fragmento genômico e os parâmetros utilizados pelo programa *CpGplot*.

**Figura 13** - Identificação de ilhas de CpG na região promotora e primeiros exons do gene ADAM23 através do programa *CpGplot*.

### ADAM 33



**Legenda:** (A) representação gráfica da razão entre o observado/esperado da frequência de dinucleotídeos CG em toda a extensão do fragmento genômico; (B) representação gráfica da porcentagem de CG em toda a extensão do fragmento genômico; (C) representação gráfica da localização da Ilha de CpG no fragmento genômico; e (D) resultado contendo o tamanho e a localização da ilha de CpG em relação ao fragmento genômico e os parâmetros utilizados pelo programa *CpGplot*.

**Figura 14** - Identificação de ilhas de CpG na região promotora e primeiros exons do gene ADAM33 através do programa *CpGplot*.

Cada uma das ilhas identificadas possui tamanhos e porcentagens de CG diferentes que estão listadas na tabela 5. Podemos observar que a porcentagem de CG nas diferentes ilhas é alta e varia de 62% na ilha da ADAM 22 a 75% na ilha da ADAM 8. Os tamanhos destas ilhas também variam de 341bp no gene da ADAM 8 até 1280bp no gene da ADAM 10. Para as seqüências que apresentaram mais de uma ilha CpG, foram selecionadas para análise as que se localizavam na região promotora logo acima do primeiro nucleotídeo alinhado.

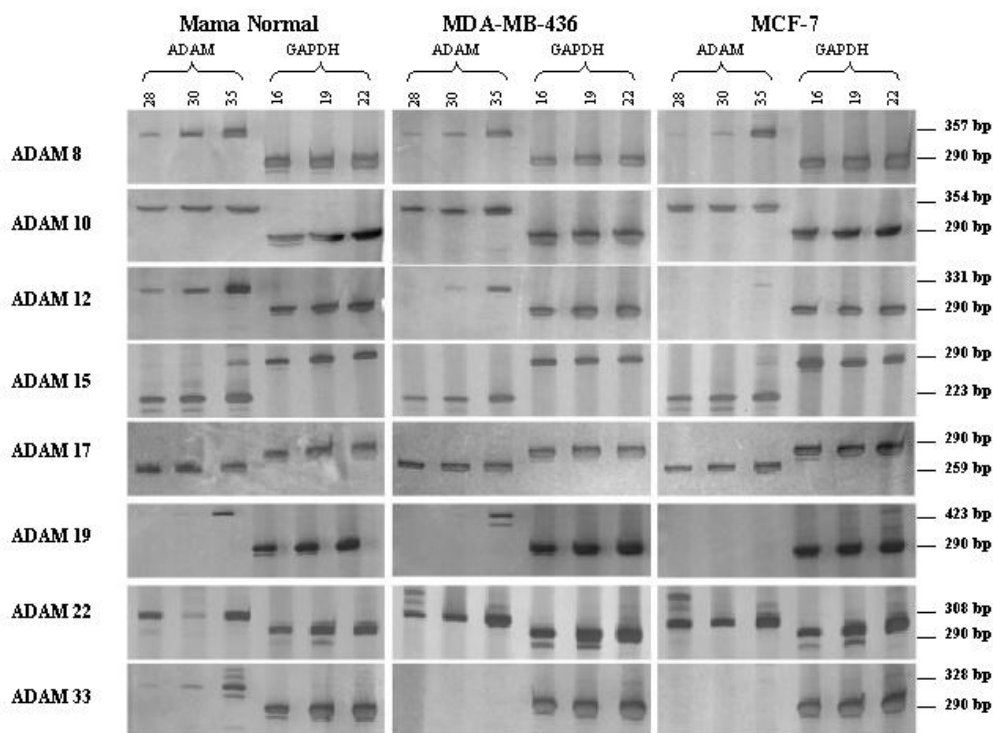
**Tabela 5** - Características das ilhas de CpG identificadas na região genômica correspondente à região promotora e primeiros exons dos diferentes membros da família ADAM.

ADAM	%CG	Tamanho (pb)
8	75	341
10	70	1280
12	72	1121
15	67	906
17	64	792
19	71	705
22	62	544
23	69	853
33	73	514

#### **4.2 ESTUDO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DOS DIFERENTES MEMBROS DA FAMÍLIA ADAM QUE APRESENTARAM ILHAS DE CpG EM SUAS REGIÕES PROMOTORAS.**

O RT-PCR semi-quantitativo foi conduzido conforme descrito no item **3.3.4** do *Material e Métodos* para avaliar a expressão dos diferentes membros da família ADAM no tecido normal de mama e nas linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-436, que estavam disponíveis para cultivo no laboratório no início desse trabalho.

Dentre as 8 ADAMs que possuem ilhas de CpG em seus promotores apenas as ADAMs 12 e 33 apresentaram alterações no padrão de expressão em nossos ensaios preliminares (figura 15). O gene ADAM 12 apresentou uma redução significativa em sua expressão nas duas linhagens tumorais em relação ao tecido normal e o gene ADAM 33 se mostrou expresso apenas no tecido normal de mama.



**Figura 15** - RT-PCR semi-quantitativo. Géis de poliacrilamida representando a expressão dos diferentes genes da Família ADAM analisados no tecido normal e nas linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-436.

Com base nesses resultados preliminares, o padrão de expressão dos genes ADAM 12 (isoformas L e S) e ADAM 33 também foi analisado por RT-PCR em um painel ampliado composto por 20 linhagens tumorais de mama gentilmente cedidas pelo Dr. Michael O'Hare do Instituto Ludwig de Londres. Os fragmentos de RT-PCR foram transferidos conforme descrito por SOUTHERN (1975) para uma

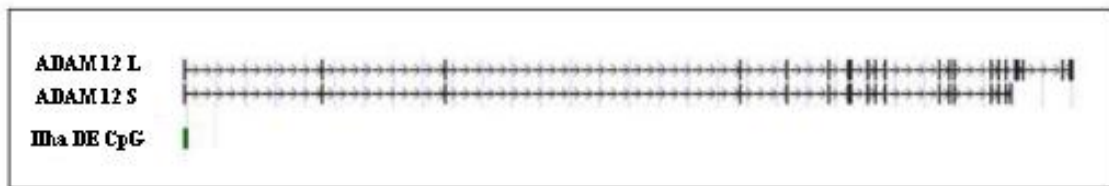
membrana de Nylon. A hibridização da membrana foi realizada com sondas específicas para as ADAMs 12L, 12S, 33 e para o gene constitutivo GAPDH e as mesmas foram expostas ao filme fotográfico que foi posteriormente revelado. A intensidade das bandas referentes à expressão de cada ADAM e do controle constitutivo GAPDH foram obtidas utilizando o *software LabWorks* e a diferença de expressão foi calculada como descrito no item **3.3.7.** do Material e Métodos

Na Figura 16 estão representadas as duas isoformas do gene ADAM 12 e a posição da ilha de CpG na região promotora. No caso da isoforma L, não foi detectada expressão em 10 das 20 linhagens tumorais estudadas (50,0%), foram observados níveis reduzidos de expressão em relação ao tecido normal em 5 das 20 linhagens tumorais (25,0%) e não foi observada diferença de expressão em 5 das 20 linhagens tumorais (25,0%) (figura 17). A quantificação desta diferença de expressão revelou uma diminuição da expressão deste gene que varia de 5 vezes na linhagem tumoral PMC-42 a 353,3 vezes na linhagem tumoral SKBR-3 (Tabela 6).

No caso do estudo de expressão da isoforma S, não foi detectada expressão em 13 das 20 linhagens tumorais estudadas (65,0%), foram observados níveis reduzidos de expressão em relação ao tecido normal em 4 das 20 linhagens tumorais (20,0%) e não foi observada diferença de expressão em relação ao tecido normal em 3 das 21 linhagens tumorais (15,0%) (Figura 17). A quantificação da diferença de expressão revelou uma diminuição da expressão deste gene que varia de 3,9 vezes na linhagem tumoral MDA-MB-134 a 5,5 vezes nas linhagens tumorais MDA-MB-175 e MCF-7 (Tabela 6).

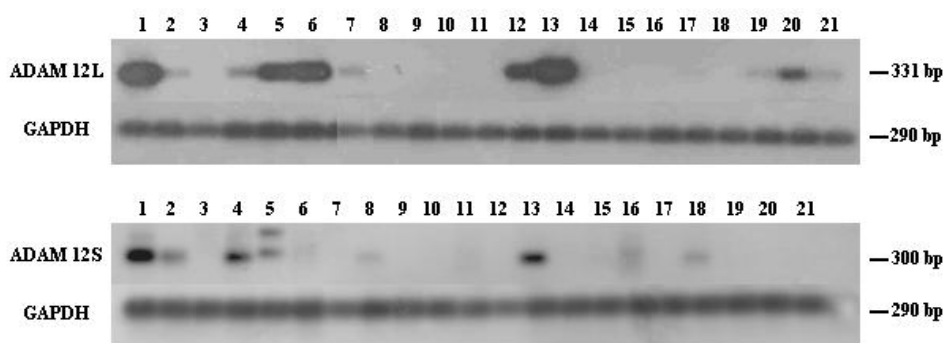
Nesta análise podemos observar:

- a ausência da expressão de ambas isoformas da ADAM 12 em 7 das 20 linhagens tumorais estudadas (35,0%),
- a redução da expressão das 2 isoformas em 2 das 20 linhagens tumorais estudadas (10%),
- 6 das 20 linhagens tumorais estudadas (30,0%) apresentaram, mesmo que reduzido em relação ao tecido normal, somente a expressão da isoforma L,
- 3 das 20 linhagens tumorais (15,0%) apresentaram, mesmo que reduzidas em relação ao tecido normal, apenas a expressão da isoforma S e
- 2 das 20 linhagens tumorais estudadas (10,0%) não apresentaram diferença na expressão em relação ao tecido normal de nenhuma isoforma.



**Legenda:** a composição de exons (□) e introns (<) das diferentes isoformas (ADAM12L: isoforma longa; ADAM12S: isoforma curtaB).

**Figura 16** - Representação gráfica das duas isoformas do gene ADAM 12 e a posição da ilha de CpG na região promotora.



**Legenda:** Southern Blot das reações de RT-PCR da ADAM 12 isoforma L (painel superior), da isoforma S (painel inferior) e do gene constitutivo GAPDH no painel de linhagens tumorais de mama. 1- mama normal; 2- MDA-MB-134; 3- MDA-MB-415; 4- MDA-MB-175; 5- MDA-MB-436; 6- MDA-MB-435; 7- MDA-MB-468; 8- MDA-MB-456; 9- BT-20; 10- ZR-7530; 11- ZR-751; 12- CAMA-1; 13- GI101; 14- 734B; 15- CAL51; 16- MCF-7; 17- SKBR-7; 18- SKBR-5; 19- SKBR-3; 20- PMC42 e 21- DU4475.

**Figura 17** - Southern Blot das reações de RT-PCR das diferentes isoformas da ADAM 12 e do gene constitutivo GAPDH no painel de linhagens tumorais de mama.

**Tabela 6** - Dados de densitometria utilizando o *software LabWorks* do gene ADAM 12 em painel de linhagem tumoral de mama. (N/T) número de vezes em que a expressão do gene está diminuída na linhagem tumoral em relação ao tecido normal.

Amostra	Linhagem	Razão N/T ADAM 12 S	Razão N/T ADAM 12 L
2	MDA-MB-134	3,9	52,1
3	MDA-MB-415	0	0
4	MDA-MB-175	5,5	16,5
5	MDA-MB-436	2,4	0,9
6	MDA-MB-435	0	1,0
7	MDA-MB-468	0	2,9
8	MDA-MB-453	4,2	0
9	BT-20	0	0
10	ZR-7530	0	0
11	ZR-751	0	0
12	CAMA-1	0	2,9
13	GI101	1,2	1,7
14	734B	0	0
15	CAL51	0	0
16	MCF-7	5,5	0
17	SKBR-7	0	0
18	SKBR-5	1,1	0
19	SKBR-3	0	353,9
20	PMC42	0	5,0
21	DU4475	0	119,1

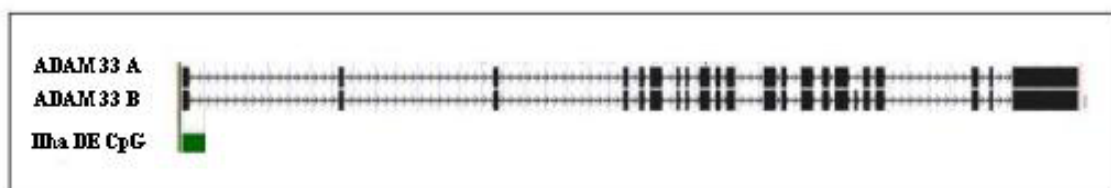


No caso da ADAM 33, os iniciadores utilizados analisaram a expressão das 2 isoformas descritas simultaneamente e não permitem distinguir as duas isoformas, uma vez que estão localizados em exons comuns as duas. Na figura 18 estão representadas as duas isoformas do gene ADAM 33 e a posição da ilha de CpG na região promotora.

