

ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS DO GENE *RASSF1* E
INVESTIGAÇÃO DE MODULAÇÃO GENE-ESPECÍFICA POR
NON-CODING RNA EM LINHAGENS CELULARES DERIVADAS
DE CARCINOMAS MAMÁRIOS

ANA PAULA PASCHOAL

BOTUCATU – SP

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS DO GENE *RASSF1* E
INVESTIGAÇÃO DE MODULAÇÃO GENE-ESPECÍFICA POR
NON-CODING RNA EM LINHAGENS CELULARES DERIVADAS
DE CARCINOMAS MAMÁRIOS

ANA PAULA PASCHOAL

CLAUDIA APARECIDA RAINHO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

BOTUCATU – SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Paschoal, Ana Paula.

Alterações epigenéticas do gene RASSF1 e investigação de modulação gene-específica por non-coding RNA em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários / Ana Paula Paschoal. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Claudia Aparecida Rainho

Capes: 20205007

1. Mamas - Câncer - Diagnóstico. 2. Metilação de DNA. 3. Expressão gênica. 4. Epigenética. 5. Reação em cadeia de polimerase.

Palavras-chave: Câncer de mama; Epigenética; Gene RASSF1; Regulação gênica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me fazer ver nas dificuldades e desafios um motivo a mais para persistir e seguir em frente.

Aos meus pais, Paulo Sérgio e Maria Francisca, pelo amor, apoio e confiança inesgotáveis.

Ao meu irmão, José Luiz, pela lição de vida e pela coragem inspiradora.

À minha avó Alice, por ser meu exemplo de vida e dignidade, pelo carinho, compreensão e fé.

Aos meus primos, primas, tios e tias, pelos momentos de descontração, motivação e incentivo.

Aos meus amigos de jornada Danielle, Carlos, Eder, Marcelo, Camila, Marcela, Vinícius, Alejandra, Flávia e Veridiana pela convivência, risadas, planos de vida, comemorações e paciência!

Às queridas amigas Mariana Bizarro e Mariana Ribeiro, pelas orientações dos primeiros passos, dedicação e trocas de experiência.

À Dra. Claudia Aparecida Rainho, pela orientação, críticas construtivas, ensinamentos, oportunidade e confiança em mim depositada durante meu período de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo suporte financeiro.

RESUMO

Alterações epigenéticas, incluindo as alterações da metilação do DNA, das modificações de histonas e da atividade de RNAs não codificadores, são eventos frequentes em células tumorais e estão associados às mudanças da estrutura da cromatina e dos níveis de expressão gênica. O gene *RASSF1*, localizado em 3p21.3, é responsável pela transcrição de sete variantes a partir de regiões promotoras distintas, associadas a duas ilhas CpG. Dentre os transcritos estão *RASSF1A* e *RASSF1C*, codificados por regiões promotoras diferentes, e que têm sido descritos na literatura como codificadores de proteínas com funções celulares opostas: *RASSF1A* é caracterizado como supressor tumoral e é frequentemente silenciado por metilação anormal em vários tipos de câncer, enquanto *RASSF1C* tem sido associado a atividades oncogênicas, e não há relatos de metilação de ilha CpG associada à sua região promotora. Com a finalidade de investigar uma possível associação entre parâmetros clínicos e histopatológicos em pacientes diagnosticadas com câncer de mama e o padrão de metilação de *RASSF1A* e *RASSF1C*, foram analisadas 84 amostras de carcinomas mamários pela técnica de MS-PCR (*Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*). Para *RASSF1A*, foi encontrada uma frequência de metilação de 84,5% das amostras, enquanto que para *RASSF1C* todas as amostras apresentaram alelos exclusivamente não-metilados, o que sugere uma regulação de expressão diferente da observada para *RASSF1A*. Devido ao fato de 75 das 84 amostras utilizadas serem diagnosticadas como carcinomas ductais invasivos, as análises estatísticas incluíram apenas esse subtipo histológico. Não foi encontrada diferença estatística significativa para as características clínicas/histopatológicas e presença/ausência de metilação de *RASSF1A*. Foi também analisado o padrão de metilação das ilhas CpG de *RASSF1* em 17 linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários e em 3 linhagens celulares derivadas de tecido mamário normal ou de tumor benigno da mama. Para *RASSF1A*, foi observada em 5 linhagens a presença de alelos metilados e não-metilados, em apenas uma a presença exclusiva de alelos não metilados e em 14 a presença exclusiva de alelos metilados. Contrariamente, todas as linhagens apresentaram ausência de metilação de *RASSF1C*. Os ensaios quantitativos de expressão gênica por qRT-PCR (*Quantitative Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) demonstraram que *RASSF1C* é expresso em todas as linhagens, porém em maiores níveis em linhagens classificadas como do subtipo basal ($p=0,0470$, teste de Kruskal-Wallis). No entanto apenas 2 linhagens apresentaram expressão de *RASSF1A* (MDA-MB-415 e Hs578T). Com a finalidade de investigar a regulação da expressão de *RASSF1* e uma possível modulação por lncRNA (*long non coding RNA*), foram realizados ensaios qualitativos e quantitativos para a detecção de um RNA não-codificador intrônico antissense ao gene *RASSF1*. A expressão do transcrito antissense ao gene *RASSF1*, denominado *ANRASSF1*, foi detectado em 16 linhagens (2 normais e 14 derivadas de carcinomas mamários), e seu nível de expressão não foi correlacionado com os níveis de *RASSF1C* e foi independente do padrão de metilação da região promotora associada à *RASSF1A*. Estes dados corroboram o mecanismo proposto recentemente para a modulação epigenética locus-específica para *RASSF1A* mediado por esse lncRNA intrônico.

Palavras-chave: Gene *RASSF1*, epigenética, câncer de mama, regulação gênica.

ABSTRACT

Epigenetic alterations in DNA methylation, histone modifications and non-coding RNAs are events frequently associated to tumor cells, leading to changes in chromatin structure and gene expression levels. *RASSF1* gene is located on 3p21.3 and it is responsible for the transcription of seven variants from alternative promoter regions, associated with two different CpG islands. Among the alternative transcripts of the gene *RASSF1* are found *RASSF1A* and *RASSF1C*. These RNA variants are regulated by distinct promoter regions and encode proteins with opposite role in cellular processes: while *RASSF1A* has been characterized as a tumor suppressor and is frequently silenced by aberrant methylation in several cancer types, *RASSF1C* has been associated to oncogenic activities, and there is no data about DNA methylation changes in its CpG island. In order to investigate a possible association between clinical and histopathological parameters of breast cancer patients and the DNA methylation patterns of *RASSF1A* and *RASSF1C*, the present study analyzed 84 samples breast carcinomas by MS-PCR technique (*Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*). For *RASSF1A*, 84.5% of the samples were methylated, whereas all samples showed *RASSF1C* alleles exclusively non-methylated, which suggests a different mechanism of expression regulation for *RASSF1C*. Further, 75 of the 84 samples were diagnosed as invasive ductal carcinomas; so statistical analyzes included the group of breast cancer patients with this histological subtype. No statistically significant differences were found between clinical/histopathological and presence/absence of *RASSF1A* methylation. The DNA methylation patterns of *RASSF1A* and *RASSF1C* were also evaluated in 17 breast cancer cell lines as well as in three cell lines derived from normal breast epithelium (184A1 e 184B5) or benign breast tumor (MCF10A). For *RASSF1A*, 5 cell lines showed methylated and non-methylated alleles, only one showed exclusively non-methylated alleles, and 14 showed exclusively methylated alleles. For *RASSF1C* the pattern was maintained, none of the cell lines showed methylated alleles. The quantitative assays of gene expression by qRT-PCR (*Quantitative Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) showed that *RASSF1C* is ubiquitously expressed, but at higher levels in breast cancer cell lines classified as the basal subtype ($p = 0.0470$, Kruskal-Wallis test). However, only two cell lines showed expression of *RASSF1A* (MDA-MB-415 e Hs578T). In order to investigate the possible modulation of *RASSF1* gene expression by lncRNA (long non coding RNA), it was performed qualitative and quantitative assays for the detection of a long non-coding intronic RNA antisense to *RASSF1*. The expression of the antisense transcript of *RASSF1* gene, also named *ANRASSF1*, was detected in 16 cell lines (2 derived from normal mammary epithelium and 14 from breast carcinomas). *ANRASSF1* expression levels were not correlated with the levels of *RASSF1C* and they were independent of the DNA methylation status of the *RASSF1A* promoter region. Taking together, these data support the recently proposed mechanism for the locus-specific epigenetic modulation for *RASSF1A* mediated by this intronic lncRNA.

Key words: *RASSF1* gene, epigenetics, breast cancer, gene regulation.

ÍNDICE

I.INTRODUÇÃO.....	2
I. 1. Câncer de mama.....	4
I. 2. Conceitos em epigenética.....	10
I. 3. Alterações epigenéticas no cromossomo 3p em neoplasias.....	17
I. 4. O gene <i>RASSF1</i>	19
II. OBJETIVOS	
II. 1. Objetivo geral.....	32
II. 2. Objetivos específicos.....	32
III. MATERIAL E MÉTODOS	
III. 1. Amostras biológicas.....	34
III. 2. Análise do padrão de metilação das ilhas CpG do gene <i>RASSF1</i> ..	36
III. 3. Análise da expressão dos transcritos <i>RASSF1A</i> e <i>RASSF1C</i> em linhagens celulares.....	39
III. 4. Detecção do transcrito antissense <i>ANRASSF1</i> em linhagens celulares.....	41
III. 5. Análise estatística.....	44
IV. RESULTADOS	
IV. 1. Análise do padrão de metilação das ilhas CpG do gene <i>RASSF1</i> ..	47
IV. 2. Análise de metilação das ilhas CpGs do gene <i>RASSF1</i> e de expressão dos transcritos <i>RASSF1A</i> e <i>RASSF1C</i> nas linhagens celulares.....	56
IV. 3. Detecção do transcrito intrônico antissense <i>ANRASSF1</i>	60
IV. 4. Análise da expressão relativa de <i>ANRASSF1</i>	63
V. DISCUSSÃO.....	68
VI. CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
APÊNDICE I.....	90
APÊNDICE II.....	97
APÊNDICE III.....	98

INTRODUÇÃO

A etiopatogenia do câncer humano vem intrigando a ciência por décadas, e cientistas de todo o mundo, desde então, se desdobram em pesquisas, as quais têm nos trazido contribuições relevantes e essenciais para um melhor entendimento desta doença heterogênea sob a perspectiva clínica e biológica. Ao final do século dezenove e início do século vinte, análises microscópicas de células cancerígenas trouxeram à tona evidências de várias aberrações cromossômicas, propondo a ideia geral do câncer como clones anormais de células, caracterizado por possuir inúmeras alterações no material genético (Coe *et al.*, 2008; Chari *et al.*, 2008; Stratton *et al.*, 2009; Chari *et al.*, 2010a; 2010b).

A importância e a preocupação com o câncer são observadas em todos os países, sendo considerado a segunda causa de morte no mundo. O número de casos de câncer de vários tipos tem aumentado tanto em países desenvolvidos quanto em países subdesenvolvidos, possivelmente devido ao aumento da expectativa de vida e também à exposição a fatores de risco. A Organização Mundial de Saúde lançou uma meta de reduzir (de 2013 até 2030) em 25% o número de casos de morte prematura por câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e doenças respiratórias crônicas (WHO, 2014).

Após décadas de estudos intensos, o conhecimento sobre o câncer aumentou significativamente, porém, a eminente complexidade ainda impõe muitos limites. Existem mais de 100 tipos de câncer diferentes, cada um com sua peculiaridade. Contudo, algumas alterações celulares são comuns a todos os tipos de neoplasias, por esse motivo são denominadas “*hallmarks*” tumorais. As principais vias moleculares alteradas nas células tumorais incluem: sinalização proliferativa constante, insensibilidade a inibidores do crescimento celular, resistência à morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, invasão de tecidos

adjacentes, indução da angiogênese e metástases. Essas habilidades são adquiridas pelas células tumorais durante a evolução do câncer, sendo favorecidas pela instabilidade genômica. Espera-se que a melhor compreensão das bases moleculares do câncer humano permitirá o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e tratamento (Hanahan e Weinberg, 2011).

Os estudos sobre mutações e atuação de genes-chave no processo da carcinogênese têm aberto portas para uma era repleta de descobertas importantes. Diversas alterações, como substituição de bases, rearranjos, inserções e deleções de pequenos ou grandes segmentos de DNA são características da transformação celular maligna, presentes na maioria dos tumores (Stratton *et al.*, 2009).

Os avanços nas técnicas de biologia molecular e nos conhecimentos cada vez mais apurados do genoma humano possibilitaram a caracterização e acompanhamento de diversas alterações que ocorrem durante a carcinogênese, como a perda do controle da proliferação, crescimento celular, diferenciação e apoptose. Este cenário é devido ao acúmulo de mutações, transmitidas de célula-mãe para células-filhas, afetando mecanismos responsáveis pela manutenção da homeostasia celular (Yokota, 2000).

Existem duas classes de genes que, quando expressos inadequadamente, se relacionam intrinsecamente à formação de células cancerosas. Genes supressores tumorais devem promover o controle da proliferação celular, porém em células malignas podem estar silenciados, ter sofrido deleção ou mutação, não efetivando sua função. A outra classe é dos proto-oncogenes, responsáveis por promover a divisão celular ordenada, mas que em câncer podem sofrer ativação mutacional para oncogene, promovendo proliferação celular excessiva e descontrolada (Rivoire *et al.*, 2006; Chen e Hunter, 2005).

I.1. Câncer de mama

O câncer de mama é um dos tipos mais comuns de câncer, contando com mais de 1.300.000 casos e 450.000 mortes por ano, no mundo (*Cancer Genome Atlas Network*, 2012). Segundo os levantamentos do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de mama é o segundo tipo mais frequente entre as mulheres brasileiras, tendo para o ano de 2014 a estimativa de 57.120 novos casos. Existem vários fatores de risco para o desenvolvimento de carcinomas mamários, como, por exemplo, aqueles que estão relacionados à vida reprodutiva da mulher: menarca precoce, idade da primeira gestação maior do que 30 anos, uso de anticoncepcionais orais, menopausa tardia, dentre outros. A incidência de câncer de mama até os 35 anos é relativamente baixa e rara, porém aumenta rápida e progressivamente após essa faixa de idade (Brasil. Ministério da Saúde, INCA, 2014). O histórico familiar também resume um fator de risco crítico, deixando evidente o importante papel da predisposição hereditária no desenvolvimento de neoplasias (Cheung *et al.*, 2000).

Apesar de ser considerado um tipo de câncer de bom prognóstico, quando detectado precocemente, no Brasil a tendência de mortalidade por neoplasias mamárias é aumentar, possivelmente por conta do diagnóstico tardio em muitos casos (Barrios *et al.*, 2005). Os métodos tradicionais utilizados atualmente para diagnóstico são, normalmente, a mamografia, auto-exame e exame clínico realizado pelo profissional de saúde. Exames de imagem como a ultrassonografia são procedimentos auxiliares, bem como exames citológicos (punção aspirativa) e exame histopatológico (biópsia). Contudo, na maioria das pacientes, quando o tumor é detectado por esses métodos, geralmente já se encontra em fases mais avançadas do desenvolvimento, e estão associados a um pior prognóstico (Krasseinstein *et al.*, 2004; INCA, 2014).

As novas metodologias de análise de perfis de alterações genéticas e de expressão gênica diferencial são importantes para a compreensão do comportamento celular em tipos e estágios tumorais diferentes, além de promissores no desenvolvimento de técnicas mais eficientes de diagnóstico e terapia (van't Veer *et al.*, 2002).

O câncer de mama pode resultar do acúmulo de diferentes mutações em classes distintas de genes: alterações em oncogenes, geralmente ativados por mutação em ponto ou amplificação gênica; em genes de reparo a danos do DNA e em genes supressores tumorais, que geralmente sofrem inativação gênica bialélica, por mutação de um alelo e perda do outro por deleção de um segmento cromossômico ou por silenciamento epigenético. Durante o processo de carcinogênese, acredita-se que eventos genéticos e epigenéticos complementam-se (Lodygin *et al.*, 2005).

Tomando por base os dados epidemiológicos da doença, a maioria das pacientes com câncer de mama encontram-se na faixa etária de 40 a 69 anos, sendo o carcinoma esporádico o maior representante dos casos (95%). Apenas 5% dos casos são considerados hereditários, e desenvolvem-se em pacientes normalmente mais jovens e com histórico familiar da doença. A aproximadamente 80% dos casos hereditários associam-se mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (*Breast Cancer 1* e *Breast Cancer 2*), genes de suscetibilidade hereditária a câncer de mama e ovário, além de aumentar os riscos de câncer de pâncreas e próstata. Esses genes estão relacionados a diversos processos celulares, como ativação e regulação transcricional, reparo a danos do DNA, controle do ciclo celular, proliferação e diferenciação. Em carcinomas esporádicos, a presença de mutações nesses genes é menos frequente comparada aos casos hereditários (INCA, 2014; Hirata *et al.*, 2014).

Os tipos histológicos do câncer de mama possuem diversas classificações, e nem sempre o tumor apresentado pelo paciente se enquadra em apenas um deles. Os tumores de melhor prognóstico são basicamente os carcinomas ductais (se originam das células dos ductos mamários) e lobulares (se originam dos lóbulos, ou glândulas produtoras de leite) não-invasivos (*in situ*, ou crescimento confinado ao epitélio). Seguidos destes, estão os carcinomas invasivos de prognóstico favorável: carcinoma *ductal* invasivo com componente intraductal predominante (carcinoma ductal microinvasivo), carcinoma mucinoso (coloide), carcinoma medular, carcinoma papilífero, carcinoma tubular, carcinoma adenocístico e carcinoma secretor (juvenil). Os tumores de pior prognóstico são os carcinomas ductais invasivos e os carcinomas lobulares invasivos (ambos invadem o estroma). O carcinoma ductal invasivo é o tipo histológico mais comum, contando com uma incidência de 80-85% dos casos (Alverenga, 2000).

