

RUBENS DOS SANTOS SAMUEL DE ALMEIDA

**ANÁLISE DE MUTAÇÕES E CARACTERIZAÇÃO DO GENE
MYLK4 EM CARCINOMAS DE MAMA**

BRASÍLIA

2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

RUBENS DOS SANTOS SAMUEL DE ALMEIDA

Análise de mutações e caracterização do gene *MYLK4* em carcinomas de
mama

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre
em Ciências da Saúde pelo Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Pittella Silva

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a Rosângela Vieira de Andrade

BRASÍLIA

2014

RUBENS DOS SANTOS SAMUEL DE ALMEIDA

Análise de mutações e caracterização do gene *MYLK4* em carcinomas de mama

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 14 de Agosto de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Pittella Silva (Presidente)

Universidade de Brasília, UnB

Prof^a. Dr^a. Marie Togashi

Universidade de Brasília, UnB

Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo

Universidade de Brasília, UnB

Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira (Suplente)

Universidade de Brasília, UnB

“A pesquisa básica é como atirar uma flecha para o ar e, onde ela cair, pintar um alvo”. (Homer Adkins Burton)

Eroncina da Cunha Ledebark (*in
memorian*)

AGRADECIMENTOS

Muitos obstáculos foram superados ao longo da incrível jornada que foi esse mestrado. Este trabalho não foi conquistado apenas com conhecimento científico, mas com a amizade e apoio de pessoas excepcionais e capazes que conheci ao longo da minha jornada. Sem as trocas de experiências essa vitória não existiria.

Agradeço aos meus pais, Wânia e Hermanny, por me proporcionarem todo o estudo, suporte, amor e carinho durante minha vida.

Aos meus irmãos, Rafael e Sofia, pela paciência nos momentos difíceis e pelo entendimento da ausência necessária.

À minha amada Luana, pela amizade, amor e companheirismo durante esta jornada.

Aos meus amigos de longa data, Pedro Milani, Pedro dos Santos, Bruno Saboya, Vitor Rabelo, Rodrigo Antonelli e Davih Rodrigues, por sempre estarem presentes quando necessário.

À Martha Estrêla, última integrante do PMC FRIENDS, pelo apoio nesses últimos meses do Mestrado. No futuro daremos gargalhadas das dificuldades e desesperos.

Aos amigos que conquistei durante esse projeto no grupo de Patologia Molecular do Câncer, no Laboratório de Farmacologia Molecular e no Laboratório de Virologia Molecular.

A todos que colaboraram com a realização desse trabalho, especialmente a Dora e ao prof. Diêgo Madureira pelo conhecimento e experiência compartilhada, e ao Brenno Vinícius pela colaboração desde o início.

À Fundação de Apoio à pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Ao Professor Doutor Fábio Pittella Silva pela oportunidade, colaboração e docência.

À Professora Doutora Andrea Barretto Motoyama pela oportunidade de iniciar minha jornada na pesquisa em 2008.

Às pessoas que aceitaram participar deste trabalho.

Muito Obrigado

RESUMO

Muitos fatores são caracterizados como desencadeadores do câncer como os fatores genéticos e a desregulação nos processos de sinalização celular. O acúmulo de mutações em células normais está nos fatores genéticos ligados a carcinogênese e a localização dessas mutações no genoma possui um papel fundamental. Até o momento, diversas mutações têm sido descritas em genes importantes relacionados à carcinogênese mamária. Desregulação nos processos de sinalização celular levam por vezes ao aumento da proliferação celular característica fundamental para o desenvolvimento do câncer. Genes da família *MYLK* (*Miosin Light Chain Kinase*) codificam proteínas do tipo serina/treonina quinase inicialmente identificados como responsáveis pela fosforilação da cadeia leve da miosina. Estudos anteriores identificaram mutações no gene *MYLK4* como de grande importância no câncer de mama. Estudos mostram que um aumento da expressão dos genes *MYLK1* e *MYLK2* estão relacionados com a carcinogênese mamária. Os membros desta família não foram totalmente caracterizados. Este estudo buscou investigar uma possível relação entre o *MYLK4* e o câncer de mama. Foi constatado que a frequência de mutações no gene *MYLK4* é baixa tanto em linhagens celulares quanto em amostras clínicas de câncer de mama. Ainda, observamos uma superexpressão do gene em linhagens celulares de câncer de mama e uma maior expressão em mama quando comparado com outros tipos de tecidos normais. A análise por imunohistoquímica em amostras clínicas parafinizadas demonstrou uma maior expressão do *MYLK4* no tecido tumoral e presença em tecido normal. Analisando sua expressão em um número maior de amostras clínicas tumorais pareadas com sua contra parte normal ou não, não foram observadas alterações significativas na expressão do *MYLK4* apenas uma grande variância em sua expressão. Ensaio de superexpressão do *MYLK4* em linhagem celular normal demonstrou um aumento na proliferação celular *in vitro*. Os dados em conjunto apontam para um possível envolvimento do *MYLK4* no crescimento celular em tumores que apresentem superexpressão deste gene.

Palavras-chave: Proteína quinase, *MYLK4*, câncer de mama.

ABSTRACT

Many factors are characterized as causes of cancer such as genetic factors and deregulation of cellular signaling processes. The accumulation of mutations in normal cells is linked to genetic factors in carcinogenesis and the location of these mutations in the genome plays a key role. To date, several mutations have been described in important genes related to mammary carcinogenesis. Disruption in cellular signaling process sometimes leads to increased cell proliferation, critical to the development of cancer. The MYLK (Light Chain Kinase Miosin) gene family encodes proteins of the serine / threonine kinase family originally identified as responsible for the phosphorylation of myosin light chain. Previous studies have identified mutations in the gene MYLK4 to be important in breast cancer. Studies have shown that increased expression of genes MYLK1 and MYLK2 are related to mammary carcinogenesis. Members of this family have not been fully characterized. This study sought to investigate a possible relationship between MYLK4 and breast cancer. It has been found that the frequency of mutations in the gene MYLK4 is low in both cell lines and clinical samples of breast cancer. Also, we observed a gene overexpression in cell lines of breast cancer and increased expression in normal cells of breast cancer when compared with other types of normal tissues. Analysis by immunohistochemistry in paraffin embedded clinical samples showed an increased expression of MYLK4 in tumor tissue and its presence in normal tissue. Analyzing its expression in a larger number of clinical tumor samples paired with its counterpart normal part or not, no significant changes were observed in the expression of MYLK4 just a great variance in their expression. Assay overexpressing MYLK4 normal cell line showed increase on cell proliferation in vitro. This data together suggest a possible involvement of MYLK4 in cell growth in tumors that exhibit overexpression of this gene.

Keywords: Protein Kinase, MYLK4, breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – As seis características do câncer.
- Figura 2 – Esquema de coleta de fragmentos tumorais e não tumorais de amostras
- Figura 3 – Amplificação dos onze exons do gene MYLK4.
- Figura 4 – Lista de Primers para amplificação dos onze exons do gene MYLK4
- Figura 5 – Resumo do método de transfecção adotado no trabalho, utilizando o reagente lipofectaminaTM2000
- Figura 6 – Modelo esquemático do vetor de expressão.
- Figura 7 – Resumo da diluição seriada utilizada para seleção clonal.
- Figura 8 – Comparação entre MYLK4 e os outros membros da família MYLK4
- Figura 9 – Alinhamento da sequência dos domínios quinase dos membros da família MYLK
- Figura 10 – Identificação de mutações no gene *MYLK4* em linhagens celulares de câncer de mama.
- Figura 11 – Representação esquemática do gene e da proteína MYLK4.
- Figura 12 – Análise in silico de novas mutações no gene MYLK4
- Figura 13 – Expressão de *MYLK4* em tecidos normais por PCR semi-quantitativo.
- Figura 14 - Expressão relativa do gene *MYLK4* em diferentes tecidos humanos
- Figura 15 – Expressão de MYLK4 em linhagens celular de câncer de mama.
- Figura 16 – Quantificação da expressão de *MYLK4* em linhagens de câncer de mama
- Figura 17 – Distribuição tecidual do MYLK4 em tecidos normais.
- Figura 18 – Distribuição do MYLK4 em tecidos tumorais.
- Figura 19 – Distribuição tecidual do MYLK4 em câncer de mama.
- Figura 20 – Expressão relativa do *MYLK4* em amostras clínicas de câncer de mama.
- Figura 21 – Expressão relativa de MYLK4 em pool de amostras clínicas
- Figura 22 – Expressão de *MYLK4* em diferentes tipos de câncer de mama
- Figura 23 – Determinação da quantidade de agente seletivo
- Figura 24 – Western Blot de controle e clone superexpressando MYLK4

Figura 25 – Ensaio de MTT para avaliação do efeito da superexpressão do gene *MYLK4* em células HEK293

Figura 26 – Avaliação do tempo de duplicação celular em clone superexpressando *MYLK4*

Figura 27 – Ensaio de formação de colônia em soft Agar

Figura 28 – Análise de formação de colônias em soft Agar.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil para 2014

Tabela 2 – Classificação dos principais genes envolvidos na carcinogênese mamária

Tabela 3 – Caracterização de linhagens celulares de câncer de mama.

Tabela 4 – Características clínicas das amostras clínicas sequenciadas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6p.25.2	Cromossomo 6, braço curto, região 2, banda 5, sub-banda 2
ATCC	American Type Culture Collection
cDNA	DNA complementar
Cerb-B2	Receptor do crescimento epidérmico HER2/neu
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Cycle threshold
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse I	Desoxirribonuclease I
G418	Geneticina
HEK293	Human Embryonic Kidney 293
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HUB	Hospital Universitário de Brasília
I.C.	Intervalo de confiança
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo (em tempo real)
RE	Receptor de estrógeno
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Receptor de progesterona

RQ	Quantificação relativa
SFB	Soro fetal bovino
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UnB	Universidade de Brasília
Δ CT	Média do CT do gene alvo normalizado com a média do CT de um gene endógeno
$\Delta\Delta$ CT	Δ CT da amostra de interesse calibrado com o Δ CT de uma amostra controle.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	O CÂNCER	16
1.2	CÂNCER DE MAMA.....	19
1.3	ALTERAÇÕES MOLECULARES NO CÂNCER.....	21
1.4	FAMÍLIA MYLK E GENE MYLK4	23
2.	OBJETIVO	26
2.1	OBJETIVOS GERAIS	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS ENTRE MEMBROS DA FAMÍLIA MYLK4.....	27
3.2	LINHAGENS CELULARES.....	27
3.3	SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA) DE DIFERENTES TIPOS DE TECIDO	28
3.4	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE MAMA NORMAL E TUMORAL.....	29
3.5	EXTRAÇÃO DE RNA, DNA E PROTEÍNAS DE AMOSTRAS CLÍNICAS E LINHAGENS CELULARES.....	30
3.6	SÍNTESE DE cDNA E QUALIFICAÇÃO DA EXTRAÇÃO	31
3.7	SEQUENCIAMENTO DO GENE MYLK4	32
3.8	TRANSFEÇÃO DE LINHAGENS CELULARES	34
3.9	DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE MÍNIMA DE AGENTE SELETIVO	34
3.10	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR REAÇÃO POR REAÇÃO DE REDUÇÃO DO MTT	35
3.11	SELEÇÃO DAS CÉLULAS TRANSFECTADAS.....	36
3.12	ENSAIO DE IMUNOHISTOQUÍMICA	37
3.13	WESTERN BLOT	38
3.14	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA EM SOFTAGAR	39
4.	RESULTADOS.....	41
4.1	GENE MYLK4	41
4.2	SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>MYLK4</i>	42
4.2.1	SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>MYLK4</i> EM LINHAGENS	42
4.2.2	SEQUENCIAMENTO DO GENE MYLK4 EM AMOSTRAS TUMORAIS.....	45
4.3	PERFIL DE EXPRESSÃO DO MYLK4 EM TECIDOS NORMAIS	48

4.4	PERFIL DE EXPRESSÃO DO <i>MYLK4</i> EM LINHAGENS CELULAR DE CÂNCER DE MAMA..	50
4.5	IMUNOHISTOQUÍMICA DE MYLK4 EM TECIDOS NORMAIS E TUMORAIS.	52
4.6	PERFIL DE EXPRESSÃO DE <i>MYLK4</i> EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE CÂNCER DE MAMA...	54
4.7	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPEREXPRESSÃO DO GENE <i>MYLK4</i>	56
5.	DISCUSSÃO	62
6.	CONCLUSÃO.....	66
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
8.	ANEXOS	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER


Câncer é um termo usado para as doenças em que as células assumem características que as tornam capazes de se dividir sem controle e de invadir outros tecidos. As células cancerosas podem se espalhar para outras partes do corpo através do sangue e sistema linfático (1,2). O câncer não é apenas uma doença, mas o resultado da combinação de muitas doenças. Existem diversos tipos diferentes de câncer e em sua maioria são nomeados de acordo com o órgão ou o tipo de célula na qual o processo de carcinogênese é iniciado (3).

O câncer se apresenta como um problema de saúde pública atualmente, tanto em países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Estatísticas da Organização Mundial da Saúde mostram que no ano de 2012 8,2 milhões de pessoas morreram por câncer no mundo, colocando essa doença como uma das principais causas de mortes no mundo, sendo que 30% dos casos de câncer poderiam ser prevenidos. Além disso, a expectativa de novos casos por ano deve aumentar de 14 milhões em 2012 para 22 milhões de novos casos de câncer por ano até 2032 (4).

O aumento constante nas taxas globais de incidência de câncer ocorre em grande parte pelo crescimento e envelhecimento da população mundial além de certos hábitos que podem causar câncer como tabagismo, dieta desbalanceada, sedentarismo, etc. Esses fatores devem ser observados nos estudos das taxas de câncer, principalmente em países em desenvolvimento onde ocorre mais da metade das mortes por câncer (5), dessa forma com o estudo desses diversos fatores é possível buscar relações entre eles e o surgimento de alguns tipos de câncer (6). No mundo, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres sendo o segundo tipo de câncer mais comum com 1,7 milhão de novos casos diagnosticados em 2012, enquanto em homens o câncer de próstata apresentou 1,1 milhão de novos casos, sendo responsável por 15% dos casos de câncer em homens. (7). No Brasil os dados não são diferentes, o câncer de mama é o com maior incidência entre as mulheres com uma expectativa para 2014 de que 20,8% dos novos casos de câncer em mulheres sejam de câncer de mama, enquanto nos

homens a expectativa é que 22,8% dos novos casos sejam de câncer de próstata, o mais incidente entre os homens.

Tabela 1 – Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil para 2014

Localização primária	casos novos	%		Localização primária	casos novos	%
Próstata	68.800	22,8%	 <p>Homens Mulheres</p>	Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%		Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%		Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%		Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%		Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%		Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%		Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%		Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%		Leucemias	4.320	1,6%

Legenda: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma (6).

O câncer surge pelo acúmulo de mutações genéticas que as células sofrem, ocorrendo uma mutação em um gene responsável pela regulação celular, é possível que essa célula saia do equilíbrio entre proliferação e morte celular, podendo levar a formação de tumores (8,9), que são tecidos complexos, compostos de diversos tipos celulares que interagem de forma heterotópica entre si (10). Com os avanços nas pesquisas sobre o câncer nos anos 1980 e 1990 (11-18), vários dados sobre o comportamento celular no processo da tumorigênese foram obtidos, porém de forma densa e complexa. Buscando facilitar o entendimento sobre as modificações celulares observadas no câncer, Hanahan e Weinberg publicaram em 2000 os

hallmarks do câncer (9), onde foram detalhadas seis características que eram adquiridas pelas células durante o processo da formação do tumor. São elas: 1) Autossuficiência para sinais de crescimento, 2) Insensibilidade a supressores de crescimento, 3) invasão tecidual e metástase, 4) potencial replicativo infinito, 5) sustentação da angiogênese e 6) evasão da apoptose.



Figura 1 – As seis características do câncer.

Foi sugerido que a maioria – se não todos – dos cânceres durante seu desenvolvimento adquire o mesmo conjunto de capacidades funcionais, embora isso ocorra através de várias estratégias diferentes. Adaptado de Hanahan e Weinberg (10).

Subjacente às seis características principais, instabilidade genômica e inflamação são responsáveis por promover muitas destas características. Estudos na última década mostraram duas características que podem ser adicionadas as características anteriores: reprogramação do metabolismo celular e evasão a destruição pelo sistema imune (10).

Listadas as principais características que as células cancerígenas adquirem durante a tumorigênese, a busca por novos marcadores

moleculares capazes de promover um tratamento racional, diagnosticar uma pré-disposição à doença ou permitir uma melhor estratégia no desenvolvimento de novas drogas anti-câncer revela a necessidade de aprofundamento nos estudos que levem ao melhor entendimento dos processos ligados à carcinogênese (19-23). Portanto, são de fundamental importância os estudos dos mecanismos moleculares que estão envolvidos nos eventos relacionados ao surgimento e a progressão do câncer de mama.

1.2 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum na população feminina, com uma expectativa de 22% de casos novos por ano. Se diagnosticado e tratado oportunamente, o prognóstico é relativamente bom. No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios tardios. Na população mundial, a sobrevivência média após cinco anos é de 61% e estudos estatísticos indicam aumento constante de novos casos de câncer de mama em países desenvolvidos e em desenvolvimento. (24)

A estimativa para o ano de 2014 é de 57.120 novos casos e 12.245 mortes decorrentes de câncer de mama no Brasil, com um risco estimado de 63 novos casos a cada 100 mil mulheres. No Distrito Federal, espera-se 920 novos casos (24).