A análise da diferença de expressão da ADAM 33 entre o tecido normal e o painel de 20 linhagens tumorais revelou:

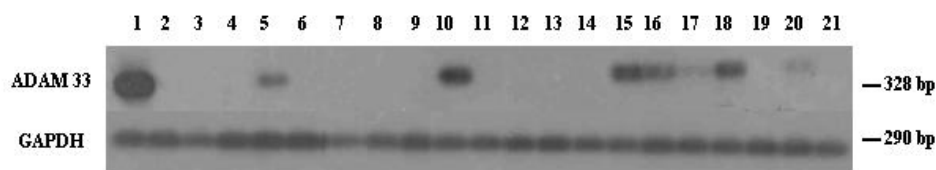
- uma diminuição nos níveis de expressão em 6 das 20 linhagens estudadas (30,0%),
- uma completa inibição da expressão em 13 das 20 linhagens tumorais (65,0%) e
- a ausência de diferença de expressão em relação ao tecido normal em 1 das 20 linhagens tumorais estudadas (5,0%) (figura 19).

A diminuição nos níveis de expressão variou de 3,3 vezes na linhagem tumoral SKBR-5 a 234, 6 vezes na linhagem tumoral SKBR-7 (Tabela 7).



**Legenda:** a composição de exons (□) e introns (<) das diferentes isoformas (isoA: isoforma A; isoB: isoforma B).

**Figura 18** - Representação gráfica das duas isoformas do gene ADAM 33 e a posição da ilha de CpG na região promotora.



**Legenda:** 1- mama normal; 2- MDA-MB-134; 3- MDA-MB-415; 4- MDA-MB-175; 5- MDA-MB-436; 6- MDA-MB-435; 7- MDA-MB-468; 8- MDA-MB-456; 9- BT-20; 10- ZR-7530; 11- ZR-751; 12- CAMA-1; 13- GI101; 14- 734B; 15- CAL51; 16- MCF-7; 17- SKBR-7; 18- SKBR-5; 19- SKBR-3; 20- PMC42 e 21- DU4475.

**Figura 19** - Southern Blot das reações de RT-PCR da ADAM 33 (painel superior) e do gene constitutivo GAPDH (painel inferior) no painel de linhagens tumorais de mama.

**Tabela 7** - Dados de densitometria utilizando o *software LabWorks* do gene ADAM 33 em painel de linhagem tumoral de mama. (N/T) número de vezes em que a expressão do gene está diminuída na linhagem tumoral em relação ao tecido normal.

Amostra	Linhagem	Razão N/T
2	MDA-MB-134	0
3	MDA-MB-415	0
4	MDA-MB-175	0
5	MDA-MB-436	4,2
6	MDA-MB-435	0
7	MDA-MB-468	0
8	MDA-MB-456	0
9	BT-20	0
10	ZR-7530	1,1
11	ZR-751	0
12	CAMA-1	0
13	GI101	0
14	734B	0
15	CAL51	4,9
16	MCF-7	12,7
17	SKBR-7	234,6
18	SKBR-5	3,3
19	SKBR-3	0
20	PMC42	68,5
21	DU4475	0

### **4.3 ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES ADAM 12 E ADAM 33 EM TECIDO NORMAL E LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA.**

A metodologia de tratamento do DNA com bissulfito de sódio seguida de amplificação por PCR, clonagem e seqüenciamento foi utilizada para verificar a existência de correlação entre o padrão de expressão dos genes ADAM 12 e 33 e a presença de metilação em suas regiões promotoras nas linhagens tumorais e tecido normal de mama. Foram selecionadas para esta análise linhagens celulares que expressam os genes ADAM 12 e 33 e linhagens nas quais a expressão desse genes não pode ser detectada por RT-PCR.

Nesta análise foi possível verificar a correlação positiva entre o padrão de metilação e o de expressão de ambos os genes analisados em algumas linhagens tumorais. No geral, as linhagens tumorais que não apresentam expressão destes genes apresentaram maior densidade de metilação nas regiões promotoras analisadas e as linhagens que apresentam expressão apresentaram uma menor freqüência de metilação nas regiões analisadas (Figuras 21 e 23).

A ilha de CpG do gene ADAM 12 analisada por tratamento com bissulfito de sódio seguido de seqüenciamento, corresponde a um fragmento de 715 pb que engloba a região promotora propriamente dita (dinucleotídeos 1 a 56) e parte da região 5'UTR (dinucleotídeos 57 a 70) como esquematizado na Figura 20.

```

accccttttc tgggtccagggtcatggaatggaaaCGtgagccaatctatcaaaCGtaaaac
                                     1                               2
ctaacactgttgatcaaaagtaaCGcccagggtgtcttgtgcctgCGagtccaagcttgt
                                     3                               4
ttctCGggCGagagatgcccccttgggCGcttagggcCGggCGgggtCGCGCGcCGggc
   5  6                               7  8  9  10 11 12 13
tgtgggcCGCGgtggagacctgaccCGcactcCGagggttccagagagcCGgggagCG
   14 15                               16  17                               18  19
agtagcagagtcacCGtttccagcttcagcctgaaaagctggacCGtgcCGcCGcatgt
                                     20                               21  22  23
gCGcttggcagcCGggCGcccCGggccctgCGgccacatcatcctggggCGgggaCGtg
   24                               25  26  27                               28                               29  30
tgCGctcCGggCGccCGgaCGccactgagccaCGtctgagcCGcccaccctCGggggtg
   31  32  33  34  35                               36                               37                               38
agCGagcCGCGgctCGgggCGggacccttggCGgggggaccCGagCGgtctctaggaccC
   39  40 41  42  43                               44                               45  46                               47
GCGggaCGcCGccaactggCGggggtgCGggggagacaataattgttcCGCGgtaata
   48  49 50                               51  52                               53 54
agaaCGtgactgctggcCGtgatccatttcacaggcctgcttcctcactaaCGctc
   55                               56                               57
ttcctagtcocCGggccaactCGgacagtttgctcatattatgcaaCGgtcaaggctgg
   58                               59                               60
cttgtgccagaaCGgCGCGCGCGCGcaCGcaCGcacacacaCGgggggaaactttt
   61 62 63 64 65 66 67  68  69                               70

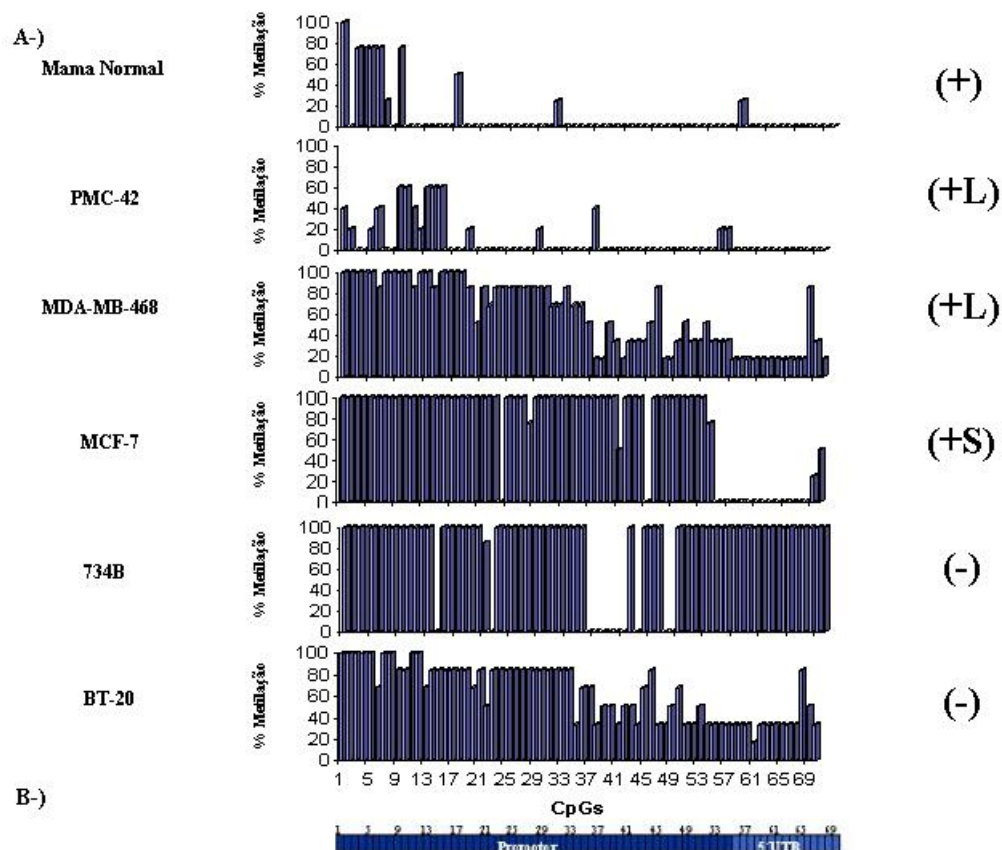
```

**Legenda:** Em vermelho estão marcados os dinucleotídeos presentes na ilha e abaixo de cada um está o seu número. Em azul está marcada a região 5'UTR englobada pela ilha.

**Figura 20** - Seqüência de nucleotídeos da Ilha de CpG do gene ADAM 12.

O estudo do padrão de metilação desta região nas diferentes linhagens analisadas revelou, como mostrado na figura 21, uma menor densidade de metilação no tecido normal e na linhagem tumoral PMC-42, que apresenta expressão deste gene, em relação às linhagens tumorais 734B e BT20 que não apresentam expressão deste gene, revelando uma estreita correlação entre o padrão de expressão com o padrão de metilação nestas linhagens. Não foi possível verificar esta correlação para as linhagens MDA-MB-468 e MCF-7, que apresentam expressão deste genes, pois a densidade de metilação nestas linhagens tumorais é semelhante às das linhagens que não apresentam expressão do mesmo.

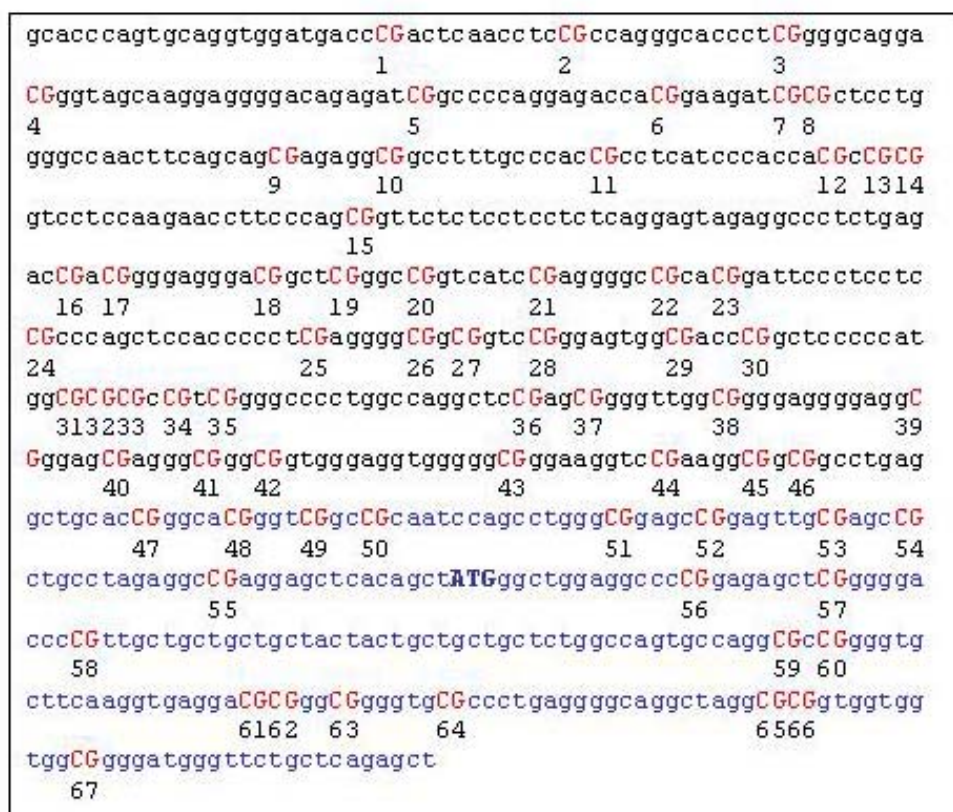
No caso do tecido normal que apresenta expressão de ambas isoformas, foi verificada a presença de metilação em apenas 0,01% (1/70) dos dinucleotídeos CG em todos os alelos analisados. Para as linhagens que apresentam expressão deste gene, a linhagem tumoral PMC-42 não apresentou nenhum (0/70) dos dinucleotídeos metilados em todos os alelos analisados, a linhagem MDA-MB-468 apresentou 22,8% (16/70) dos dinucleotídeos CG metilados em todos os alelos analisados e a linhagem MCF-7 apresentou 70% (49/70) dos dinucleotídeos CG metilados em todos os alelos analisados. Das linhagens tumorais que não apresentam expressão de nenhuma das isoformas destes genes, a linhagem 734B apresentou 82,8% (58/70) dos dinucleotídeos metilados em todos os alelos analisados e a linhagem tumoral BT-20 apresentou 14,3% (10/70) dos dinucleotídeos metilados em todos os alelos analisados. Podemos observar também que, nas linhagens tumorais, a densidade de metilação é maior até o dinucleotídeo 53 e coincide com o início da região 5' não traduzida (Figura 21).