Alguns marcadores são avaliados para se estabelecer o prognóstico, como a expressão dos receptores hormonais ER (receptor de estrógeno) e PgR (receptor de progesterona), Ki-67, Her-2, E-caderina e p53, sendo esta investigação conduzida por análise imunohistoquímica. Os receptores hormonais de estrógeno e de progesterona normalmente têm suas expressões associadas a tumores de baixo grau histológico, ou seja, menor potencial de malignidade, sendo possível associar ao tratamento terapias endócrinas (Pusztai et al., 2006). A proliferação celular, por sua vez, é investigada através do antígeno nuclear Ki-67, que é encontrado em células nas fases proliferativas do ciclo celular. Portanto, quando mais elevada a expressão de Ki-67, pior o prognóstico, já que tumores com essa característica apresentam alta probabilidade de desenvolver metástases (Esteve e Hortobagyi, 2004).

O Her-2 (*Human Epidermal growth factor receptor type-2*) é um proto-oncogene responsável pela codificação de uma proteína que, quando em quantidades normais, atua no crescimento e desenvolvimento de células epiteliais. As células epiteliais são encontradas revestindo o organismo interna e externamente, bem como o tecido glandular. Em carcinomas mamários, o gene *HER2* é amplificado em muitas cópias, apresentando expressão aumentada e associada à proliferação celular, devido à transmissão constante de sinais para o crescimento e desenvolvimento celular (Hirata et al., 2014).

A E-caderina é uma proteína codificada pelo gene *CDH1*, um outro marcador que pode ser investigado em câncer de mama. Esta proteína pertence a uma família de moléculas de adesão celular, tendo importante função na manutenção da diferenciação e regulação da arquitetura normal de tecidos epiteliais. A imunomarcagem de E-caderina é mais abundante em tumores mais diferenciados (menos invasivos), pois ainda mantém sua adesividade celular. Já em tumores indiferenciados, a imunomarcagem é bem reduzida, pois perderam a adesão célula-célula, tendo comportamento fortemente invasivo (Graziano et al., 2003; Wijnhover et al., 2000).

O gene supressor tumoral *TP53* (*tumor protein p53*) é responsável por codificar um fator de transcrição, ativado em resposta a diferentes situações de estresse e dano celular, desempenhando funções antiproliferativas, como por exemplo a parada do ciclo celular para que haja reparação dos danos. Esse gene pode sofrer diversas mutações e, dessa forma, deixar de desempenhar sua função de “proteção” ao genoma, já que a proteína codificada é um fator de transcrição que regula a expressão de outros genes importantes. Embora seja considerado um supressor tumoral, devido a maioria das mutações levar à perda de sua função, pode atuar, em alguns casos, como oncogene, pois determinadas mutações

produzem um efeito dominante-negativo, onde o produto do único alelo mutado inativa o alelo normal (Levine, 1997).

As mutações que afetam o gene *TP53* ocorrem principalmente em células somáticas, mas podem acontecer em células germinativas, caracterizando a síndrome de Li Fraumeni. Essa é uma síndrome rara de câncer hereditário, caracterizada por predispor portadores a diversos tipos de tumor, como tumor cerebral, tumores de partes moles, sarcomas ósseos, leucemias, carcinoma adrenocortical e câncer de mama em mulheres na pré-menopausa (Xu et al., 2014).

Perou e colaboradores (2000) investigaram a variação no padrão de expressão gênica de 65 amostras de tumor primário de mama, utilizando uma plataforma de *microarray* contendo 8.102 genes humanos. Os resultados permitiram classificar as amostras de acordo com a expressão de ER e Her-2, pois o grupo com expressão de ER também exibiu elevada expressão relativa de genes característicos do grupo luminal, e não apresentou amplificação do gene Her-2. Já as amostras com amplificação do gene Her-2 demonstraram níveis baixos de expressão de ER, condizente com as características do grupo basal-símile.

Neve e colaboradores (2006), revisaram a literatura especializada e classificaram 51 linhagens derivadas de carcinomas humanos em subtipos, de acordo com as características moleculares e biológicas comparadas com as das amostras de tumores primários de mama. O resultado principal do trabalho foi a comparação do número de cópias do genoma e perfil transcricional entre as duas classes de amostras. Os autores perceberam diferenças mais contrastantes entre dois grupos de amostras (luminal e basal-símile). O grupo luminal apresentava características mais uniformes, já o basal-símile subdividia-se em dois outros grupos: basal-A e basal-B, sendo o último considerado mais invasivo e indiferenciado. Muitos genes foram investigados para que essa classificação

pudesse ser estabelecida, dentre eles o gene *Her-2* que, em contraste com o trabalho de Perou e colaboradores (2000), não caracterizou nenhum grupo de amostras pela expressão diferenciada, já que foi identificada a amplificação desse gene tanto no grupo luminal quanto no subgrupo basal-A.

A Sociedade Brasileira de Mastologia (SBM) relata que, a partir de 2001, os tumores de mama passaram a ser classificados de acordo com suas características moleculares. Isso foi possível devido a vários estudos que investigaram a expressão de centenas de genes simultaneamente, permitindo a classificação em subtipos morfológicos: Luminal A, Luminal B, Luminal híbrido, Her-2 e Basal-símile. Cada um desses subtipos agrupam tipos tumorais com características genéticas semelhantes, e cada grupo diferencia-se quanto à características imunohistoquímicas, prognósticas e terapêuticas (Nielsen et al., 2004; Cheang et al., 2009; Rakha et al., 2009; Schnitt 2010).

Segundo dados da Sociedade Brasileira de Mastologia, os subtipos mais frequentes são Luminal A e Luminal B, com 60% dos casos. Os tumores Luminal A possuem menor grau histológico, alta expressão de ER e PgR, e baixos índices de proliferação celular (Ki-67). Já os tumores do subtipo Luminal B apresentam um grau histológico maior do que o apresentado pelo Luminal A e também maiores índices proliferativos. Os subtipos Her-2 e Basal símile respondem por 15% dos casos cada um, sendo que a principal característica de ambos é a não-expressão de receptores hormonais (ER e PgR). O primeiro subtipo caracteriza-se pela amplificação do *Her-2*, de elevada agressividade clínica. Os dois subtipos apresentam alto grau histológico e elevado índice de proliferação celular; no entanto, os tumores classificados como Basal-símile são os mais agressivos clinicamente, devido a não apresentarem expressão de nenhum dos marcadores prognósticos (ER, PgR e Her-2), sendo denominados triplo-negativos (Schnitt 2010).

O sistema de estadiamento utilizado hoje, no mundo todo, é o recomendado pela União pelo Controle Internacional do Câncer (UICC, do inglês *Union for International Cancer Control*) denominado Tumor-Nódulo-Metástase (TNM). Esse sistema leva em consideração as características anatômicas, tumor primário e extensão tumoral, além da presença ou ausência de metástase: a categoria T descreve o tumor primário e o local onde se encontra; a categoria N descreve o envolvimento regional de linfonodos; a categoria M descreve a presença ou ausência de metástases. Esse estadiamento varia de 0 a IV, dependendo dos resultados do conjunto de fatores analisado (UICC, 2013).

I.2. Conceitos em epigenética

O termo epigenética refere-se a um conjunto de fatores que associam-se à sequência do DNA e auxiliam na determinação e regulação da expressão gênica, seja através de ligações covalentes em determinados sítios da molécula de DNA ou de modificações nas histonas, que são proteínas responsáveis pelo empacotamento e organização da cromatina (Yang et al., 2002). Esses mecanismos são herdáveis, ou seja, são mantidos após as divisões celulares, e ocorrem normalmente no organismo, sendo indispensáveis para a manutenção da ordem na dinâmica celular (Choi e Lee, 2013). Os principais mecanismos epigenéticos estudados são: metilação de DNA, modificação de histonas e ação de RNAs não codificadores (Bayling e Schuebel, 2007). A metilação de DNA, atualmente um dos mecanismos bastante estudados, caracteriza-se pela adição de um radical metil ao quinto carbono de um resíduo de citosina (5^mC), imediatamente precedida de uma guanina, denominado dinucleotídeo CpG. Este evento epigenético está envolvido na regulação da expressão gênica (Robertson e Wolffe, 2000; Lodygin *et al.*, 2005).

A distribuição dos dinucleotídeos CpG no genoma humano não é uniforme, sendo que em algumas regiões eles encontram-se de forma esparsa, e em outras de maneira concentrada. A estas regiões de alta concentração é dado o nome de ilha CpG. Normalmente, os dinucleotídeos CpG esparsos encontram-se metilados, e as ilhas CpG não metiladas, porém, é frequente a presença de ilhas CpG metiladas em células tumorais. Cerca de 60% dos promotores de genes humanos estão associados a ilhas CpG, e sabe-se que a hipermetilação está associada à repressão transcricional e a hipometilação relaciona-se à transcrição ativa; dessa forma, alterações no epigenoma implicam no silenciamento e expressão gênica aberrantes (Ting *et al.*, 2006; Coolen *et al.*, 2010).

Gardiner-Garden e Frommer (1987) foram os responsáveis por realizar a primeira análise computacional em larga escala do GenBank sobre ilhas CpG, utilizando sequências de vertebrados. Eles definiram ilha CpG como sendo uma região do DNA de 200 pares de bases (pb) com uma concentração de nucleotídeos C e G maior que 50%, e a relação de CpG observado/CpG esperado sendo maior ou igual a 0,6. Utilizando essa definição, outras sequências podem ser confundidas com ilhas CpG, como no caso das sequências *Alu* (elementos curtos intercalados, altamente repetitivos) que, em vários casos, se encaixam perfeitamente nesse primeiro conceito.

Para contornar o problema, Takai e Jones (2002) propuseram um novo parâmetro para identificar uma ilha CpG, que exclui as sequências *Alu* e muitas ilhas CpG que não se encontram em promotores de genes. Dessa forma, uma ilha CpG é caracterizada atualmente como sendo um fragmento de DNA de 500pb, com concentração de nucleotídeos C e G maior que 55% e razão de CpG observado/esperado maior ou igual a 0,65.

O silenciamento gênico ocorre naturalmente nas células, coordenando a expressão de um gene à necessidade e especificidade da célula e tecido. Apesar da maioria das ilhas CpG não estarem metiladas no período de desenvolvimento e também em tecidos diferenciados, algumas ilhas CpG permanecem metiladas, mesmo durante o desenvolvimento normal. Esse processo recebe o nome de silenciamento transcricional de longo prazo, e exemplos típicos desse evento são: a inativação do cromossomo X em fêmeas de mamíferos, *imprinting* genômico e silenciamento de parasitas intragenômicos (Bird, 2002).

A metilação em ilhas CpG e dinucleotídeos CpG esparsos acontece devido à atuação de um grupo de enzimas denominadas DNMTs (DNA metiltransferases). Essas enzimas são responsáveis pela metilação e manutenção desse mecanismo, promovendo marcas epigenéticas que seguem o padrão existente na fita molde de DNA durante a replicação. As DNMTs utilizam a S-adenosilmetionina (SAM) como substrato para a reação, adquirindo, dessa forma, os grupos metil (Bestor, 2000).

As células tumorais possuem diferentes níveis de metilação aberrante, os quais contribuem para a progressão do câncer. A hipometilação global acarreta em instabilidade genômica e aumento da taxa de mutação, pois ativa sequências que deveriam permanecer silenciadas, como, por exemplo, elementos transponíveis. Já a hipermetilação de ilhas CpG nas extremidades 5' dos genes leva à repressão transcricional, podendo culminar num grave transtorno celular, principalmente quando o gene em questão é um TSG (*tumor supressor gene*) (Toyota e Issa, 1999).

A cromatina apresenta uma estrutura de organização definida pelas histonas, proteínas passíveis de diversas modificações químicas pós-traducionais (acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitilação, sumoilação entre outras). O nucleossomo é a unidade básica de organização da cromatina, formada por quatro tipos de histonas (H2A, H2B, H3 e H4) agrupadas num *core* de oito histonas, duas de cada tipo.

Quando em sua conformação original, os nucleossomos permitem que o DNA permaneça altamente condensado e inacessível à maquinaria de transcrição. Porém, essa estrutura de organização pode mudar devido à modificações químicas que ocorrem nas caudas N-terminais das histonas ou na própria molécula de DNA, interferindo na acessibilidade ao DNA pelos elementos de transcrição, regulando a expressão gênica (Rando 2006; Esteller, 2007).

Alguns modelos têm sido propostos para explicar o controle da expressão gênica pelas histonas. A verdade é que essas modificações têm se mostrado muito mais complexas do que os mecanismos de metilação de DNA, uma vez que o perfil de eucromatina ou heterocromatina é definido por um conjunto de modificações de histonas conhecido por “Código das Histonas” (Wang et al., 2004). Eventos epigenéticos envolvendo metilação de DNA e modificação de histonas são considerados complementares, portanto determinam um efeito crucial e indispensável na regulação da expressão gênica em células normais (Esteller, 2008; Murr, 2010).

Kikuyama e colaboradores (2012) investigaram o perfil da cromatina e proteínas associadas a genes supressores tumorais, e verificaram que, para TSGs conhecidos, o estado normal de expressão ativa inclui a presença de RNA polimerase II (Pol II) e ausência da marca de histona H3K27me3 (tri-metilação da lisina 27 da histona H3). Em câncer, foi observado que TSGs importantes possuem metilação de ilhas CpG na região promotora, além de ausência de Pol II e presença da marca de histona H3K27me3, eventos associados ao silenciamento gênico.

A grande quantidade de transcritos não-codificadores de proteínas presente na célula humana é uma enigmática evidência que vem sendo discutida na comunidade científica, através de estudos com importantes informações biológicas. O papel desses *non-coding* RNAs (ncRNA) é alvo de intensa investigação, pois

estima-se que aproximadamente 70-98% do genoma é responsável por produzir transcritos não-codificadores de proteínas, o que sugere uma função apreciável, já que envolve grande gasto energético (Taft *et al.*, 2007; Morris 2009; Morris 2011; Gomes et al., 2013).

lncRNAs (*long non-coding RNAs*) estão presentes de forma abundante no genoma de organismos complexos, desempenhando uma grande variedade de papéis regulatórios em praticamente todos os estágios da expressão gênica, combinando-se de formas distintas, de modo a participarem de uma rede regulatória epigenética, porém uma parcela ainda muito pequena desses transcritos foi completamente caracterizada (Mercer e Mattick, 2013; Li et al., 2014; Walsh et al., 2014).

Estudos sobre como lncRNAs podem atuar regulando a expressão gênica iniciaram-se utilizando ensaios com siRNAs (*small interfering RNA*) direcionados a promotores de genes humanos. lncRNAs são transcritos não-codificadores de proteínas maiores do que 200 nucleotídeos, e desempenham funções como reguladores da expressão gênica de algumas maneiras distintas: afetando a metilação do DNA, a partir da interação com DNA metiltransferases, guiando-as para o local de atuação; reposicionando nucleossomos, a partir da interação com complexos remodeladores de nucleossomos; recrutamento de enzimas, como as responsáveis pela modificação de histonas; envolvendo-se em mecanismos de ativação gênica (*enhancer*); interagindo diretamente com a cromatina; influenciando o processamento de pre-mRNAs e a organização nuclear, envolvendo-se também em processos patológicos (Figura 1) (Rinn e Chang, 2012; Singh e Prasanth, 2013; Beckedorff et al., 2013b; Maass et al., 2014; Backofen e Vogel, 2014).