Vários são os fatores envolvidos no surgimento do câncer de mama, entre eles podemos citar a idade e o histórico de câncer de mama familiar, uso abusivo de hormônios e gestação após os 30 anos de idade, porém apesar do grande número de pesquisas realizadas a etiologia do câncer de mama ainda não foi totalmente esclarecida, sendo necessário um conjunto de fatores para determinar o desenvolvimento da doença (25-29).

Com idade superior a 35 anos a incidência da doença cresce progressivamente, podendo chegar a ser 10 vezes maior (24). A história familiar de câncer de mama representa um risco aumentado para o desenvolvimento de tumores, quanto mais cedo o aparecimento de câncer de mama em um parente de primeiro grau, maior o risco, porém apenas 5-10% dos casos de câncer de mama possuem histórico familiar (30).

Entre as técnicas utilizadas para a detecção e diagnóstico do câncer de mama, a principal é o exame de imagem enquanto o tratamento é determinado pelas características histopatológicas além dos dados clínicos do paciente, porém uma análise molecular do tumor pode gerar informações importantes para a definição de um tratamento específico ao tipo de tumor, uma vez que diferentes tipos de câncer de mama possuem características distintas (31).

Os principais genes no contexto do câncer de mama são o BRCA1, BRCA2, p53 e PTEN (30).

Estudos moleculares mostram que o câncer de mama possui várias características distintas como evolução da doença, prognóstico e comportamento biológico (32). Carcinomas de mama classificados com o mesmo grau de diferenciação e tipos histológicos idênticos podem apresentar resultados finais distintos, essa característica pode ser explicada pela complexidade do câncer de mama e pelo acúmulo de alterações moleculares (33,34). Essa heterogeneidade no câncer de mama ganhou destaque após a descoberta de receptores hormonais que se mostraram efetivos alvos terapêuticos no tratamento do câncer de mama, são eles: Receptor do Fator de Crescimento Epitelial do Tipo 2 (HER2), o Receptor de Estrógeno (RE) e o Receptor de Progesterona (RP) (35). Essas variações nas características moleculares de um mesmo tipo de câncer mostraram a importância de se tomar medidas preventivas ou definir tratamentos levando em consideração as características individuais (36) e tornou a busca por novos alvos terapêuticos, nos vários subtipos moleculares de câncer de mama, um dos principais objetivos na investigação molecular do câncer de mama. (37). Essa evolução rápida entre a melhora no diagnóstico e criação de terapias adaptada ao genoma individual acontece através do desenvolvimento do campo da farmacogenômica (19).

Em países em desenvolvimento o câncer é diagnosticado tardiamente devido à falta de políticas de prevenção, diagnóstico precoce e acesso aos instrumentos de diagnóstico levando a um aumento na taxa de morbidade e mortalidade da doença (4, 38). Estudos mostram que o diagnóstico e o tratamento precoce do câncer de mama podem reduzir a mortalidade específica, e comparando a sobrevivência após cinco anos, populações de países

desenvolvidos apresentam uma sobrevivência 25% maior comparado com populações de países em desenvolvimento (24,39).

Dessa forma um dos principais objetivos na pesquisa do câncer de mama é a busca por novos marcadores moleculares que possibilitem melhorar diagnósticos e terapias de forma cada vez mais individualizada, buscando alterar o resultado final da doença (37,40).

1.3 ALTERAÇÕES MOLECULARES NO CÂNCER

No carcinoma vários mecanismos prejudicam progressivamente o altamente regulado, sistema de crescimento e morte celular. Entre esses mecanismos pode-se observar o acúmulo de mutações, instabilidades cromossômicas e alterações epigenéticas capazes de alterar a taxa de proliferação celular e danificar o sistema de reparo do DNA (37). Muitos estudos foram realizados nos últimos anos buscando identificar os mecanismos de oncogenes e genes supressores tumorais envolvidos na transformação celular maligna (41).

Dentre esses mecanismos, destacam-se a ação de oncogenes mutados ou amplificados, resultando no aumento de suas atividades enzimáticas específicas e de mutações em genes supressores de tumor, levando a sua inatividade ou mau funcionamento. É importante, portanto, identificar novas mutações gênicas e buscar correlacioná-las ao surgimento e à progressão de diversos tipos de tumores, visto que as mutações podem alterar a função do *gene* que, por sua vez, podem estar diretamente envolvidos na proliferação e diferenciação celular como, por exemplo, o controle do ciclo celular, apoptose, reparo do DNA e outros (42).

As proteínas quinases constituem a maior família de proteínas em eucariotos, formada por aproximadamente 520 membros, correspondendo a aproximadamente 2% dos genes humanos. Essas proteínas são a chave da sinalização intercelular, atuando como mediadores na cascata de sinalização realizando importantes funções nos processos biológicos como proliferação celular, diferenciação, metabolismo, apoptose e oncogênese, uma vez que mais de 30% de todas as proteínas humanas podem ter sua atividade alterada por quinases (43).

Proteínas quinase em eucariotos possuem como característica o domínio catalítico conservado (44-47). Na porção N-terminal existe uma região em glicina e lisina, responsável pela ligação do ATP, que funciona na maioria das proteínas quinases como o doador do grupo fosfato. Na parte central da proteína existe o domínio catalítico, responsável pela atividade catalítica da enzima, contendo um ácido aspártico conservado (48).

Devido a grande importância no controle celular, a atividade das proteínas quinases são altamente reguladas por fosforilação, seja essa mediada por outra proteína quinase ou por autofosforilação. Essa atividade química consiste na transferência de um grupo fosfato para um aminoácido específico de forma covalente. Essas modificações químicas permitem a regulação das proteínas dessa família permitindo a ligação com ativadores, inibidores, ou alterando a localização da proteína em relação ao seu substrato.

Os três principais grupos de proteínas quinases atuam fosforilando resíduos de serina e treonina (Serina/Treonina quinase), resíduos de tirosina (Tirosina quinase) ou resíduos de serina, treonina e tirosina (dupla-especificidade quinase) (44). Serina/threonina quinases fosforilam o grupo hidroxila (OH-) na cadeia lateral desses aminoácidos, possuindo sua atividade de quinase regulada por eventos específicos como dano no DNA ou por sinais químicos como Ca^{2+} /calmodulina, cAMP/cGMP, diacilglicerol. Um dos principais membros dessa família é a MAP-quinase onde seus membros são ativados por sinais mitogênicos ou por stress celular. Tirosina quinases atuam fosforilando resíduos de hidroxila em tirosinas específicas nas proteínas alvo, porém sua ação se concentra mais em receptores de fatores de crescimento e em suas cascatas de sinalização. Um importante membro dessa família no câncer é o EGFR (Receptor de fator de Crescimento Epidermal), presente na membrana celular. (49-51).

O envolvimento dessa família de proteínas no desenvolvimento e na progressão de tumores pode ocorrer devido a fatores genômicos que geram alterações na estrutura e função dessas proteínas. Esses fatores genômicos podem ser, por exemplo, amplificação gênica, rearranjos genômicos ou mutações que conduzem à desregulação na atividade de quinase. Com um aumento na atividade de quinase os produtos da transcrição desses genes

podem atuar em diferentes rotas de sinalização relacionadas à atividade celular. O papel das proteínas quinase é, portanto, muito relevante para a progressão de vários tipos de cânceres. Com isso, o estudo funcional desses genes e do impedimento mutacional que eles podem sofrer é cada vez mais realizado em diversos tipos de tumores (42).

Devido a grande importância dessa família de proteínas na regulação celular, muitas pesquisas foram realizadas buscando alvos terapêuticos e moléculas capazes de restituir a atividade normal celular perdida no processo de oncogênese (52).

Os inibidores de quinases podem ser pequenas moléculas, anticorpos monoclonais, imunoconjugados entre outros tipos de moléculas sendo responsáveis por bloquear a atividade de uma categoria de proteína quinase específica. Uma vez que uma mutação pode desencadear uma ativação exacerbada de um oncogene ou a inibição de gene supressor de tumor, essa inibição seletiva é capaz de promover uma base terapêutica individual de acordo com as características do tumor. Assim, o estudo das vias de sinalização que possuem a participação de proteínas quinases, como suas funções, são informações importantes para a busca de novos alvos moleculares para o tratamento do câncer (53-55).

1.4 FAMÍLIA MYLK E GENE MYLK4

Recentes estudos sobre o câncer concentram seus esforços em identificar mutações gênicas e relacioná-las ao surgimento e/ou à progressão dos tumores. No ano de 2007, *Wood, et al* (56) publicaram um trabalho no qual analisaram a sequência de 18.191 genes e identificaram, através de sequenciamento genômico de DNA e análise computacional, 1.718 genes com pelo menos um tipo de mutação em câncer de mama ou de colo-retal. Essa análise foi baseada no *CaMP (Câncer Mutation Prevalence) score*. O *CaMP score* reflete a probabilidade de um número de mutações observadas em um gene ser maior do que o esperado. Através de uma análise estatística 280 genes foram selecionados como possíveis candidatos a ser um *Cancer Gene*. Considerando todos os 280 genes selecionados, aqueles que apresentaram um *CaMP score* maior que 1 foram considerados *Cancer*

Genes (Cancer Candidate Genes ou CAN genes) (57). No ranking dos genes classificados, o *MYLK4* foi o 7º mais relevante com um *CaMP score* maior que o de genes já descritos na literatura como por exemplo o *BRCA1* que atua no reparo de DNA, sendo muito importante no câncer de mama (56).

Tabela 2 – Classificação dos principais genes envolvidos na carcinogênese mamária

Gene	CaMP Score	CaMP Rank
TP53	55,19	1
PIK3CA	10,98	2
ATP8B1	7,93	3
CPAMD8	7,25	6
LOC340156 (MYLK4)	6,60	7
BRCA1	3,10	112
APC2	2.8	132

Legenda: Valor do CaMP score dos principais genes no câncer de mama e classificação do gene *MYLK4* após sequenciamento genômico e análise por computação. *Wood et al.* (56)

As quinases da cadeia leve da miosina (MYLCKs, inglês) são um grupo de proteínas quinases do tipo serina/treonina atualmente divididos em dois subtipos, *MYLK1* e *MYLK2*. O gene *MYLK1* ou *MLCK* localizado no cromossomo 3q21.1 codifica a maior proteína da família que possui 1.914 aminoácidos, predominante no músculo liso. O gene *MYLK2* está localizado no cromossomo 20q13.31 e codifica uma proteína de 596 aminoácidos predominante no músculo esquelético. O gene *MYLK3* está no cromossomo 16q11.2 e o produto protéico possui 819 aminoácidos, predominante em músculo cardíaco. O gene *MYLK4* (Myosin Light Chain Kinase member 4) ocupando aproximadamente 88kpb no cromossomo 6 (6p.25.2) codifica uma proteína de 388 aminoácidos que possui um domínio catalítico de serina/treonina quinase (STk) constituindo uma quinase putativa cuja função ainda não foi descrita na literatura. Os genes dessa família e os seus produtos protéicos ainda não foram completamente descritos e o gene *MYLK4* representa o gene menos estudado desse grupo. (58-62)

A análise da sequência desses genes indica que duas das proteínas codificadas por eles são proteínas quinase dependente de cálcio-calmodulina. [Ca²⁺/Calmodulina-dependente] (MYLK1 ou MLCK e MYLK2.) Acredita-se que esses quatro genes estejam envolvidos na fosforilação da cadeia leve da miosina e dessa forma diretamente relacionados com os eventos da invasão e migração celular através da regulação do citoesqueleto celular.

A ativação e a expressão elevada do mRNA do gene *MYLK1* (*MLCK*) está relacionada com o surgimento e a progressão de um câncer metastático. (63,64). Em trabalho recente (65) identificaram um domínio de ligação para uma acetiltransferase (ARD1) no MYLK1 (MLCK). A acetilação do resíduo de lisina 608 do MLCK impede que ocorra a fosforilação da cadeia leve da miosina provocando uma alteração no comportamento celular e impedindo a migração de células cancerígenas. Nesse trabalho a acetiltransferase hARD1 foi considerada um possível alvo molecular para fármacos no tratamento de câncer metastático já que bloqueia a migração de células cancerígenas através da acetilação do MLCK.

MYLK1 também foi identificado como um possível marcador pra identificação precoce de lesões gástricas pré-cancerígenas (66).

Em estudos anteriores o gene MYLK2 apresentou mutações somáticas em câncer colo-retal, apresentando mutações em 2,9% das amostras analisadas sendo 33% das mutações acontecendo dentro do domínio de quinase da proteína (67).

Com base nos dados obtidos por estudos anteriores sobre os genes da família MYLK e o câncer, a investigação de mutações no gene *MYLK4* em carcinomas de mama pode contribuir de forma significativa para o entendimento do surgimento e progressão do câncer, podendo ser um possível marcador genético dessa patologia. Além disso, sua caracterização funcional além de contribuir como fonte de estudos futuros, pode, através da investigação do seu papel no crescimento celular, auxiliar nas medidas terapêuticas atuando, por exemplo, como alvo de ação de fármacos.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar o padrão de mutações, o perfil de expressão do gene *MYLK4* em linhagens celulares, tecidos normais e amostras de tecido mamário tumoral e contraparte não tumoral de pacientes com câncer de mama.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar os principais objetivos deste trabalho, foram realizadas as seguintes etapas:

- Obtenção de linhagens celulares e amostras clínicas de câncer de mama e isolamento de RNA, DNA e proteína dessas amostras;
- Análise de mutações no gene *MYLK4* em linhagens celulares de câncer de mama e amostras clínicas tumorais e suas contra-partes não tumorais;
- Avaliação do perfil de expressão do gene *MYLK4* em tecidos normais, linhagens celulares de câncer de mama e amostras clínicas tumorais e suas contra-partes não tumorais.
- Análise dos efeitos da hiperexpressão de *MYLK4* no crescimento celular;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS ENTRE MEMBROS DA FAMÍLIA MYLK4

Para análise das possíveis semelhanças entre os membros da família MYLK4, todos os quatro membros foram submetidos a comparações em suas sequências proteicas, bem como seus domínios quinases e sítios de ligação, por meio do programa BLAST e Align da base de dados UniProt (68).

3.2 LINHAGENS CELULARES

Nesse trabalho foram utilizadas oito linhagens celulares de câncer de mama: RNA total de HCC-1954, CAMA-1, SKBR3, MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468 gentilmente cedidas pela Dra. Ana Maria Camargo Aranha (Instituto Ludwig de Pesquisa do Câncer, São Paulo); linhagens celulares HCC-1954, MCF-7 e MDA-MB-231 foram adquiridas pelo *American Type Culture Collection* (ATCC). Células HEK-293 (células embrionárias humanas de rim) foram cedidas gentilmente pela Dra. Galina Gulis, Instituto de Biologia, UnB. As principais características das linhagens celulares de câncer de mama utilizadas estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 – Caracterização de linhagens celulares de câncer de mama.

Linhagem	ER	PR	c-erbB2	Tipo tumoral
HCC1954	-	-	+	carcinoma ductal
HCC2218	-	-	+	carcinoma ductal invasivo
MCF-7	+	+	-	carcinoma ductal invasivo
CAMA1	+	-	-	adenocarcinoma
SKBR3	-	-	+	adenocarcinoma
MDA-MB-231	-	-	-	adenocarcinoma
MDA-MB-436	-	-	-	carcinoma ductal invasivo
MDA-MB-468	-	-	-	adenocarcinoma

Legenda: Aspectos patológicos das linhagens celulares de câncer de mama utilizadas nas análises das características do *MYLK4*. Adaptado de Neves *et al.* (69). ER – receptor de estrógeno; PR – receptor de progesterona; c-erbB2 – receptor tipo 2 para fator de crescimento epidérmico humano (Her2/Neu).

As linhagens celulares que estavam armazenadas em criotubos em nitrogênio líquido foram revividas para o início da cultura. Uma alíquota foi retirada do estoque em nitrogênio líquido e imediatamente incubada em banho-maria a 37°C até total liquefação da solução. Em um tubo de polipropileno tipo *Falcon* de 15mL foi adicionado à solução contendo às células de interesse, em seguida 5mL do meio de cultura apropriado para o tipo celular (DMEM) foi acrescentado gota a gota. Após centrifugação a 1.500rpm por 5 minutos a temperatura ambiente o sobrenadante foi descartado e o precipitado, contendo as células, ressuspendido em 5mL de meio de cultura apropriado onde as mesmas foram colocadas em placa de *petri* (Corning Costar) para cultura de tecidos de 10cm de diâmetro em um volume final de 10mL.

As células em cultura foram mantidas a 37°C, em estufa úmida com 5% de dióxido de carbono (CO₂), em *Dulbecco's modified Eagle's médium* (DMEM; Gibco; Life Technologies – Carlsbad, CA, USA) suplementado com bicarbonato de sódio (5mM), penicilina (100UI/mL), estreptomicina (0,1mg/mL) (Life technologies) e acrescentado de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cripion Biotecnologia Ltda.) (DMEM completo). Para transfecção foi utilizado Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA), as células foram cultivadas em DMEM sem adição de antibióticos. Para selecionar as células transfectadas o meio DMEM completo teve a adição de Geneticina (G418 – Gibco; Life Technologies – Carlsbad, CA, USA) na concentração de 800mg/mL devido à marca de seleção do plasmídeo.