**Legenda:** (A) porcentagem de metilação no tecido normal e nas linhagens tumorais; e (B) esquema da posição dos dinucleotídeos em relação ao gene. Do lado direito da representação pode-se observar o status de expressão do gene em cada linhagem (+) expressa as duas isoformas; (+L) expressa apenas a isoforma L; (+S) expressa apenas a isoforma S; e (-) não expressa nenhuma das isoformas analisadas.

**Figura 21** - Representação gráfica da porcentagem de metilação nos dinucleotídeos CG da Ilha de CpG do gene da ADAM 12 em tecido normal e nas diferentes linhagens tumorais de mama.

O fragmento de PCR correspondente à ilha de CpG identificada na região promotora do gene da ADAM 33 possui 742pb e compreende 67 dinucleotídeos CpG, estando os dinucleotídeos de 1 a 46 posicionados na região promotora, os dinucleotídeos 47 a 55 na região 5'UTR e os dinucleotídeos 56 a 67 posicionados no primeiro exon como esquematizado na Figura 22.



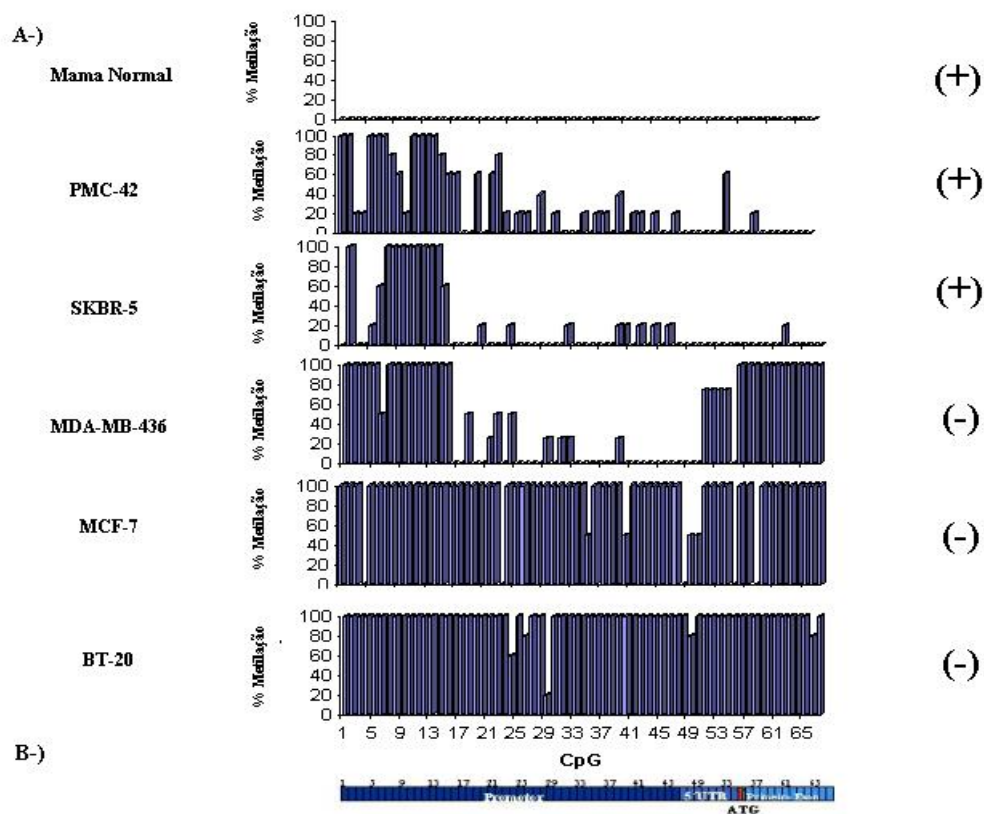
**Legenda:** Em vermelho estão marcados os dinucleotídeos presentes na ilha e abaixo de cada um está o seu número. Em azul claro está marcada a região transcrita e em azul escuro está evidenciado o ATG inicial representando o início da tradução.

**Figura 22** - Seqüência de nucleotídeo da Ilha de CpG do gene ADAM 33.

O estudo do padrão de metilação da ilha de CpG do gene ADAM 33 nas diferentes linhagens analisadas revelou, como mostrado na figura 23, uma menor

densidade de metilação no tecido normal e nas linhagens que apresentam expressão deste gene, revelando uma estreita correlação do padrão de expressão com o padrão de metilação. Na figura 23 podem ser observados os padrões de metilação da ilha de CpG do gene ADAM 33 no tecido normal e nas linhagens tumorais analisadas. No tecido normal não foi detectada a metilação em nenhum dinucleotídeo analisado. Das linhagens tumorais que apresentam expressão deste gene à linhagem tumoral PMC-42 apresentou 12,9% (9/67) dos dinucleotídeos metilados em todos os alelos analisados e a linhagem SKBR-5 apresentou 12,9% (9/67) dos dinucleotídeos CG metilados em todos os alelos analisados. Das linhagens tumorais que não apresentam expressão deste gene, a linhagem tumoral MDA-MB-436 apresentou 39% (26/67) dos dinucleotídeos CG metilados em todos os alelos analisados, a linhagem tumoral MCF-7 89% (60/67) dos dinucleotídeos CG metilados em todos os alelos analisados e a linhagem tumoral BT-20 apresentou 92,5% (62/67) dos dinucleotídeos CG metilados em todos os alelos analisados.





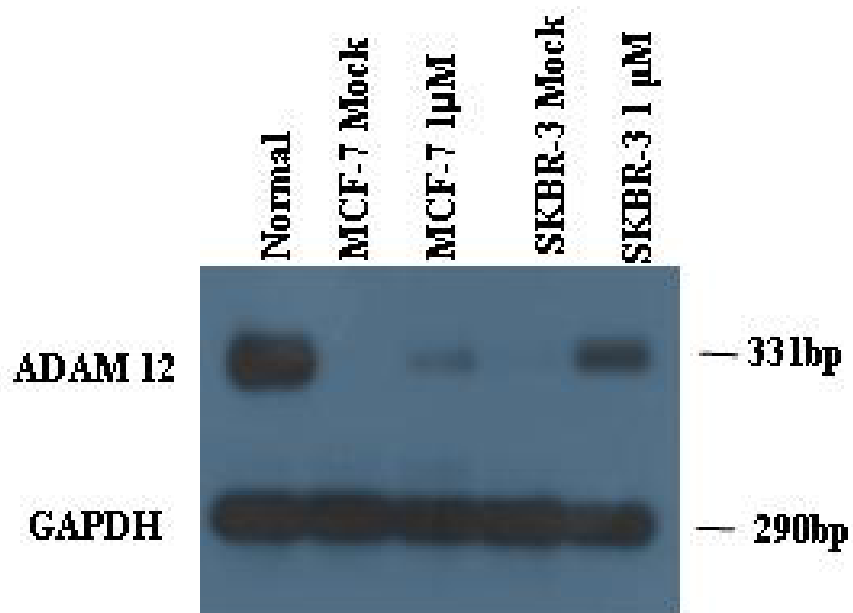
**Legenda:** (A) porcentagem de metilação no tecido normal e nas linhagens tumorais; e (B) esquema da posição dos dinucleotídeos em relação ao gene. Do lado direito da representação pode-se observar o status de expressão do gene em cada linhagem (+)apresenta expressão deste gene; e (-) não apresenta expressão deste gene.

**Figura 23** - Representação gráfica da porcentagem de metilação nos dinucleotídeos CG da Ilha de CpG do gene da ADAM 33 em tecido normal e nas diferentes linhagens tumorais de mama.

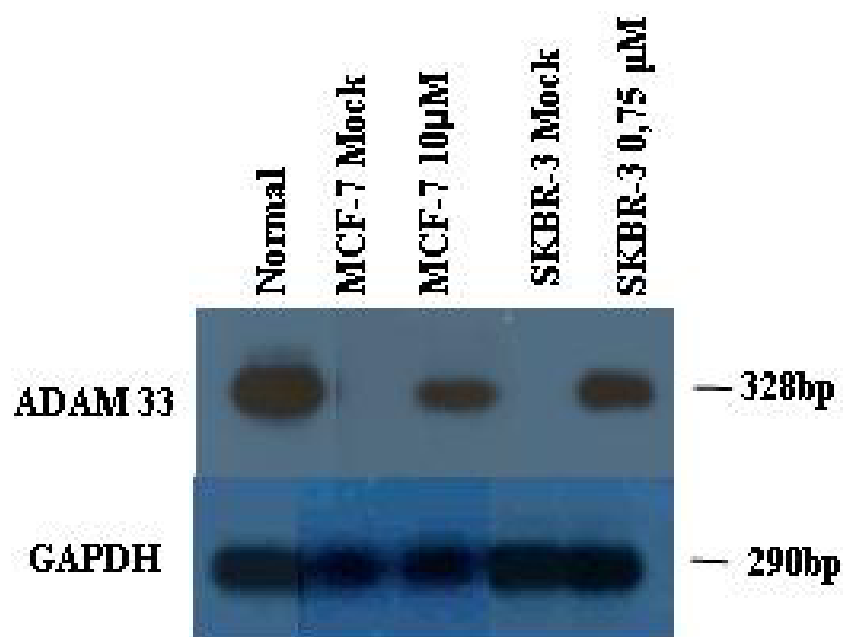
#### **4.3.2 Indução da expressão dos genes ADAM 12 e ADAM 33 após o tratamento das linhagens tumorais de mama com o agente desmetilante 5'-AZA-2'-deoxicitidina**

Para confirmar o envolvimento da metilação na regulação da expressão dos genes ADAM 12 e 33, visto que a correlação do padrão de expressão e o padrão de metilação não foi observado em todas as linhagens tumorais, as linhagens celulares de mama MCF-7 e SKBR-3, foram submetidas ao tratamento com o agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicitidina. Para a linhagem MCF-7 o tratamento foi realizado com 1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M e para a linhagem SKBR-3 com 0,75  $\mu$ M e 1  $\mu$ M do agente desmetilante. O RNA total foi extraído dessas linhagens antes e após o tratamento. A expressão dos genes ADAM 12 isoforma L e ADAM 33 foi analisada nas diferentes amostras através de RT-PCR. O gene GAPDH foi utilizado para avaliar a qualidade e quantidade do mRNA nas diferentes amostras.

Como pode ser observado na Figura 24, a expressão do gene ADAM 12L foi induzida em ambas as linhagens após o tratamento com 1  $\mu$ M de 5'-aza-2'-deoxicitidina. Na Figura 25 podemos observar a indução da expressão do gene ADAM 33 na linhagem MCF-7 após o tratamento com 10  $\mu$ M e na linhagem SKBR-3 com 0,75  $\mu$ M da droga. A re-expressão destes genes após o tratamento com o agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicitidina confirma o envolvimento da metilação no controle da expressão gênica destes 2 genes nestas linhagens tumorais como sugerido nos experimentos anteriores.



**Figura 24** – RT-PCR seguido de Southern blot mostrando a re-expressão do gene da ADAM 12 após o tratamento das linhagens MCF-7 e SKBR-3 com 1µM do agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicitidina .



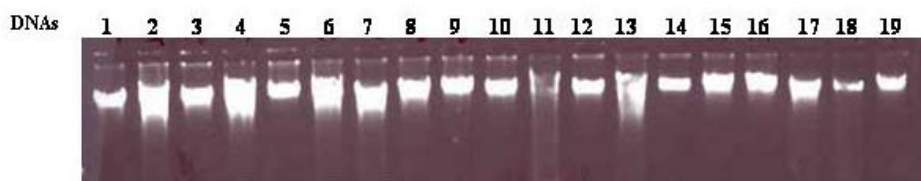
**Figura 25** - RT-PCR seguido de Southern blot mostrando a re-expressão do gene da ADAM 33 após o tratamento das linhagens MCF-7 e SKBR-3 com 10µM e 0,75µM, respectivamente, do agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicitidina.

#### **4.4 ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES ADAM 12 E ADAM 33 EM AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA E CORRELAÇÃO COM OS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS PACIENTES.**

##### **4.4.1 Levantamento e processamento das amostras de tumores primários de mama do banco de tumores do Hospital do Câncer A.C. Camargo/Instituto Ludwig**

Para validar as alterações nos padrões de metilação observadas para os genes ADAM 12 e 33 nas linhagens tumorais de mama, foram selecionados 108 carcinomas ductais invasivos de mama do banco de tumores do Hospital do Câncer A. C. Camargo/Instituto Ludwig. Este estudo faz-se necessário uma vez que existem relatos na literatura que afirmam que alterações no padrão de expressão gênica e metilação podem estar associadas exclusivamente às condições de cultura.

Os tumores foram reavaliados pelo serviço de patologia do hospital e foram retiradas das áreas de carcinoma ductal invasivo as áreas de carcinoma “in situ” e as bordas consideradas normais. Apenas aquelas amostras, que foram confirmadas como sendo carcinomas ductais invasivos, tiveram seu DNA extraído conforme descrito no item 3.4.1 do Material e Métodos. Um exemplo do resultado da extração de DNA de algumas amostras tumorais pode ser visualizado na figura 26.



**Figura 26** - Eletroforese em gel de agarose 1% de 19 (1-19) amostras de DNA de tumores após a extração com Fenol/Clorofórmio.