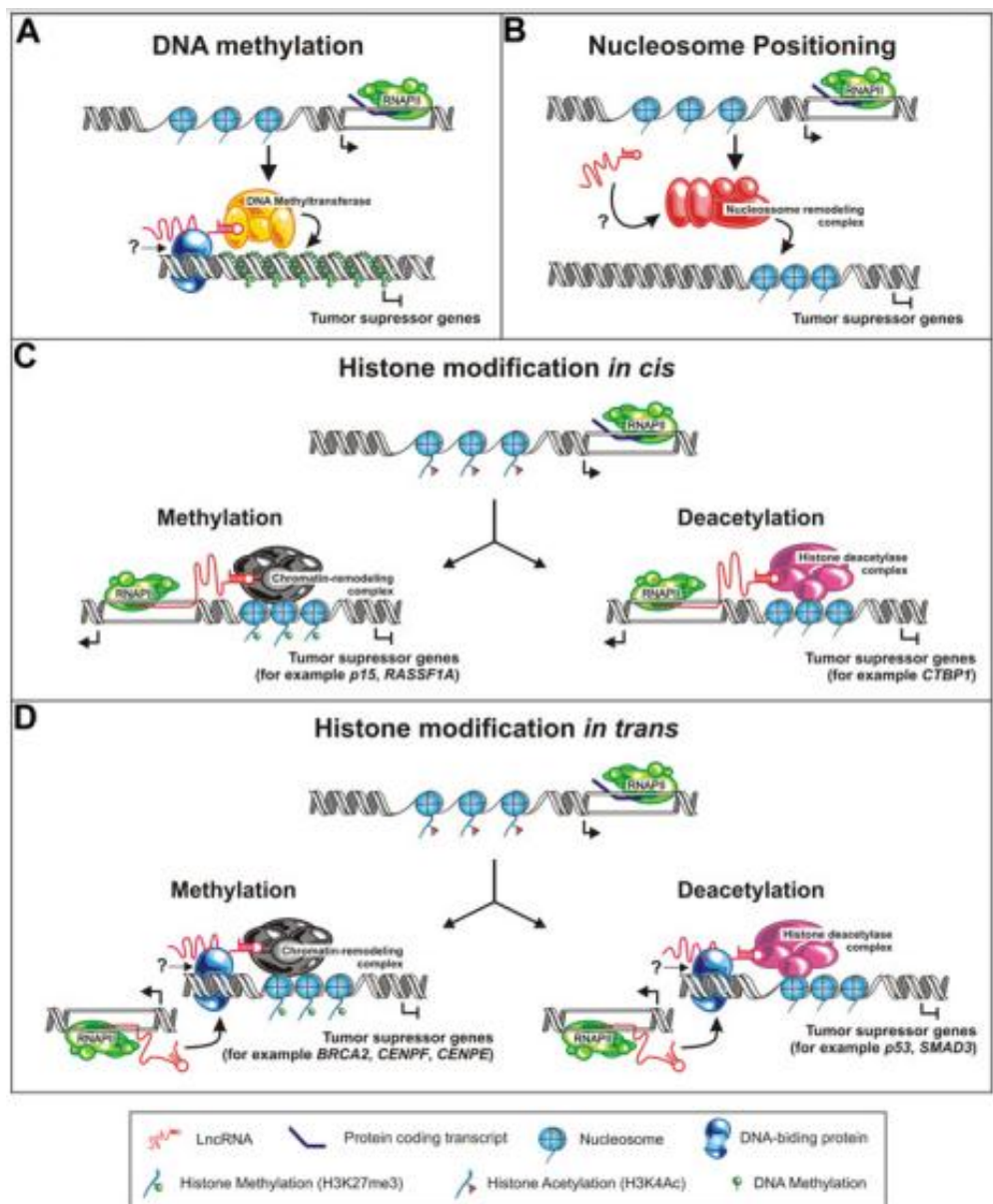


Figura 1. Interação dos lncRNAs com mecanismos epigenéticos em câncer. A: lncRNA afetando a metilação de DNA. Neste modelo, um lncRNA (vermelho) interage com DNA metiltransferase e guia essa proteína a alvos específicos, levando à metilação de promotores e repressão de genes supressores tumorais. Uma proteína ligante de DNA (azul escuro) pode mediar a interação do lncRNA com sítios específicos do DNA. B: lncRNA mudando a posição de nucleossomo. Um lncRNA pode interagir com um complexo remodelador de nucleossomo, levando à reestruturação ou deslocamento do nucleossomo em regiões genômicas específicas. Um aumento do empacotamento da cromatina pelos nucleossomos em determinada região contendo um gene supressor tumoral pode levá-lo à repressão transcricional. C: lncRNA atuando em regulação *cis*. Neste modelo, uma RNAPII transcreve um lncRNA (vermelho) que pode permanecer ligado a seu sítio transcricional e recrutar uma enzima modificadora de histona (HME). Esta HME pode levar à metilação (esquerda, círculos verdes pequenos) ou à desacetilação (direita) das histonas e o subsequente silenciamento de genes supressores tumorais. D: lncRNA atuando em regulação *trans*. Neste modelo, um lncRNA (vermelho) transcrito de um locus recruta uma HME para um locus diferente, distante. Esta HME pode levar à metilação (esquerda, círculos verdes pequenos) ou à desacetilação (direita) de histonas e o subsequente silenciamento de genes supressores tumorais. (Retirada de Beckedorff et al., 2013b).

RdDM (*RNA-directed DNA methylation*) é um mecanismo que envolve a ação de RNAs não-codificadores, definindo-se como um guia para a regulação epigenética, sendo descrito primeiramente em plantas. O silenciamento ou ativação gênica em células humanas regulados por processos de RdDM através lncRNAs antissense ocorre quando o transcrito não-codificador forma estruturas secundárias e interage com diversas proteínas, formando um complexo. Este complexo é dirigido ao locus de homologia no genoma, onde modificações químicas de histona e metilação de DNA devem ocorrer; desta forma, o perfil epigenético que caracteriza expressão ou silenciamento gênico da região-alvo é definido através da atuação das proteínas presentes no complexo (Aufsatz *et al.*, 2002; Morris 2009; Mahfouz 2010; Morris 2011; Liu *et al.*, 2011; Lorković *et al.*, 2012).

Conhecimentos aprimorados sobre o estabelecimento e progressão do câncer, eventos genéticos e epigenéticos que envolvem esse processo dinâmico e que o caracterizam como tal, formam a base para o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais promissores e de detecção precoce. Em adição, a análise genética pode ser empregada na predição dos riscos de ocorrência de neoplasias e, no caso de tumor já estabelecido, a previsão de resposta ao tratamento. A viabilidade da manipulação dos mecanismos epigenéticos também tem sido investigada, sendo uma possibilidade auspiciosa de ação terapêutica (Strathdee e Brown, 2002; Dawson e Kouzarides, 2012).

1.3. Alterações epigenéticas no cromossomo 3p em neoplasias

A perda de heterozigose (LOH) é um evento frequentemente observado em vários tipos de câncer, inclusive carcinomas mamários. O braço curto do cromossomo 3 humano, alvo de LOH, é uma região de importância singular, já que

estudos relataram a presença de atividade supressora tumoral neste local. Em vários casos, a LOH é identificada como um evento pré-neoplásico, aumentando em frequência com a progressão tumoral e, ocasionalmente, está relacionada à características clínico-patológicas específicas. A caracterização de diversos genes supressores de tumor no braço curto do cromossomo 3 demonstrou o papel relevante do silenciamento anormal desta região no processo de carcinogênese (Braga *et al.*, 1999; Burbee *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002; de Oliveira *et al.*, 2012).

Os ensaios de LOH utilizando marcadores do tipo microssatélites são considerados um método eficiente para se identificar e localizar novos genes supressores tumorais. Técnicas baseadas na análise genômica baseada em *microarrays* também foram abordadas neste tipo de estudo em câncer de pulmão (Zabarovsky *et al.*, 2002).

Segundo o estudo realizado por Maitra e colaboradores (2001), as perdas alélicas que ocorrem na região 3p em câncer de mama é um processo heterogêneo, pois em algumas regiões este evento é mais frequente que em outras. A partir da utilização de vários marcadores microssatélites mapeados em intervalos constantes no braço curto do cromossomo 3, o delineamento de regiões como intervalos mínimos de deleções (3p22-24, 3p21.3, 3p21.2-21.3, 3p14.3 e 3p12) permitiu a localização de genes com atividades supressoras tumorais. A região 3p21.3 foi a que apresentou maior frequência de LOH, local este em que está mapeado o gene *RASSF1* (Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1). Um dos produtos deste gene é uma proteína com domínio de associação a proteínas Ras (p21^{ras}), com funções relacionadas ao controle do ciclo celular, transdução de sinal, apoptose e morte celular, sendo considerado um regulador negativo do ciclo (Ji *et al.*, 2005).

Um estudo envolvendo análises de tumores de mama hereditários por hibridização comparativa de microarranjos de sondas de DNA (*High Resolution Tiling-path BAC Array-Comparative Genomic Hybridization* ou CGH-array) demonstrou a deleção de diversos *loci* contendo genes frequentemente relacionados ao silenciamento genômico, por hipermetilação, em vários tipos de câncer, ou seja, possíveis genes supressores tumorais. A região 3p21 foi identificada como deletada em 10% dos tumores de mama analisados (Alvarez et al., 2013).

O grupo de Hoebeeck e colaboradores (2006) também se utilizaram das análises por CGH-array, analisando as regiões de perdas de 3p21-p22 em linhagens derivadas de neuroblastomas e outros tipos tumorais, incluindo linhagens derivadas de carcinomas mamários. O grupo identificou três regiões mínimas de deleção, denominadas SROs (*shortest region of overlap*). Foi detectado que as regiões mais frequentes de LOH relatadas em carcinomas de pulmão e de mama coincidem com as duas regiões de SRO contidas em 3p21.3, sugerindo que possíveis genes supressores críticos para o desenvolvimento do câncer podem ser comuns a diferentes tipos tumorais. A SRO1 é mapeada em 3p21.31-p21.2, possui 3,6Mb e inclui o gene *RASSF1*, além de outros 86 genes.

I.4. O gene *RASSF1*

O gene *RASSF1*, bem como outros localizados na região 3p21.3, tem sido associado à inativação por silenciamento da expressão gênica através da metilação de ilha CpG. Segundo dados da literatura, o gene *RASSF1* é responsável por codificar sete transcritos, através de regiões promotoras distintas e *splicing* alternativo (Figura 2). Esses produtos gênicos desempenham funções diferentes, podendo ser tecido-específicas ou até mesmo célula-específicas. Bancos de dados

públicos atuais têm predito novos transcritos variantes para o gene *RASSF1*, além dos sete produtos já descritos na literatura (Bar-Sagi e Feramisco, 1985; Ji *et al.*, 2005; Hesson *et al.*, 2007; Reeves *et al.*, 2010). Em adição, o gene *RASSF1* possui duas ilhas CpG, incluindo as regiões promotoras e dois primeiros éxons (di Goia *et al.*, 2006). Alguns produtos de *RASSF1* são melhores caracterizados que outros, e estudos sobre a expressão desse gene mostraram que proteínas codificadas por ele, juntamente com outras moléculas efetoras, são responsáveis por mediar atividades opostas, tanto supressoras tumorais como oncogênicas (van der Weyden e Adams, 2007; Volodko *et al.*, 2014).

A variante *RASSF1A* é responsável pela produção de um transcrito e subsequente tradução deste em uma cadeia polipeptídica de 340 aminoácidos, tem sido relacionada a atividades supressoras tumorais e é frequentemente silenciada em vários tipos de câncer, confirmando sua importante função. A expressão exógena dessa variante demonstrou diminuição no crescimento de colônias celulares *in vitro*, além de diminuir, de forma relevante, a progressão tumoral *in vivo*. Além de *RASSF1A*, a outra principal variante relacionada a neoplasias, porém, pouco estudada em carcinomas mamários, é *RASSF1C* (Figura 2). Esta, por sua vez, codifica uma cadeia polipeptídica de 270 aminoácidos, sendo muito parecida estruturalmente com *RASSF1A*, exceto por não possuir um domínio de ligação amino-terminal diacil glicerol (domínio C1), presente na primeira (Burbee *et al.*, 2001; Reeves, 2010).

Diferente da função de *RASSF1A*, *RASSF1C* tem sido associada a atividades oncogênicas: foi detectado que células tumorais apresentam elevada expressão de *RASSF1C*, enquanto que *RASSF1A* é silenciada, na maioria das vezes. A utilização de pequenos RNAs de interferência específicos para *RASSF1C* (em células tumorais de pulmão que expressam apenas essa isoforma, e não *RASSF1A*),

provocou uma diminuição da concentração de mRNA de *RASSF1C*, o que resultou num grande decréscimo na proliferação celular, evidenciando sua participação na progressão tumoral (Amaar *et al.*, 2006).

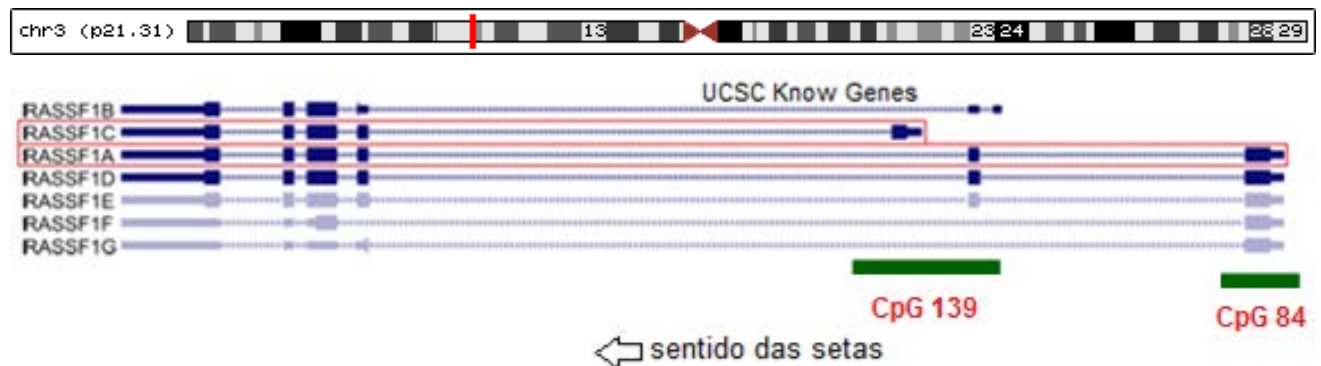


Figura 2. Representação do cromossomo 3 e a localização do gene *RASSF1*. Em azul observamos os sete transcritos variantes de *RASSF1*, e em verde as ilhas CpG 84 e 139, nas regiões promotoras dos transcritos mencionados (UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu/>).

Enquanto *RASSF1A* tem sido extensivamente estudada, encontram-se poucas referências de *RASSF1C* na literatura especializada (Figura 3), e a quantidade de informações fica ainda menor quando é investigado o perfil de metilação da região promotora associada a esse transcrito (Tabela 1).

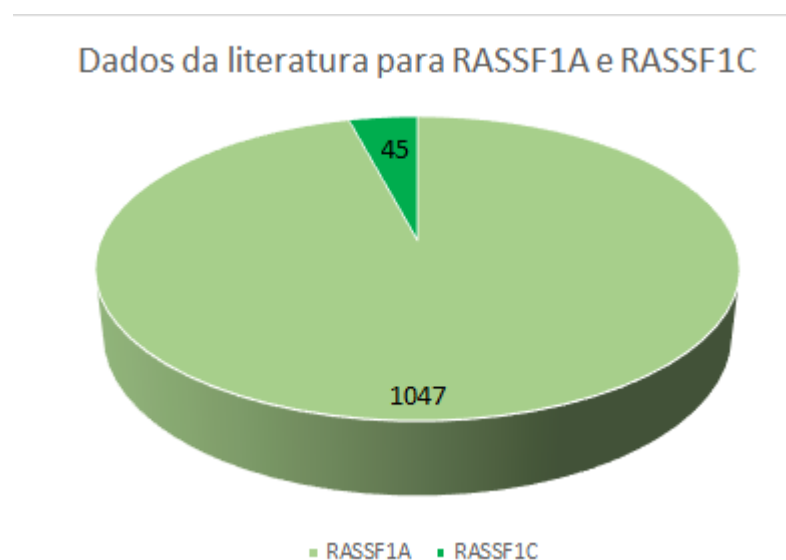


Figura 3. Número de artigos científicos envolvendo os transcritos *RASSF1A* e *RASSF1C* encontrados no banco de dados PubMed (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, acesso em 09/2014).

Tabela 1. Estudos sobre a variante *RASSF1C* em câncer disponíveis na literatura científica.

	Amostragem	Resumo geral	Referência
Análise de metilação de <i>RASSF1C</i>	Tumor pancreático endócrino	<i>RASSF1A</i> está expresso tanto em PET quanto em tecido normal de pâncreas, e os níveis são inversamente proporcionais à quantidade de metilação. <i>RASSF1C</i> superexpresso em PET, sua ilha CpG não está metilada em nenhuma amostra. (Pirosequenciamento dos 37 CpG's na ilha CpG C).	Malpeli et al., 2011.
	Câncer colorretal	Padrão de metilação da ilha CpG no promotor de 31 genes (inclusive <i>RASSF1C</i>) em câncer colorretal. Não foi detectada metilação de <i>RASSF1C</i> .	Xu et al., 2004.
	Astrocitoma	Padrão de metilação da ilha CpG no promotor de 34 genes (inclusive <i>RASSF1C</i>) em astrocitoma. Não foi detectada metilação de <i>RASSF1C</i> em nenhuma amostra.	Yu et al., 2004.
	Carcinoma nasofaríngeo	Análise de expressão e metilação de <i>RASSF1A/C</i> e mais 7 genes nesta região. Não foi detectada metilação de <i>RASSF1C</i> .	Chow et al., 2004.
	Carcinoma de células hepáticas	Não foi detectada metilação de <i>RASSF1C</i> em nenhuma amostra (0/33 amostras).	Yu et al., 2002.
	Carcinoma de pulmão e HeLa	Análise de metilação de <i>RASSF1A</i> e <i>RASSF1C</i> . Não foi encontrada metilação de <i>RASSF1C</i> em nenhuma amostra.	Dammann et al., 2001.
	Câncer de pulmão e de mama	Análise de expressão de <i>RASSF1A/C</i> . Análise do status de metilação de <i>RASSF1A/C</i> . Não foi encontrada metilação de <i>RASSF1C</i> em nenhuma amostra (8 linhagens de câncer de pulmão).	Burbee et al., 2001.
Estudos gerais sobre <i>RASSF1C</i>	Câncer de pulmão	<i>RASSF1C</i> aumenta a expressão de piwil1. IGFBP-5 pode ser um modulador negativo das funções proliferativas de <i>RASSF1C/PIWIL1</i> .	Reeves et al., 2014.
	Câncer de pulmão	Super-expressão e silenciamento (siRNA) de <i>RASSF1C</i> , utilização de plataforma de microarray para identificar genes alvo de <i>RASSF1C</i> .	Reeves et al., 2012.
	Tecido embrionário de rim, rim, carcinoma de pulmão.	Interação de <i>RASSF1A</i> e <i>RASSF1C</i> com <i>MST1</i> e <i>MST2</i> (quinases) através do domínio SARAH.	Dittfeld et al., 2012.
	Câncer de ovário	O gene <i>CAS/CSE1L</i> associado à susceptibilidade à apoptose protege da morte as células cancerosas de ovário através da supressão de	Lorenzato et al., 2012.