3.3 SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA) DE DIFERENTES TIPOS DE TECIDO

Um painel comercial de RNA total de doze tecidos normais de diferentes órgãos (pulmão, intestino delgado, cérebro, cólon, rim, músculo esquelético, fígado, baço, músculo cardíaco, testículo, estômago e placenta) foi adquirido junto à empresa OriGene Technologies. O cDNA foi obtido utilizando The High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), seguindo o protocolo do fabricante.

3.4 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE MAMA NORMAL E TUMORAL

As amostras clínicas foram adquiridas em cirurgias de mastectomia realizadas em pacientes diagnosticadas com câncer de mama, atendidas no Hospital Universitário de Brasília (HUB) e no Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF), no período de 2010 a 2012. Todas as mulheres que iriam realizar mastectomia devido ao diagnóstico de câncer de mama foram convidadas a participar desse estudo. Todas as pacientes participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO I) antes da cirurgia.

Como mostrado na figura 2, as amostras clínicas passaram por seis etapas. Ao final da remoção da mama, foram coletados fragmentos de tecido tumoral e, quando possível, fragmentos não tumorais do mesmo tecido de cada paciente por especialistas em oncologia. Cada fragmento foi nortado por uma marcação com tinta nanquim e em seguida dividido em duas partes: uma parte foi conservada em formaldeído e encaminhada para a criação do laudo histopatológico através de microscopia ótica em cortes representativos da amostra, enquanto a segunda parte foi acondicionada em um criotubo e congelada em nitrogênio líquido ($N_{(l)}$). Apenas amostras que apresentaram laudo de malignidade maior ou igual a 70% do fragmento foram utilizadas nesse trabalho. Os dados clínicos das pacientes presentes no prontuário foram anotados.

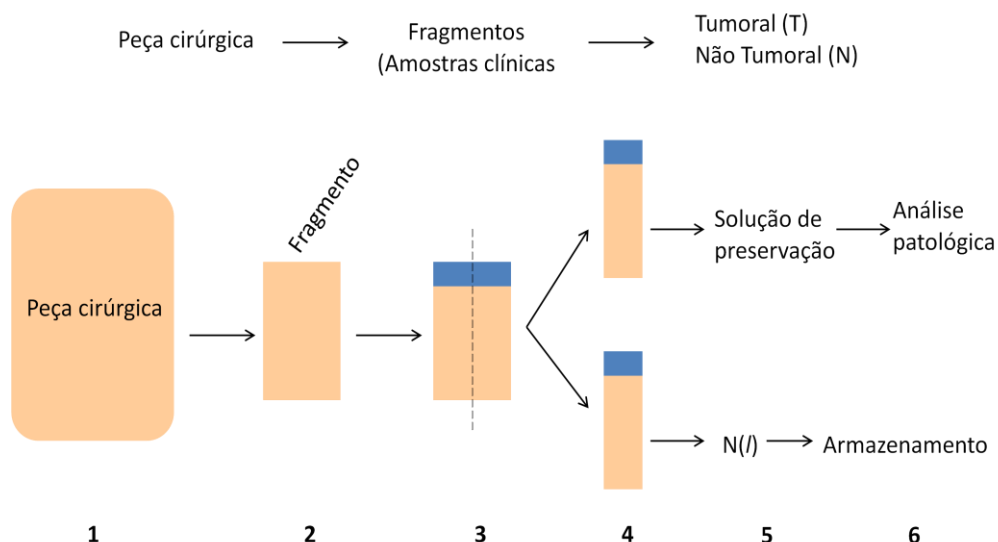


Figura 2 – Esquema de coleta de fragmentos tumorais e não tumorais de amostras clínicas. Imediatamente após a mastectomia os fragmentos tumorais eram coletados. Em azul, representação da marcação com tinta nanquim, utilizada para nortear o fragmento. Sempre que possível, um fragmento de tecido normal era coletado da mesma peça cirúrgica.

3.5 EXTRAÇÃO DE RNA, DNA E PROTEÍNAS DE AMOSTRAS CLÍNICAS E LINHAGENS CELULARES.

A extração de RNA, DNA e proteínas das amostras clínicas selecionadas e das linhagens celulares foram feitas usando o reagente TRIzol[®] (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA), de acordo com as indicações do fabricante.

Em resumo, as células foram lisadas com o reagente TRIzol[®] o qual se separava a fase aquosa (RNA) da fase orgânica (DNA/Proteína) com clorofórmio. Com a fase aquosa se precipitava o RNA com isopropanol absoluto, o precipitado foi lavado com etanol 75% gelado e ressuspendido em água Milli-Q. Todas as etapas foram realizadas no gelo ou sob baixa temperatura (4°C) e com materiais RNase Free para evitar a degradação do RNA. A integridade foi observada pela presença das bandas do RNA ribossomal 28S e 18S através de eletroforese em gel de agarose em 1%.

A fase orgânica foi utilizada para a extração do DNA e Proteínas das amostras clínicas e linhagens celulares, e sua extração feita em no máximo 24 horas após a separação na fase orgânica para evitar a degradação do DNA. Qualquer resíduo da fase aquosa foi eliminado, adicionou-se etanol

absoluto e após centrifugação a 8.000rpm a 4°C o precipitado formado contia o DNA e a fase fenol-etanol foi armazenada para a extração da proteína posteriormente. O DNA foi lavado com citrato de sódio (0,1M) em etanol 10% e posteriormente com etanol 75%, após centrifugar a amostra novamente a amostra a 8.000rpm a 4°C todo resquício de etanol foi evaporado a temperatura ambiente e em seguida ressuspendido em 8mM de hidróxido de sódio (NaOH) para melhorar a solubilidade do DNA. Após a extração o DNA foi quantificado através do espectrômetro NanoVue (GE Healthcare Life Sciences) e armazenado a -20°C

A quantificação e análise do grau de pureza dos RNAs totais e do DNA extraídos foram geradas por espectrometria, utilizando-se o aparelho NanoVue Plus™ (GE Healthcare – Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) com o objetivo de fundamentar a síntese de DNA complementar (cDNA) ou amplificação de exons. A quantificação foi realizada no comprimento de onda de 260nm e determinada em µg/µL. A pureza foi determinada através da razão entre o comprimento de onda 260nm e 230nm (contaminação por solventes orgânicos) e através da razão 260/280nm (contaminação por proteínas), todas as amostras que apresentaram ambas as razões entre 1,5 e 2,0 foram consideradas adequadas.

À fase fenol-etanol, armazenada na fase de extração de DNA, adicionou-se isopropanol absoluto para precipitar as proteínas, após centrifugação a 12.000rpm o sobrenadante foi descartado. A lavagem do *pellet* foi feita com hidrocloreto de guanidina (0,3M) em 95% etanol por três vezes consecutivas, centrifugando a amostra a 7.500rpm para formação do pellet e descarte do sobrenadante. Posteriormente o pellet foi lavado em etanol absoluto. Após centrifugação a 15.000rpm e evaporação dos resíduos de etanol do pellet esse foi ressuspendido em solução de 1% SDS. Após a extração as proteínas foram quantificadas através do reagente de Bradford (Bio-Rad).

3.6 SÍNTESE DE cDNA E QUALIFICAÇÃO DA EXTRAÇÃO

Após a extração de RNA total, quantificação e análise de integridade, alíquotas de 2 µg foram tratadas com o kit de DNase I (Sigma-Aldrich), sob as recomendações do fabricante. O kit *High Capacity cDNA Reverse*

Transcription (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), foi utilizado tanto em linhagens celulares quanto em amostras clínicas e para o painel de tecidos normais seguindo as normas do fabricante.

O controle de qualidade da extração e síntese do cDNA foi realizado após a síntese através de PCR convencional com primers de β -actina (Forward: 5'GGACTTCGAGCAAGAGATGG3' e Reverse: 5'AGCACTGTGTTGGCGTACAG 3'). Desta forma apenas as amostras que amplificavam o gene da β -actina foram selecionadas para o PCR em tempo real.

3.7 SEQUENCIAMENTO DO GENE MYLK4

Após a extração do DNA das amostras clínicas e das linhagens celulares, foi realizado um PCR para amplificação dos 11 exons do gene *MYLK4*. Após a reação de PCR parte da reação era submetida à eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da amplificação do exon desejado. (Figura 3).

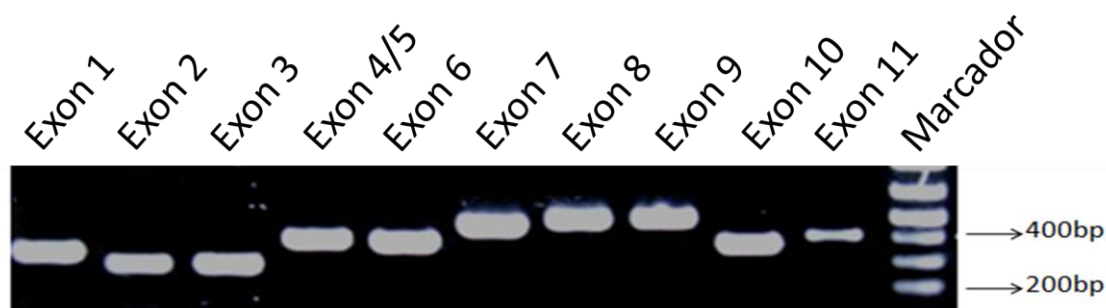


Figura 3 – Amplificação dos onze exons do gene MYLK4.

Todas as reações amplificaram seus respectivos exons de forma específica. Os exons 4 e 5 foram amplificados utilizando o mesmo par de primers devido à proximidade entre eles no genoma. Marcador 1 Kb Plus®.

O sequenciamento foi feito com o produto de PCR purificado e quantificado. Para o sequenciamento, o kit utilizado foi “BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kits” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O protocolo das reações de sequenciamento foi 40 ciclos a 96°C por 10 segundos, 54°C por 20 segundos e 60°C por 40 minutos. Os produtos foram precipitados com isopropanol 65%, lavados com etanol 60% e sequenciados

no sequenciador automático ABI PRISM™ 3700 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). O primer utilizado para o sequenciamento de todos os exons foi o M13 (Life Technologies) comum em todos os primers utilizados para amplificação dos exons de interesse (Figura 4).

Lista de Primers para o gene MYLK4		Tamanho do Amplicon
MYLK1 F	TGATTTATAAATCGGAGACAGAGGGAGACG	312pb
MYLK1 R	GAAACAGCTATGACCCTTAATTGTA CTCACAAAGC	
MYLK2 F	GATGCTGCTGTCCTGTAATGCTCG	280pb
MYLK2 R	GAAACAGCTATGACCCTCTGAATAACAACAGG	
MYLK3 F	GGATCATTAGGAATCAAACAGATGGC	274pb
MYLK3 R	GAAACAGCTATGACCGAGAGAATATTAACATTC	
MYLK4/5 F	CCAGACTCAGCAGGAGAAATACTGGG	387pb
MYLK4/5 R	GAAACAGCTATGACCGGATACGTACTACTCC	
MYLK6 F	GAAGAGGTAGCAGAAGCTGCACGACAAG	373pb
MYLK6 R	GAAACAGCTATGACCGGTAACAATTCAGATG	
MYLK7 F	GAGAAAGTACCCACACGGACAAGC	449pb
MYLK7 R	GAAACAGCTATGACCCTTCACTGTATTAGG	
MYLK8 F	GTCTGAAGTTTGCTGTATGGCTGAAGTC	479pb
MYLK8 R	GAAACAGCTATGACCCCTAGGAGTTAAAGTG	
MYLK9 F	CTTCTCTCACCTTTAAATGGCACAACC	475pb
MYLK9 R	GAAACAGCTATGACCCCATATGATAAATGG	
MYLK10 F	CCGAAGGCAGAAGCTGGAGTTGA	363pb
MYLK10 R	GAAACAGCTATGACCGAGAGTGAAATTTTGC	
MYLK11 F	GTTGTCGGGAATGTAGGCTTCAAGAAC	393pb
MYLK11 R	GAAACAGCTATGACCCAGTAAGAAAGAGC	

Figura 4 – Lista de Primers para amplificação dos onze exons do gene MYLK4

Conjunto de primers utilizados para amplificar as regiões do gene MYLK4 que foram sequenciadas através de sequenciamento automático de DNA. Forward Primer (F) e Reverse Primer (R). A região em negrito no primer reverse representa a sequência da cauda M13 para o sequenciamento automático.

Feito o sequenciamento e o resultado obtido foi analisado utilizando dois softwares de análise distintos, FinchTV (Geopiza Inc.) e Vector NTI (Life Technologies), para detecção de mutação nos exons do gene em análise.

3.8 TRANSFEÇÃO DE LINHAGENS CELULARES

As células a serem transfectadas foram plaqueadas em placas de 6 poços (Corning – Corning, NY, USA) na confluência de 70% aproximadamente em meio DMEM sem antibiótico.

Para transfecção, por poço, foram incubados concomitantemente em tubo de 1,5 mL (Eppendorf - Alemanha) independentes 250µL de Opti-MEM (Gibco; Life Technologies - Carlsbad, CA, USA) com 4µg de DNA plasmidial e 250 µL de Opti-MEM (Gibco; Life Technologies - Carlsbad, CA, USA) com 10 µL de LipofectaminaTM (Invitrogen - Carlsbad, CA, USA) por cinco minutos à temperatura ambiente (T.A.). As soluções foram então combinadas, homogeneizadas e deixadas em repouso por mais vinte minutos, a TA. Após esse período, a solução foi pipetada para o poço contendo as células e a placa foi incubada à estufa a 37°C, 5% de saturação de CO₂ por 4 horas. Depois desse período, houve troca de meio de cultura por DMEM completo (Figura 5).

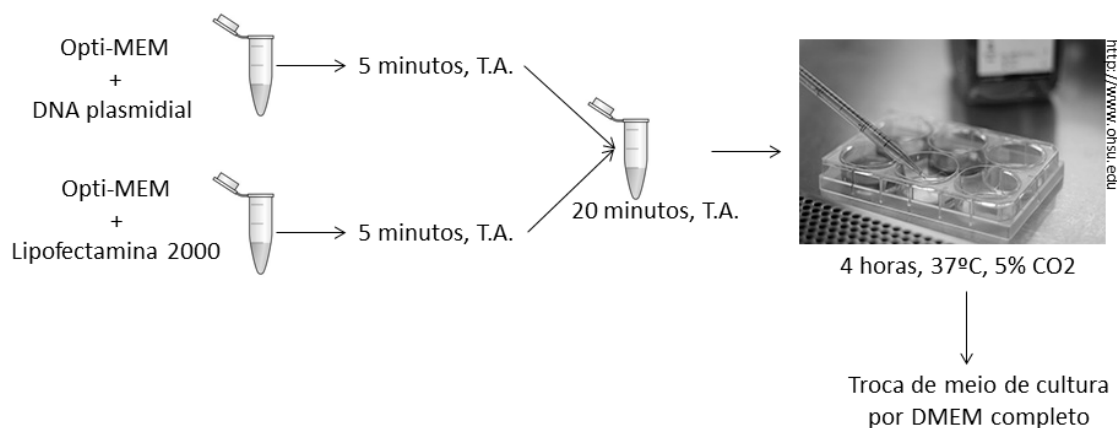


Figura 5 – Resumo do método de transfecção adotado no trabalho, utilizando o reagente lipofectaminaTM2000 (invitrogen – Carlsbad, CA, USA).

3.9 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE MÍNIMA DE AGENTE SELETIVO

O Vetor utilizado possui resistência à geneticina (G418). A concentração mínima do agente seletivo é necessária para determinar a quantidade mínima do antibiótico para a seleção das células transfectadas.

Para a determinação, células HEK293 foram plaqueadas em placas de 96 poços na confluência de 5×10^4 células por poço cultivadas em meio DMEM. Cada fileira com 8 poços foram tratadas da mesma maneira. Com concentrações diferentes do antibiótico. O meio foi trocado a cada dois dias e após uma semana a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de redução do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina]. Com os dados obtidos foi feita a curva de seleção e determinação do IC₉₅ que foi o valor da concentração do antibiótico utilizada para a seleção das células transfectadas.

3.10 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR REAÇÃO POR REAÇÃO DE REDUÇÃO DO MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste com o reagente MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina], o qual se constitui um método colorimétrico sensível e quantitativo, desenvolvido para avaliar a sobrevivência e de proliferação de células de mamíferos. Este ensaio detecta apenas células vivas e o sinal gerado é dependente do grau de ativação metabólica das células. Aqui, o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal, pelas enzimas desidrogenases mitocondriais resulta na formação de cristais de formazan com coloração azul que se acumulam nas células (71). Quanto maior o número de células, mais forte o sinal.

Duas horas antes da leitura, o meio de cultura da placa a ser submetida ao ensaio foi trocado por meio DMEM sem SBF com 10% de MTT (Solução estoque: 5mg/mL em PBS 1X) e a mesma era novamente acondicionada em estufa úmida a 37°C, 5% saturação de CO₂. Decorridas às duas horas, o meio de cultura foi cuidadosamente removido e isopropanol acidificado (0,04 M de ácido clorídrico) foi adicionado à placa para solubilização dos cristais de formazan. A solução foi homogeneizada e 200 µl de cada poço foram transferidos para uma nova placa de 96 poços. Seguiu-se com a leitura a 570nm no leitor de placas DTX 800 Multimode detector (Beckman Coulter).