#### **4.4.2 Levantamento dos dados clínico-patológicos das pacientes junto ao Serviço de Arquivo Médico (SAME) do Hospital do Câncer A.C. Camargo.**

Para cada um dos casos de carcinomas ductais invasivos utilizados nesse estudo, foram levantados os dados clínico-patológicos referentes às pacientes através da análise detalhada dos prontuários. Os dados clínicos levantados incluíram: a data de nascimento, a data do diagnóstico da doença, realização de quimioterapia neoadjuvante, estágio da doença no momento da avaliação clínica, o estadiamento do tumor segundo a Classificação TNM, tamanho do tumor, classificação do grau histológico conforme o sistema SBR, a presença de linfonodos positivos, a presença dos marcadores moleculares ER (receptor de estrógeno), c-erbB2 e p53, a presença de metástases no momento do diagnóstico, a ocorrência de recidivas locais e a distância. Estes dados estão mostrados no Anexo 1.

As pacientes incluídas no estudo foram submetidas à ressecção segmentar ou mastectomia total, não receberam quimioterapia neoadjuvante ou tratamento endócrino pré-operatório. Estas pacientes retornaram ao serviço para acompanhamento da doença a cada 6 meses nos primeiros 2 anos e 1 vez por ano por 5 anos. A estratégia para a detecção de metástase a distancia incluiu: cintilografia óssea, ultra-sonografia de fígado, tomografia computadorizada e radiografia de tórax.

A média de idade das pacientes no momento do diagnóstico da doença foi de 56,7 anos e a mediana de tempo de seguimento foi de 55,4 meses. Das 108 pacientes analisadas, 22 desenvolveram metástases e 15 morreram durante o período de seguimento. Os dados clínicos e histopatológicos estão resumidos na Tabela 8.

Das 108 amostras tumorais analisadas, 19 (17,6%) foram diagnosticadas com estágio I, 53 (49,1%) com estágio II, 36 (33,3%) com estágio III ou IV. Devido ao pequeno número de amostras com o estágio IV, apenas 2 (0,02%), as mesmas foram agrupadas com as amostras de estágio III para a realização de nossas análises. O comprometimento de linfonodos foi avaliado em 105 pacientes entre as quais 58 (55,2%) apresentaram linfonodos comprometidos. Em relação aos marcadores moleculares analisados, 106 tumores foram avaliados para a presença de ER dos quais 65 (61,3%) apresentaram expressão deste marcador. No caso do marcador tumoral c-erbB2, 102 tumores foram avaliados, dos quais 69 (67,6%) apresentaram positividade para este marcador. E no caso da expressão de p53, 104 tumores foram avaliados dos quais 63 (60,6%) apresentaram positividade para este marcador.

**Tabela 8** - Distribuição categórica dos dados clínicos das pacientes

<b>Variável</b>	<b>Pacientes (%)</b>
<b>Estádio</b>	
I	19(17,6)
II	53(49,1)
III/IV	36(33,3)
<b>Tamanho do Tumor</b>	
pT1	33(30,6)
pT2	60(55,6)
pT3	15(13,9)
<b>SBR</b>	
I	30(27,8)
II	59(54,6)
III	18(16,7)
<b>Comprometimento de linfonodos</b>	
Negativo	47(44,8)
Positivo	58(55,2)
<b>Receptor de Estrógeno (ER)</b>	
Negativo	41(38,7)
Positivo	65(61,3)
<b>c-erbB-2</b>	
Negativo	33(32,4)
Positivo	69(67,6)
<b>P53</b>	
Negativo	41(39,4)
Positivo	63(60,6)
<b>Metástase</b>	
Negativo	86(79,6)
Positivo	22(20,4)

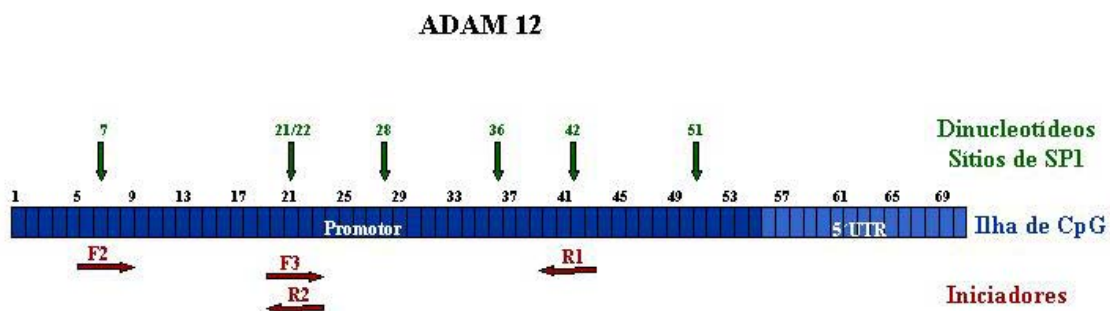


#### **4.4.3 Análise do padrão de metilação dos genes ADAM 12 e ADAM 33 nas amostras de tumores primários do banco de tumores do Hospital A.C. Camargo/Instituto Ludwig.**

Em análises anteriores foi observada a existência de correlação entre o padrão de metilação da região promotora dos genes ADAM 12 e 33 com o padrão de expressão dos mesmos em linhagens tumorais de mama. Com intenção de validar os dados de metilação observados para as linhagens tumorais em amostras de tumores de mama de uma forma eficiente e com a utilização de pequena quantidade de amostra, foi utilizada a técnica de tratamento do DNA com bissulfito de sódio seguida de PCR específico para Metilação (MSP). Nesta técnica, o DNA genômico é tratado com bissulfito de sódio e os iniciadores são desenhados dentro das regiões ricas em CG. Dois pares de iniciadores, capazes de distinguir as amostras metiladas das não-metiladas, são desenhados levando-se em consideração a modificação dos nucleotídeos pelo bissulfito de sódio. Dessa forma, duas reações de PCR separadas (uma para a situação metilada e outra para a situação não-metilada) são realizadas e a presença de metilação em uma seqüência de nucleotídeos pode ser inferida a partir do padrão de amplificação observado.

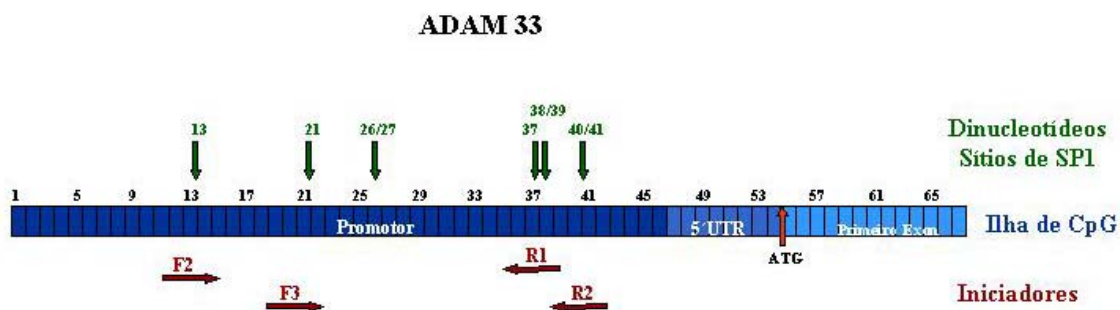
Um passo muito importante nesta técnica é o desenho dos iniciadores específicos, que devem, na medida do possível, ser desenhados englobando dinucleotídeos presentes em sítios de ligação de fatores de transcrição e que sejam importantes no processo de regulação da expressão destes genes. Para isso, as seqüências referentes às ilhas de CpG dos genes ADAM 12 e ADAM 33 foram analisadas quanto a presença de sítios de ligação do fator de transcrição SP1 através da ferramenta TESS (*Transcription Element Search System*) disponibilizada na

Internet pelo Laboratório de Biologia Computacional e Informática da Universidade da Pensilvânia (<http://www.cbil.upenn.edu/tess>). Foram encontrados na ilha de CpG dos genes ADAM 12 e 33 um total de 6 sítios do fator de transcrição SP1 como esquematizado nas figuras 27 e 28, respectivamente. Estes sítios contêm dinucleotídeos CpG que foram localizados na ilha de cada gene e correlacionados com o padrão de metilação obtidos previamente. Destes CpGs foram selecionados para o desenho dos iniciadores das reações de MSP aqueles sítios que estavam densamente metilados nas linhagens que não expressam e que não estavam metilados nas linhagens que expressam cada um destes genes. Para cada ADAM foram desenhados mais de um par de iniciadores englobando os dinucleotídeos CpG selecionados. Assim, para o gene da ADAM 12 os iniciadores foram desenhados englobando os dinucleotídeos 6, 7, 20, 21, 22, 41 e 42. Para o gene da ADAM 33 os iniciadores foram desenhados englobando os dinucleotídeos 10, 11, 12, 13, 17, 18, 19, 37, 40 e 41. A localização dos iniciadores na ilha de CpG dos genes ADAM 12 e 33 está esquematizada nas figuras 29 e 30, respectivamente. A seqüência de cada iniciador e os dinucleotídeos englobados por cada um está listada na tabela 3.



**Legenda:** localização dos sítios do fator de transcrição SP1; os dinucleotídeos englobados em cada sítio (em verde) e a localização dos iniciadores de MSP (em vermelho).

**Figura 27** - Esquema da Ilha de CpG do gene ADAM 12.



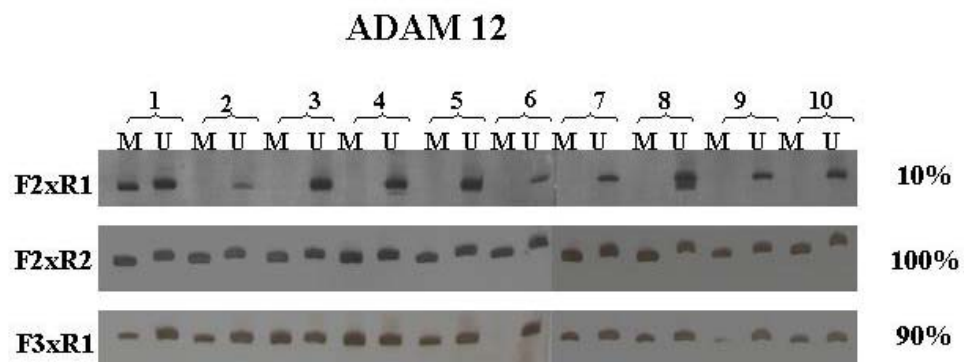
**Legenda:** Localização dos sítios do fator de transcrição SP1; os dinucleotídeos englobados em cada sítio (em verde) e a localização dos iniciadores de MSP (em vermelho).

**Figura 28** - Esquema da Ilha de CpG do gene ADAM 33.

Para a análise do padrão de metilação das amostras tumorais através da técnica de MSP foi necessário padronizar as reações para os diferentes pares de iniciadores. Foram utilizadas as linhagens tumorais MCF-7 para a situação metilada e a HB4a para a situação não metilada. Estas linhagens foram selecionadas para a padronização uma vez que o padrão de metilação já havia sido previamente analisado por seqüenciamento, e foram posteriormente utilizadas como controles positivos nas respectivas reações para a análise das amostras tumorais. Durante a padronização das reações foram variados a temperatura de anelamento dos iniciadores, a concentração de  $MgCl_2$ , o tempo de cada etapa do ciclo de amplificação e o número de ciclos. Foi possível padronizar as reações com os iniciadores F2 e R1, F2 e R2 e F3 e R2 para a ADAM 12 e apenas com os iniciadores F3 e R2 para a ADAM 33.

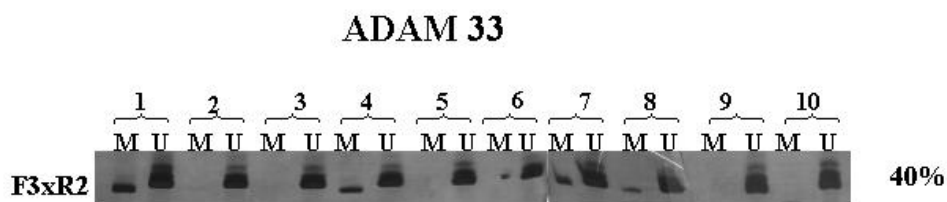
Para selecionar o par de iniciadores mais adequado para a análise do padrão de metilação nas amostras tumorais, foi feita a análise do padrão de metilação dos genes ADAM 12 e 33 em 10 amostras de DNA extraídas de tecido normal de borda de tumor e tratadas com bissulfito de sódio conforme descrito no item 3.4.2 do Material e Métodos. Observou-se amplificação específica para a situação metilada em 100% (10/10) das amostras quando os iniciadores F2 e R2 da ADAM 12 foram utilizados, em 90% (9/10) dos casos quando foram utilizados os iniciadores F3 e R1 e em apenas 10% (1/10) dos casos quando foram utilizados os iniciadores F2 e R1 para a ADAM12 (figura 29). No caso da reação com os iniciadores F3 e R2 da ADAM 33 foram observadas amplificações específicas para a situação metilada em 40% (4/10) dos casos (figura 30). Esse resultado sugere que os iniciadores F3 e R2 da ADAM 33 não são os mais indicados para esta análise por apresentarem uma frequência de metilação relativamente alta em amostras normais. Porém, devido a

grande dificuldade de se desenhar iniciadores nesta região e a dificuldade de padronizar as reações com os outros iniciadores, os primers F3 e R2 foram utilizados para a continuidade de nossas análises. Assim sendo, foram selecionados para a utilização na análise dos tumores as reações com os iniciadores F2 e R1 para a ADAM 12 e com os iniciadores F3 e R2 para a ADAM 33.