Estudos gerais sobre RASSF1C		<i>RASSF1C</i> (mecanismo desconhecido).	
	Rim	Co-localização de <i>RASSF1A</i> , <i>RASSF1C</i> e <i>TFPI-2</i> por microscopia confocal e coimunoprecipitação.	Chen et al., 2012.
	Câncer de mama	Investigação de mudanças epigenéticas na região de <i>RASSF1</i> .	Prando et al., 2011.
	Célula embrionária de rim, HeLa, U2OS.	Mecanismo molecular de regulação de <i>RASSF1C</i> por poliubiquitilação e degradação proteossômica. Gene Mule controla a poliubiquitilação e degradação de <i>RASSF1C</i> em condições normais, enquanto Mule e <i>SCF B-TrCP</i> são responsáveis pela degradação proteossômica de <i>RASSF1C</i> em resposta a irradiação UV.	Zhou et al., 2012.
	<i>Escherichia coli</i>	Caracterização da <i>DAXX</i> e interação com <i>RASSF1C</i> (trata <i>RASSF1C</i> como supressor tumoral).	Escobar-Cabrera et al., 2010.
	Câncer de mama (Hs578T, MDA-231 e T47D) Epitélio mamário AG1132B.	Silenciamento e super-expressão de <i>RASSF1C</i> . Microarray utilizando células T47D para identificar genes alvo de <i>RASSF1C</i> .	Reeves et al., 2010.
	Câncer de pulmão e câncer renal	Investigação de <i>HYAL1</i> e <i>HYAL2</i> .	Wang et al., 2008.
	-	Revisão geral sobre a família <i>RASSF</i> e o papel de cada membro na tumorigênese humana.	van der Weyden e Adams, 2007.
	<i>Escherichia coli</i>	Caracterização de uma proteína (Hampin) que atua em conjunto com a histona acetiltransferase <i>MYST1/MOF</i> . (Trata <i>RASSF1C</i> como supressor tumoral)	Dmitriev et al., 2007.
	Cos-7, carcinoma de pulmão, HeLa	Transporte de proteínas <i>RASSF</i> a compartimentos sub-celulares.	Kumari et al., 2007.
	HeLa	Interação de <i>RASSF1C</i> com <i>BTrCP</i> e acúmulo de B-catenina por conta de super-expressão de <i>RASSF1C</i> devido à inibição de sua degradação	Estrabaud et al., 2007.

Estudos gerais sobre RASSF1C		através de <i>BTrCP</i> . (Sugestão de participação de <i>RASSF1C</i> na tumorigênese).	
	Câncer de pulmão	Silenciamento de <i>RASSF1C</i> diminui a proliferação celular em câncer de pulmão, enquanto a super-expressão aumenta.	Amaar et al., 2006.
	HeLa e Cos-7	Sugestão de mecanismo pelo qual o complexo <i>RASSF1C-Daxx</i> atua na via de sinalização <i>SAPK/JNK</i> .	Kitagawa et al., 2006.
	Osteossarcoma	Caracterização da isoforma <i>RASSF1C</i> como participante que interage com <i>IGFBP-5</i> .	Amaar et al, 2005.
	Câncer de ovário	Análise de expressão de <i>RASSF1A</i> e <i>RASSF1C</i> . <i>RASSF1C</i> foi detectado em quase todas as amostras.	Ma et al., 2005.
	Bactéria	<i>RASSF1A</i> é responsável por hiper-estabilizar microtúbulos e acúmulo de <i>C19ORF5</i> .	Liu et al., 2005.
	-	Revisão de <i>RASSF1A</i> .	Dammann et al., 2005.
	Ratos	Ratos knockout para <i>RASSF1A</i> com maior propensão a desenvolvimento de tumor.	Tommasi et al., 2005.
	Câncer de mama (MCF7), carcinoma de colo, de pulmão, tecido de rim (embrionário), fibroblasto embrionário de rato.	Proposta de mecanismo da ação de <i>RASSF1A</i> nos microtúbulos e indução da parada do ciclo celular.	Rong et al., 2004.
	Carcinoma de pulmão, carcinoma renal, linhagem de próstata	<i>RASSF1C</i> induz a parada do ciclo celular em células de próstata e carcinoma renal. Não é detectada a expressão de <i>RASSF1C</i> na linhagem <i>KRC/Y</i> de carcinoma renal.	Li et al., 2004.
	Cos-7, tecido de rim humano (embrionário), câncer de pulmão	<i>RASSF1A/C</i> associam-se aos microtúbulos e os estabilizam, porém <i>RASSF1C</i> é menos eficiente que <i>RASSF1A</i> . Uma mutação de ponto em <i>RASSF1C</i> constitui um defeito grave na estabilização da tubulina, que torna-se incapaz de bloquear a desestabilização dos efeitos de Ras. (Eram conhecidos apenas 2	Vos et al., 2004.

Estudos gerais sobre RASSF1C		transcritos de <i>RASSF</i> : A e C).	
	Rim (embrionário)	Descrição da interação e possível função de <i>RASSF1</i> e <i>PMCA4b</i> (Plasma membrane calmodulin-dependent calcium ATPase 4b).	Armesilla et al., 2004.
	Rim (embrionário)	Proposta de mecanismo pelo qual <i>NORE1/RASSF1</i> direciona MST1 aos sítios de ativação e talvez co-localização com substratos endógenos. (<i>NORE1/RASSF1</i> mantém a baixa atividade de MST1 in vivo).	Praskova et al., 2004.
	Tecido de rim humano (embrionário) e câncer de colo.	A proteína "scaffold" CNK1 se liga ao complexo <i>RASSF1A-MST</i> , participando na sinalização pró-apoptótica iniciada pela proteína Ras ativa.	Rabizadeh et al, 2004.
	Carcinoma de pulmão e melanoma.	Nore1 se liga à Ras e tem sequência de aminoácidos muito parecida com a sequência de <i>RASSF1</i> . Também tem atividade supressora em algumas linhagens tumorais.	Aoyama et al., 2004.
	Carcinoma de pulmão.	<i>RASSF1A/B/C</i> tem expressão detectada em tecidos normais, mas em tecido tumoral verifica-se uma alta taxa de perda de expressão de <i>RASSF1A</i> e B. <i>RASSF1C</i> é detectado em todos os tecidos tumorais.	Shao et al., 2003.
	Câncer de pulmão.	Expressão de <i>RASSF1A</i> (e <i>RASSF1C</i>) em câncer de pulmão. Não foi detectada a expressão de <i>RASSF1A</i> em 12 de 20 linhagens. Em linhagens que expressavam <i>RASSF1A</i> foram detectados 2 polimorfismos no transcrito.	Endoh et al., 2003.
	Osteossarcoma	Análise de expressão de <i>RASSF1A/B/C</i> . <i>RASSF1C</i> estava sendo expresso em todas as amostras e não foi alterado após tratamento com agente desmetilante.	Lim et al., 2003.
	Carcinoma de células hepáticas	Análise de metilação de <i>RASSF1A</i> e p16.	Zhang et al., 2002.
	Melanoma e câncer de pulmão	Identificação de 2 formas alternativas (por splicing) de Nore1 e um terceiro membro da família <i>RASSF</i> (<i>RASSF3</i>). Análise de metilação de	Tommasi et al., 2002.

Estudos gerais sobre RASSF1C		<i>NORE 1B</i> .	
	Cos-7	<i>RASSF1C</i> tem menor capacidade de homo ou heterodimerização com <i>Nore1</i> .	Ortiz-Vega et al., 2002.
	Adenocarcinoma gástrico	Análise de expressão de <i>RASSF1A/B/C</i> . <i>RASSF1C</i> teve expressão detectada em todas as amostras.	Byun et al., 2001.
	Carcinoma de bexiga e próstata	Análise de expressão de <i>RASSF1A/B/C</i> . <i>RASSF1C</i> teve expressão detectada em todas as amostras.	Lee et al., 2001.
	Carcinoma renal	As unidades transcricionais das ilhas CpG que coincidem com o exon 1α de <i>RASSF1A</i> e exon 2γ de <i>RASSF1C</i> tem tamanhos e conteúdos de GC similares. No entanto, ao contrário de <i>RASSF1A</i> , a ilha de <i>RASSF1C</i> nunca está metilada em tumores primários renais (mesmo conjunto de amostras que foi utilizado para o estudo de <i>RASSF1A</i>) – Dado não foi mostrado no trabalho.	Koen et al., 2001.
	Carcinoma de ovário	<i>RASSF1C</i> é down-regulado em carcinoma de ovário (deleção da região, mutação, inativação), mas não em câncer de pulmão. (Eram conhecidos apenas 3 transcritos de <i>RASSF1</i> – A, B, C).	Vos et al., 2000.

Um estudo realizado recentemente por nosso grupo (Prando et al., 2011) propôs a investigação da regulação epigenética do gene *RASSF1* e mais nove genes contíguos que o flanqueiam (*SEMA3B*, *HYAL1*, *HYAL2*, *HYAL3*, *TUSC2*, *ZMYND10*, *TUSC4*, *TMEM115* e *CACNA2D2*), demonstrando a modulação da expressão dos mesmos em linhagens de carcinoma mamário. Como resultados deste estudo, foi possível observar que nas linhagens derivadas de carcinomas mamários, o silenciamento da isoforma *RASSF1A* é um evento frequente, enquanto o transcrito *RASSF1C* é expresso em todas as linhagens. Adicionalmente, foi notada uma diferença nos níveis de expressão de *RASSF1C* entre linhagens celulares

derivadas de epitélio normal e linhagens celulares carcinogênicas, sendo maiores no segundo tipo celular. A isoforma *RASSF1C* é relatada por reduzir a sensibilidade das células cancerosas mamárias à apoptose e, a partir de outros estudos que investigaram a atividade favorável desta isoforma ao progresso neoplásico, foi possível concluir que *RASSF1C* pode efetivamente exercer função oposta à *RASSF1A*, evidenciando seu papel oncogênico, estimulante da proliferação e invasão em carcinomas mamários (van der Weyden e Adams, 2007; Estrabaud *et al.*, 2007; Reeves *et al.*, 2010).

Num estudo de investigação do perfil transcricional de mensagens intrônicas em câncer, utilizando como modelo tumores de próstata com diferentes graus de diferenciação, foram realizadas análises por plataforma de *cDNA microarray* com partes de transcritos mapeados em segmentos intrônicos de genes conhecidos. Foi detectado um lncRNA (*long non-coding RNA*) antissense de *RASSF1*, que tem a expressão diminuída quanto menor o grau de diferenciação das células tumorais (Reis *et al.*, 2004). Entretanto, esse estudo inicial não investigou se haveria alguma relação entre este transcrito antissense e as isoformas *RASSF1A* e *RASSF1C*.

Recentemente, Beckedorff e colaboradores (2013a) publicaram um trabalho propondo um mecanismo de regulação gênica de *RASSF1A* por um RNA não-codificador longo (lncRNA) intrônico *unspliced*, transcrito na fita oposta do gene *RASSF1* (diferente do lncRNA detectado por Reis e colaboradores em 2004) que se liga ao complexo repressivo *polycomb* (PRC2) (Figuras 4 e 5). O RNA foi caracterizado e identificado pelo grupo como *ANRASSF1*, que é transcrito pela RNA polimerase do tipo II, possui estrutura cap 5' e cauda poli-A, localiza-se no núcleo e possui um tempo de meia-vida em torno de 4 vezes menor do que os demais lncRNAs que se ligam à PRC2. Segundo os autores, a superexpressão ectópica de *ANRASSF1* reduziu os níveis de *RASSF1A* e aumentou a taxa de proliferação em

células HeLa, enquanto seu silenciamento provocou efeito contrário. Porém, as mudanças nos níveis de *ANRASSF1* não produziram alteração na abundância de *RASSF1C* em nenhuma condição. O grupo propõe um novo mecanismo de repressão epigenética do supressor tumoral *RASSF1A*, envolvendo este lncRNA antissense, onde *ANRASSF1* reprime seletivamente a expressão do transcrito de *RASSF1* que sobrepõe a região antissense de modo local e específico (Figura 4).

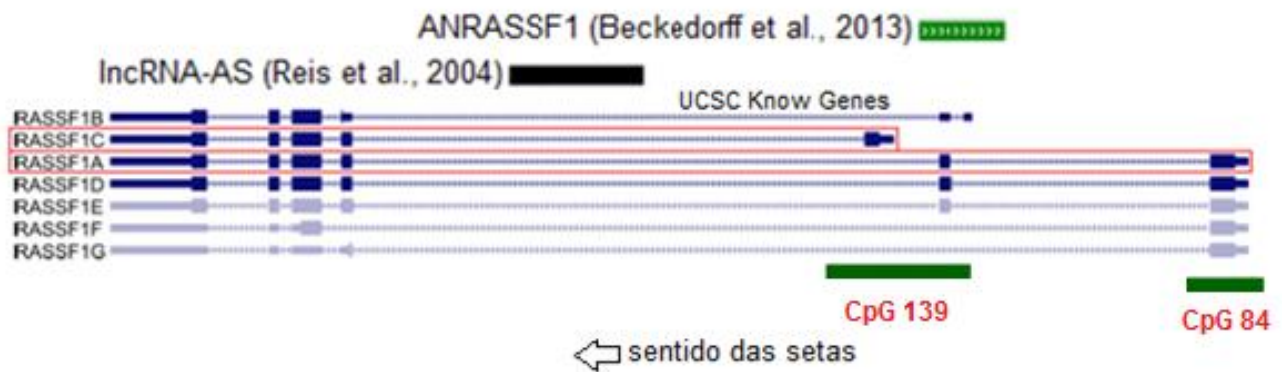


Figura 4. Representação das variantes transcricionais do gene *RASSF1*, as duas ilhas CpG a ele pertencentes e os dois transcritos antissense descritos na literatura. Em azul, observam-se os sete transcritos variantes de *RASSF1* (*RASSF1A* e *RASSF1C* circundados em vermelho); em verde opaco, as ilhas CpG 139 e 84; em preto, o RNA longo não codificador identificado por Reis e colaboradores; em verde com setas brancas, o RNA longo não codificador identificado por Beckedorff e colaboradores.

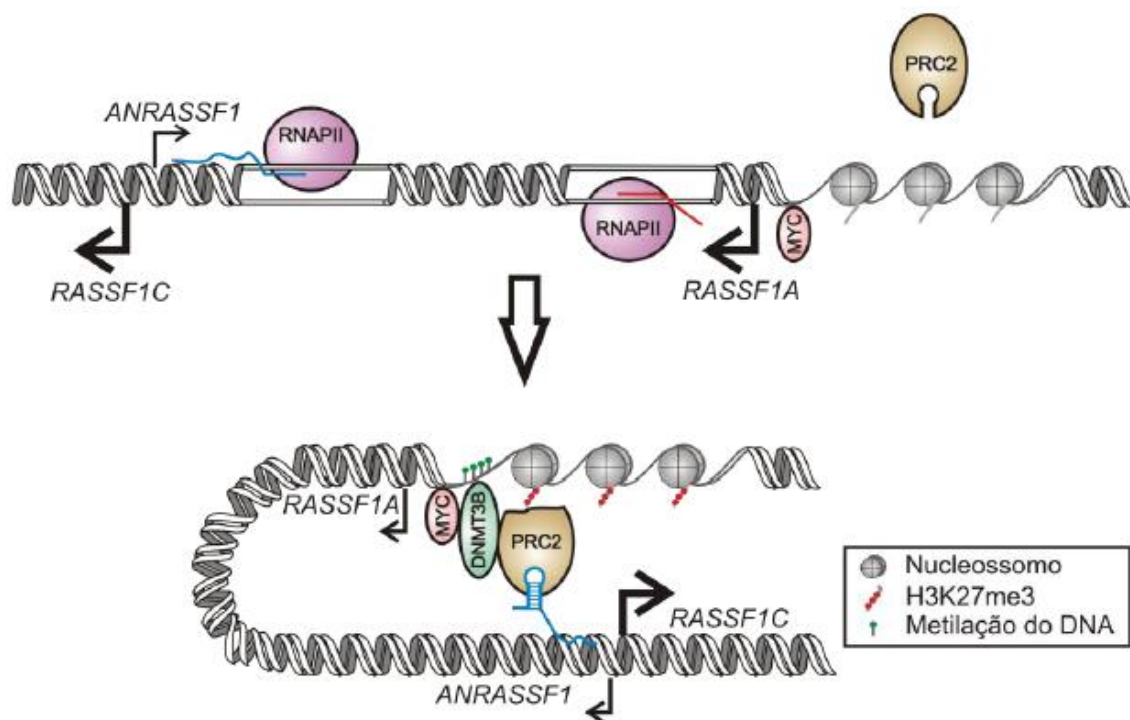


Figura 5. Representação do mecanismo proposto para a inativação epigenética de *RASSF1A*, através da ação do lncRNA *ANRASSF1*. O lncRNA *ANRASSF1* (linha azul) interage com DNA genômico no sítio transcricional, formando um híbrido DNA/RNA, e recruta o complexo remodelador de cromatina PRC2 para a região promotora do gene *RASSF1A*. O recrutamento do complexo PRC2 resulta na modificação seletiva do padrão de metilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27) (círculos vermelhos) no promotor de *RASSF1A*, levando à redução específica da atividade transcricional de *RASSF1A*, sem apresentar efeito na transcrição de *RASSF1C* (Retirado de Beckedorff et al., 2013a).

Considerando-se o que *long non-coding* RNA derivado do gene *RASSF1* foi previamente associado a parâmetros prognósticos em carcinomas prostáticos (Reis et al., 2004) e que esse transcrito antissense foi recentemente implicado no silenciamento epigenético do transcrito alternativo *RASSF1A* (Beckdorff et al., 2013b), propomos este estudo para investigar a possível associação da metilação das ilhas CpGs dos promotores alternativos do gene *RASSF1* com parâmetros clínico e histopatológicos em carcinomas mamários esporádicos, bem como testar a hipótese de que o padrão de metilação dessas ilhas e os níveis de expressão dos transcritos *RASSF1A* e *RASSF1C* depende dos níveis de expressão desse *long non-coding* RNA (*ANRASSF1*) em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários.

OBJETIVOS

II. 1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo a investigação da metilação do DNA em regiões promotoras alternativas do gene *RASSF1* em carcinomas mamários primários humanos, bem como da relação entre a metilação dessas regiões e os níveis de expressão dos transcritos *RASSF1A*, *RASSF1C* e *non-coding* RNA antissense *ANRASSF1* em linhagens celulares derivadas de tecidos mamários normais ou tumorais.

II. 2. Objetivos específicos

- Determinar o padrão de metilação das ilhas CpG 84 e 139, localizadas nas regiões promotoras associadas aos transcritos variantes *RASSF1A* e *RASSF1C*, respectivamente, em amostras de carcinomas mamários e em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários;
- Investigar possíveis correlações entre características clínicas e histopatológicas e a presença e ausência de metilação em amostras obtidas de pacientes com carcinoma mamário;
- Analisar os níveis de expressão dos transcritos alternativos *RASSF1A* e *RASSF1C* nas linhagens celulares;
- Detectar e correlacionar a expressão do transcrito intrônico antissense *ANRASSF1* com os níveis de expressão dos transcritos codificadores nas linhagens celulares.

MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Amostras biológicas

Carcinomas mamários primários e amostras de tecido mamário de pacientes sem câncer

Para o presente estudo, foram utilizadas 84 amostras de tumores primários provenientes de 84 pacientes diagnosticadas com câncer de mama, isentas de tratamento quimio e/ou radioterápico neoadjuvante (Apêndice I). As amostras teciduais foram coletadas cirurgicamente em colaboração com o Dr. José Roberto Fígaro Caldeira, do Departamento de Mastologia do Hospital Amaral Carvalho de Jaú-SP. Todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e os procedimentos foram realizados com aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Amaral Carvalho.

Imediatamente após a cirurgia, as amostras de tecido tumoral foram congeladas a -80°C e, posteriormente, macrodissecadas, na tentativa de se obter pelo menos 80% de tecido tumoral. Todas as amostras foram avaliadas histopatologicamente junto ao Serviço de Patologia do Hospital Amaral Carvalho, e os respectivos prontuários médicos das pacientes foram consultados para se obter os dados clínicos e histopatológicos (idade, estadiamento clínico, tamanho do tumor, envolvimento de linfonodos axilares, ocorrência de metástases, diagnóstico histopatológico e grau tumoral). Os dados da análise imunoistoquímica para a detecção das proteínas: receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PgR), Her-2, p53 e Ki-67 foram obtidos em estudos prévios do grupo conforme descrito em Caldeira et al., 2006. O diagnóstico histopatológico foi estabelecido de acordo com a WHO *International Classification of Disease for Oncology* (1990) e o

estadiamento clínico foi determinado pelo *TNM Staging System*. As pacientes foram acompanhadas periodicamente pelo oncologista responsável, sendo o tempo médio de seguimento clínico pós-cirúrgico igual a 89,2 meses, variando de 6 a 153 meses.

Além das amostras supracitadas, foram incluídas sete amostras como referência de tecido mamário normal, provenientes de pacientes jovens submetidas à cirurgia estética da mama e sem histórico de câncer de mama na família. As amostras foram obtidas junto ao Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários

Foram selecionadas três linhagens de células epiteliais não tumorigênicas: duas estabelecidas a partir do tecido mamário normal (184A1 e 184B5) e uma linhagem epitelial derivada de doença fibrocística da mama (MCF10A) bem como dezessete linhagens de células epiteliais derivadas de carcinomas mamários (BT-474, BT-483, MCF7, MDA-MB-134-IV, MDA-MB-361, MDA-MB-415, MDA-MB-453, SK-BR-3, T47D, ZR-75-1, ZR-75-30, BT-20, MDA-MB-468, BT-549, Hs 578T, MDA-MB-231, MDA-MB-436). Essas linhagens são parte da coleção do *Lombardi Comprehensive Cancer Center, Georgetown University Medical Center, Washington, USA* e foram cedidas pela colaboração estabelecida com a Dra. Luciane R. Cavalli.

III.2. Análise do padrão de metilação das ilhas CpG do gene *RASSF1*

O padrão de metilação das ilhas CpG 84 e 139, localizadas em regiões promotoras alternativas do gene *RASSF1* e associadas aos transcritos *RASSF1A* e *RASSF1C*, respectivamente, foi investigado em amostras de tumor primário, amostras de tecido mamário normal e nas linhagens celulares derivadas de carcinoma de mama.

A extração do DNA foi conduzida segundo protocolo padronizado baseado na digestão com proteinase K (concentração final de 10µg/mL) em 200µL de tampão de extração contendo 100mM de Tris-HCl pH 8.0, 50mM de EDTA e 75mM de NaCl e 20µL de SDS a 10%. Após a incubação a 37°C, o DNA foi purificado pela extração com solventes orgânicos (0,5mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) seguida do tratamento com clorofórmio/álcool isoamílico (24/1). Após a precipitação (acetato de amônio 7M e etanol absoluto gelado), o DNA obtido foi lavado em etanol 70%, seco e ressuspendido em água ultra pura estéril. A quantidade e a qualidade do DNA isolado foram avaliadas pela leitura em espectrofotômetro a 260/280nm.

Modificação do DNA pelo bissulfito de sódio

Foi utilizado um protocolo otimizado em nosso laboratório, segundo Paulin et al. (1998), com modificações: 1µg de DNA genômico foi desnaturado em um volume final de 18µL pela adição de 2µL de uma solução de NaOH 3M a 40°C por 15 minutos. Em seguida, foram adicionadas solução de uréia-bissulfito (6,24M de uréia/2M de metabissulfito de sódio) e 6µL de solução de hidroquinona a 10mM. Os tubos foram mantidos em termociclador e submetidos a 20 ciclos de 55°C durante 15 minutos, separados por um período de desnaturação a 95°C por 30 segundos. O DNA tratado foi purificado com o *kit Wizard DNA Clean-UP System* (Promega), segundo as recomendações do fabricante. A modificação foi concluída pela adição

de 5,0 μ L de NaOH a temperatura ambiente durante 10 minutos. A precipitação foi realizada pela adição de 75 μ L de acetato de amônio 5M, 350 μ L de etanol e 1,0 μ L de glicogênio (20 μ g/ μ L) (Invitrogen). O DNA modificado foi ressuspendido em 40 μ L de água ultra-pura estéril e armazenado a -80°C para posterior amplificação pela PCR.

Análise qualitativa da metilação do DNA pela metodologia de *Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction* (MS-PCR)

A modificação do DNA pelo bissulfito de sódio discrimina as citosinas metiladas das citosinas não metiladas, pois as primeiras são resistentes a este agente químico enquanto as últimas são convertidas em uracila. Dessa forma, para a análise de metilação do DNA, utiliza-se pares de *primers* específicos para as sequências metiladas e não metiladas. No presente estudo, também foi incluído um par de *primer* controle (C) (Tabela 2). Esse par de oligonucleotídeo amplifica um fragmento localizado próximo ao gene *RASSF1* e não contém dinucleotídeos CpG, ou seja, o produto da MS-PCR somente é obtido quando a conversão pelo bissulfito de sódio for completa.

A análise de MS-PCR da ilha CpG 84 baseou-se em ensaio publicado previamente (Di Gioia et al., 2006). Os pares de *primer* para a amplificação da região da ilha CpG 139 foram obtidos com o uso do programa *Methyl Primer Express 1.0* (Applied Biosystems) e padronizados neste estudo. Inicialmente, a sequência da região promotora de *RASSF1C* foi identificada em bancos de dados públicos (<http://genome.uscs.edu>). A sequência selecionada foi submetida à simulação de modificação por bissulfito de sódio utilizando o software *Methyl Primer Express 1.0* (Applied Biosystems), onde todas as citosinas foram substituídas por timinas para a sequência não metilada, enquanto apenas as citosinas não CpG foram substituídas por timinas para a mesma sequência para a detecção do alelo metilado. Em

seguida, o *software* construiu pares de *primers* adequados para a identificação individual de cada alelo (metilado ou não metilado), isoladamente.

Para a padronização da MS-PCR, inicialmente avaliou-se a eficiência e a especificidade dos pares de *primers* específicos para as sequências metilada e não-metilada utilizando-se como molde DNA hipermetilado (*CpG Methylated HeLa Genomic DNA*, New England) e DNA hipometilado (EpiTect Control DNA, unmethylated, Qiagen) disponíveis comercialmente, ambos previamente modificados pelo bissulfito de sódio (Apêndice III, Figura 2).

As reações foram preparadas separadamente em um volume final de 25µL, contendo 0,25 µM de cada *primer*, 200 µM de cada dNTP, 15 mM de Tris-HCl pH 8.0, 50 mM de KCl, 1 U de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) e 3 mM de MgCl₂. Os produtos amplificados foram visualizados após eletroforese em gel poliacrilamida a 6%, corados com nitrato de prata. Foram incluídos NTCs (*no template control*) para cada conjunto de amostras analisadas simultaneamente pela MS-PCR.

Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos utilizadas nas reações de MS-PCR

Região	Primers 5'-3'	Amplicon (pb)	Referência
RASSF1A (M)	CGGTTTTTTTAGTTTTTTTCGTCG (F) TAACTTTAAACGCTAACAAACGCGAA (R)	111	Di Gioia <i>et al.</i> (2006)
RASSF1A (U)	TGTGTGGTTTTTTTAGTTTTTTTGTG (F) CCCAACATAACCCAATTAAACCCA (R)	147	Di Gioia <i>et al.</i> (2006)
RASSF1C (M)	TTAATTATCGTTTCGGTCGC (F) CTAAATCCCGACGATCTACG (R)	113	
RASSF1C (U)	GTTAATTATTGTTTTGGTTGT (F) ACTAAATCCCAACAATCTACA (R)	115	
Control	GGGTTTTATAGTTTTTGTATTTAGGTT (F) AACTCAATAAACTCAAACCTCCCC (R)	120	Di Gioia <i>et al.</i> (2006)

III.3. Análise de expressão dos transcritos *RASSF1A* E *RASSF1C* em linhagens celulares

As amostras de RNA total utilizadas no presente estudo foram obtidas por Prando e colaboradores (2011), pelo uso do RNeasy Mini *Kit* (Qiagen), segundo as recomendações do fabricante. A integridade do RNA extraído foi avaliada no equipamento 2100 Bioanalyzer, utilizando-se o kit *RNA Nano Chips* (Agilent Technologies). Obteve-se o valor de integridade de RNA (*RNA Integrity Number*, RIN) para cada amostra, permitindo a estimativa da integridade por meio da análise do traçado eletroforético da amostra avaliada (Apêndice II, Figura 1). Uma alíquota contendo 1µg de RNA total foi submetida à purificação com DNase I (*amplification grade* –Invitrogen). O RNA purificado foi diretamente utilizado na síntese de cDNA pelo uso do *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). A reação foi conduzida num volume final de 20µL, contendo 1X RT-buffer, 4mM de dNTPs, *random primers*, 40 unidades de inibidor de ribonuclease *RNAseOut* (Invitrogen) e 50U de *MultiScribe Reverse Transcriptase*, segundo as recomendações do fabricante.

A quantificação dos níveis de expressão de *RASSF1A* e *RASSF1C* foi conduzida previamente no laboratório e baseou-se no sistema *TaqMan Gene Expression Assay* (Applied Biosystems), que são ensaios pré-desenhados constituídos por conjuntos de sonda e *primers* para cada transcrito alvo cuja expressão se deseja analisar. As reações de amplificação do cDNA foram realizadas em um volume final de 10µL, em duplicatas, contendo 1µL de cDNA diluído 20 vezes, 0,5µL do 20X *TaqMan Gene Expression Assay* (Hs00945257_m1 e Hs00200394_m1 para os transcritos *RASSF1A* e *RASSF1C*, respectivamente) e 5µL do reagente 2X *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas no *StepOne Real Time PCR System* (Applied Biosystems)

nas seguintes condições: 50°C por 2min (etapa de ativação da enzima *AmpErase*® *Uracil-N-glycosylase* (UNG) - um controle para eventuais contaminações com produto de DNA amplificado), 95°C por 10min (etapa de ativação da enzima Taq Gold DNA polimerase), 40 ciclos de 95°C por 15seg (etapa de desnaturação) e 60°C por 1min (etapa de anelamento dos *primers* e extensão do *molde*). O gene *GAPDH* foi selecionado como o melhor controle endógeno para a normalização dos níveis de expressão dos transcritos testados. Os valores de Ct obtidos pelo uso do *StepOne SDS Software v2.1* (Applied Biosystems) foram utilizados para a comparação dos níveis de expressão gênica pelo método de quantificação.

III.4. Detecção do transcrito antissense *ANRASSF1* em linhagens celulares

Etapas de purificação, transcrição reversa fita-específica e síntese de cDNA

Aproximadamente 1 µg de RNA foi submetido à digestão com DNase I *Amplification Grade* (Life Technologies) em uma reação contendo 20mM de Tris-HCl pH8,4; 50mM de KCl e 20mM de MgCl₂. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos. A ação da enzima foi interrompida pela adição de 1µL de EDTA 25mM e aquecimento a 65°C durante 15 minutos.

Para a síntese do cDNA fita-específico utilizou-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Life Technologies), segundo as recomendações do fabricante. Inicialmente, o experimento incluiu a utilização de quatro tubos contendo 250ng de RNA purificado cada: o primeiro contendo o *primer reverse* para a detecção do transcrito antissense; o segundo contendo o *primer forward* que detecta o transcrito *sense* não processado; o terceiro sem a adição da enzima *MultiScribe Reverse Transcriptase* para a detecção de eventual contaminação com DNA e o

tubo 4 sem adição de *primer* como controle para artefatos decorrentes de interações entre as moléculas de RNA. Para a detecção do controle endógeno *GAPDH*, utilizou-se cDNA obtido a partir de *primers* randômicos pelo uso do *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), conforme recomendações.

As reações de síntese de cDNA foram conduzidas num volume final de 20µL, contendo 1X RT-buffer, 4mM de dNTPs, 40 unidades de inibidor de ribonuclease *RNAseOut* (Invitrogen) e 50U de *MultiScribe Reverse Transcriptase*. A síntese do cDNA foi realizada no equipamento *Verity 96 well thermal cycler* (Applied Biosystems), sob as seguintes condições: uma etapa de 85°C durante 3 minutos seguida de uma etapa de 60°C por 5 minutos, 37°C por 120 minutos e 5 minutos a 85°C para interromper a reação. O produto obtido foi usado diretamente na reação em cadeia da polimerase (PCR) ou conservado a -80°C. Foram testados três pares de oligonucleotídeos iniciadores para a detecção de *ANRASSF1* (número 1, Tabela 3), descrito por Beckedorff e colaboradores (2013), além de um segundo par (número 2, Tabela 3) que gera um produto de amplificação menor, porém dentro da região do *amplicon* gerado pelo primeiro par. Um terceiro par de *primers* (número 3, Tabela 3) foi obtido segundo sequência descrita por Reis e colaboradores (2004). Utilizou-se o programa *Primer Express 2.0* (Applied Biosystems) para desenhar os pares de *primers* 2 e 3. Para a confirmação do tamanho predito dos *amplicons*, foi utilizada a ferramenta *in silico* PCR (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?hgsid=356262817>) (Tabela 3).

Para a amplificação do transcrito de interesse, utilizou-se 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1U de Taq DNA polimerase (Go Taq DNA Polymerase, Promega), segundo as instruções do fabricante. Previamente, foi realizada uma reação com DNA genômico das linhagens T-47D e MDA-MB-453 como a verificação da eficiência e especificidade dos *primers* (controle positivo) (Apêndice III, figura 2).

Como controle negativo das reações, foi utilizada água ultra pura estéril. Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e corados com nitrato de prata (Apêndice III, Figura 3).

Tabela 3. Sequências de oligonucleotídeos para síntese de cDNA e detecção do *ANRRASF1* e controle endógeno (GAPDH)

Identificação		Primer 5'-3'	Tamanho do amplicon (pb)
1	Sense	CCGCGCAGAATTAGCCTCT	516
	Antissense	CCAATGAGGAAAGGGGAAGT	
2	Sense	CACACTGCTACGCGGACTCTAA	110
	Antissense	CTGTGCTAGGCGATAGAGATCCA	
3	Sense	ACCCAGAACCCGCTGCTATT	90
	Antissense	CCTCCCCCTTTACCTTTTTTCC	
4	Sense	CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	120
	Antissense	TGTTGCTGTAGCCAAATTCGTT	

Análise de expressão de *ANRASSF1* por RT-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Para a padronização da determinação do nível de expressão do transcrito *ANRASSF1*, inicialmente foi realizada a análise de eficiência de amplificação: gene alvo (*primers* 2) e o controle endógeno (Tabela 3). Foi elaborada uma curva de amplificação baseada na utilização de cinco diferentes pontos de diluição (1/10; 1/50; 1/250; 1/1250; 1/6250) de um *pool* de cDNAs sintetizados a partir de *random primer*, de diferentes linhagens celulares. Foi escolhida como melhor concentração de amostra a diluição 1/50 (neste experimento, aproximadamente 26ng). As eficiências (E) dos *primers* obtidas foram diferentes (*ANRASSF1*: 105,886% e *GAPDH*: 85,715%) (Apêndice III, Figura 5).

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento *Step One* (Applied Biosystems) utilizando o Go Taq qPCR Master Mix Kit (Promega) nas condições recomendada pelo fabricante: um período de aquecimento de ativação inicial de 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de dois passos com desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento combinado à extensão a 60°C por 1 minuto.

A quantificação relativa (R) dos genes foi determinada de acordo com Pfaffl (2001), onde o ciclo *threshold* (CT) é definido como o ponto em que a fluorescência detectada está acima da fluorescência de fundo e E a eficiência de cada par de *primer*.

E alvo^{ΔCTalvo (controle-amostra)}

R= _____

E endógeno^{ΔCTendógeno (controle-amostra)}

III.4. Análise estatística

Utilizou-se a análise clássica para a descrição dos principais parâmetros avaliados como média, desvio padrão e porcentagem. As medidas de associação entre a presença de metilação do DNA e parâmetros clínicos, histopatológicos e imunoistoquímicos foram baseadas em análise de significância para comparar grupos 2X2 em análise univariada pelo teste exato de Fisher, seguindo variáveis dicotômicas que foram previamente estabelecidas. A análise de sobrevivência foi realizada pelo método não-paramétrico de Kaplan-Meier e as diferenças observadas foram avaliadas pelo teste de *log-rank*. Nessa análise de sobrevida, foram censurados os tempos das pacientes que permaneceram vivas até a data final do seguimento; para aquelas com perda do seguimento, considerou-se a data referente

ao último acompanhamento registrado no prontuário médico como a data da censura. Considerou-se também como censura as datas dos óbitos não relacionados ao câncer de mama. Como análise estatística multivariada, aplicou-se o modelo de Cox para avaliar os efeitos conjuntos de algumas variáveis clínicas e histopatológicas, denotadas pelo vetor z . Aplicou-se o método *stepwise* para encontrar quais variáveis poderiam explicar significativamente a função risco $\lambda(t;z)$. A análise dos níveis de expressão foram conduzidas pelos testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney e a análise de correlação baseou-se no teste de Pearson. O nível de significância considerado foi de 5%. O *software package* SAS System, version 6.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) e *GraphPad Prism* 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) foram utilizados para as análises descritas. Esta etapa do estudo contou com a colaboração do Dr. Rogério Antonio de Oliveira, do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.