3.11 SELEÇÃO DAS CÉLULAS TRANSFECTADAS

Para obter células superexpressando o MYLK4, células *Human Embryonic Kidney 293* (HEK293) foram utilizadas para geração de linhagens superexpressando o MYLK4 com o vetor de superexpressão do gene MYLK4 humano marcado com Myc-DDK (TrueORF™ cDNA Clones and PrecisionShuttle™ Vector System; pCMV6-MYLK4-Myc/DDK) obtido pela empresa Origene Technologies (Figura 6). Esse vetor foi utilizado na transfecção de células HEK 293 para a geração de clones superexpressando MYLK4.

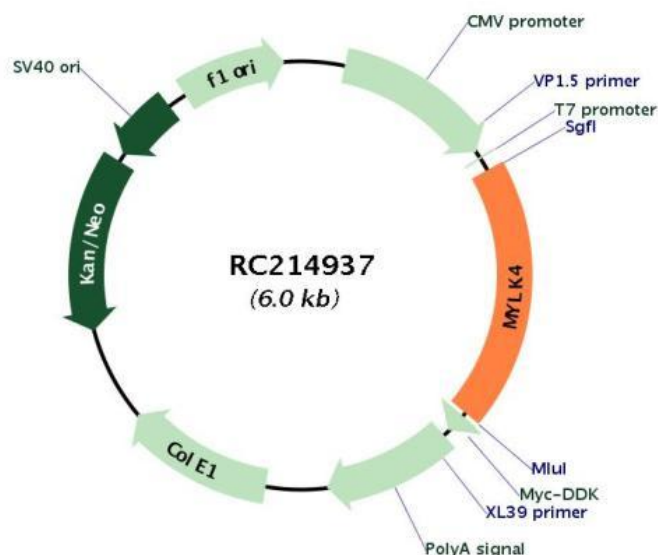


Figura 6 – Modelo esquemático do vetor de expressão.

Esquema ilustrando as principais regiões do vetor de superexpressão.

A seleção clonal foi feita a partir de uma diluição seriada em placa de 96 poços. Feita a transfecção com lipofectamina e após o período de seleção das células com G418, $2,5 \times 10^4$ células foram plaqueadas no poço 1A as células foram diluídas na proporção de 1:2 no sentido A-H na primeira coluna da placa. Após essa diluição inicial, foi realizada uma segunda diluição no sentido horizontal na proporção de 1:2 no sentido 1-12 (Figura 7). Os poços que apresentavam uma única célula após as duas diluições foram identificados e o crescimento celular foi acompanhado em meio de cultura não seletivo. Quando as células apresentavam 50% de confluência estas foram

transferidas para placas com diâmetro de cultura maior, quando as células atingiram a placa de 6 poços o meio seletivo foi colocado novamente, e a partir desse momento as células sempre foram mantidas nesse meio seletivo com o antibiótico correspondente a marca de seleção presente no plasmídeo transfetado.

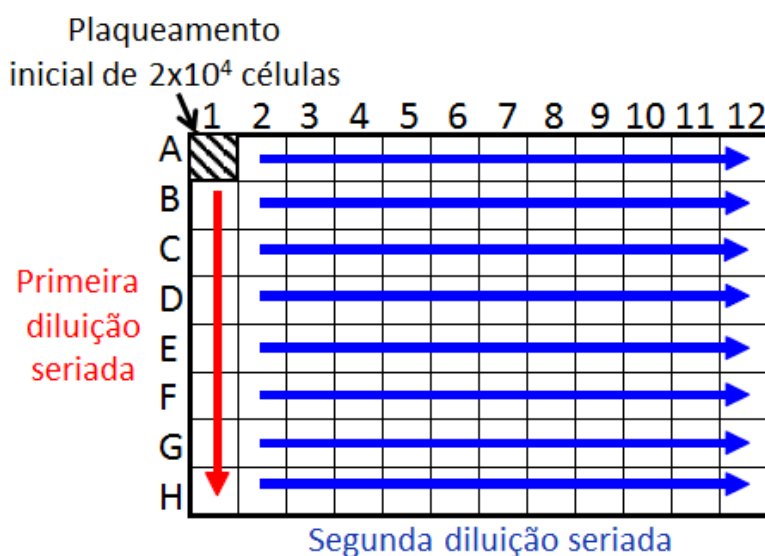


Figura 7 – Resumo da diluição seriada utilizada para seleção clonal.

3.12 ENSAIO DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Seções histológicas de amostras clínicas de câncer de mama humano foram preparadas segundo o método do Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC). Resumidamente, a atividade de peroxidase endógena de xileno-desparafinizadas e desidratada foi inibida pelo tratamento com 0,3% de H_2O_2 /metanol. A ligação não específica foi bloqueada através da incubação das secções com soro de cabra normal a 10% numa câmara úmida durante 30 minutos à temperatura ambiente, seguido por incubação durante *overnight* a $4^\circ C$ com uma diluição de 1:10 do anticorpo de coelho anti-MYLK4 policlonal (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO). As secções foram lavadas duas vezes com PBS, incubadas com $5 \mu g/\mu L$ anticorpo IgG de cabra anti-coelhobiotinilado em PBS contendo 1% de albumina de soro bovino (do inglês, Bovine serum albumin – BSA) durante 30 minutos à temperatura ambiente, e depois incubadas com o reagente ABC durante 30 minutos. A imunomarcção específica foi visualizada por 3,3'-diaminobenzidina. As

lâminas foram desidratadas através do álcool graduado à lavagem sylene e montado sobre

lamínulas. Hematoxilina foi utilizada para coloração nuclear.

3.13 WESTERN BLOT

Em linhagens celulares de câncer de mama wild-type ou superexpressando MYLK4 a extração de proteínas foi realizada com tampão RIPA (cloreto de sódio (150mM), Triton 1%, Tris-hidrocloreto (50mM) em pH 7,5 a quantificação dessas proteínas foi feita utilizando o reagente de Bradford (BioRad) segundo orientação do fabricante e a leitura foi feita no leitor de placas *DTX 800 Multimode Detector* (Beckman Coulter) em absorvância de 595nm, para determinação da concentração de cada uma das amostras.

As proteínas foram desnaturadas em tampão específico a 96°C em banho Maria por 5 minutos, feita a desnaturação 20µg de cada amostra foi utilizada para separação por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Após a eletroforese as proteínas foram transferidas para uma membrana de polivinilideno (PVDF). A membrana foi bloqueada com solução de caseína 5% em TBS-T (Solução salina tamponada com Tris com Tween 20) por 30 minutos. A membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-MYLK4 (Abcam Inc.) overnight a 4°C na diluição de 1:200 (v:v) em *Antibody Diluent Reagent Solution* (invitrogen). No dia seguinte o anticorpo primário foi removido e o anticorpo secundário anti-IgG marcado com peroxidase (GE Healthcare Life Sciences) foi diluído em solução de caseína 1% na proporção de 1:10000 durante 1 hora em temperatura ambiente. Para revelar a membrana foi tratada com ECL (GE Health Life Sciences) e observada no ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences).

Para a marcação de diferentes anticorpos na mesma membrana, esta foi submetida a um tampão de “stripping” (1,5g glicina, 0,1g SDS, 1mL Tween e 99mL de água destilada) para a retirada do anticorpo utilizado anteriormente. Além do anticorpo anti-MYLK4 (abcam), utilizaram-se anticorpos anti-β-actina (Cell Signaling technology) na diluição 1:1000 (v:v) e anti-myc/DDK (Cell Signaling Technology) na diluição 1:2000 (v:v).

3.14 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA EM SOFTAGAR

Para o teste de formação de colônias, placas de 6 poços (Corning – Corning, NY, USA) foram usadas. Cada poço recebeu, inicialmente, uma camada basal de meio de cultura sólido (0,2 mL contendo 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão em meio DMEM), uma intermediária semi-sólida (0,2 mL contendo agarose de baixo ponto de fusão a 0,35%) na qual se dispersavam as células (1000 por poço), adicionadas quando o meio atingia 38°C, e uma terceira camada apenas de meio líquido contendo meio de cultura. A camada líquida foi repostada a cada dois dias. A aquisição de imagens foi feita com uma máquina fotográfica de alta resolução acoplada ao microscópio. O número de colônias foi contado varrendo-se campos aleatórios do poço sob o microscópio e o diâmetro médio foi calculado medindo-se, através de comparação com régua milimétrica fotografada em mesmo aumento, o diâmetro máximo e o perpendicular de cada colônia e calculando-se a média entre estas duas medidas. Um total de cinco campos aleatórios de cada um dos três poços de cada grupo foi fotografado para este experimento.

3.15 PCR QUANTITATIVO (qPCR)

As reações de qPCR foram realizadas com o sistema *Step One Plus™ Real-Time PCR* (Applied Biosystems) usando *TaqMan Universal PCR Master Mix e Ensaios de expressão gênica TaqMan*, de acordo com as instruções do fabricante. A identidade do ensaio (ID Assay) do MYLK4 foi Hs01584150_m1 e a *ID Assay* gene endógeno usado como normalizador, β -actina, foi Hs99999903_m1 (Applied Biosystems). A saber, 2 μ L do cDNA de cada amostra foram adicionados a um volume final de reação de 10 μ L por poço. As condições de amplificação foram: 2 minutos a 50°C e 10 minutos a 95°C no *holding stage*, e então 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

Os valores de expressão gênica são expressos como razões entre o gene de interesse e o gene usado como controle endógeno, que fornece o fator de normalização para a quantidade de RNA isolado a partir de uma amostra. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

Para determinar a quantificação relativa (do inglês, *Relative Quantification* - RQ) da expressão gênica de MYLK4, os dados foram analisados usando o método CT comparativo de quantificação relativa ($\Delta\Delta\text{CT}$) (Applied Biosystems). Brevemente, a média dos valores de CT (*cycle threshold*) das amostras replicadas do gene de interesse foram calculadas e normalizadas pela subtração de seu valor com a média do valor de CT do gene endógeno usado como controle, que foi amplificado na mesma placa da amostra, gerando assim um ΔCT (CT gene de estudo – CT gene endógeno). A normalização da expressão do gene em análise com a referência endógena foi determinada pela fórmula $2^{-\Delta\text{CT}}$ para as análises estatísticas. Para os tecidos normais e amostras clínicas utilizadas, a expressão do gene do MYLK4 foi normalizada utilizando como um controle endógeno à expressão de β -actina. A expressão relativa foi definida a partir da subtração da média do ΔCT do grupo controle do ΔCT de todas as amostras tumorais gerando o $\Delta\Delta\text{CT}$. A quantidade de gene-alvo, normalizada com a referência endógena e relativa ao calibrador foi transformada em quantificação relativa (QR) pela fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$.

Utilizando os valores da expressão relativa, os gráficos e análises estatísticas foram feitas no programa GraphPad Prism® versão 5.0. Para checar a significância estatística dos resultados de expressão relativa e para análise de amostras pareadas (amostra tumoral e contra parte normal do mesmo paciente) foi utilizado o teste T de Student. Para análise dos *pools* de amostras normais (n=7) e tumorais (n=12), foi feito o teste-T para amostras independentes, comparando-se a média entre os dois grupos. Os testes estatísticos foram considerados significantes quando valor de $P < 0,05$ (IC: 95%).

4. RESULTADOS

4.1 GENE MYLK4

Com o auxílio dos programas BLAST e Aling da base de dados UniProt, foi realizada uma comparação das proteínas humanas dos genes da família MYLK. O grau de similaridade entre as proteínas MYLK 2, MYLK 3, MYLK4 e suas isoformas variaram de 96% a 63%, enquanto o BLAST realizado não foi capaz de identificar identidade da proteína MYLK1 com as demais (figura 8).

Alignments	Entry	Entry name	Status	Protein names	Organism	Length	Identity
	Q86YV6	MYLK4_HUMAN	★	Myosin light chain kinase family member 4 (EC 2.7.11.1) (Sugen kinase 85) (SgK085)	Homo sapiens (Human)	388	100.0%
	Q86YV6-2	MYLK4_HUMAN	★	Isoform 2 of Myosin light chain kinase family member 4	Homo sapiens (Human)	388	96.0%
	C9JMC3	C9JMC3_HUMAN	★	Myosin light chain kinase family member 4	Homo sapiens (Human)	388	95.0%
	Q32MK0-4	MYLK3_HUMAN	★	Isoform 2 of Myosin light chain kinase 3	Homo sapiens (Human)	478	69.0%
	Q32MK0	MYLK3_HUMAN	★	Myosin light chain kinase 3 (EC 2.7.11.18) (Cardiac-MyBP-C-associated Ca/CaM kinase) (Cardiac-MLCK)	Homo sapiens (Human)	819	69.0%
	Q9H1R3	MYLK2_HUMAN	★	Myosin light chain kinase 2, skeletal/cardiac muscle (MLCK2) (EC 2.7.11.18)	Homo sapiens (Human)	596	63.0%
	Q15746-9	MYLK_HUMAN	★	Isoform 7 of Myosin light chain kinase, smooth muscle	Homo sapiens (Human)	714	53.0%

Figura 8 – Comparação entre MYLK4 e os outros membros da família MYLK

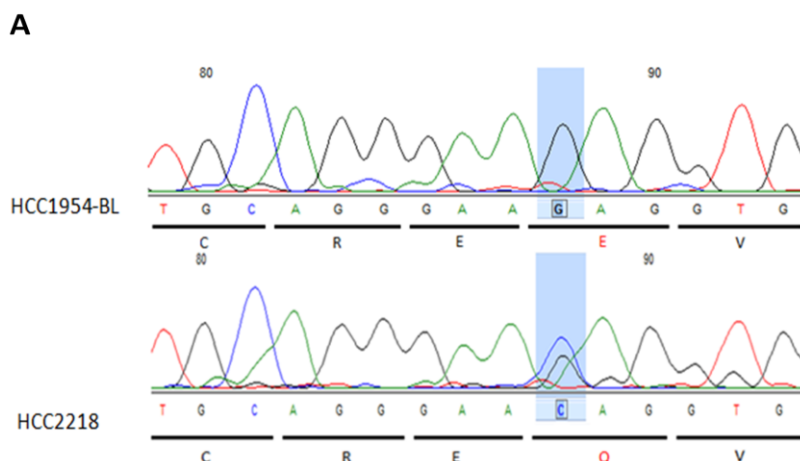
Comparação das sequências protéicas do MYLK2, MYLK3 e MYLK4 e suas isoformas pelo programa *BLAST* da base de dados da UniProt (68).

Comparando o domínio de quinase (amarelo) das principais isoformas protéicas dos quatro membros da família MYLK, observou-se grande similaridade nas posições dos aminoácidos deste domínio além dos presentes no sítio ativo (vermelho) e do sítio de ligação (verde) (Figura 9).

231, MDA-MB-436, MDA-MB-468 e MCF-7. Como controle foi utilizado uma linhagem normal HCC1954-BL.

A análise das sequências geradas pelo sequenciador automático de DNA foi realizada no software Vector NTI 11.0 (Invitrogen) e Finch TV (Geopiza Inc.). Dessa forma, duas mutações foram identificadas no gene MYLK4 em duas linhagens diferentes. A primeira mutação encontrada na linhagem HCC2218 está no primeiro exon do gene, essa mutação corresponde a substituição de uma guanina para uma citosina (G>C). Essa substituição altera o códon 30 do gene MYLK4 de GAG para CAG, essa mutação acarreta em uma alteração na sequência de aminoácidos da proteína, ocorrendo à troca de um ácido glutâmico por uma glutamina (88G>C. E30Q). A presença de dois picos no cromatograma do sequenciamento do exon 1 revela uma mutação monoalélica do gene MYLK4

A segunda mutação encontrada é localizada na segunda região exônica do gene MYLK4 na linhagem celular MDA-MB-468. A mutação provoca a substituição na base 232 do gene MYLK4 de uma guanina por uma timina (G>T) alterando a sequência de DNA e promovendo uma troca de aminoácidos na proteína de uma alanina por uma serina (232 G>T. A78S) (Figura 10).



B

Alteração Genômica	Alteração na proteína MYLK4	Linhagem celular
c88G>C	E30Q	HCC2218
c232G>T	A78S	MDA-MB-468

Figura 10 – Identificação de mutações no gene *MYLK4* em linhagens celulares de câncer de mama.

O sequenciamento completo de todos os exons do gene *MYLK4* revelou duas mutações do tipo missense em diferentes linhagens celulares de câncer de mama, porém nenhuma alteração foi identificada em células normais. (A) A mutação 88G>C responsável pela substituição E30Q, foi identificada na linhagem celular HCC2218 comparado com a sequência da linhagem normal HCC1954-BL. (B) Na linhagem MDA-MB-468 foi identificada a mutação 232G>T resultando na substituição A78S.