**Legenda:** Os números indicam a amostra; (M) reação com os iniciadores para a situação metilada; (U) reação com os iniciadores para a situação não metilada; do lado esquerdo está indicado o par de iniciadores utilizado em cada reação e do direito a porcentagem de metilação observada.

**Figura 29** - Gel de acrilamida das reações de MSP com os diferentes iniciadores da ADAM 12 utilizando as amostras normais.



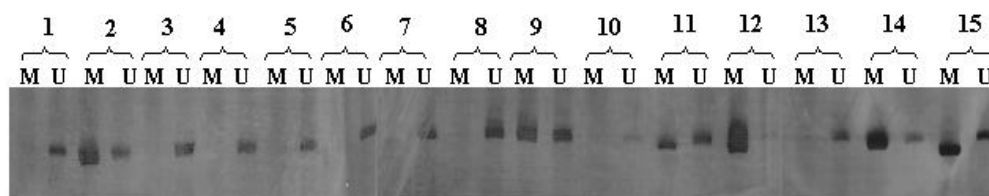
**Legenda:** Os números indicam a amostra; (M) reação com os iniciadores para a situação metilada; (U) reação com os iniciadores para a situação não metilada e do direito a porcentagem de metilação observada.

**Figura 30** - Gel de acrilamida das reações de MSP com os iniciadores F3 e R2 da ADAM 33 utilizando as amostras normais.

#### 4.4.4 Reações de PCR específico para metilação (MSP) nas amostras de tumores primários do banco de tumores do Hospital A.C. Camargo/Instituto Ludwig.

Na análise das reações de MSP para as 108 amostras de tumores de mama utilizadas neste estudo observamos que 53 (49,1%) apresentaram metilação nos dinucleotídeos analisados da ADAM 12 e 55 (55,6%) apresentaram metilação nos dinucleotídeos analisados da ADAM33. Na figura 31 e 32 observamos alguns exemplos das reações de MSP com as amostras tumorais para as ADAMs 12 e 33, respectivamente.

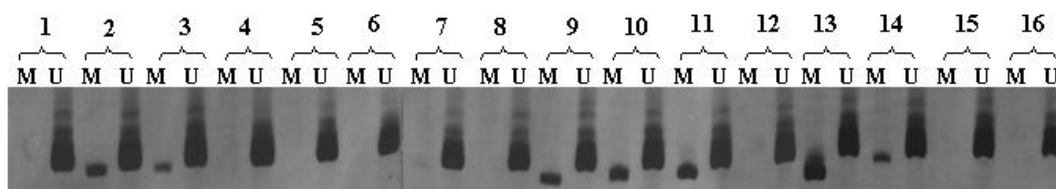
### ADAM 12



**Legenda:** Os números representam cada caso, (M) reação com os iniciadores para a situação metilada; e (U) reação com os iniciadores para a situação não metilada.

**Figura 31** - Gel de acrilamida corado com prata das reações de MSP de 15 casos de tumores de mama com os iniciadores F2 e R1 da ADAM 12.

### ADAM 33



**Legenda:** Os números representam cada caso, (M) reação com os iniciadores para a situação metilada; e (U) reação com os iniciadores para a situação não metilada.

**Figura 32** - Gel de acrilamida corado com prata das reações de MSP de 15 casos de tumores de mama com os iniciadores F3 e R2 da ADAM 33.

#### **4.4.5 Análise estatística dos dados clínico-patológicos e do padrão de metilação dos genes ADAM 12 e ADAM 33.**

O padrão de metilação das amostras tumorais determinado através de MSP foram associados aos dados clínico-patológicos dos pacientes através de análises estatísticas. A associação das variáveis qualitativas foi avaliada através do teste do Qui-Quadrado ou teste exato de Fisher e a análise de sobrevivência foi realizada pelo método de Kaplan-Meier, com o teste de log-rank para a comparação entre as curvas.

Na análise da ADAM 12 observamos a presença de metilação em 4 de 19 (21,1%) pacientes com estágio I, em 25 de 53 (47,2%) pacientes com estágio II, em 24 de 36 (66,7%) dos pacientes com estágios III e IV (ver Tabela 9). Essas diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ( $p=0,013$ ). A presença de metilação também foi considerada estatisticamente significativa ( $p=0,028$ ) quando correlacionada com o tamanho do tumor. Dos tumores T1 13 de 33 (39,4%) apresentaram metilação neste gene, dos tumores T2 28 de 60 (46,7%) apresentaram metilação neste gene e dos tumores T3 12 de 15 (80,0%) apresentaram metilação neste gene. A associação entre a presença de metilação na região promotora do gene ADAM 12 e o comprometimento de linfonodos também foi considerada estatisticamente significativa ( $p=0,038$ ). Dos tumores com linfonodos comprometidos 34 de 58 (58,5%) apresentaram metilação na região analisada e dos tumores sem linfonodos comprometidos 18 de 47 (38,3%) apresentaram metilação na região analisada.

Não observamos associações estatisticamente significativas entre metilação na região promotora deste gene e o grau histológico SBR ( $p=0,42$ ), a ocorrência de metástases a distância ( $p=0,292$ ) e a expressão dos marcadores moleculares ER



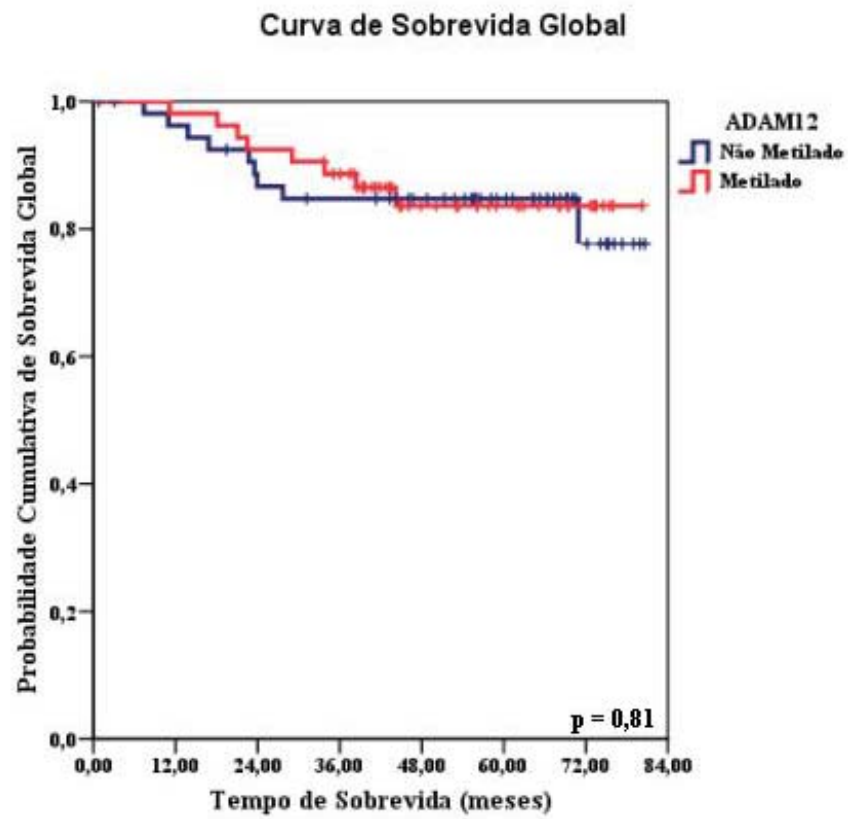
( $p=0,55$ ), c-erbB2 ( $p=0,432$ ) e p53 ( $p=0,358$ ). Também não observamos associações estatisticamente significativas entre o padrão de metilação e a sobrevida global ( $p=0,81$ ) (figura 33) e sobrevida livre de doença ( $p=0,28$ ) (Figura 34). Foi verificado que 83,6% das pacientes que apresentaram metilação estavam vivas após 60 meses de acompanhamento, enquanto que 84,7% das que não apresentaram metilação estavam vivas no mesmo período. Foi verificado também que 77,4% das pacientes que apresentaram metilação neste gene não apresentaram recidivas após 60 meses e que 84,5% das pacientes que não apresentaram metilação neste gene não apresentaram recidivas no mesmo período.

Na análise do *status* de metilação da região promotora do gene ADAM 33 apenas foi considerada estatisticamente significativa a associação da metilação desta região com o estadiamento da doença ( $p=0,017$ ). Foi observada a presença de metilação em 6 das 19 pacientes (31,6%) com estágio I, em 36 das 53 pacientes (67,9%) com estágio II, em 18 das 36 pacientes (50,0%) com estágio III e IV. Para este gene não observamos associações estatisticamente significativas entre metilação na região promotora e o tamanho do tumor ( $p=0,110$ ), o grau histológico SBR ( $p=0,584$ ), a presença de linfonodos comprometidos ( $p=0,704$ ), a ocorrência de metástases a distância ( $p=0,708$ ) e a expressão dos marcadores moleculares ER ( $p=0,933$ ), c-erbB2 ( $p=0,423$ ) e p53 ( $p=0,205$ ). Além disso, não observamos associações estatisticamente significativas na sobrevida global ( $p=0,50$ ) (figura 35) e sobrevida livre de doença ( $p=0,70$ ) (figura 36) entre as pacientes com e sem metilação na região promotora do gene ADAM 33. Foi verificado que 86,1% das pacientes que apresentaram metilação estavam vivas após 60 meses de acompanhamento, enquanto que 82,7% das que não apresentaram metilação estavam

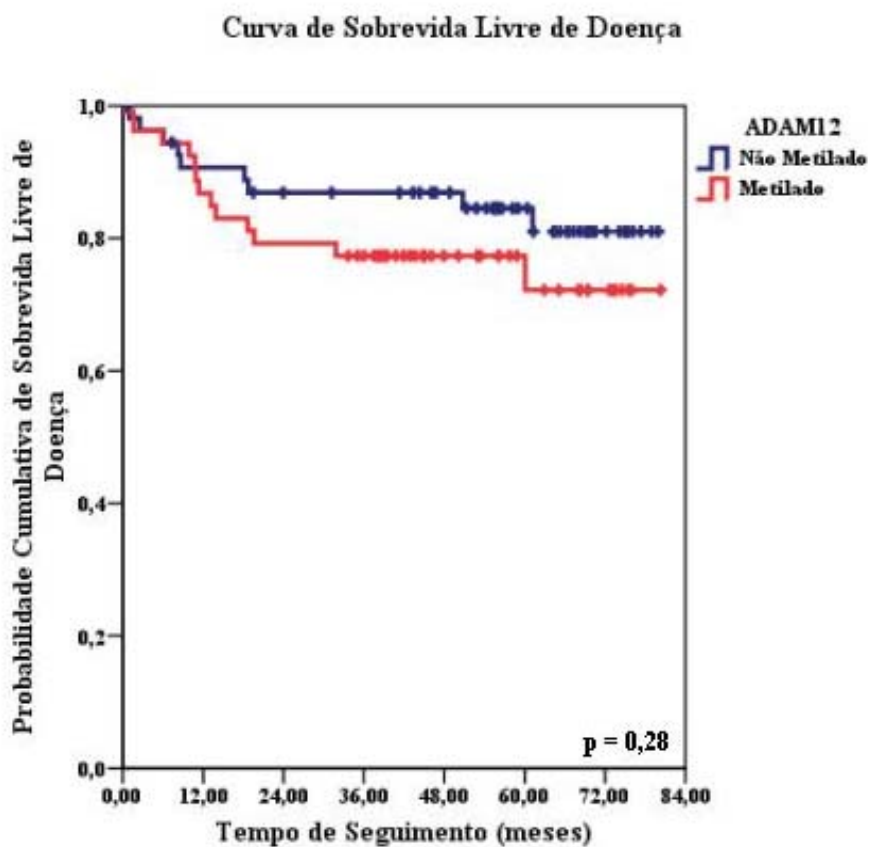
vivas no mesmo período. Foi verificado também que 79,9% das pacientes que apresentaram metilação neste gene não apresentaram recidivas após 60 meses e que 82,1% das pacientes que não apresentaram metilação neste gene não apresentaram recidivas no mesmo período.

**Tabela 9** - Distribuição categórica dos dados clínicos das pacientes analisadas e a metilação das regiões promotoras dos genes ADAM 12 e 33.