RESULTADOS

IV.1. Análise do padrão de metilação das ilhas CpG do gene *RASSF1*

O padrão de metilação das duas ilhas CpG associadas à regiões promotoras alternativas do gene *RASSF1* (ilhas CpG 84 e 139) foram analisadas em um conjunto de 84 amostras de carcinomas mamários (Apêndice I), sem tratamento químico e/ou radioterápico prévios à coleta do tecido tumoral e obtidas de pacientes não relacionadas. A idade média das pacientes foi igual a $58,9 \pm 15,7$ anos. A tabela 4 apresenta a distribuição de frequência dos principais parâmetros clínicos e histopatológicos desse grupo amostral. O tempo médio de acompanhamento clínico pós-cirúrgico foi igual a 89,2 meses (variando entre 6 a 153 meses).

Tabela 4. Características clínicas e histopatológicas do conjunto de 84 casos de carcinomas mamários incluídos no presente estudo.

Parâmetros	Nº de casos (%)
Idade	
≤55	38 (45,2%)
>55	46 (54,8%)
Estadiamento clínico*	
I, IIA, IIB	69 (83,1%)
IIIA, IIIB	14 (16,9%)
Status Axilar*	
(+)	34 (41%)
(-)	49 (59%)
Tamanho do tumor**	
≤ 20 mm	21 (25,6%)
> 20 mm	61 (74,4%)
Envolvimento de Linfonodos*	
≤ 4	67 (80,7%)
> 4	16 (19,3%)
Metástase	
Presença	11 (13,1%)
Ausência	73 (86,9%)
Grau Histológico***	
I, II	41 (51,9%)
III	38 (48,1%)
Subtipo histológico*	
Carcinoma ductal infiltrante	75 (90,4%)
Carcinoma lobular infiltrante	5 (6,0 %)
Outros	3 (3,6%)
ER*	
Negativo/reduzido (0, +1, +2)	55 (66,3%)
Positivo (+3)	28 (33,7%)
PgR*	
Negativo/reduzido (0, +1, +2)	56 (67,4%)
Positivo (+3)	27 (32,6%)
Her-2*	
Negativo/reduzido (0, +1, +2)	73 (88%)
Positivo (+3)	10 (12%)
p53***	
Negativo (0, +1)	65 (82,3%)
Positivo (+2, +3)	14 (17,7%)
Ki-67	
Baixa proliferação (≤ 25%)	51 (60,7%)
Alta proliferação (> 25%)	33 (39,3%)

*83 casos analisados; **82 casos analisados; ***79 casos analisados

O padrão de metilação da ilha CpG 84 associada à região promotora do transcrito *RASSF1A* foi avaliado num estudo prévio do grupo nas 84 amostras de carcinomas mamários primários, pela técnica de MS-PCR. Das 84 amostras, 71 apresentaram a presença de metilação em *RASSF1A*, enquanto 13 apresentaram exclusivamente a amplificação de alelos não metilados. O presente estudo também incluiu a análise dessa mesma região promotora em 7 amostras de referência, oriundas de tecido mamário obtido de mulheres sem câncer de mama e que se submeteram a cirurgias estéticas, bem como a análise do padrão de metilação da ilha CpG 139 associada à região promotora do transcrito *RASSF1C* no mesmo conjunto amostral, além da análise do padrão de metilação de ambas as ilhas nas 20 linhagens celulares selecionada.

As condições do ensaio de MS-PCR para a região promotora associada à ilha CpG 139 (transcrito *RASSF1C*) e os pares de *primers* específicos para a amplificação dos respectivos alelos metilados e não-metilados foram delineados e padronizados neste estudo. A especificidade desse conjunto de oligonucleotídeos foi demonstrada através da amplificação mutuamente exclusiva dos produtos de PCR esperados a partir do uso dos pares de *primers* específicos para a detecção da sequência metilada ou não metilada e DNA controles hipermetilado e hipometilado em reações de amplificação independentes, respectivamente (Apêndice III, Figura 2).

Diferentemente da alta frequência observada de metilação da ilha CpG 84 (71/84 amostras ou 84,5%), não foi detectada a metilação da região promotora do transcrito *RASSF1C* em nenhuma amostra estudada (figura 6). Por esse motivo, os dados de metilação de *RASSF1C* não foram considerados nas análises estatísticas subsequentes, realizadas para se avaliar a possibilidade de associação entre a

metilação do gene *RASSF1* e os parâmetros clínicos e histopatológicos dos carcinomas mamários.

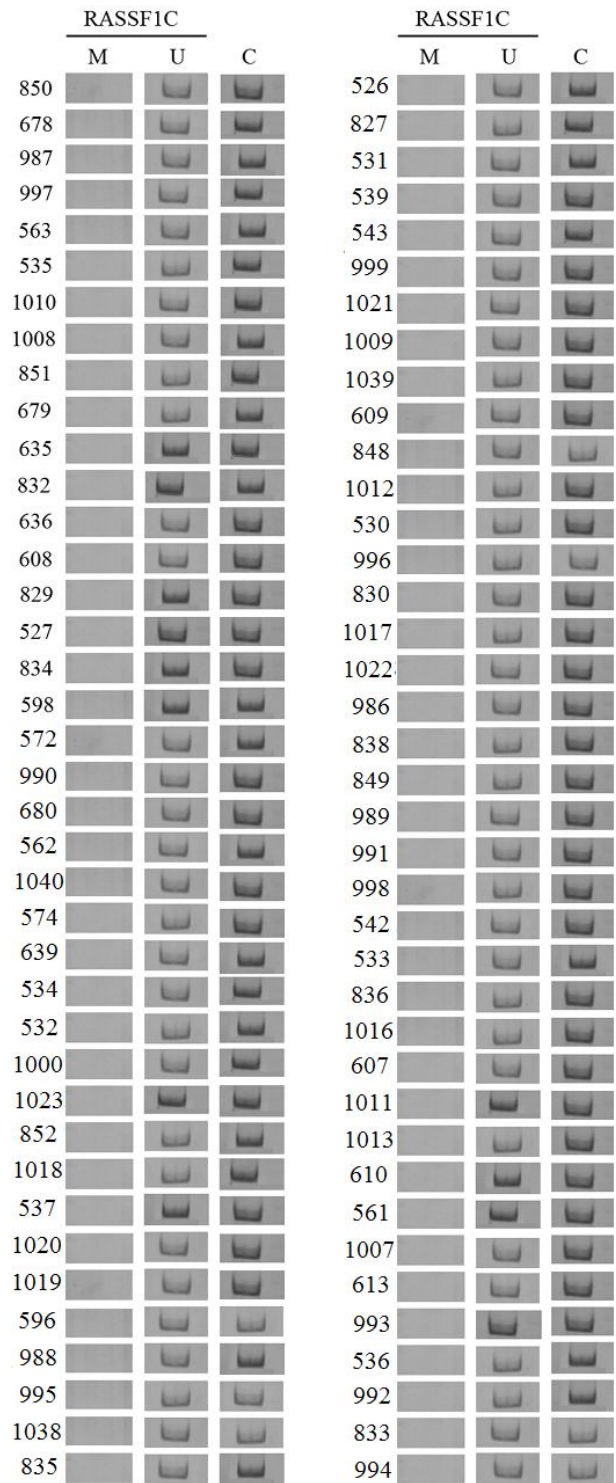


Figura 6. Análise de metilação da ilha CpG 139 em carcinomas mamários primários. M: alelo metilado; U: alelo não metilado (115 pb); C: controle da eficiência da modificação pelo bissulfito de sódio (210 pb).

Nos sete tecidos mamários sem câncer, detectou-se a presença de alelos metilados e não metilados na região promotora *RASSF1A*. Na maioria das amostras avaliadas, porém as bandas que identificam alelos não-metilados foram mais evidentes. Para *RASSF1C*, o resultado permaneceu como os observados nos carcinomas primários: somente a presença de alelos não-metilados foi detectada em todas as amostras analisadas (figura 7).

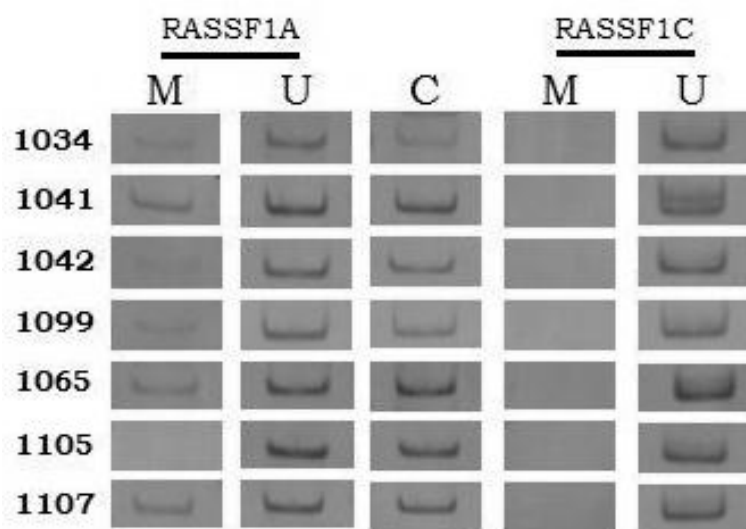


Figura 7. Análise do padrão de metilação das ilhas CpG 84 e 139 em tecido mamário derivado de mamoplastia. M: DNA metilado (*RASSF1A*: 111 pb); U: DNA não metilado (*RASSF1A*: 147 pb; *RASSF1C*: 115 pb); C: controle da eficiência da modificação pelo bissulfito de sódio (210 pb).

Para as análises estatísticas, o grupo “presença de metilação” incluiu o conjunto de amostras de carcinomas primários mostrando exclusivamente alelos metilados, bem como aquelas amostras com alelos metilados e não-metilados. O grupo “ausência de metilação” incluiu apenas as amostras que mostravam a amplificação exclusiva da banda correspondente a alelos não-metilados. Dentre os 5 carcinomas lobulares infiltrantes, 4 apresentaram metilação dessa região. Os 3 carcinomas classificados como carcinoma metaplásico, carcinoma ductal apócrino ou carcinoma papilífero também apresentaram-se metilados, bem como 85,3% (64

do total de 75 amostras) de carcinomas ductais infiltrantes. O conjunto de carcinomas ductais infiltrantes compreende um total de 76 amostras, porém uma foi excluída das análises estatísticas por não apresentar dados de seguimento clínico.

Devido ao fato de carcinomas mamários do subtipo histológico ductal invasivo comporem o grupo com maior número de amostras, as análises estatísticas para investigação de uma possível associação entre características clínicas/histopatológicas e presença/ausência de metilação foram baseadas neste subconjunto de amostras. A análise da distribuição da frequência de metilação de *RASSF1A* entre os 75 casos de carcinoma ductal invasivo, realizada pelo teste exato de Fisher, não mostrou diferenças estatísticas significativas quando comparadas com as características clínicas e histopatológicas (tabela 5).

Tabela 5. Distribuição da frequência de metilação da ilha CpG 84 associada à região promotora do transcrito *RASSF1A* em 75 amostras de carcinoma ductal invasivo.

Variáveis	Metilação		<i>p</i> ***
	Presença	Ausência	
Idade			
≤ 55	31	4	0,5276
> 55	33	7	
Estadiamento clínico *			
I, IIA, IIB	51	11	0,1930
IIIA, IIIB	12	0	
Status axilar*			
(+)	37	6	1,0
(-)	26	5	
Tamanho do tumor**			
≤ 20 mm	14	4	0,4474
> 20 mm	48	7	
Grau Histológico			
I, II	35	6	1,0
III	29	5	
Envolvimento de Linfonodos*			
≤ 4	49	10	0,4430
>4	14	1	
Metástase			
Presença	8	0	0,5950
Ausência	56	11	
p53***			
Negativo (0, 1+)	48	9	1,0
Positivo (2+, 3+)	11	2	
Her-2*			
Negativo/reduzido (0, +1, +2)	56	9	0,6145
Positivo (+3)	7	2	
ER*			
Negativo/reduzido (0, +1, +2)	43	7	0,7400
Positivo (+3)	20	4	
PgR*			
Negativo/reduzido (0, +1, +2)	46	7	0,4953
Positivo (+3)	17	4	
Ki-67			
Baixa proliferação (≤ 25%)	40	6	0,7405
Alta proliferação (> 25%)	24	5	

*74 casos com dados considerados. **73 casos com dados considerados. ***70 casos com dados considerados. ***Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$, determinados pelo teste exato de Fisher.

A presença ou ausência de metilação em *RASSF1A* não modificou o tempo de sobrevida doença-específico, segundo análise de Kaplan Meier ($p=0,1293$) (Figura 8).

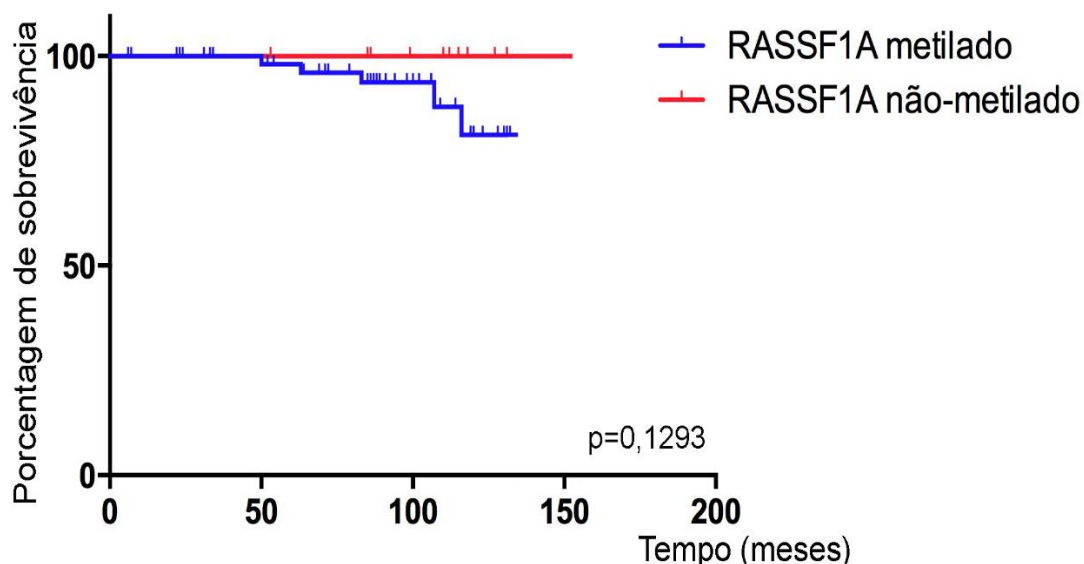


Figura 8. Curva de sobrevivência de acordo com a metilação de *RASSF1A* em pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal infiltrante (Curva de Kaplan-Meier, $p=0,1293$ determinado pelo teste de Log-rank).

A análise de sobrevivência foi baseada em teste de significância dos grupos em análise univariada, conforme apresentada na tabela 6. Não foi possível estabelecer relações entre as características clínicas/histopatológicas e a presença ou ausência de metilação, pois o grupo de pacientes portadoras de tumores com ausência de metilação de *RASSF1A* incluiu apenas 11 casos, sendo que destes, 10 foram censurados e apenas uma foi a óbito por câncer de mama após 153 meses do diagnóstico inicial da doença. Dessa forma, optou-se pela análise global de sobrevivência considerando-se cada as características clínicas/histopatológicas e tempo de acompanhamento clínico das pacientes. Observou-se que os parâmetros estágio clínico, envolvimento de linfonodos e ocorrência de metástase, foram indicadores prognósticos independentes para a progressão da doença e menor tempo de sobrevida. No entanto, após a análise multivariada, apenas a ocorrência

de metástase permaneceu no modelo como parâmetro associado a um maior risco de morte pela doença (Tabela 6).

Tabela 6. Análise de sobrevivência em 75 casos de carcinomas ductais invasivos.

Parâmetros	Análise Univariada (N=73/75)		Análise Multivariada	
	HR (CI 95%)	p	HR (CI 95%)	p
Idade (anos)		0.1154		
≤ 55	1.0			
> 55	5.658 (0.654 - 48.949)			
Estágio Clínico		0.0050		
I, IIA, IIB	1.0			
IIIA, IIIB	23.301 (2.589 - 209.744)			
Tamanho do Tumor (mm)		0.9950		
≤ 20	1.0			
>20	17125464 (nd)			
Envolvimento de Linfonodos		0.0163		
≤ 4	1.0			
> 4	14.271 (1.632 - 124.788)			
Ocorrência de metástases		0.0014		0.0014
Ausência	1.0		1.0	
Presença	18.792 (3.093 -114.186)		18.792 (3.093 -114.186)	
Grau Histológico		0.8001		
I, II	1.0			
III	1.230 (0.248 - 6.111)			
ER		0.0971		
Positiva(+3)	1.0			
Negativa/reduzida (0, +1, +2)	4.288 (0.768 - 23.939)			
PgR		0.9959		
Positiva (+3)	1.0			
Negativa/reduzida (0, +1, +2)	(nd)			
Her-2		0.7151		
Negativa/reduzida (0, +1, +2)	1.0			
Positiva (+3)	1.506 (0.167 - 13.590)			
p53		0.6169		
Negativa (0, +1)	1.0			
Positiva (+2, +3)	0.568 (0.062 - 5.213)			
Índice de proliferação -Ki-67		0.6069		
Baixo (≤ 25%)	1.0			
Alto (> 25%)	0.640 (0.117 - 3.508)			

HR: Hazard ratio; CI: Confidence interval; N: número de casos. Em negrito, estão destacados os dados com diferença estatística significativa.