Ambas as mutações encontradas no gene *MYLK4* em linhagens estão localizadas fora do domínio de proteína quinase. A proteína possui 388 aminoácidos. O domínio de serina/treonina quinase começa no resíduo de aminoácido 106 termina no resíduo 361. Dentro do domínio de quinase há também o domínio de ligação do ATP que começa no resíduo 112 até o resíduo 120

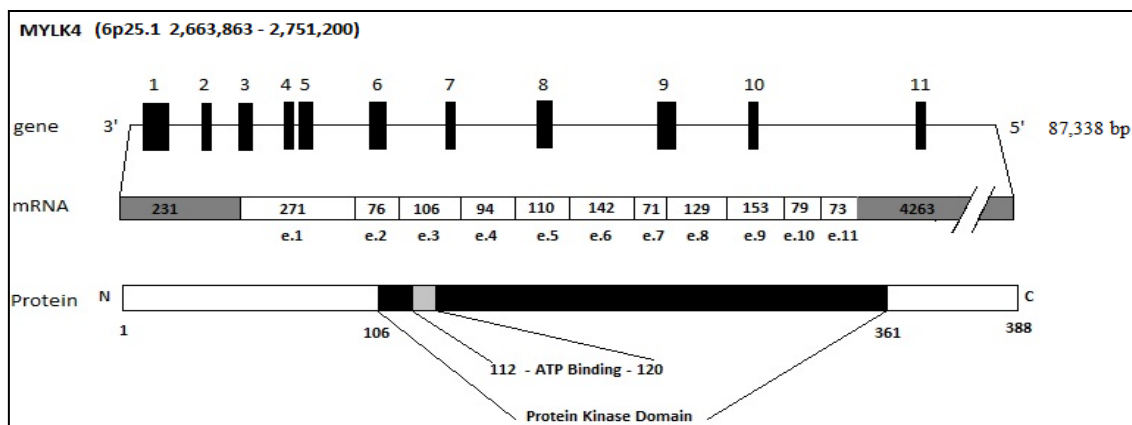


Figura 11 – Representação esquemática do gene e da proteína MYLK4.

Gene: os boxes negros representam os exons do gene numerados. mRNA: os boxes brancos possuem a numeração representativa do tamanho de cada exon em nucleotídeos. Proteína: a posição de cada domínio está indicada dentro de cada boxe. Figura construída seguindo a descrição obtida no banco de dados UniProt (68).

4.2.2 SEQUENCIAMENTO DO GENE MYLK4 EM AMOSTRAS TUMORAIS

Foram sequenciadas trinta e sete amostras clínicas no total, sendo quatorze pares extraídos do mesmo paciente, contendo um fragmento tumoral e outro normal da mama, e nove amostras tumorais sem presença da contra-parte normal (Tabela 4). As amostras sequenciadas possuíam diferentes características tumorais.

Tabela 4 – Características clínicas das amostras clínicas sequenciadas

Amostra	Idade (anos)	ER	PR	HER-2	Necrose tumoral	Linfonodos Acometidos
4N	61	-----	-----	-----	-----	-----
4T	61	+	+	+	-	0/3
13N	53	-----	-----	-----	-----	-----
13T	53	+	-	-	-	0/4
17N	59	-----	-----	-----	-----	-----
17T	59	-----	-----	-----	-	4/13
20N	54	-----	-----	-----	-----	-----
20T	54	-----	-----	-----	-	18/18
22N	64	-----	-----	-----	-----	-----
22T	64	-	-	-	+	3/18
23N	43	-----	-----	-----	-----	-----
23T	43	-----	-----	-----	-	2/27
24N	56	-----	-----	-----	-----	-----
24T	56	-	-	-	+	2/19
32N	60	-----	-----	-----	-----	-----
32T	60	-	-	+	-	8/21
38N	51	-----	-----	-----	-----	-----
38T	51	+	-----	+	-	1/20
40N	59	-----	-----	-----	-----	-----
40T	59	-----	-----	-----	-	13/13
44N	63	-----	-----	-----	-----	-----
44T	63	+	+	+	-----	-----
47N	59	-----	-----	-----	-----	-----
47T	59	-	-	-	+	11/11
48N	49	-----	-----	-----	-----	-----
48T	49	-	+	+	+	1/1
49N	52	-----	-----	-----	-----	-----
49T	52	-	+	+	-	3/25
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3T	60	-	-	-	-	15/36
14T	33	-	-	+	-	4/13
16T	44	+	+	+	+	0/17
19T	62	-	+	+	+	31/36
25T	89	-	-	-	+	2/20
28T	36	+	+	+	-	15/16
35T	53	-	-	-	-	3/17
42T	29	-	-	-	-	0/15
45T	79	-	-	-	-	0/22

Legenda: Características das 37 amostras clínicas de câncer de mama sequenciadas. Expressão de ER (receptor de estrogênio), PR (receptor de progesterona) e Her-2 (receptor tipo 2 para fator de crescimento epidérmico humano). Presença ou não de fatores de necrose

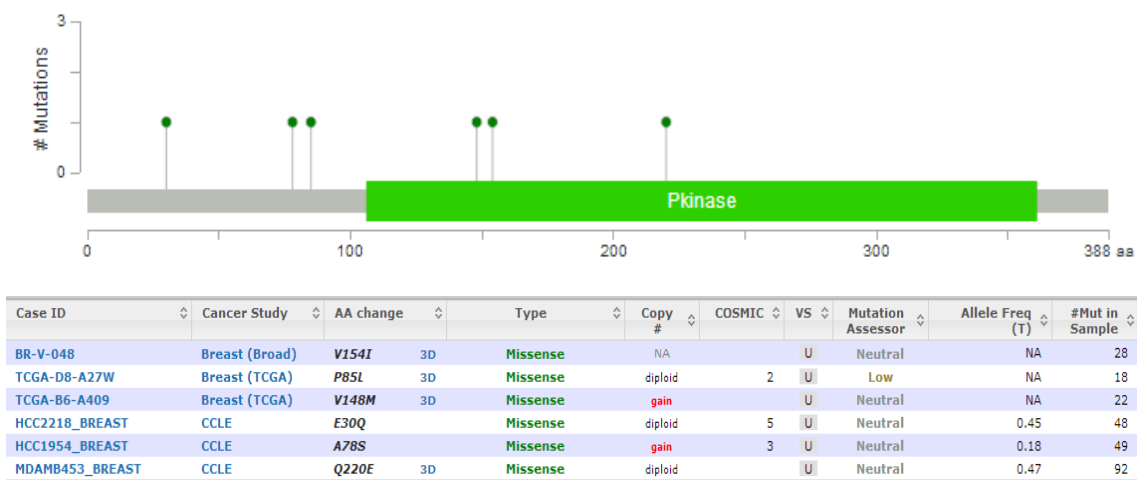
tumoral e quantidade de linfonodos invadidos. (+) expressão positiva; (-) expressão não existente; (----) dados não disponíveis.

Em todas as amostras clínicas de câncer de mama e suas contra-partes normais, quando existentes, os onze exons do gene *MYLK4* foram amplificados por PCR convencional, purificados quando necessário e quantificados para posteriormente serem sequenciados como descrito anteriormente. Em nenhuma amostra clínica foi observada alguma das mutações descritas nas linhagens celulares ou a identificação de novas mutações. Analisando as linhagens celulares onde foram identificadas as mutações a linhagem HCC2218 é derivada de um carcinoma ductal invasivo apresentando metástase em 42/43 linfonodos, enquanto a linhagem MDA-MB-468 é derivada de um adenocarcinoma mamário metastático. Ambas as linhagens possuem alta expressão de HER2. Diferente das linhagens celulares que apresentaram mutações no *MYLK4*, as amostras clínicas obtidas para sequenciamento não possuem características metastáticas e foram coletadas de pacientes submetidos à quimioterapia prévia.

Estudos presentes no banco de dados cBio Portal (71) identificaram duas novas mutações no gene *MYLK4* em duas linhagens diferentes, são elas: HCC1954 (A78S) e MDA-MB-453 (Q220E), em amostras clínicas de câncer de mama três mutações foram identificadas em diferentes pacientes (P85L), (V148M) e (V154I), mutações essas não encontradas no nosso estudo. (Figura 12).

MYLK4:

MYLK4_HUMAN

**Figura 12 – Análise in silico de novas mutações no gene MYLK4**

Esquema com a localização das mutações na proteína MYLK4. Seis mutações identificadas sendo três delas no domínio de proteína quinase do MYLK4. Figura retirada do banco de dados cBio Portal (71).

Apesar da confirmação da mutação descrita no trabalho de *Wood et al.* (9), da identificação de uma nova mutação na linhagem celular MDA-MB-468 e de cinco mutações distintas presente no banco de dados cBio Portal (71) essas mutações possuem um baixo impacto preditivo de alteração no funcionamento da proteína além de baixa frequência no câncer de mama.

4.3 PERFIL DE EXPRESSÃO DO MYLK4 EM TECIDOS NORMAIS

Para determinar o padrão de expressão do gene MYLK4 em tecidos humanos não tumorais, foi utilizado como template cDNA obtido através da transcrição-reversa (RT-PCR) de um painel comercial de RNA de doze tipos de tecidos humano adquirido junto à empresa Origene®, e a expressão de *MYLK4* foi comparada entre os diferentes tecidos. Resultado do PCR semi quantitativo mostra baixa expressão do MYLK4 em todos os tecidos com exceção do músculo onde sua expressão está aumentada quando comparada com os outros tecidos normais (Figura 13)

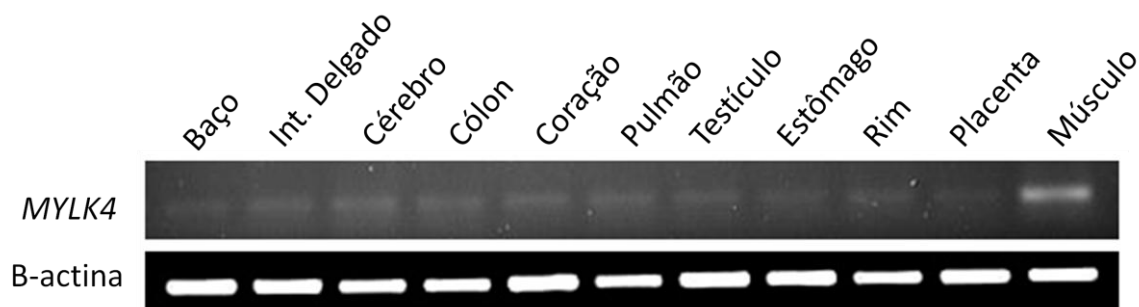


Figura 13 – Expressão de *MYLK4* em tecidos normais por PCR semi-quantitativo

Amplificação do gene *MYLK4* em tecidos normais por PCR convencional, padronização com gene da β -actina.

PCR quantitativo (qPCR) foi realizado no mesmo painel de tecidos normais para análise expressão do gene *MYLK4*. A análise da expressão relativa (do inglês, Relative Quantitation – RQ) do gene *MYLK4* foi feita pela pelo método $\Delta\Delta C_t$ comparando cada um dos tecidos com um conjunto de seis amostras clínicas não tumorais de tecido mamário. Esta análise revelou que o gene *MYLK4* possui uma maior expressão no grupo controle de tecido mamário comparado com os outros tecidos analisados (Figura 14) e também demonstrou uma maior expressão relativa em músculo esquelético (1,2 vezes menor) e músculo cardíaco (2,3 vezes menor) em relação aos demais. Enquanto a placenta expressou a menor expressão de *MYLK4* (23 vezes menor).

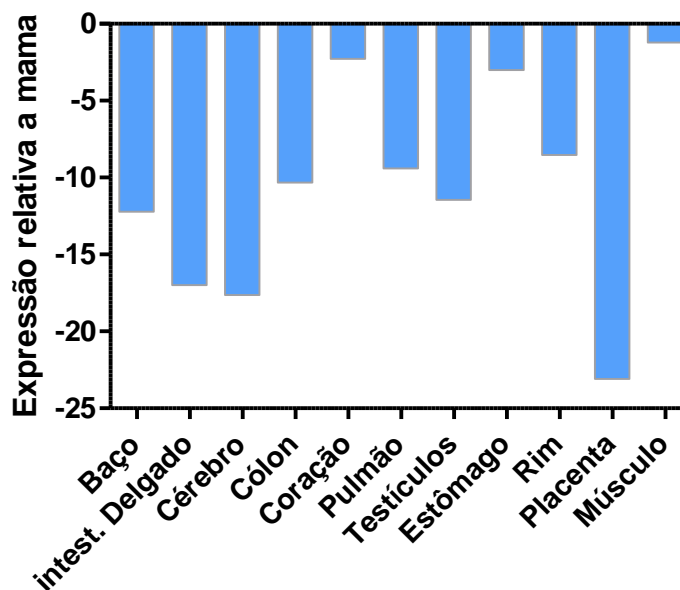


Figura 14 - Expressão relativa do gene *MYLK4* em diferentes tecidos humanos
 Comparação de expressão do gene *MYLK4* em tecidos normais em relação tecido mamário normal. B-actina utilizada na normalização; método $\Delta\Delta C_t$.

4.4 PERFIL DE EXPRESSÃO DO *MYLK4* EM LINHAGENS CELULAR DE CÂNCER DE MAMA

Para investigar a expressão do gene *MYLK4* em câncer de mama, inicialmente foi feita uma PCR semi quantitativo em cinco linhagens de câncer de mama amplificando o gene *MYLK4*, como controle foi utilizado o gene endógeno β -actina (Figura 15). Para a análise foi utilizado o software ImageJ, foi realizada a razão da densidade ótica quantificada pelo software das bandas obtidas do gene *MYLK4* pelo gene endógeno β -actina. Essa análise mostrou aumento na expressão do gene *MYLK4* em linhagens tumorais de pelo menos duas vezes quando comparado com a linhagem normal HCC1954-BL (Figura 16).

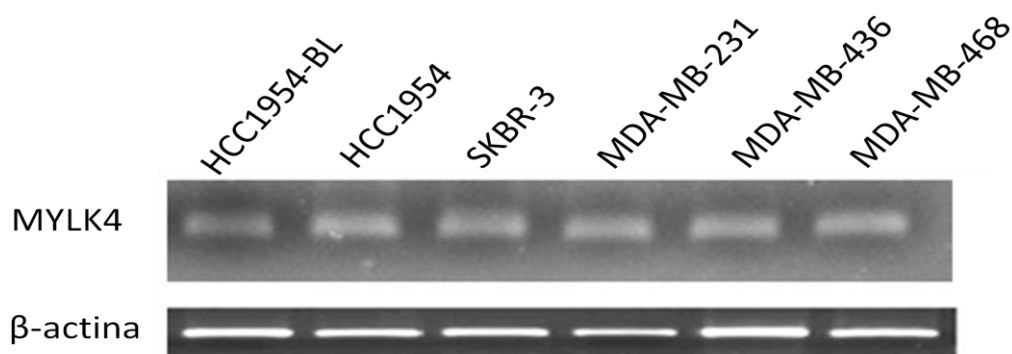


Figura 15 – Expressão de MYLK4 em linhagens celular de câncer de mama.

Amplificação do gene MYLK4 em linhagens celulares de câncer de mama por PCR convencional e padronização com gene endógeno β -actina.

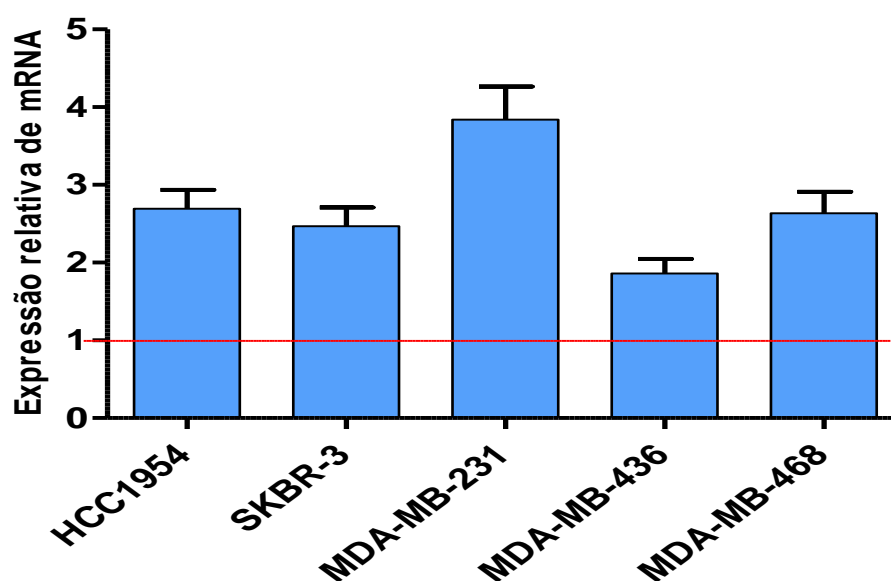


Figura 16 – Quantificação da expressão de MYLK4 em linhagens de câncer de mama

Utilizando o software ImageJ a quantificação da expressão do gene *MYLK4* foi feita usando como padrão a expressão na linhagem celular normal HCC1954-BL. A padronização foi realizada com o gene endógeno β -actina. Todas as amostras apresentaram variações estatisticamente significativas (Wilcoxon signed-rank test). A linha vermelha representa a expressão do gene *MYLK4* na linhagem celular normal HCC1954-BL.

4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA DE MYLK4 EM TECIDOS NORMAIS E TUMORAIS.