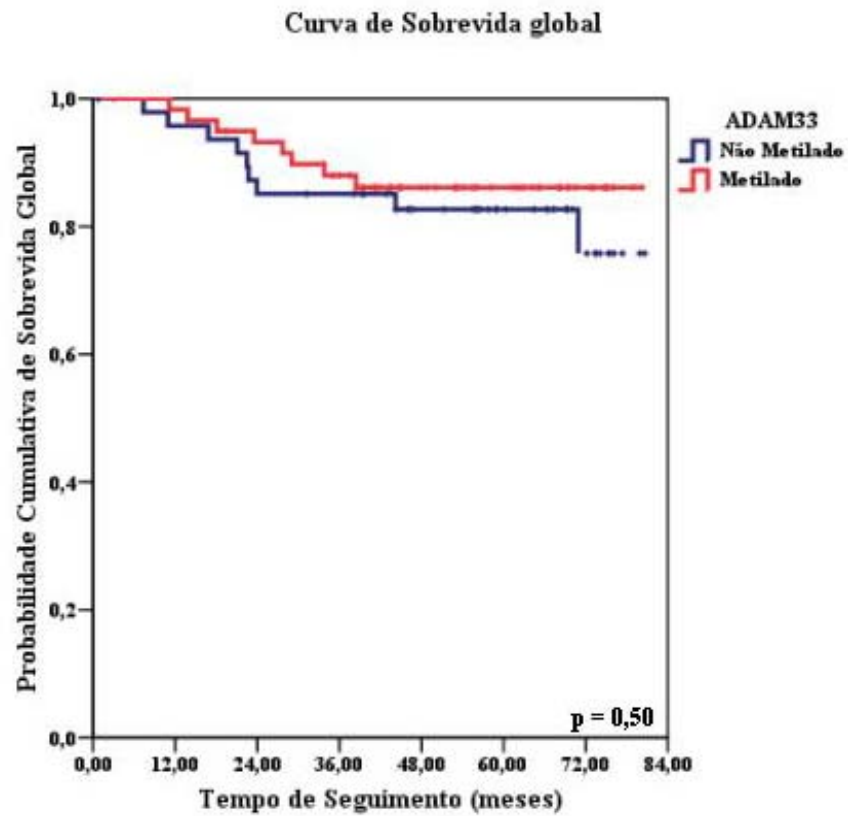
Variável	ADAM 12		P V.	ADAM33		P V.
	Não Met(%)	Met. (%)		Não Met(%)	Met. (%)	
<b>Estádio</b>						
I	15(78,9)	4(21,1)		13(68,4)	6(31,6)	
II	25(52,8)	25(47,2)		17(32,1)	36(67,9)	
III/IV	12(33,3)	24(66,7)	0,013	18(50,0)	18(50,0)	0,017
<b>Tamanho do Tumor</b>						
pT1	20(60,6)	13(39,4)		19(57,6)	14(42,4)	
pT2	32(53,3)	28(46,7)		25(41,7)	35(58,3)	
pT3	3(20,0)	12(80,0)	0,028	4(26,7)	11(73,3)	0,110
<b>SBR</b>						
I	17(56,7)	13(43,3)		12(40,0)	18(60,0)	
II	27(45,8)	32(54,2)		26(44,1)	33(55,9)	
III	11(61,1)	7(38,9)	0,422	10(55,6)	8(44,4)	0,584
<b>Comprometimento de linfonodos</b>						
Negativo	29(61,7)	18(38,3)		22(46,8)	25(53,2)	
Positivo	24(41,4)	34(58,6)	0,038	25(43,1)	33(56,9)	0,704
<b>Receptor de Estrógeno (ER)</b>						
Negativo	22(53,7)	19(46,3)		18(43,9)	23(56,1)	
Positivo	31(47,7)	34(52,3)	0,550	28(43,1)	37(56,9)	0,933
<b>c-erbB-2</b>						
Negativo	19(57,6)	14(42,4)		13(39,4)	20(60,6)	
Positivo	34(49,3)	35(50,7)	0,432	33(47,8)	36(52,2)	0,423
<b>P53</b>						
Negativo	19(46,3)	22(53,7)		15(36,6)	26(63,4)	
Positivo	35(55,6)	28(44,4)	0,358	31(49,2)	32(50,8)	0,205
<b>Metástase</b>						
Negativo	46(53,5)	40(46,5)		39(45,3)	47(54,7)	
Positivo	9(40,9)	13(59,1)	0,292	9(40,9)	13(59,1)	0,708



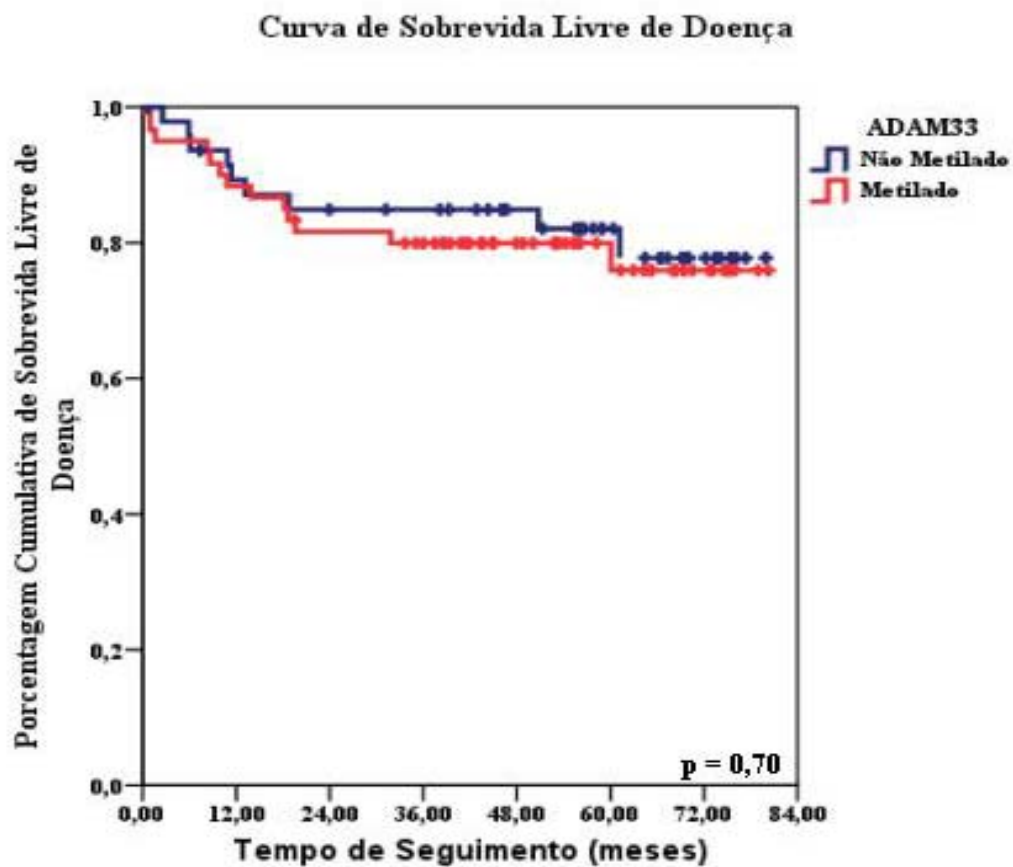
**Figura 33** - Curva de Sobrevida Global das pacientes que apresentaram metilação no gene ADAM 12 e que não apresentaram metilação neste gene.



**Figura 34** - Curva de Sobrevida Livre de Doença das pacientes que apresentaram metilação no gene ADAM 12 e que não apresentaram metilação neste gene.



**Figura 35** - Curva de Sobrevida Global das pacientes que apresentaram metilação no gene ADAM 33 e que não apresentaram metilação neste gene.



**Figura 36** - Curva de Sobrevida Livre de Doença das pacientes que apresentaram metilação no gene ADAM 33 e que não apresentaram metilação neste gene.

***DISCUSSÃO***

---



## 5 DISCUSSÃO

A tumorigênese é um processo complexo que pode ser dividido em três etapas: a iniciação, a promoção e a progressão tumoral. Esse processo é resultado de defeitos genéticos e epigenéticos acumulados no DNA das células. A iniciação e a promoção ocorrem precocemente e compreendem alterações em genes envolvidos principalmente no controle da proliferação celular. Durante a progressão tumoral, as alterações acometem genes envolvidos com a adesão celular e genes de enzimas proteolíticas. Neste processo, algumas células perdem a capacidade de adesão, invadem a membrana basal do tecido de origem, atravessam a parede do vaso, caem na circulação e formam áreas de proliferação em outros tecidos denominadas metástases (MENDELSON et al. 1995; BOGENRIEDER e HERLYN 2003).

As características moleculares dos tumores, incluindo os eventos epigenéticos como a metilação, estão sendo exploradas com o objetivo de determinar o risco de desenvolvimento da doença, o prognóstico global e a resposta aos diferentes tipos de tratamentos (KEEN e DAVIDSON 2003). A caracterização das alterações no padrão de metilação parecem ser promissoras para a detecção precoce de tumores, uma vez que elas podem ser detectadas com alto grau de especificidade mesmo na presença de células normais contaminantes. Além disso, essas alterações podem ser detectadas em amostras de biópsias e em diversos fluidos corpóreos, constituindo assim um método de diagnóstico menos invasivo (LAIRD 2003; BAIS et al. 2004).

O câncer de mama é um dos tumores mais freqüentes entre as mulheres ocidentais, sendo no Brasil a terceira causa mais freqüente de morte neste sexo.

Quando diagnosticado em estádios iniciais a taxa de cura é superior a 90%, e a sobrevida média da população mundial após 5 anos é de 61%. Porém as dificuldades de acesso aos métodos diagnósticos levam, no Brasil, ao diagnóstico tardio em 70% dos casos resultando em um pior prognóstico da doença. Os fatores prognósticos mais importantes são: a presença de metástases axilares (linfonodos comprometidos) e o tamanho do tumor. No entanto, cerca de 30% das pacientes que não apresentam acometimento de linfonodos vem a óbito em decorrência da doença. Visando melhorar o diagnóstico e o prognóstico da doença, há claramente a necessidade de explorar melhor as características moleculares destes tumores e de desenvolver novos marcadores.

As proteínas que fazem parte da Família ADAM são glicoproteínas transmembranas do tipo I formada por multidomínios e são capazes de promover interações célula-célula através de seu domínio de desintegrina e de atuar na clivagem proteolítica de proteínas de superfície celular (moléculas de adesão, citocinas, fatores de crescimento e seus respectivos receptores) através de seu domínio de metaloproteinase. Vários trabalhos vêm demonstrando a participação dos diversos membros desta família em diferentes patologias, incluindo os diferentes tipos de câncer (PRIMAKOFF e MYLES 2000; SEALS e COURTNEIDGE 2003).

Neste trabalho analisamos o padrão de expressão e de metilação da região promotora de diferentes membros da família ADAM em linhagens tumorais e tumores primários de mama. Através de análises de bioinformática foi possível detectar a presença de ilhas de CpG na região promotora de 9 dos 21 membros da família ADAM descritos para humanos. Este dado sugere que a metilação tenha um papel importante na regulação da expressão gênica desses genes.

Utilizando inicialmente a técnica de RT-PCR semi-quantitativo e duas linhagens tumorais de mama, disponíveis no laboratório no início desse estudo, foi possível verificar a ocorrência de alterações no padrão de expressão para os genes ADAM 12 e 33 em relação ao tecido normal de mama. Essas alterações foram posteriormente confirmadas em um número significativo de linhagens tumorais através de RT-PCR seguido de Southern blot e densitometria. Não foi utilizada a técnica de PCR em tempo Real (Real-time-PCR), pois não havia equipamento disponível no momento da realização desse estudo e principalmente porque procurávamos alterações significativas (silenciamento completo) no padrão de expressão dos genes analisados. Outro fator que influenciou na escolha da metodologia foi a quantidade limitante de RNA da maioria das linhagens tumorais.

Após a análise de expressão foi possível estabelecer uma correlação positiva entre o padrão de expressão e o padrão de metilação da região promotora dos genes ADAM12 e 33 para algumas linhagens analisadas utilizando a técnica de tratamento do DNA com bissulfato de sódio seguida de seqüenciamento. Visto que nem todas as linhagens apresentavam esta correlação, experimentos com o agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicitidina foram também realizados para comprovar o envolvimento da metilação na regulação da expressão desses genes. Em conjunto, estes dados indicam que a metilação possui um papel fundamental na regulação da expressão gênica dos membros da Família ADAM e sugerem que, a exemplo do que foi verificado pelo nosso grupo para a ADAM 23, alterações no padrão de metilação possam estar associadas com a tumorigênese (COSTA et al. 2004-Anexo 2). Uma vez que não foi possível comprovar esta correlação para todas as linhagens analisadas, é possível que outros mecanismos de regulação da expressão estejam atuando. SCHLOMANN et al.

(2000) demonstraram que a expressão da ADAM 8, uma das ADAMs que possui ilhas de CpG em seu promotor, é induzida pela secreção de TNF- $\alpha$  via ativação do fator de transcrição IRF-1, dependente da sinalização de TNFRI, em células primárias e linhagens celulares de origens neuronal e glial nas vias de eventos da neurodegeneração (SCHLOMANN et al. 2000).

Para determinar o valor da hipermetilação da região promotora dos genes ADAM 12 e 33 como marcadores moleculares de câncer de mama, foi analisado o padrão de metilação dos mesmos, através de MSP, em 108 amostras de tumores primários de mama e correlacionou-se estes dados com parâmetros clínico-patológicos já estabelecidos para essa doença. A técnica utilizada para a análises de metilação foi o tratamento do DNA com bissulfito de sódio seguido de MSP devido a sua eficiência e a pequena quantidade de material necessário para o procedimento.