IV.2. Análise de metilação das ilhas CpGs do gene *RASSF1* e de expressão dos transcritos *RASSF1A* e *RASSF1C* nas linhagens celulares

A figura 9 demonstra que enquanto a ilha CpG 139 é não-metilada em todas as 20 linhagens estudadas, a presença de alelos metilados e não-metilados na ilha CpG 84 foi observada nas linhagens: 184-A1, 184-B5, MCF10A, BT-20 e Hs578T; a presença exclusiva de alelos não-metilados foi observada na linhagem MDA-MB-415; e a presença exclusiva de alelos metilados foi observada nas demais 14 linhagens: BT-474, BT-483, MCF-7, MDA-MB-134-VI, MDA-MB-361, MDA-MB-453, SKBR 3, T-47D, ZR-75-1, ZR-75-3, MDA-MB-468, MDA-MB-231, BT-549 e MDA-MB-436.

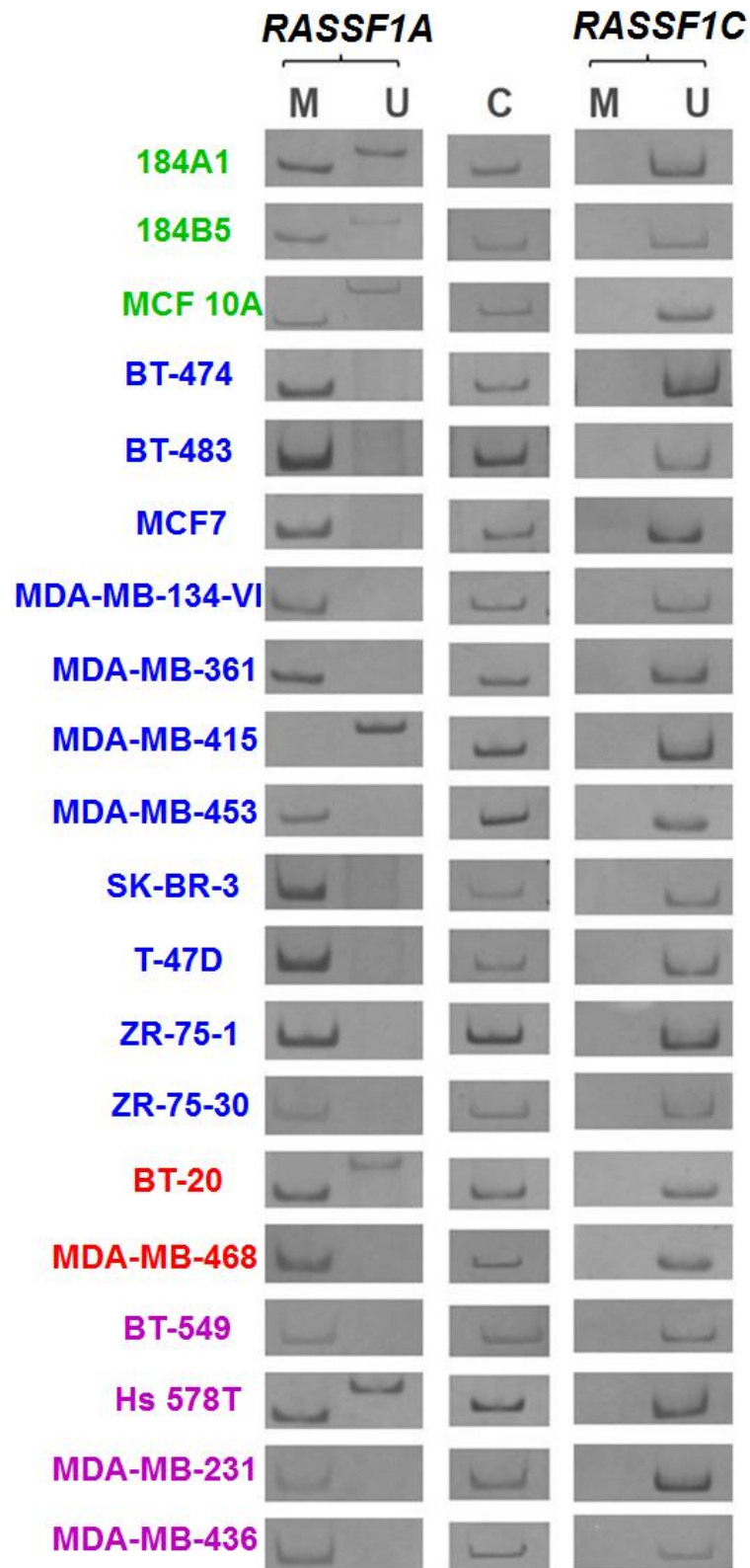


Figura 9. Análise do padrão de metilação das ilhas CpG 84 e 139 nas linhagens celulares. As linhagens foram subdivididas conforme o perfil de expressão global em luminal ou basal. Em cor verde estão as linhagens celulares derivadas de epitélio mamário normal ou de tumores benignos; em azul, linhagens do tipo luminal; em vermelho, linhagens do tipo basal A; em roxo, linhagens do tipo basal B. M: DNA metilado (*RASSF1A*: 111 pb); U: DNA não metilado (*RASSF1A*: 147 pb; *RASSF1C*: 115 pb); C: controle da eficiência da modificação pelo bissulfato de sódio (210 pb).

Todas as linhagens apresentaram expressão de *RASSF1C*, porém em níveis diferentes enquanto o transcrito *RASSF1A* foi detectado em apenas duas linhagens: MDA-MB-415 e Hs579T. A figura 10A mostra o nível de expressão dos transcritos *RASSF1A* e *RASSF1C* nas linhagens celulares estudadas e a figura 10B mostra o nível de expressão de *RASSF1C* agrupado por subtipos moleculares. O nível de expressão de *RASSF1C* foi maior no grupo de linhagens classificadas como basais em comparação com as luminais ($p=0,0470$). As linhagens 184A1, 184B5, MCF10A e BT-20 apresentaram alelos metilados e não-metilados nas análises por MS-PCR, porém não foi observada expressão de *RASSF1A* nos ensaios quantitativos. As duas linhagens celulares que apresentaram expressão de *RASSF1A*, MDA-MB-415 e Hs578T, apresentaram-se exclusivamente não-metilada ou hemi-metilada, respectivamente. As demais linhagens apresentaram alelos exclusivamente metilados e não expressaram *RASSF1A*.

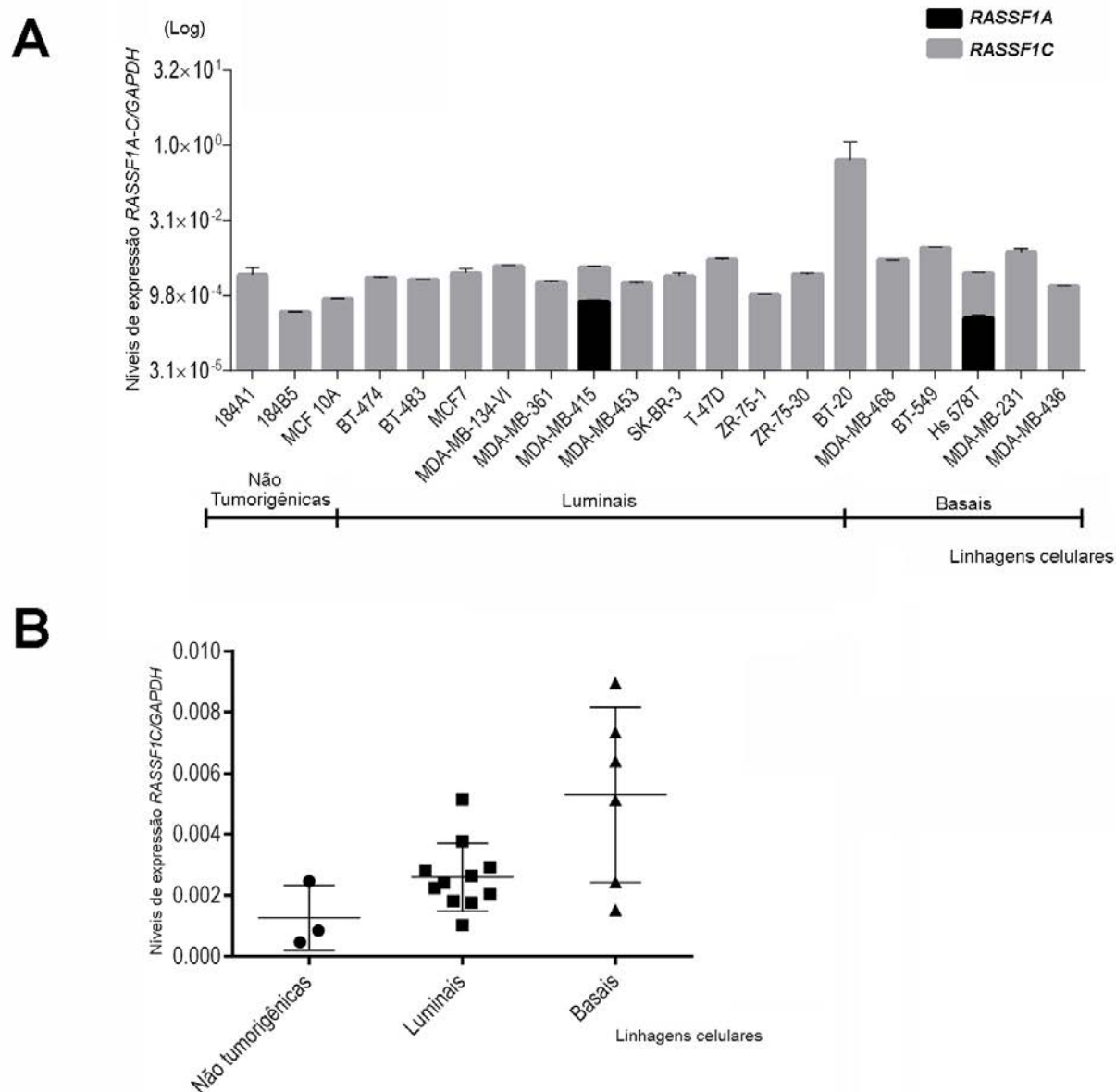


Figura 10. Expressão normalizada de *RASSF1A* e *RASSF1C* em 3 linhagens celulares não tumorigênicas e 17 linhagens derivadas de carcinomas mamários, incluindo 11 do subtipo luminal e 6 do subtipo basal. **A).** Expressão dos dois transcritos em todas as linhagens celulares, mostrando a expressão ubíqua de *RASSF1C* e presença de *RASSF1A* em apenas duas linhagens. **B).** Expressão do transcrito *RASSF1C* em cada grupo de linhagens segundo a classificação molecular. Nota-se o aumento do nível desse transcrito nas linhagens derivadas de carcinomas mamários, especialmente nas do subtipo basal ($p=0,0470$).

IV.3. Detecção do transcrito intrônico antissense *ANRASSF1*

Para a investigação do possível mecanismo de regulação de expressão dos transcritos *RASSF1A* e *RASSF1C* mediado por *non-coding* RNA, inicialmente, foi testado o par de *primers* número 3, que detecta o transcrito intrônico antissense descrito no trabalho de Reis e colaboradores (2004). Sob as condições testadas, não foi obtido sucesso na detecção desse transcrito. Baseado no estudo recentemente publicado por Beckedorff e colaboradores (2013), um novo transcrito antissense mapeado foi selecionado para o prosseguimento do presente estudo (Figura 11). Para tanto, foi utilizado o mesmo conjunto de *primers* utilizado pelos autores, bem como um novo par de *primers* interno ao fragmento alvo gerado pelo primeiro.

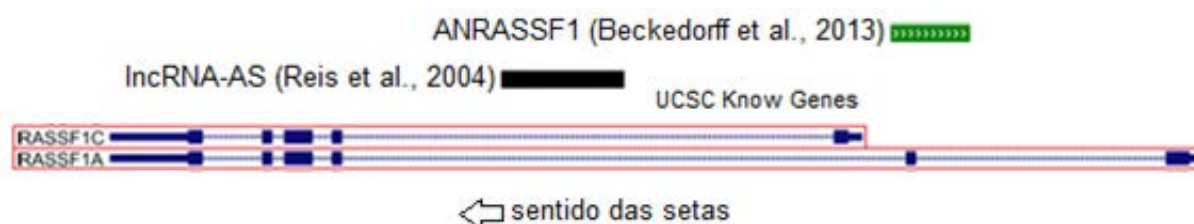


Figura 11. Gene *RASSF1*, seus transcritos variantes *RASSF1A*, *RASSF1C* e *IncRNAs* antissense. Em azul, observam-se os transcritos codificadores *RASSF1A* e *RASSF1C*, segundo UCSC Genome Browser UCSC (<http://genome.ucsc.edu>) (barras retangulares mais espessas representam os éxons, barras retangulares mais finas representam as regiões UTRs e linhas intermediárias com setas representam os íntrons e sentido dos transcritos no genoma). Em preto, observa-se o *IncRNA* antissense identificado por Reis e colaboradores e em verde, o *IncRNA* antissense identificado por Beckedorff e colaboradores.

A figura 12 mostra a detecção de uma banda correspondente ao *amplicon* de 516pb, correspondente ao transcrito *ANRASSF1* nas linhagens celulares MDA-MB-231 e MCF10A.

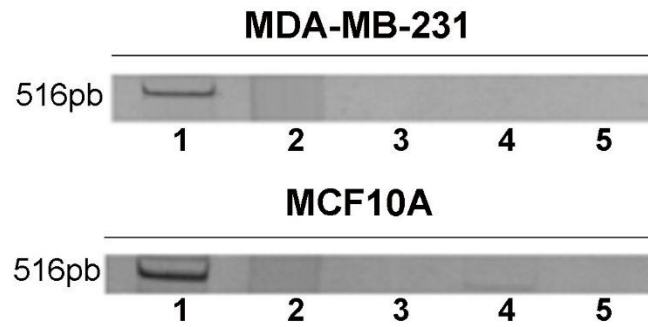


Figura 12. Detecção do transcrito *ANRASSF1* utilizando cDNA da linhagem derivada de carcinomas mamários MDA-MB-231 e de doença fibrocística da mama MCF10A. 1: detecção do transcrito antissense; 2: controle negativo com *primer* para detecção de transcrito *sense*; 3: controle negativo com ausência de transcriptase reversa na reação de síntese de cDNA; 4: controle negativo com ausência de *primers* na reação de síntese de cDNA; 5: *no template control*, reação com ausência de molde na PCR.

A detecção do transcrito *ANRASSF1* utilizando-se o par de *primers* internos ao produto de 516pb foi conduzida em todas as linhagens. Entretanto, após a realização dos ensaios observou-se a presença desse transcrito nas linhagens em 5 das 16 amostras: 184-B5, BT-474, SK-BR-3, ZR-75-30 e MDA-MB-231. Nas demais, os resultados foram considerados inconclusivos devido à presença do produto esperado em pelo menos um dos controles experimentais (Figura 13).