Utilizando o banco de dados The Human Protein Atlas (78) avaliamos a distribuição da proteína MYLK4 em diferentes tecidos normais uma vez que ela se mostrava expressa em 26/81 diferentes tipos de tecidos normais analisados (Figura 17). A mesma análise foi feita para tecidos tumorais (Figura 18). Os resultados mostraram a presença da proteína MYLK4 em diferentes níveis nos tecidos normais, e confirmam a alta expressão em músculo estriado e músculo cardíaco, porém em tecido mamário normal não foi detectada na amostra analisada. Nos tecidos tumorais a expressão de MYLK4 quando comparada com os tecidos normais mostrou-se heterogênea. Enquanto em tecido tumoral de mama e ovário foi detectada uma maior expressão, em tumores de estômago observou-se uma redução da expressão de MYLK4 quando comparado com o tecido normal.

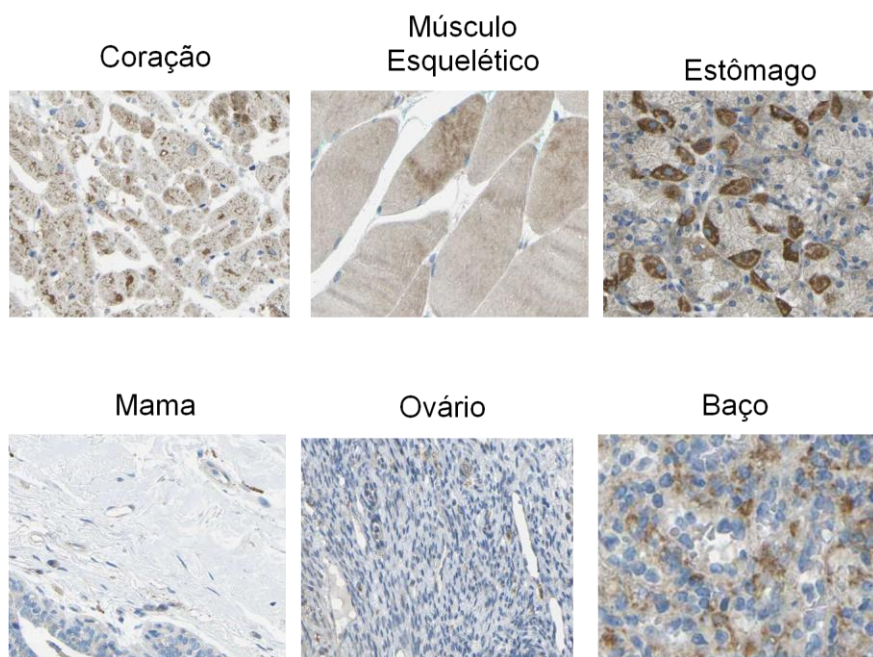


Figura 17 – Distribuição tecidual do MYLK4 em tecidos normais.

Imagens representativas da marcação da proteína MYLK4 por imunohistoquímica diferentes tipos de tecidos normais. Adaptado de Uhlen *et al.* (78).

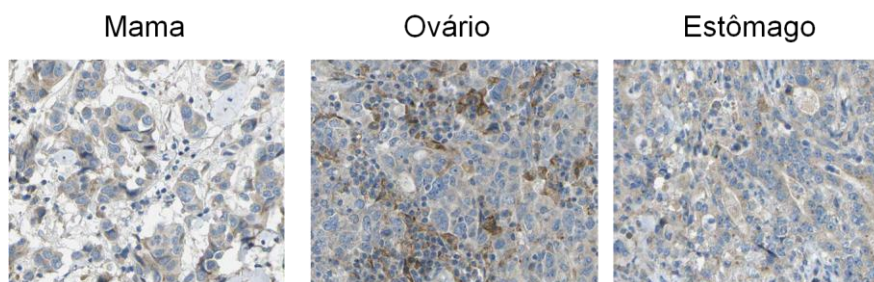


Figura 18 – Distribuição do MYLK4 em tecidos tumorais.

Imagens representativas da marcação da proteína MYLK4 por imunohistoquímica diferentes tipos de tecidos tumorais. Adaptado de Uhlen *et al.* (78).

Para examinar a distribuição e presença tecidual do MYLK4 em amostras de câncer de mama, foi realizada uma análise por imunohistoquímica de amostras clínicas de câncer de mama e de tecido mamário normal parafinizados (Figura 19). Foi observada a presença da proteína MYLK4 em todos os tecidos analisados (amostra normal e tumorais) embora seja mais evidente a presença nas amostras tumorais.

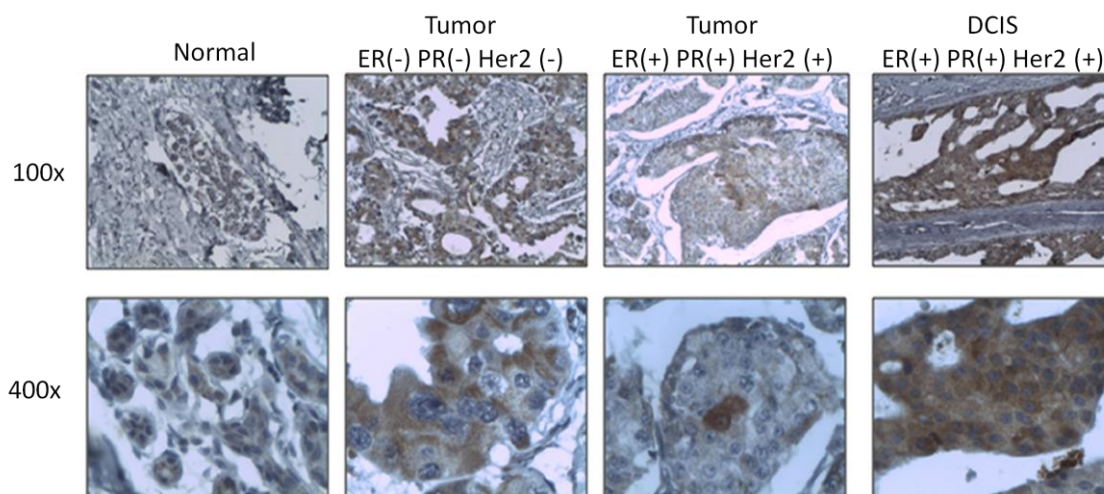


Figura 19 – Distribuição tecidual do MYLK4 em câncer de mama.

Imagens representativas da marcação da proteína MYLK4 por imunohistoquímica em tecidos de câncer de mama. (Triplo negativo ou triplo positivo) e tecido não tumoral de mama. DCIS, carcinoma ductal invasivo.

4.6 PERFIL DE EXPRESSÃO DE *MYLK4* EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE CÂNCER DE MAMA

Após observar uma maior expressão do gene *MYLK4* em linhagens celulares de câncer de mama, verificaram-se os níveis de expressão do gene em amostras clínicas tumorais pareadas. A análise da quantificação relativa por $\Delta\Delta CT$ em seis amostras tumorais pareadas, demonstraram uma hipoexpressão do gene em quatro dos seis pares analisados e hiperexpressão nas duas amostra restantes comparado com a contra parte não tumoral obtida do mesmo paciente. (Figura 20).

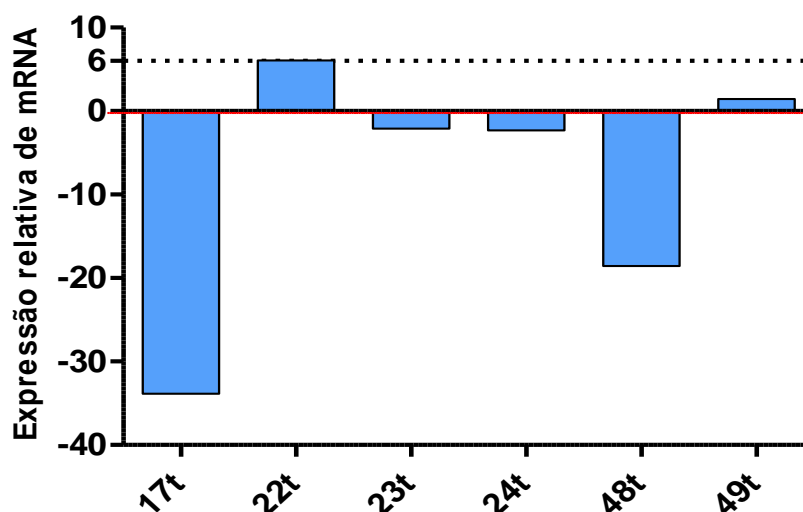


Figura 20 – Expressão relativa do *MYLK4* em amostras clínicas de câncer de mama.

Os dados são apresentados como quantificação relativa (RQ), onde o calibrador utilizado para obtenção do $\Delta\Delta CT$ foi a média do ΔCT da contra parte normal da mama do mesmo paciente. B-actina foi utilizada com controle endógeno. Linha vermelha representa a expressão normalizada das amostras clínicas de mama não tumoral.

Observando os resultados obtidos em amostras pareadas foi realizada uma análise da expressão relativa de *MYLK4* em um “pool” de amostras clínicas de câncer de mama, utilizando seis amostras normais e doze amostras tumorais (Figura 21). As análises estatísticas dos dados mostram que não existem variações significativas na expressão de *MYLK4* em amostras de câncer de mama quando comparado com a expressão deste gene em amostras normais de mama, apenas uma grande variância na expressão do gene nas amostras clínicas.

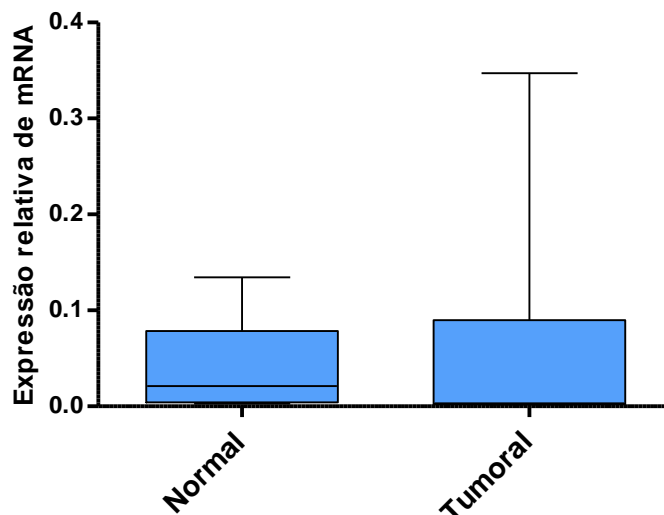


Figura 21 – Expressão relativa de MYLK4 em pool de amostras clínicas

A expressão de MYLK4 em amostras clínicas de câncer de mama não demonstrou variações significativas em amostras clínicas tumorais comparada com amostras clínicas normais.

Consultando o banco de dados Oncomine um total de seis estudos analisaram a expressão do gene MYLK4 em vários tipos de tumores de mama (72-77). Nenhum dos estudos mostrou alterações significativas na expressão do gene *MYLK4* em carcinomas de mama, como observado pelos resultados anteriores. Estudo utilizando 66 amostras, 28 normais, 18 de carcinoma ductal invasivo de mama e 20 de carcinoma ductal in situ não encontrou alterações significativas do gene MYLK4, além da grande variância na expressão desse gene (Figura 22).

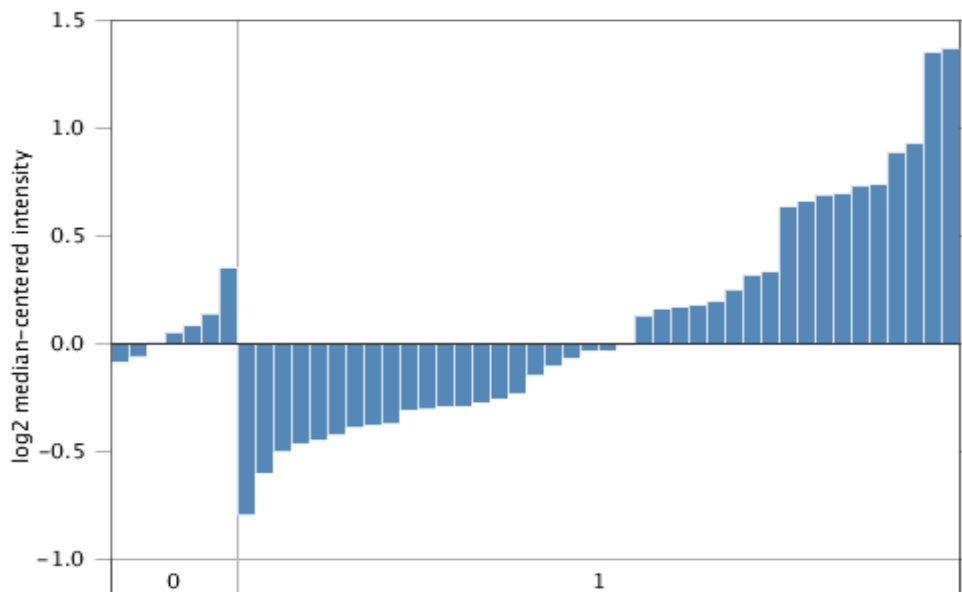


Figura 22 – Expressão de *MYLK4* em diferentes tipos de câncer de mama

Estudos obtidos do banco de dados Oncomine não identificaram variações estatísticas na expressão de *MYLK4* em diversos tipos tumorais. (0) tecido normal, (1) carcinoma ductal. Figura adaptada de Richardson *et al.* (75).

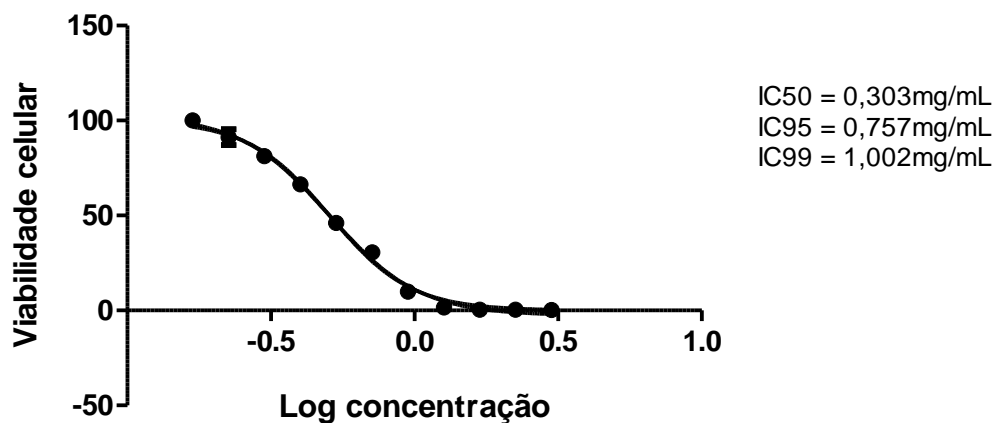
4.7 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPEREXPRESSION DO GENE *MYLK4*

Com os resultados obtidos observou-se uma hiperexpressão do *MYLK4* em linhagens celulares e em alguns tumores de câncer de mama analisados por imunohistoquímica e PCR quantitativo. Apesar da expressão do *MYLK4* não apresentar uma variação estatisticamente significativa, nos tumores superexpressando *MYLK4*, sua proteína pode contribuir de alguma forma para a alteração do controle de proliferação celular. Para avaliar os efeitos do gene *MYLK4* no crescimento celular, foram obtidos clones de células HEK293 estáveis superexpressando o gene *MYLK4* utilizando o vetor pCMV6-*MYLK4*-myc/DDK obtido junto a empresa Origene®. Os efeitos da superexpressão na proliferação celular foram analisados a partir da comparação das taxas de crescimento do clone superexpressando *MYLK4* com a taxa de crescimento de células HEK293 wild-type. Até a conclusão desse trabalho, não foi possível a clonagem do vetor após a deleção do inserto *MYLK4* do plasmídeo original, criando um plasmídeo controle vazio “mock”.

Para a seleção das células estáveis, a quantidade de agente seletivo necessária teve de ser definida primeiramente. Dessa forma um experimento foi desenhado para avaliar a quantidade de antibiótico necessário para realizar a seleção com G418 (geneticina).

Em uma placa de 96 poços foram plaqueadas células HEK-293 na densidade de $3,0 \times 10^3$. Nas onze colunas foram avaliadas as concentrações finais de 1,8 até 0,10 mg/mL em diluições de 1:4 e uma coluna ficou como controle. 24 horas após o plaqueamento, o agente seletivo foi aplicado. A cada 48 horas o meio de cultura era renovado com as mesmas concentrações anteriores e a cada 24 horas a morte celular era evidenciada pelo ensaio de MTT em uma fileira de poços da placa, dessa forma o efeito de cada concentração de G418 na viabilidade celular foi avaliado por oito dias.

Com os dados obtidos pelo ensaio de MTT a viabilidade celular foi calculada em relação à dose de agente seletivo e o IC50, IC95 e IC99 foram determinados. A dose escolhida para a seleção clonal em células HEK-293 foi de 0,8mg/mL (Figura 23).



$$\text{Equation: } Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC50} - X) * \text{HillSlope})})$$

Figura 23 – Determinação da quantidade de agente seletivo

A quantidade de antibiótico utilizado para seleção de células transfectadas foi definida em razão da viabilidade celular e a concentração de antibiótico utilizado observado em ensaio de MTT. Com os dados obtidos a curva log da concentração foi plotada em relação a viabilidade celular (equação mostrada) e os valores de IC50, IC95 e IC99 calculados.