Através das análises estatísticas foi possível observar uma associação significativa entre o padrão de metilação do gene ADAM 12 e o estadiamento da doença, o tamanho do tumor e a positividade de linfonodos. Além disso, foi observada a associação positiva da presença de metilação na região promotora do gene ADAM 33 com o estadiamento da doença. Apesar de não terem sido observadas associações significativas entre a hipermetilação destes genes e a sobrevida global e a sobrevida livre de doença, nossos dados sugerem a existência de modificações do padrão de metilação durante o processo de tumorigênese de mama. A ausência de um número maior de associações positivas com os parâmetros clínicos já estabelecidos pode ser explicada pelo tamanho da amostra utilizada (n=108). No caso mais específico da ADAM 33 este fato também pode estar relacionado à

limitação da técnica utilizada, visto que, os iniciadores disponíveis detectavam metilação em 40% dos tecidos normais.

As ADAMs 12 e 33, analisadas neste trabalho, possuem a estrutura típica de um membro da família ADAM incluindo a seqüência consenso de atividade de metaloprotease.

A ADAM 12 parece estar envolvida em vários processos biológicos, como a diferenciação de mioblastos, a regeneração muscular, a adipogênese, a neurogênese e a fertilização. Ela parece atuar de diferentes formas em cada processo. Na diferenciação de mioblastos, sua atuação parecer estar associada exclusivamente com os domínios relacionados com processos de adesão celular (os domínios de desintegrina, rico em cisteína e EGF-like) (GILPIN et al. 1998). O envolvimento da proteína ADAM 12 em processos de adesão célula-célula e célula-matriz é sustentada pela existência de interações desta proteína com moléculas de sindecans e integrinas (IBA et al. 1999, 2000; ETO et al. 2000; THODETI et al. 2003).

Em relação à sua atividade na clivagem proteolítica de moléculas de superfície, já foi demonstrada que a ADAM 12 age na clivagem de IGFBP-3 e 5 (*Insulin-like growth factor-binding proteins*) e de proHB-EGF (SHI et al. 2000; ASAKURA et al. 2002). As IGFBPs 3 e 5 são capazes de se ligar e seqüestrar os fatores de crescimento IGF e possuem, portanto, atividade anti-mitogênica. Ao contrário, o próHB-EGF assim como os demais ligantes de EGFR são expressos como precursores transmembrânicos que se ligam a receptores  $\alpha_3\beta_1$  e transmitem sinais antiproliferativos. Esses fatores são liberados da superfície celular através de clivagem proteolítica do seu domínio extracelular gerando uma forma solúvel

mitoticamente ativa. Outras ADAMs, como as ADAMs 10 e 17 também são capazes de processar o próHB-EGF e outros ligantes de EGFR.

A ADAM 33 não possui ainda sua atividade em interações célula-célula descrita. Ensaio funcionais comprovaram a atividade proteolítica desta ADAM e até o momento foi comprovada sua atuação na clivagem da proteína ligante de Kit 1. Este gene atua sobre seu receptor, o oncogene c-Kit, principalmente em sua forma ancorada a membrana. Isso sugere que a ausência da expressão da ADAM 33, como observado em nossos resultados, aumentaria a ativação de c-kit, uma vez que essa ativação é mais intensa quando seu ligante permanece ancorado a membrana plasmática da célula (ASHMAN et al. 1999; ZOU et al. 2004). Porém, são necessários estudos adicionais envolvendo ensaios funcionais para determinar outros possíveis substratos da ADAM 33 e determinar sua atuação funcional na formação e ou progressão tumoral.

Das duas ADAMs analisadas neste estudo, apenas a ADAM 12 já foi correlacionada com o câncer. A expressão da ADAM 12 foi associada à fusão de células mononucleares estromais na formação de células gigantes multinucleadas em tumores de células gigantes de osso (TIAN et al. 2002) e também foi correlacionada com a agressividade de tumores de fígado e com a expressão e atividade da MMP2 (metaloproteinase de matriz 2) nestes tumores (LE PABIC et al. 2003). Além disso, foi detectada sua superexpressão em glioblastomas, sugerindo que nestes tumores a ADAM 12 estaria ativando receptores de fatores de crescimento através de sua atividade proteolítica (KODAMA et al. 2004). Foi visto, recentemente, que a ADAM 12 está mais expressa em tumores gástricos do que no epitélio normal, em especial em tumores intestinais do que em tumores difusos e esta ADAM, assim como as

ADAMs 9 e 15, parece estar diretamente relacionada com o crescimento tumoral nestes tumores (CARL-MCGRATH et al. 2005).

Em tumores de mama, a detecção da isoforma curta da ADAM 12 em urina de pacientes também foi correlacionada com a agressividade deste tumores (ROY et al. 2004). Recentemente, LENDECKEL et al. (2005) demonstraram uma expressão aumentada deste gene em tumores em relação aos seus pares normais de borda de tumor e que a localização da ADAM 12 é predominante no citoplasma das células tumorais. Além disso, através de ensaios de proliferação este grupo mostrou que a adição de anticorpo monoclonal anti-ADAM12 tem efeitos opostos em linhagens tumorais diferentes. Na linhagem MCF-7, que apresenta expressão deste gene na superfície celular, a adição do anticorpo promove o crescimento celular, enquanto que a mesma adição na linhagem MDA-MB-453, que possui expressão deste gene no citoplasma das células, não apresenta efeitos na proliferação.

Outro trabalho analisando a influência da ADAM 12 em tumores de mama mostrou através de ensaios de imunohistoquímica e a produção de camundongos transgênicos carregando a ADAM 12, que este gene aumenta a agressividade de tumores de mama, acelerando o desenvolvimento tumoral, aumentando o tamanho dos tumores e o número de metástases pulmonares. Além disso, este estudo mostrou que a ADAM 12 diminui a apoptose das células tumorais e aumenta a apoptose nas células do estroma favorecendo a progressão tumoral através do remodelamento do compartimento estromal (KVEIBORG et al. 2005).

Apesar de nossos resultados de expressão serem aparentemente contraditórios com os dados disponíveis na literatura os experimentos realizados não são diretamente comparáveis. No nosso trabalho a expressão do gene ADAM12 foi

analisada exclusivamente em tecido normal e linhagens tumorais de mama, sendo a grande maioria dessas linhagens de origem metastática. Além disso, a expressão do gene ADAM12 em tumores de mama foi indiretamente inferida a partir da presença de metilação na sua região promotora. Através desses experimentos, e como mencionado anteriormente, a metilação na região promotora do gene ADAM12 se mostrou mais freqüente em tumores de estágio III e IV sugerindo que esse fenômeno ocorra em estágios mais avançados do desenvolvimento tumoral. No trabalho de LENDECKEL et al. (2005) foram analisadas quanto a expressão 15 tumores de mama dos quais apenas 26,6% correspondiam a tumores de estágio III e IV. Os autores não mostram dados individuais de cada tumor, não sendo possível avaliar a expressão desse gene durante a progressão tumoral. Com base nesses resultados podemos sugerir que a ADAM12 possa atuar em estágios precoces do desenvolvimento tumoral, remodelando o tecido adjacente (como sugerido por KVEIBORG et al. 2005) e que em estágios mais avançados, devido à sua dualidade de função, esta expressão seja desligada através da metilação favorecendo a invasão e migração das células tumorais.

A continuidade deste estudos deverá indicar a correlação da hipermetilação tanto da ADAM 12 como da ADAM 33 na progressão dos tumores de mama e indicar a localização da expressão destes genes "in vivo", além de mostrar os fatores que regulam a expressão dos mesmos nestes tumores.



***CONCLUSÕES***

---

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que:

- 9 das 21 ADAMs humanas apresentam ilhas de CpG em suas regiões promotoras sugerindo que a metilação possa ter um papel importante na regulação da expressão desses genes.
- Uma diminuição significativa nos níveis de expressão dos genes ADAM 12 e 33 foi detectada através de RT-PCR em linhagens tumorais de mama em relação ao tecido normal.
- Uma correlação direta entre a ausência de expressão dos genes ADAM12 e 33 e a presença de metilação da região promotora desses genes foi verificada para a maioria das linhagens tumorais avaliadas, sugerindo que a metilação esteja diretamente relacionada com a expressão destes genes nestas linhagens. Porém, não podemos excluir a possibilidade da existência de outros mecanismos de regulação da expressão gênica.
- O tratamento com o agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicitidina foi capaz de induzir a expressão dos genes ADAM12 e 33 em linhagens de mama nas quais os mesmos estavam silenciados.
- A presença de metilação na região promotora dos genes ADAM 12 e 33 foi verificada em 49,1% e em 55,6% das amostras tumorais de mama respectivamente.

- Existe uma associação entre a hipermetilação da região promotora dos genes ADAM 12 e 33 e o estadiamento de tumores de mama, sugerindo que a metilação desses genes ocorra durante o processo de progressão tumoral.
- Existe uma associação entre a hipermetilação da região promotora da ADAM 12 com o tamanho do tumor e a positividade de linfonodos, sugerindo que o gene ADAM12 possa ser utilizado como um marcador molecular para o câncer de mama.
- Não foi possível observar uma associação estatisticamente significativa entre a hipermetilação da região promotora dos genes ADAM 12 e 33 e a sobrevida global e livre de doença para pacientes com tumores de mama.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abram CL, Seals DF, Pass I, et al. The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs Family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. **J Biol Chem** 2003; 278:16844-51.

Amatschek S, Koenig U, Auer H, et al. Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. **Cancer Res** 2004; 64:844-56.

Asakura M, Kitakaze M, Takashima S, et al. Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. **Nat Med** 2002; 8:35-40.

Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. **Int J Biochem Cell Biol** 1999; 31:1037-51.

Bae YK, Brown A, Garrett E, et al. Hypermethylation in histologically distinct classes of breast cancer. **Clin Cancer Res** 2004; 10:5998-6005.

Bais AJ, Gardner AE, McKenzie OL, Callen DF, Sutherland GR, Kremmidiotis G. Aberrant CBFA2T3B gene promoter methylation in breast tumors. **Mol Cancer** 2004; 3:22-??.

Bax DV, Messent AJ, Tart J, et al. Integrin alpha5beta1 and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells. **J Biol Chem** 2004; 279:22377-86.

Beck V, Herold H, Bengel A, et al. ADAM15 decreases integrin alphavbeta3/vitronectin-mediated ovarian cancer cell adhesion and motility in an RGD-dependent fashion. **Int J Biochem Cell Biol** 2005; 37:590-603.

Ben-Kasus T, Ben-Zvi Z, Marquez VE, Kelley JA, Agbaria R. Metabolic activation of zebularine, a novel DNA methylation inhibitor, in human bladder carcinoma cells. **Biochem Pharmacol** 2005; 70:121-33.

Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. **Nature** 1997; 385:729-33.

Black RA. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. **Int J Biochem Cell Biol** 2002; 34:1-5.

Blobel CP, White JM. Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing disintegrin domain. **Curr Opin Cell Biol** 1992; 4:760-5.

Blobel CP. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. **Cell** 1997; 90:589-92.

Bogenrieder T, Herlyn M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. **Oncogene** 2003; 22:6524-36.

Bridges LC, Tani PH, Hanson KR, Roberts CM, Judkins MB, Bowditch RD. The lymphocyte metalloprotease MDC-L (ADAM 28) is a ligand for the integrin alpha4beta1. **J Biol Chem** 2002; 277:3784-92.

Bridges LC, Sheppard D, Bowditch RD. ADAM disintegrin-like domain recognition by the lymphocyte integrins alpha4beta1 and alpha4beta7. **Biochem J** 2005; 387:101-8.

Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, et al. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. **J Biol Chem** 1998; 273:27765-7.

Cal S, Freije JM, Lopez JM, Takada Y, Lopez-Otin C. ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the alphavbeta3 integrin through an RGD-independent mechanism. **Mol Biol Cell** 2000; 11:1457-69.

Cao Y, Kang Q, Zhao Z, Zolkiewska A. Intracellular processing of metalloprotease disintegrin ADAM12. **J Biol Chem** 2002; 277:26403-11.

Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Roessner A, Rocken C. The disintegrin-metalloproteinases ADAM9, ADAM12, and ADAM15 are upregulated in gastric cancer. **Int J Oncol** 2005; 26:17-24.

Chae SC, Yoon KH, Chung HT. Identification of novel polymorphisms in the Adam33 gene. **J Hum Genet** 2003; 48:278-81.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem** 1987; 162:156-9.

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.

Church GM, Gilbert W. Genomic sequencing. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1984; 81:1991-5.

Costa FF, Verbisek NV, Salim AC, et al. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene** 2004; 23:1481-8.

Costa FF, Colin C, Shinjo SM, Zanata SM, Marie SK, Sogayar MC, Camargo AA. ADAM23 methylation and expression analysis in brain tumors. **Neurosci Lett** 2005; 380:260-4.

Cousin H, Gaultier A, Bleux C, Darribere T, Alfandari D. PACSIN2 is a regulator of the metalloprotease/disintegrin ADAM13. **Dev Biol** 2000; 227:197-210.

Díaz-Rodríguez E, Montero JC, Esparis-Ogando A, Yuste L, Pandiella A. Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. **Mol Biol Cell** 2002; 13:2031-44.

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

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature** 2004; 429:457-63.

Ehrlich M. DNA hypomethylation, cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome and chromosomal rearrangements. **J Nutr** 2002; 132:2424S-9S.

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.

Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 2005a; 45:629-56.

Esteller M. Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. **J Pathol** 2005b; 205:172-80.



Eto K, Puzon-McLaughlin W, Sheppard D, Sehara-Fujisawa A, Zhang XP, Takada Y. RGD-independent binding of integrin alpha9beta1 to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction. **J Biol Chem** 2000; 275:34922-30.