A transfecção foi realizada com o plasmídeo pCMV-MYLK4-myc/DDK, utilizando Lipofectamina ® 2000 conforme as orientações do fabricante. No dia seguinte a transfecção iniciou-se a seleção de clones estáveis com meio DMEM suplementado com G418 na concentração final de 0,8mg/mL. Duas semanas após o início da seleção, iniciou-se a seleção clonal conforme item 3.12 da metodologia. Ao final do processo 5 clones contendo o pCMV-MYLK4-myc/DDK foram selecionados. Para confirmar a superexpressão do gene MYLK4 um clone foi selecionado e sua proteína foi extraída para análise por Western Blot. Três concentrações de proteína foram utilizadas nesse experimento: 15microg, 25microg e 40microg, e marcação com anticorpo para MYLK4 e myc/DDK foram realizadas e β -actina utilizada com controle endógeno (Figura 24).

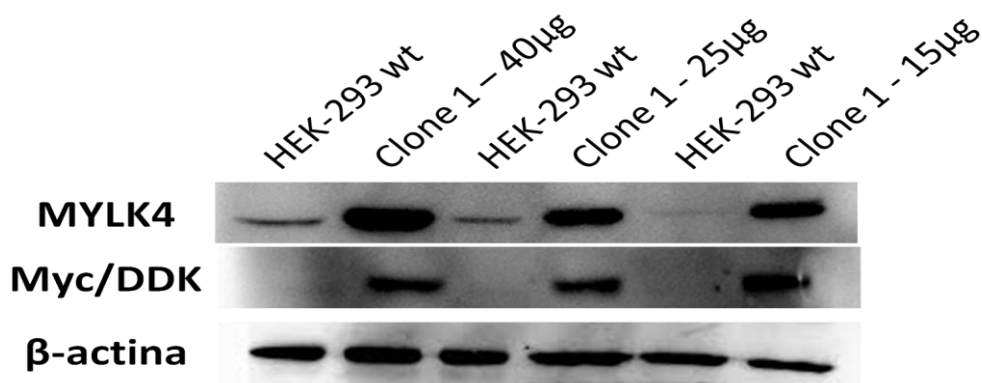


Figura 24 – Western Blot de controle e clone superexpressando MYLK4

Confirmação da superexpressão proteica de MYLK4 por Western Blot em clone de superexpressão comparado com linhagem celular Hek 293 wild-type (wt). β -actina utilizada como controle.

Verificaram-se os possíveis efeitos no crescimento celular por ensaio de MTT após a superexpressão. Embasado nos resultados do ensaio de MTT, pode-se observar um drástico aumento na proliferação celular das células transfectadas com vetor de superexpressão do MYLK4 após o sexto dia do plaqueamento (Figura 25). Outro dado observado foi a redução do tempo de duplicação celular nos clones superexpressando MYLK4 (média 33,09h) comparado com o tempo de duplicação celular do controle (média 49,40h) (Figura 26).

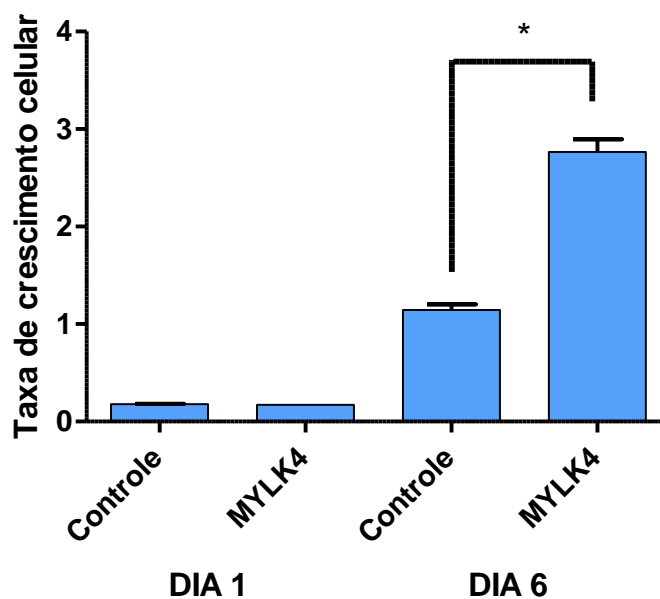


Figura 25 – Ensaio de MTT para avaliação do efeito da superexpressão do gene *MYLK4* em células HEK293

Leituras nos dias 1 e 6 após o plaqueamento referente ao ensaio de superexpressão do gene *MYLK4* em clones superexpressando *MYLK4* e em células HEK293 wild-type (Controle). $p=0,0286$, IC=95%.

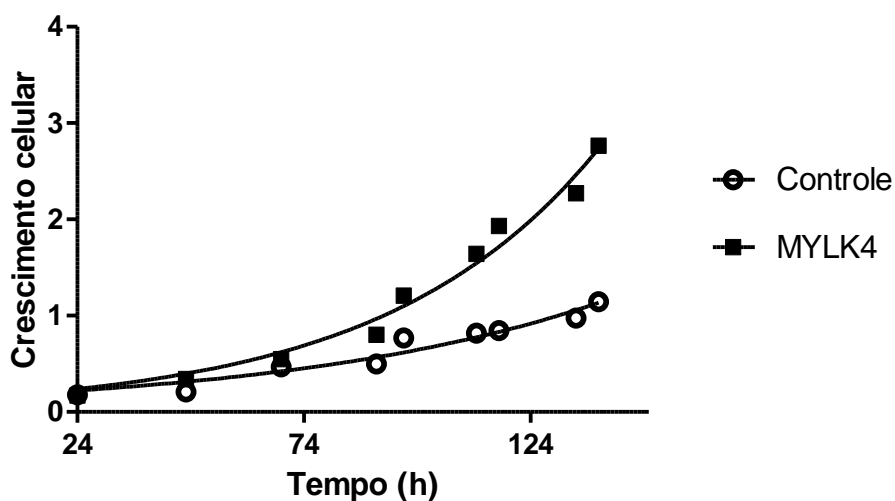


Figura 26 – Avaliação do tempo de duplicação celular em clone superexpressando *MYLK4*

Utilizando os valores referente aos seis dias da análise de MTT, os dados foram plotados em regressão não linear para determinação do crescimento exponencial celular. A diferença encontrada é estatisticamente significativa com um intervalo de confiança de 95%.

Paralelamente ao ensaio de MTT, para avaliar o efeito da superexpressão de *MYLK4* na proliferação celular também foi realizado um ensaio de formação de colônia em soft Agar (Figura 27). Observou-se um aumento tanto no número de colônias como no tamanho das colônias formadas em células superexpressando *MYLK4* (Figura 28), quando comparado com as células HEK293 wild-type utilizadas como controle.

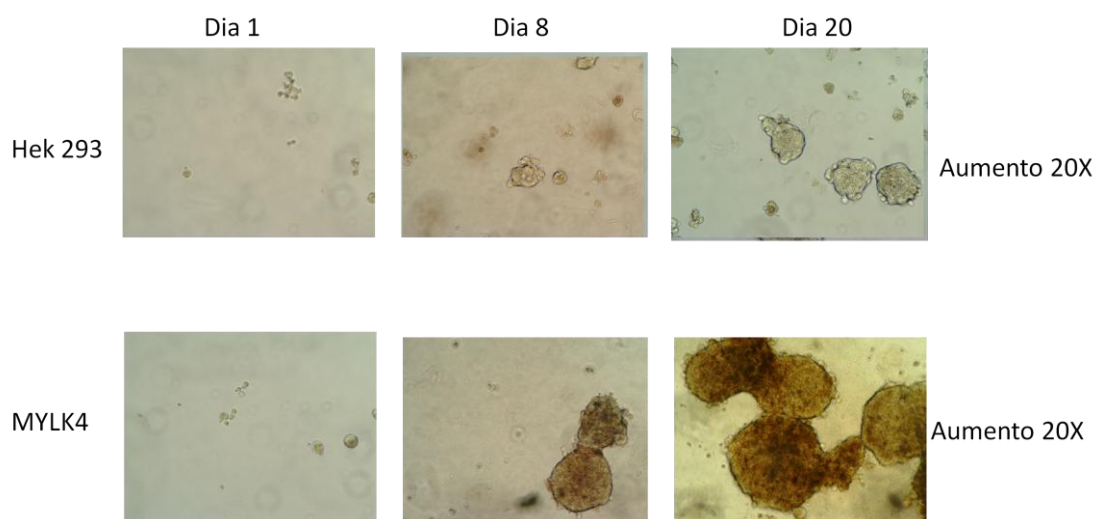


Figura 27 – Ensaio de formação de colônia em soft Agar

Ensaio realizado para avaliar o efeito da superexpressão de *MYLK4* no crescimento celular e viabilidade de formação de colônias. Como controle foi utilizado células HEK293 wild-type.

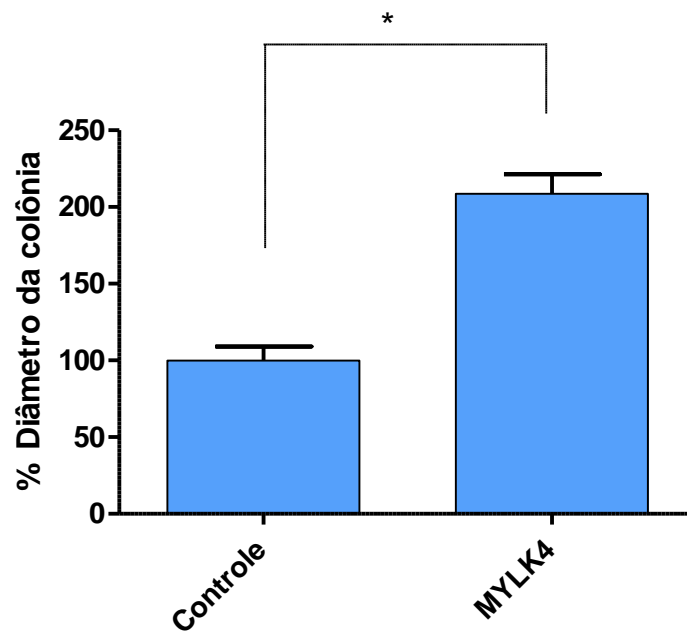


Figura 28 – Análise de formação de colônias em soft Agar.

O diâmetro das colônias foi medido no dia 20. A média do controle foi normalizada para 100%. $p=0,0286$. Teste de Mann Withney.

5. DISCUSSÃO

O MYLK4 é uma proteína serina/treonina quinase putativa, membro da família das proteínas MYLK. Alguns estudos correlacionam mutações em alguns membros dessa família com alguns tipos de doenças entre elas o câncer (59-67, 79). Pouco se sabe sobre o *MYLK4* e seu papel e importância na carcinogênese, nesse trabalho foi proposta a análise de mutações desse gene no câncer de mama, sua caracterização funcional e a investigação da relação desta proteína quinase putativa com o câncer de mama.

O alinhamento da proteína MYLK4 com os outros membros da família MYLK demonstrou que no domínio quinase e nos sítios de ligação existe uma equivalência na posição dos aminoácidos, entretanto, a real atividade de proteína serina/treonina quinase do MYLK4 ainda precisa ser detalhadamente estudada. Essa semelhança na posição dos aminoácidos em regiões importantes do MYLK4 comparado com os outros membros de sua família sugere uma possível analogia entre os mecanismos de ação da proteína MYLK4 com os outros membros da família MYLK. Apesar da analogia entre os aminoácidos da proteína MYLK4, não existe nenhum trabalho confirmando sua atividade de proteína quinase.

A análise de mutações no gene MYLK4 em linhagens celulares de câncer de mama identificou uma mutação não descrita na literatura na linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-468 (232G>T - A78S), oriunda de carcinoma mamário metastático envolvendo linfonodos, cérebro e coração, essa linhagem é caracterizada pela presença de grandes anomalias cromossômicas, inclusive o baixo número de cópias do cromossomo 6, onde se localiza o gene *MYLK4*. Outra mutação no gene *MYLK4* foi observada na linhagem de carcinoma oral OSCC-3 (148A>G – R50G), nenhuma das duas mutações observadas ocorreram no domínio de proteína quinase do MYLK4. Em amostras clínicas de câncer de mama com diferentes estadiamentos e características moleculares, nenhuma mutação foi identificada. Dos três pacientes com mutações identificadas em amostras clínicas no banco de dados cBio Portal (71) os dados dos pacientes estavam disponíveis para dois. Paciente TCGA-B6-A409 (mutação V148M), adenocarcinoma ductal invasivo in-situ. Paciente TCGA-D8-A27W (mutação P85L) carcinoma mucinoso

invasivo com expressão de ER em mais de 75% das células neoplásicas, com expressão de PR em menos de 10% das células malignas e alta expressão de HER-2. Nas mutações encontradas em linhagens celulares de câncer de mama, HCC1954 (A78S) é derivada de um carcinoma ductal invasivo sem a presença de linfonodos invadidos sem expressão de ER ou PR e com superexpressão de HER-2, enquanto isso a linhagem MDA-MB-453 é derivada de carcinoma mamário metastático envolvendo linfonodos, cérebro e coração, além de apresentar grandes anomalias cromossômicas, inclusive com baixo número de cópias do cromossomo 6, onde está localizado o gene *MYLK4*. Com o baixo número de mutações identificadas nesse trabalho e nos bancos de dados não é possível relacionar a presença das mutações com características clínicas tumorais, devido à baixa frequência de mutações nesse gene na população estudada.

A análise da expressão do *MYLK4* demonstrou que ele está hiperexpresso em cinco linhagens de câncer de mama com diferentes características moleculares. Pode-se notar que a linhagem MDA-MB-468 não possui uma expressão de *MYLK4* discrepante das demais linhagens analisadas, dessa forma, este resultado sugere que a mutação identificada não altera o perfil de expressão do *MYLK4* quando comparado com as demais linhagens celulares.

A avaliação da expressão do *MYLK4* em tecidos normais mostrou ser maior no tecido mamário ao comparar com todos os outros onze tecidos normais avaliados, além de uma superexpressão relativa em músculo cardíaco e músculo esquelético.

Devido à baixa expressão de *MYLK4* em tecidos normais e sua superexpressão em linhagens celulares de câncer de mama foi analisada sua distribuição tecidual em amostras tumorais e normais através de imunohistoquímica de tecidos parafinizados. Os resultados demonstraram que a proteína MYLK4 apresenta uma coloração gradualmente mais forte nos diferentes tecidos tumorais de mama. Este dado corrobora os dados encontrados no banco de dados The Human Protein Atlas (78) que através de imunohistoquímica de diferentes amostras clínicas de câncer de mama identificou uma marcação gradualmente maior em tecido tumoral em 50% das amostras quando comparado com tecido mamário normal, mostrando uma

grande variância na expressão de MYLK4 em diferentes amostras clínicas tumorais. Além dessa maior expressão proteica em tecido tumoral a partir da análise das imagens de imunohistoquímica acredita-se que o MYLK4 está localizado no citoplasma e na membrana celular.

Em amostras clínicas o MYLK4 mostrou uma grande variância em sua expressão tanto nas seis amostras tumorais pareadas com sua contra parte mamária normal, quanto no pool de amostras comparando a expressão em sete tecidos normais e doze tumorais. Nas amostras pareadas o MYLK4 se mostrou hiperexpresso em dois casos (paciente 22 e 49), enquanto nos demais pacientes (17, 23, 24 e 48) o MYLK4 se mostrou hipoexpresso. As características clínicas dos pacientes estão expostas na Tabela 4. Devido ao baixo número de casos observados não é possível a correlação entre a expressão do gene e as características clínicas e patológicas dos pacientes por não possibilitar uma aplicação de testes estatísticos estratificados. Entretanto, ao consultar a base de dados OncoMine, em seis estudos avaliando a expressão do gene MYLK4 por microarranjo ou PCR quantitativo em diferentes tipos de tumores de mama não foi identificada nenhuma variação significativa entre o conjunto de amostras normais e as amostras clínicas tumorais analisadas (72-77) . Dessa forma acredita-se que a expressão do gene MYLK4 não está significativamente alterada em amostras de câncer de mama. No entanto, devido à alta variância na expressão do MYLK4 entre as amostras, estudos posteriores podem associar a hiperexpressão ou hipoexpressão do MYLK4 com dados clínicos dos pacientes, utilizando esse gene como um futuro marcador molecular.

Devido a maior expressão de *MYLK4* nas linhagens celulares de câncer de mama analisadas e nas amostras clínicas tumorais submetidas a imunohistoquímica foram analisados os efeitos da superexpressão do *MYLK4* em células não cancerígenas (HEK293) na proliferação celular. Apesar das amostras clínicas pareadas ou o conjunto de amostras clínicas normais e tumorais não terem apresentado uma variação estatística na expressão do *MYLK4*. Criaram-se clones estáveis superexpressando MYLK4. Foi constatado que a superexpressão de MYLK4 em células normais reduziu o tempo de duplicação celular, aumentando a taxa de crescimento celular, e aumentou a capacidade dessas células de formarem colônias quando

comparado com as células controle não transfectadas, desta forma em tumores que possuem uma maior expressão de *MYLK4*, este pode estar envolvido em mecanismos que levam a um crescimento celular desregulado, contribuindo para a progressão tumoral.

6. CONCLUSÃO

Atualmente câncer representa um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, sendo o câncer de mama um dos mais frequentes em mulheres e responsável por mortes em todo o mundo. Desta forma são importantes novas pesquisas que possam melhorar o diagnóstico e tratamento dos pacientes. Uma vez que o câncer é caracterizado com uma doença de cunho genético é importante a realização de estudos que busquem entender as variações moleculares com mais frequência buscando novos marcadores e conseqüentemente terapias mais individualizadas.

Considerando os dados obtidos neste trabalho e a literatura existente até o momento, o gene *MYLK4* não possui uma frequência de mutações no câncer de mama como sugerido por *Wood. et al*, sendo as mutações identificadas neste trabalho e descritas na literatura presentes em baixas frequências no câncer de mama e sem alterações significativas na estrutura e função da proteína. A expressão do *MYLK4* possui uma grande variância em amostras tumorais não sendo possível relacionar sua expressão com o câncer de mama. Em contra partida a expressão da proteína MYLK4 em amostras tumorais está levemente aumentada quando comparada com amostras normais de tecido mamário nos pacientes analisados e nos bancos de dados. O aumento da expressão da proteína MYLK4 leva a alterações no crescimento celular de células normais, desta forma proteína MYLK4 pode possuir um papel importante na progressão tumoral responsável pelo aumento do crescimento celular.

Esses dados em conjunto apontam para um possível envolvimento do MYLK4 no crescimento celular em tumores que apresentem superexpressão deste gene. Contudo, mais investigações são necessárias para elucidar os mecanismos que levam a superexpressão proteica do MYLK4 em tecidos tumorais de mama e sua interação com outras proteínas importantes no crescimento celular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 *World Health Organization*. Cancer Fact sheet N°297 [internet]. [local desconhecido].[Atualizado em 2014. Acesso em julho 2014)]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- 2 *National Cancer Institute*. “Defining Cancer”.[internet]. EUA. [Atualizado em 2014; acesso em 2014, julho] Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>
- 3 *National Cancer Institute*. What is Cancer [internet]. EUA. [Atualizado em 2014; acesso em 2014, julho] Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>
- 4 *World Health Organization*. Cancer [internet]. [local desconhecido].[Atualizado em 2014. Acesso em julho 2014)]. Disponível em <http://www.who.int/cancer/en/>
- 5 Jemal A, Bray F, Center MM *et al*. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61:69-90.
- 6 Ministério da Saúde (Brasil), Instituto Nacional de Câncer. Câncer no Brasil. Prevenção e detecção [Internet]. [local desconhecido]: MS/INCA; [acesso em 2012 Mai 12]. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=13.
- 7 Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>, acesso em 2014.
- 8 Peltomäki P. Mutations and epimutations in the origin of cancer. *Exp Cell Res*. 2012;318(4):299-310.

9 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer. Cell. , Vol. 2000; 100: 57–70..

10 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of câncer: the next generation. Cell. 2011 Mar;144:646-74.

11 Moolgavkar SH, Knudson AG Jr. Mutation and cancer: a model for human carcinogenesis. J Natl Cancer Inst. 1981;66(6):1037-52.

12 Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. J Clin Oncol. 1999;17(9):2941- 53.

13 Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. Am J Pathol. 1998;153(2):333-9.

14 Harris CC. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. Cancer Res. 1991;51(18 Suppl):5023s-5044s.

15 Zingg JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. Carcinogenesis. 1997;18(5):869-82

16 Minamoto T, Mai M, Ronai Z. Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis. Carcinogenesis. 1999;20(4):519-27.

17 Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. Cancer Res. 1989;49(14):3713-21.

18 Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. Cancer Res. 1991;51(12):3075-9.

19 Barra GB, Caixeta MCSASB, Costa PGG *et al.* Diagnóstico molecular – passado, presente e futuro. RBAC. 2011;43(3)254-60.

20 Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(1): 28-39.

21 Jänne, Pasi A.; Gray, Nathanael; Settleman, Jeff (2009). "Factors underlying sensitivity of cancers to small-molecule kinase inhibitors". *Nature Reviews Drug Discovery* 8 (9): 709–23.doi:10.1038/nrd2871.

22 Capdeville R, Buchdunger E, et al. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov*, 2002; 1(7): 493-502.

23 Prenen H, Teipar S, Van Cutsem E. New strategies for treatment of KRAS mutant metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2010; 1;16(11):2921-6

24 MS – Ministério da Saúde; INCA – Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. *Revista do Instituto Nacional de Câncer*, Rio de Janeiro, 2014.

25 Pinho VFS, Coutinho ESF. Risk factors for breast cancer: a systematic review of studies with female samples among the general population in Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2005 Mar-Abr;21(2):351-60.

26 Adami HO, Persson I, Ekblom A, Wolk A, Pontén J, Trichopoulos D. The aetiology and pathogenesis of human breast cancer. *Mutat Res*. 1995;333(1-2):29-35.

27 Skegg DC. Risk assessment issues in breast cancer. *Mutat Res*. 1995;333(1-2):51-8.

28 McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 2000 Sep 9;321(7261):624-8.

29 Kluttig A, Schmidt-Pokrzywniak A. Established and Suspected Risk Factors in Breast Cancer Aetiology. *Breast Care (Basel)*. 2009; 4(2): 82–87.

30 Kluttig A, Schmidt-Pokrzywniak A. Established and Suspected Risk Factors in Breast Cancer Aetiology. *Breast Care (Basel)*. 2009; 4(2): 82–87.

31 Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nature*. 2007 Oct;7:791-8.

32 Corrêa PB, Toralles MBP, Abe-Sandes K *et al*. Câncer de mama triplo negativo e sua associação com ancestralidade africana. *Rev Cien Med Bio*. 2010;(Supl 1):3-7.

33 Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY. The impact of expression, profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2006 Mar;59(3):225-31.

34 Duda-Szymanska J, Sporny S. The practical value of breast cancer molecular classification. *Pol Merkur Lekarski*. 2011 Jul;31(181):5-8. Acesso em in: PubMed; PMID 21870701.

35 Cadore E. A expressão das claudinas 1, 3, 4, 7 e E-caderina em uma série de tumores de mama triplo-negativos [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012 [acesso em 2012 Mai 12]. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/39662>.

36 Wacholder S, Hartge P, Prentice R *et al*. Performance of common genetic variants in breast cancer risk models. *N Engl J Med*. 2010 Mar 18;362(11):986-93.

37 Vieira DSC, Dufloth RM, Schmitt FCL *et al*. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. *Rev Bras Ginecol Ostet*. 2008 Out;30(1):42-7.

38 Tonani M, Carvalho EC. Risco de câncer e comportamentos preventivos: a persuasão como estratégia de intervenção. *Rev Latinoam Enferm*. 2008 Set-Out;16(5):67-74.

39 Trufelli DA, Miranda VC, Dos Santos MBB, Fraile NMP, Pecoroni PG, Gonzaga SFR, Riechelmann R, Kaliks R, Del Giglio A. Análise do atraso no diagnóstico e tratamento do câncer de mama em um hospital público. *Rev Assoc Med Bras*. 2008; 54(1): 72-6

40 Eisenberg ALA, Koifman S. Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão de literatura). *Rev Bras Cancerol*. 2001;17(4):377-88.

41 Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumor-suppressor genes. *Br J Cancer*. 2006;94(2):179-83.

42 Helen Davies, Chris Hunter *et al*. Somatic Mutations of the Protein Kinase Gene Family in Human Lung Câncer. *Cancer Res* 2005; 65: (17). September 1, 2005.

43 Gschwind A., *et al*, 2005 e Manning G, Whyte DB. *et al*. (2002). "The protein kinase complement of the human genome". *Science* 298 (5600):1912–1934.

44 Hanks SK, Hunter T 1995 ."Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification". *FASEB J*. 9 (8): 576–96.

45 Hanks SK (2003). "Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective". *Genome Biol*. 4 (5): 111.doi:10.1186/gb-2003-4-5-111.

46 Hunter T (1991). "Protein kinase classification". *Meth. Enzymol*. Methods in Enzymology 200: 3–37.

47 Hanks SK, Quinn AM (1991). "Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members". *Meth. Enzymol. Methods in Enzymology* 200: 38–62.

48 Walker F, Abramowitz L, Benabderrahmane D, Duval X, Descatoire V, Hénin D, Lehy T, Aparicio T (November 2009). "Growth factor receptor expression in anal squamous lesions: modifications associated with oncogenic human papillomavirus and human immunodeficiency virus". *Hum. Pathol.* 40 (11): 1517–27.

49 Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD (June 2001). "EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy". *Endocr. Relat. Cancer* 8 (2): 83–96.

50 Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA (May 2004). "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib". *N. Engl. J. Med.* 350 (21): 2129–39.

51 Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM (July 1991). "Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase". *Science* 253 (5018): 407–14.

52 Neuroscience. 2nd edition. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al., editors. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001.)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19104514>)

53 Jänne, Pasi A.; Gray, Nathanael; Settleman, Jeff (2009). "Factors underlying sensitivity of cancers to small-molecule kinase inhibitors". *Nature Reviews Drug Discovery* 8 (9): 709–23.

54 Paul MK, Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. *Int J Med Sci* 2004; 1(2):101-115. doi:10.7150/ijms.1.101.

55 Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(1):28-39

56 Wood LD, Parsons DW, *et al.* The Genomic Landscapes of Human Breast and Colorectal Cancers (2007) *Science*. Nov 16; 318(5853):1108-13.

57 Sjoblom T., Siân Jones, Laura D. Wood, *et al.* The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science* 13 october 2006 Vol 314

58 Hong KW, Kim SS, Kim Y. Genome-wide association study of orthostatic hypotension and supine-standing blood pressure changes in two korean populations. *Genomics inform.* 2013; 11(3):129-34.

59 Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (December 2002). "The protein kinase complement of the human genome". *Science* 298 (5600): 1912–34.

60 Gao Y, Ye LH, Kishi H, Okagaki T, Samizo K, Nakamura A, Kohama K (June 2001). "Myosin light chain kinase as a multifunctional regulatory protein of smooth muscle contraction". *IUBMB Life* 51 (6): 337–44.

61 Seguchi O, Takashima S, Yamazaki S, *et al.*(2007). "A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart.". *J. Clin. Invest.* 117 (10): 2812–24.

62 The GeneCards [acesso em 2014 junho 12]. Disponível em: <http://www.genecards.org>

63 Minamiya Y, Nakagawa T, Saito H, Matsuzaki I, Taguchi K, et al. (2005) Increased expression of myosin light chain kinase mRNA is related to metastasis in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol* 26: 153–157.

64 Tohtong R, Phattarasakul K, Jiraviriyakul A, Sutthiphongchai T (2003) Dependence of metastatic cancer cell invasion on MLCK-catalyzed phosphorylation of myosin regulatory light chain. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 6:212–216.

65 Shin DH, Chun YS, Lee KH, Shin HW, Park JW. Arrest defective-1 controls tumor cell behavior by acetylating myosin light chain kinase. *PLoS One*. 2009 Oct 14;4(10):e7451.

66 Lu Chen, Liping Su, Jianfang Li, et al. "Hypermethylated FAM5C and MYLK in Serum as Diagnosis and Pre-Warning Markers for Gastric Cancer," *Disease Markers*, vol. 32, no. 3, pp. 195-202, 2012.

67 D.W. Parsons, T.L. Wang, Y. Samuels, A. Bardelli, J.M. Cummins, L. DeLong, N. Silliman, J. Ptak, S. Szabo, J.K. Willson, S. Markowitz, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, C. Lengauer, V.E. Velculescu Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway *Nature*, 436 (2005), p. 792.

68 The UniProt Consortium [base de dados na internet]. c2002-2014 [acesso em: 2014 Jun 13]. Disponível em: <http://www.uniprot.org/>

69 Neve RM, Chin K, Fridlyand J *et al*. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 2006;10(6):515-27.

70 Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1983;65:55-63.

71 Cerami et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discovery* 2012; 2(5); 401–4.

72 Richardson et al. X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer Cell* 2006; 9(2):121-32

73 Kamoub et al. Mesenchymal stem cells within tumor stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007; 449(7162):557-63

74 Curtis et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 2012; 486(7403):346-52.

75 Richardson et al. X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer Cell* 2006;9(2):121-32

76 Turashvili G¹, Bouchal J, Baumforth K, Wei W, Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis. *BMC Cancer*. 2007 Mar 27;7:55.

77 Radvanyi L¹, Singh-Sandhu D, Gallichan S, Lovitt C, Pedyczak A, Mallo G, Gis. The gene associated with trichorhinophalangeal syndrome in humans is overexpressed in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 2;102(31):11005-10

78 Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, Zwahlen M, Kampf C, Wester K, Hober S, Wernerus H, Björling L, Ponten F. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat Biotechnol*. 2010 28(12):1248-50.

79 Joshua M. Spin. Gene Mutations and Familial Thoracic Aortic Aneurysms *Cardiovascular Genetics*.2011; 4: 4-6

8. ANEXOS

ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O(A) sr(a). está sendo convidado(a), através deste documento fornecido em duas vias, a participar de um projeto de pesquisa denominado “Análise genômica e funcional de genes codificadores de metiltransferases protéicas em linhagens de carcinoma ductal da mama e normal linfóide humana”.

Os pesquisadores da Universidade de Brasília e os médicos do Hospital da Universidade de Brasília (HUB) estão desenvolvendo este projeto colaborativo, sob a coordenação do Prof. Dr. Fábio Pittella Silva, para estudar os mecanismos celulares e moleculares que geram o câncer de mama. Um dos benefícios desse projeto de pesquisa é que fornecerá bases para o desenvolvimento de diagnósticos mais precisos. Ajudará a caracterização da doença na Região Centro-Oeste, Norte e Nordeste do país. Outro benefício é que medicamentos específicos para o tratamento do câncer poderão ser desenvolvidos.

Caso o(a) sr(a). aceite participar, o pesquisador poderá esclarecer quaisquer dúvidas que tiver a respeito do projeto e deste termo de consentimento.

O procedimento para o estudo será o seguinte:

- O(A) senhor(a) será convidado a responder um questionário referente ao histórico da doença, compondo dados que farão parte do prontuário médico.

- O(A) senhor(a) está ciente de que há uma suspeita de acometimento com uma doença chamada câncer de mama, que requer tratamento e acompanhamento médico. Uma das maneiras pelas quais se pode confirmar ou excluir tal suspeita é através das amostra(s) de biópsia(s), ou seja, retirada de pequeno(s) fragmento(s) do tecido do órgão afetado. Esse(s) fragmento(s) será(ão) examinado(s) por um(a) médico(a)-patologista treinado(a), que poderá utilizar técnicas modernas apropriadas (como a imunohistoquímica) para o diagnóstico e posteriormente, emitirá um laudo. Na maioria dos casos, o pesquisador-responsável irá recomendar o tratamento do tumor. Nesse caso, o(a) sr(a). será encaminhado a um médico-cirurgião do HUB, que lhe fornecerá todos os esclarecimentos com relação ao tratamento. No caso de tratamento cirúrgico, amostras do tecido poderão ser examinadas também pelo(a) patologista. Não haverá qualquer custo para a realização dos exames relacionados ao tratamento, ou para o tratamento em si, mesmo que cirúrgico.

O material coletado para diagnóstico e acompanhamento do tratamento, assim como o material removido cirurgicamente, será utilizado para as análises clínicas necessárias, sendo uma pequena quantidade do mesmo utilizada para o projeto de pesquisa. Neste momento, outra pequena amostra de tecido normal também será retirada. Nenhum nome ou endereço será associado com a amostra coletada, tornando sua participação confidencial. O tratamento bem como as análises clínicas não acarretarão em ônus financeiro para o(a) sr(a) e/ou sua família.

- As amostras biológicas serão utilizadas apenas pelos pesquisadores envolvidos neste projeto, sendo experimentalmente manipuladas no Laboratório de Farmacologia Molecular, da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. As características moleculares das mesmas serão analisadas por técnicas de biologia molecular e celular. As amostras não serão disponibilizadas para outros estudos em qualquer hipótese.

- Os dados e registros relacionados a este projeto serão mantidos no HUB e somente os pesquisadores diretamente relacionados ao projeto terão acesso aos mesmos. Se desejar, o(a) sr(a) será informado(a)

dos resultados dessa pesquisa, que tem previsão de duração de 3 anos. Os resultados também serão publicados em revistas científicas e de interesse médico, sempre mantendo-se o seu anonimato.

A participação neste trabalho é voluntária, portanto o(a) sr(a). tem toda a liberdade de decidir se deseja participar ou não deste projeto. Poderá recusar-se a participar ou descontinuar a sua participação a qualquer momento, ou ainda recusar-se a fornecer qualquer informação (mesmo participando do estudo), tudo sem penalidades ou perda de benefícios a que tenha direito.

Li e entendi este TERMO. Durante a entrevista, eu me senti esclarecido quanto aos objetivos do trabalho de pesquisa. Estou ciente de que a participação no projeto é voluntária e não acarreta ônus para mim e/ou minha família. Sei ainda que em qualquer momento, posso pedir maiores esclarecimentos ao pesquisador responsável, bem como cancelar a participação sem que isso traga prejuízo a mim.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

_____ data: _____
Assinatura do(a) paciente

_____ data: _____
Assinatura do médico responsável pela pesquisa
Dr. João Nunes Neto – Cancerologista – CRM-DF 9165

_____ data: _____
Assinatura do coordenador do projeto de pesquisa
Prof. Dr. Fábio Pittella Silva – UNB

Telefones para contatos:

Comitê de Ética em Pesquisa, Faculdade de Ciências da Saúde, UnB (CEP/FS) – Tel: (61)3307-3799

Dr. João Nunes Neto – Tel: (61) 34485021

Prof. Dr. Fábio Pittella Silva – Tel: (61) 31071998