Eto K, Huet C, Tarui T, et al. Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin alpha 9beta 1: implications for sperm-egg binding and other cell interactions. **J Biol Chem** 2002; 277:17804-10.

Fabre-Lafay S, Garrido-Urbani S, Reymond N, Goncalves A, Dubreuil P, Lopez M. Nectin-4, a new serological breast cancer marker, is a substrate for tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM-17. **J Biol Chem** 2005; 280:19543-50.

Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. **Nucleic Acids Res** 1983; 11:6883-94.

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

Garlisi CG, Zou J, Devito KE, Tian F, Zhu FX, Liu J, Shah H, Wan Y, Motasim Billah M, Egan RW, Umland SP. Human ADAM33: protein maturation and localization. **Biochem Biophys Res Commun** 2003; 301:35-43.

Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. **Science** 1999; 285:1028-32.

Gilpin BJ, Loechel F, Mattei MG, Engvall E, Albrechtsen R, Wewer UM. A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo. **J Biol Chem** 1998; 273:157-66.

Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. **Hum Genet** 1989; 83:155-8.

Gunn TM, Azarani A, Kim PH, Hyman RW, Davis RW, Barsh GS. Identification and preliminary characterization of mouse Adam33. **BMC Genet** 2002; 3:2.

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:9821-6.

Howard L, Nelson KK, Maciewicz RA, Blobel CP. Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1. **J Biol Chem** 1999; 274:31693-9.

Breastcancer.org/Is the Breast Cancer Invasive. Available from: <URL:[http://www.breastcancer.org/is\\_cancer\\_invasive.html](http://www.breastcancer.org/is_cancer_invasive.html)> [2005 Jul 25]

The Breast (cross section). Available from: <URL:<http://www.cancervic.org.au/cancer1/prevent/breasthealth/dcis.gif>> [2005 Jul 25]

Methylation of CpG Island in DNA. Available from: <URL:[http://www.designeduniverse.com/articles/Nobel\\_Prize/methylation.jpg](http://www.designeduniverse.com/articles/Nobel_Prize/methylation.jpg)> [2005 Jul 25]

EMBOSS CpGPlot/CpGReport/Isochore. Available from: <URL:<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>> [2005 Jul 25]

Hospital do Câncer A.C. Camargos/Departamento de Matologia. Disponível em: <URL:<http://www.hcanc.org.br>> [2005 Jul 25]

Hu XC, Wong IH, Chow LW. Tumor-derived aberrant methylation in plasma of invasive ductal breast cancer patients: clinical implications. **Oncol Rep** 2003; 10:1811-5.

Huang L, Feng L, Yang L, Zhou W, Zhao S, Li C. Screen and identification of proteins interacting with ADAM19 cytoplasmic tail. **Mol Biol Rep** 2000; 29:317-23.

Huovila AP, Turner AJ, Peltto-Huikko M, Karkkainen I, Ortiz RM. Shedding light on ADAM metalloproteinases. **Trends Biochem Sci** 2005; 30:413-22.

Iba K, Albrechtsen R, Gilpin B, et al. The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. **J Cell Biol** 2000; 149:1143-56.

Iba K, Albrechtsen R, Gilpin BJ, Loechel F, Wewer UM. Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion. **Am J Pathol** 1999; 154:1489-501.

Issa JP. Aging, DNA methylation and cancer. **Crit Rev Oncol Hematol** 1999; 32:31-43.

Johnson PJ, Lo YM. Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease. **Clin Chem** 2002; 48:1186-93.

Katagiri T, Harada Y, Emi M, Nakamura Y. Human metalloprotease/disintegrin-like (MDC) gene: exon-intron organization and alternative splicing. **Cytogenet Cell Genet** 1995; 68:39-44.

Keen JC, Davidson NE. The biology of breast carcinoma. **Cancer** 2003; 97(3 Suppl):825-33.

Klein PM, Lawrence JA. Lavage and nipple aspiration of breast ductal fluids: a source of biomarkers for environmental mutagenesis. **Environ Mol Mutagen** 2002; 39:127-33.

Kodama T, Ikeda E, Okada A, et al. ADAM12 is selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell proliferation and shedding of heparin-binding epidermal growth factor. **Am J Pathol** 2004; 165:1743-53.

Krassenstein R, Sauter E, Dulaimi E, et al. Detection of breast cancer in nipple aspirate fluid by CpG island hypermethylation. **Clin Cancer Res** 2004; 10:28-32.

Krätzschmar J, Lum L, Blobel CP. Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. **J Biol Chem** 1996; 271:4593-6.

Kurisaki T, Masuda A, Sudo K, et al. Phenotypic analysis of Meltrin alpha (ADAM12)-deficient mice: involvement of Meltrin alpha in adipogenesis and myogenesis. **Mol Cell Biol** 2003; 23:55-61.

Kveiborg M, Frohlich C, Albrechtsen R, et al. A role for ADAM12 in breast tumor progression and stromal cell apoptosis. **Cancer Res** 2005; 65:4754-61.

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

Lammich S, Kojro E, Postina R, et al. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96:3922-7.

Le Pabic H, Bonnier D, Wewer UM, et al. ADAM12 in human liver cancers: TGF-beta-regulated expression in stellate cells is associated with matrix remodeling. **Hepatology** 2003; 37:1056-66.

Lendeckel U, Kohl J, Arndt M, Carl-McGrath S, Donat H, Rocken C. Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. **J Cancer Res Clin Oncol** 2005; 131:41-8.

Ma J, Zhou J, Fan S, et al. Role of a novel EGF-like domain-containing gene NGX6 in cell adhesion modulation in nasopharyngeal carcinoma cells. **Carcinogenesis** 2005; 26:281-91.

McCulloch DR, Harvey M, Herington AC. The expression of the ADAMs proteases in prostate cancer cell lines and their regulation by dihydrotestosterone. **Mol Cell Endocrinol** 2000; 167:11-21.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2005 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Mori S, Tanaka M, Nanba D, et al. PACSIN3 binds ADAM12/meltrin alpha and up-regulates ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor. **J Biol Chem** 2003; 278:46029-34.

Moss ML, Jin SL, Milla ME, et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. **Nature** 1997; 385:733-6.

Moss ML, White JM, Lambert MH, Andrews RC. TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. **Drug Discov Today** 2001; 6:417-26.

Moss ML, Bartsch JW. Therapeutic benefits from targeting of ADAM family members. **Biochemistry** 2004; 43:7227-35.

Muller HM, Widschwendter A, Fiegl H, et al. DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. **Cancer Res** 2003; 63:7641-5.

Muller HM, Fiegl H, Widschwendter A, Widschwendter M. Prognostic DNA methylation marker in serum of cancer patients. **Ann N Y Acad Sci** 2004; 1022:44-9.

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

Nakhlis F, Morrow M. Ductal carcinoma in situ. **Surg Clin North Am** 2003; 83:821-39.

Nath D, Slocombe PM, Stephens PE, et al. Interaction of metargidin (ADAM-15) with alphavbeta3 and alpha5beta1 integrins on different haemopoietic cells. **J Cell Sci** 1999; 112:579-87.

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

Poghosyan Z, Robbins SM, Houslay MD, Webster A, Murphy G, Edwards DR. Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein-tyrosine kinases. **J Biol Chem** 2002; 277:4999-5007.

Pradhan S, Esteve PO. Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression. **Clin Immunol** 2003; 109:6-16.

Primakoff P, Myles DG. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. **Trends Genet** 2000; 16:83-7.

Roy R, Wewer UM, Zurakowski D, Pories SE, Moses MA. ADAM 12 cleaves extracellular matrix proteins and correlates with cancer status and stage. **J Biol Chem** 2004; 279:51323-30.

Sagane K, Yamazaki K, Mizui Y, Tanaka I. Cloning and chromosomal mapping of mouse ADAM11, ADAM22 and ADAM23. **Gene** 1999; 236:79-86.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1977; 74:5463-7.

Schlomann U, Rathke-Hartlieb S, Yamamoto S, Jockusch H, Bartsch JW. Tumor necrosis factor alpha induces a metalloprotease-disintegrin, ADAM8 (CD156): implications for neuron-glia interactions during neurodegeneration. **J Neurosci** 2000; 20:7964-71.

Schütz A, Hartig W, Wobus M, Grosche J, Wittekind Ch, Aust G. Expression of ADAM15 in lung carcinomas. **Virchows Arch** 2005; 446:421-9.

Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes Dev** 2003; 17:7-30.

Shapiro SD, Owen CA. ADAM-33 surfaces as an asthma gene. **N Engl J Med** 2002; 347:936-8.

Shen D, He J, Chang HR. In silico identification of breast cancer genes by combined multiple high throughput analyses. **Int J Mol Med** 2005; 15:205-12.

Shi W, Fan H, Shum L, Derynck R. The tetraspanin CD9 associates with transmembrane TGF-alpha and regulates TGF-alpha-induced EGF receptor activation and cell proliferation. **J Cell Biol** 2000; 148:591-602.

Smith KM, Gaultier A, Cousin H, Alfandari D, White JM, DeSimone DW. The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo. **J Cell Biol** 2002; 159:893-902.

Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J Mol Biol** 1975; 98:503-17.

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

Suzuki A, Kadota N, Hara T, et al. Meltrin alpha cytoplasmic domain interacts with SH3 domains of Src and Grb2 and is phosphorylated by v-Src. **Oncogene** 2000; 19:5842-50.

Tanaka M, Nanba D, Mori S, Shiba F, Ishiguro H, Yoshino K, Matsuura N, Higashiyama S. ADAM binding protein Eve-1 is required for ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands. **J Biol Chem** 2004; 279:41950-9.

Teodoridis JM, Strathdee G, Brown R. Epigenetic silencing mediated by CpG island methylation: potential as a therapeutic target and as a biomarker. **Drug Resist Updat** 2004; 7:267-78.

Thodeti CK, Albrechtsen R, Grauslund M, et al. ADAM12/syndecan-4 signaling promotes beta 1 integrin-dependent cell spreading through protein kinase Calpha and RhoA. **J Biol Chem** 2003; 278:9576-84.

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

Tian BL, Wen JM, Zhang M, Xie D, Xu RB, Luo CJ. The expression of ADAM12 (meltrin alpha) in human giant cell tumours of bone. **Mol Pathol** 2002; 55:394-7.

Umland SP, Garlisi CG, Shah H, et al. Human ADAM33 messenger RNA expression profile and post-transcriptional regulation. **Am J Respir Cell Mol Biol** 2003; 29:571-82.



Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. **Nature** 2002; 418:426-30.

Van Poznak C, Seidman AD. Critical review of current treatment strategies for advanced hormone insensitive breast cancer. **Cancer Invest** 2002; 20 Suppl 2:1-14.

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

White JM. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. **Curr Opin Cell Biol** 2003; 15:598-606.

Wolfsberg TG, White JM. ADAMs in fertilization and development. **Dev Biol** 1996; 180:389-401.

Wu E, Croucher PI, McKie N. Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies. **Biochem Biophys Res Commun** 1997; 235:437-42.

Yagami-Hiromasa T, Sato T, Kurisaki T, et al. A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. **Nature** 1995; 377:652-6.

Yang X, Yan L, Davidson NE. DNA methylation in breast cancer. **Endocr Relat Cancer** 2001; 8:115-27.

Yoshinaka T, Nishii K, Yamada K, et al. Identification and characterization of novel mouse and human ADAM33s with potential metalloprotease activity. **Gene** 2002; 282:227-36.

Yuan Y, Liu H, Sahin A, Dai JL. Reactivation of SYK expression by inhibition of DNA methylation suppresses breast cancer cell invasiveness. **Int J Cancer** 2005;113:654-9.

Zhang XP, Kamata T, Yokoyama K, Puzon-McLaughlin W, Takada Y. Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin  $\alpha v \beta 3$ . **J Biol Chem** 1998; 273:7345-50.

Zou J, Zhu F, Liu J, et al. Catalytic activity of human ADAM33. **J Biol Chem** 2004; 279:9818-30.

Mendelsohn RR, Korelitz BI, Gleim GW. Death from Crohn's disease: lessons from a personal experience. **J Clin Gastroenterol** 1995; 20:22-6.

Ramaswamy S, Perou CM. DNA microarrays in breast cancer: the promise of personalised medicine. **Lancet** 2003; 361:1576-7.

Schlomann U, Rathke-Hartlieb S, Yamamoto S, Jockusch H, Bartsch JW. Tumor necrosis factor alpha induces a metalloprotease-disintegrin, ADAM8 (CD 156): implications for neuron-glia interactions during neurodegeneration. **J Neurosci** 2000; 20:7964-71.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:10869-74.

van't Veer LJ, Paik S, Hayes DF. Gene expression profiling of breast cancer: a new tumor marker. **J Clin Oncol** 2005; 23:1631-5.

***ANEXOS***

---

*Anexo 1*  
*Tabela dos Dados Clínico-Patológicos*  
*das Pacientes*

---

*Anexo 2*  
*“Epigenetic Silencing of the Adhesion  
Molecule ADAM23 is highly frequent in  
Breast Tumors.”*  
*Oncogene 2004*

---

*Anexo 3*  
*“ADAM23 Hypermethylation as an  
Independent Prognostic Factor in Breast  
Cancer.”*  
*(Artigo Submetido)*

---

*Anexo 4*  
*Curriculum Vitae*

---