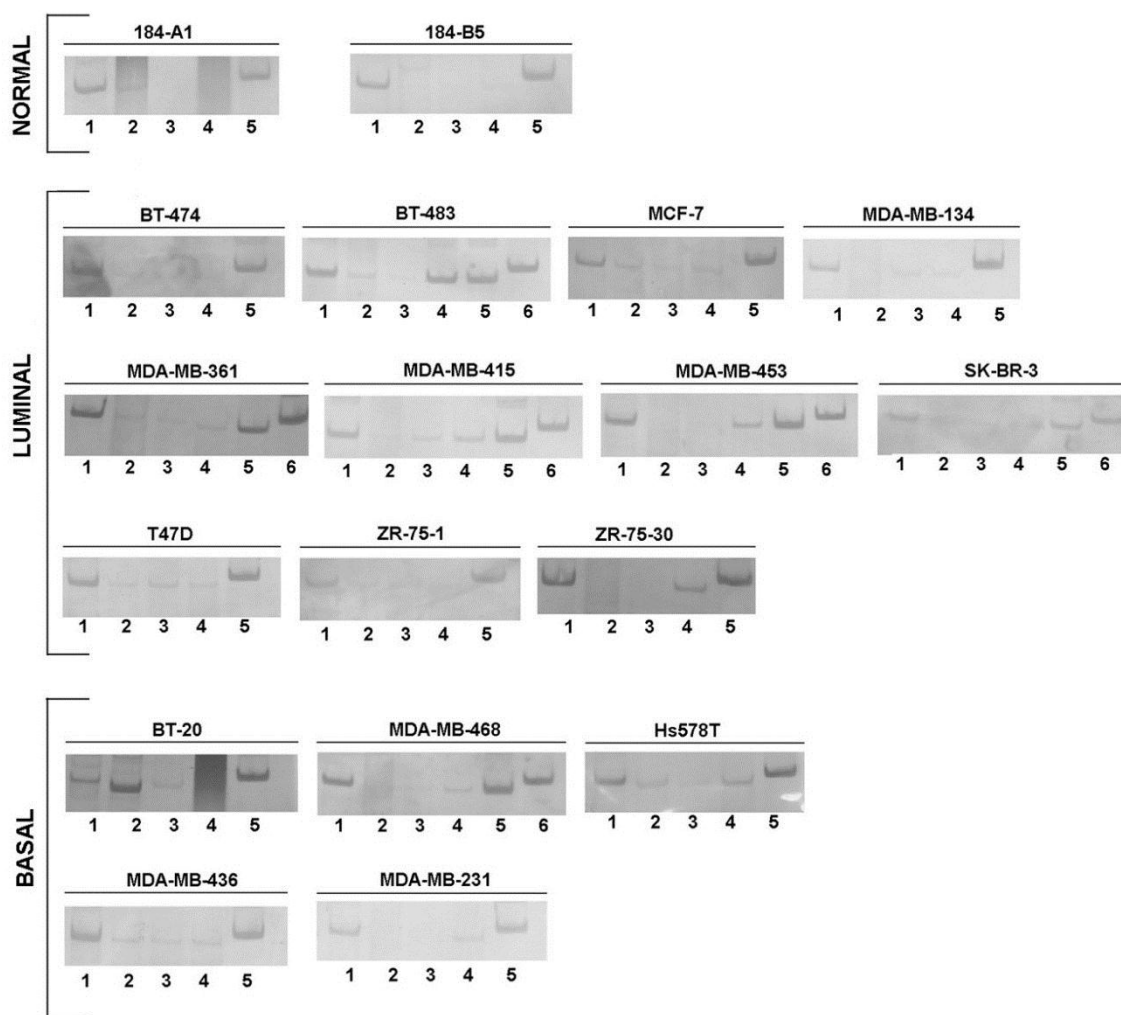


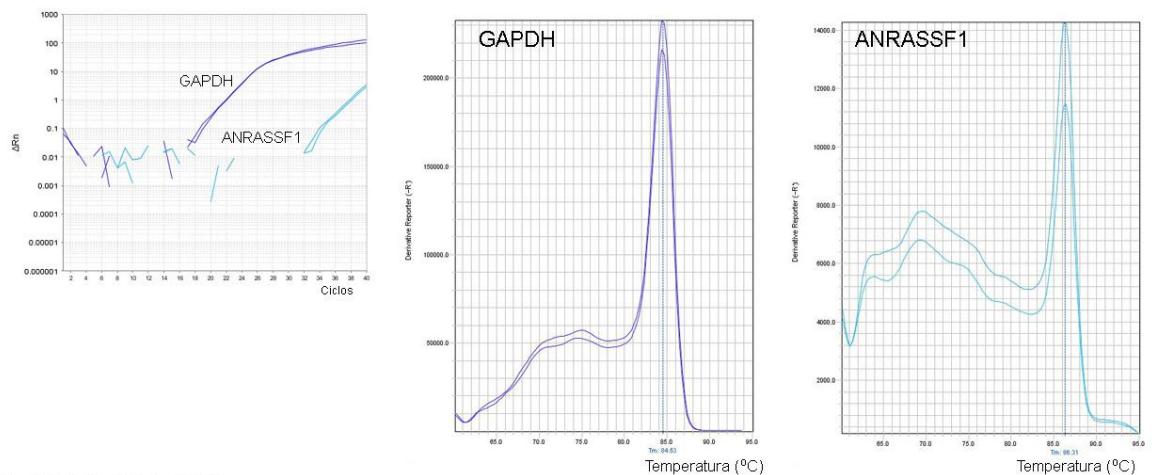
Figura 13. Detecção do transcrito *ANRASSF1* correspondente a um produto de 110pb. 1: detecção do transcrito antissense; 2: controle negativo com *primer* para detecção de transcrito *sense*; 3: controle negativo com ausência de transcriptase reversa na reação de síntese de cDNA; 4: controle negativo com ausência de *primers* na reação de síntese de cDNA; 5: *no template control*, reação com ausência de molde na PCR; 5 – DNA genômico; 6 – produto de 130pb correspondente à expressão do gene *GAPDH*.

IV.4. Análise da expressão relativa de *ANRASSF1*

Para os ensaios de quantificação da expressão relativa de *ANRASSF1*, utilizou-se a linhagem MDA-MB-415 como referência, pois a mesma apresentou apenas alelos não metilados nos ensaios qualitativos para a ilha CpG 84 e expressa os transcritos *RASSF1A* e *RASSF1C*. A figura 14 ilustra o perfil de amplificação e a especificidade dos produtos obtidos nessa análise nas linhagens celulares MDA-MB-

415 e MDA-MB-468, não-metilada e metilada para a região promotora de *RASSF1A*, respectivamente.

A) MDA-MB-415



B) MDA-MB-468

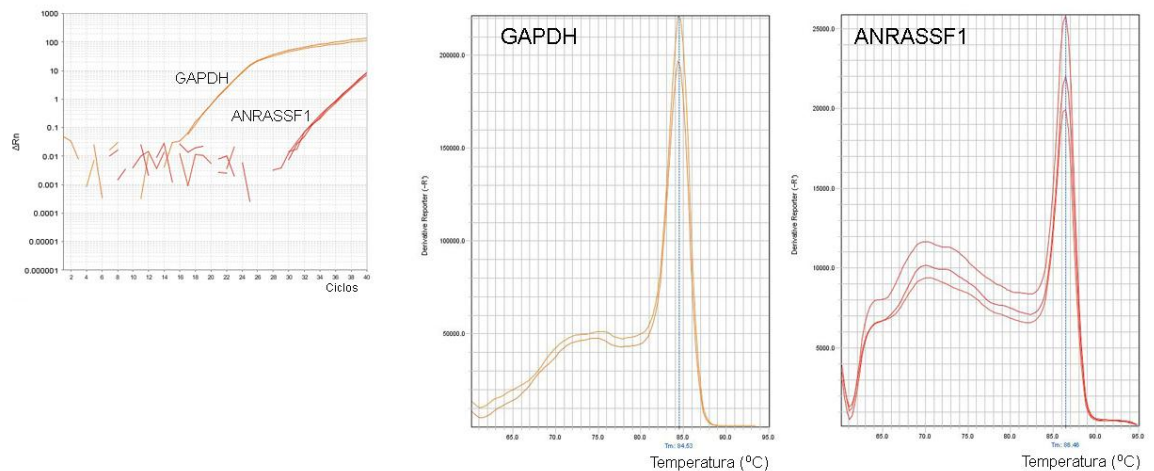


Figura 14. Curva de amplificação e de dissociação dos produtos de PCR correspondentes aos transcritos *ANRASSF1* e *GAPDH*.

A figura 15A mostra a comparação dos níveis de expressão dos transcritos *RASSF1A*, *RASSF1C* e *ANRASSF1* em 16 linhagens celulares. Embora a expressão de *ANRASSF1* varie entre as amostras, não houve diferença quando a mesma foi comparada entre os grupo de linhagens classificadas como basais ou luminais ($p=0,08941$) (Figura 15B). Também não foi detectada correlação entre a

expressão de *RASSF1C* e *ANRASSF1* (Figura 15C). Conforme esperado, o nível de expressão de *RASSF1C* não foi diferente entre linhagens que apresentaram a ilha CpG 84, associada à região promotora de *RASSF1A*, totalmente metilada ou hemimetilada. No entanto, também não foi detectada nenhuma relação entre nível de expressão de *ANRASSF1* e esses padrões de metilação de *RASSF1A* (Figura 16).

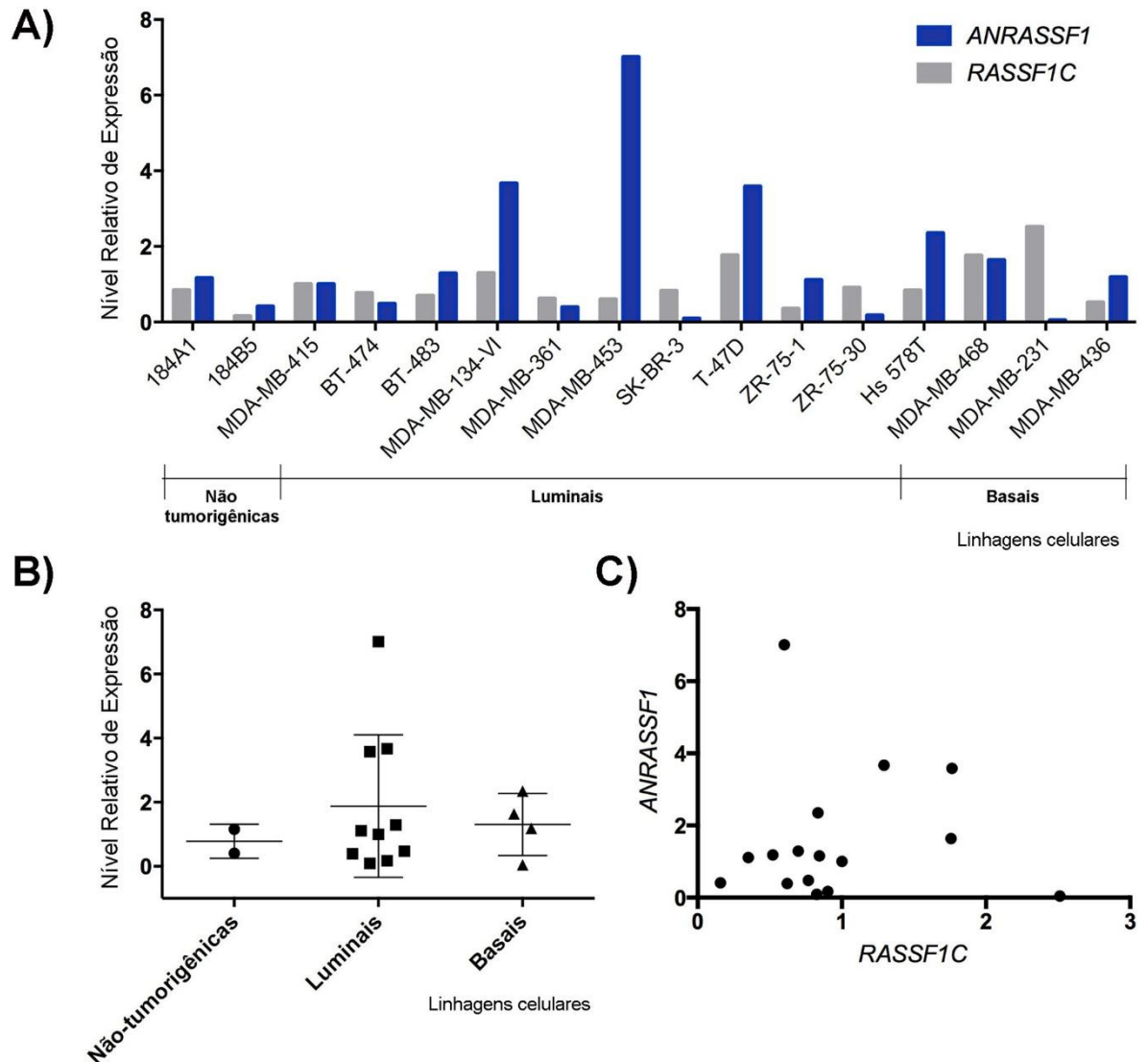


Figura 15. Expressão relativa dos transcritos *RASSF1A*, *RASSF1C* e *ANRASSF1* em 2 linhagens celulares não tumorigênicas e 14 linhagens derivadas de carcinomas mamários, incluindo 10 do subtipo luminal e 4 do subtipo basal. **A).** Expressão de *ANRASSF1* encontra-se destacada em azul, sendo variável entre as amostras. **B).** Expressão do transcrito *ANRASSF1* em cada grupo de linhagens segundo a classificação molecular. Nota-se ausência de diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$), bem como de correlação com os níveis de *RASSF1C* ($r = -0,05787$, $p = 0,8314$). **C)** Expressão de *ANRASSF1* e *RASSF1C* para cada amostra.

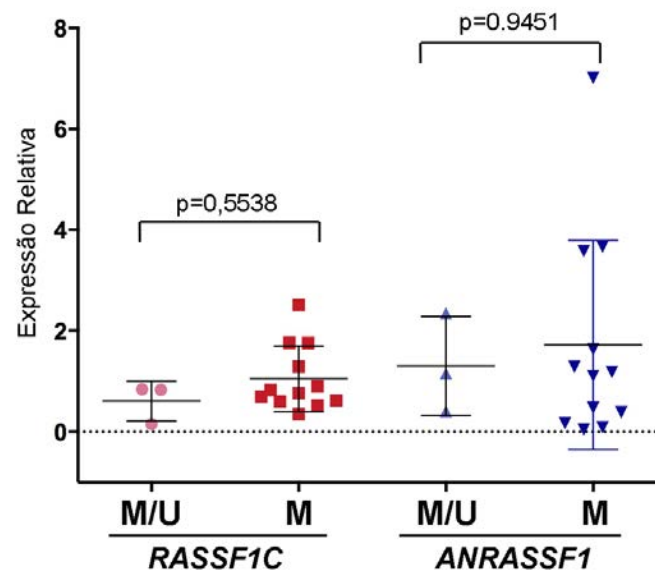


Figura 16. Comparação do nível de expressão de *RASSF1C* e *ANRASSF1* entre linhagens hemimetiladas (M/U) e metiladas (M). M: presença da alelo metilado: U: presença do alelo não-metilado.

DISCUSSÃO

Alterações epigenéticas têm sido frequentemente associadas ao desenvolvimento de neoplasias, por esse motivo o estudo desses eventos tornou-se uma importante perspectiva para desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e de tratamento do câncer (Rountree et al., 2001; Jones e Bayling, 2002; Sawan et al., 2008; Huang et al., 2011).

Atualmente, sabe-se que a metilação do DNA é um mecanismo alternativo de silenciamento da expressão gênica, e o silenciamento aberrante de genes importantes (como os supressores tumorais) tem sido descrito em vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama (Baylin e Herman, 2000; Prando et al., 2011).

O braço curto do cromossomo 3 compreende vários genes indicados como supressores tumorais, inclusive muitos são descritos como inativados epigeneticamente em tipos tumorais diferentes (Jones, 1999; Esteller, 2001). Sabe-se que a interação entre as alterações genéticas e epigenéticas colaboram para a promoção do desenvolvimento tumoral, e que a hipermetilação do DNA está envolvida nos estágios iniciais desse processo (Croce et al., 2002).

O gene *RASSF1* é um fator comum em diversos estudos, devido à sua importância em várias funções celulares essenciais, como controle da proliferação celular, diferenciação, motilidade e apoptose (Ponting e Benjamin, 1996; Yamamoto et al., 1999; Kolch, 2000). Dentre seus vários produtos gênicos, *RASSF1A* e *RASSF1C* são variantes transcritas ubiquamente em células e tecidos normais, além de serem reguladas por regiões promotoras associadas a ilhas CpG distintas (van de Weyden e Adamns, 2007).

Apesar de *RASSF1A* e *RASSF1C* serem os transcritos alternativos do gene *RASSF1* mais abordados na literatura, *RASSF1A* é extensivamente estudado, enquanto *RASSF1C* ainda possui poucas informações. A perda da expressão de

RASSF1A é um evento bem descrito em vários tipos de câncer, prejudicando sua função de supressor tumoral (Dammann et al., 2005; Hesson et al., 2007).

Estudos que investigam o papel biológico de *RASSF1C* concluíram que este transcrito codifica uma proteína com função antagônica à *RASSF1A*, por promover a proliferação e migração celular, além de atenuar a apoptose em câncer de mama e pulmão, como foi demonstrado no estudo realizado por Reeves e colaboradores (2013).

No presente estudo, procurou-se identificar alguma correlação estatisticamente significativa entre as características clínicas e histopatológicas e o perfil de metilação da ilha CpG 84, associada à região promotora do transcrito *RASSF1A*, em 75 amostras primárias de carcinoma ductal invasivo. Com relação à idade (≤ 55 ou > 55 anos) não encontramos uma diferença estatisticamente significativa, em relação aos grupos com presença ou ausência de metilação para *RASSF1A*. Similarmente, Hagrass e colaboradores (2014), também investigaram a importância da metilação de *RASSF1A* em pacientes com câncer de mama visando estabelecer correlação com a idade da paciente ao diagnóstico de câncer; entretanto, os autores não encontraram diferença estatística significativa quando considerada a idade ($<$ ou > 50 anos) em dois grupos: pacientes com câncer de mama e pacientes com lesão benigna da mama, tanto quanto à metilação de *RASSF1A* em tecido e soro, ou quanto à expressão de *RASSF1A* em tecido.

Jeronimo e colaboradores (2008) investigaram um possível biomarcador para método diagnóstico em lesões do tecido mamário, utilizando biópsia por aspiração com agulha fina. O estudo incluiu 66 casos de carcinoma mamário invasivo, 31 fibroadenomas e 12 amostras de tecido de mama sem câncer. O grupo também não encontrou diferença estatística significativa para a idade. No entanto, Karray-Chouayekh e colaboradores (2010), que determinaram o perfil de metilação

da ilha CpG na região promotora de *RASSF1A* e outros 3 genes associados com câncer, encontraram uma associação significativa entre idade de diagnóstico e metilação do gene *RASSF1A* ($p = 0,048$), onde puderam concluir que a metilação aberrante de *RASSF1A* é um evento prevalente em casos de pacientes mais jovens.

Kajabova e colaboradores (2013) investigaram a relação entre a metilação da região promotora de *RASSF1A* e outros 4 genes associados com câncer e características clinicopatológicas, onde encontraram uma relação direta e significativa entre a metilação de *RASSF1A* e expressão do receptor de estrógeno. Entretanto, os resultados do presente estudo não corroboraram este achado. O fato de que o perfil de metilação pode diferir entre populações e etnias explica o fato dessa divergência de dados encontrados na literatura (Bae et al., 2004).

Para todas as demais características clínicas e histopatológicas, não foi encontrada significância estatística, quando correlacionadas com a presença ou ausência de metilação. Croce e colaboradores (2002) propuseram uma explicação para este fato, onde o grupo estudou um fator de transcrição oncogênico que recruta DNA-metiltransferases para promotores de genes específicos. Segundo os autores, haveria uma correlação mecânica entre alterações genéticas e epigenéticas sugerindo que a hipermetilação contribui para os estágios iniciais da carcinogênese.

Embora no presente estudo as análises que correlacionaram presença/ausência de metilação em *RASSF1A* com as características clínicas/histopatológicas não tenham demonstrado diferença estatística significativa em relação à sobrevida das pacientes, o estudo de meta-análise realizado por Jiang e colaboradores (2012) sugeriu que a hipermetilação da região promotora de *RASSF1A* associa-se a uma pior chance de sobrevivência para pacientes com câncer de mama. Dados semelhantes foram encontrados no trabalho de Wang e colaboradores (2012).

Enquanto *RASSF1A* é frequentemente associado à perda de expressão devido à metilação de sua região promotora, *RASSF1C* não parece ser regulado da mesma maneira. Embora o estudo de Vos e colaboradores (2000) tenha demonstrado perda de expressão de *RASSF1C* em tumores de ovário, expressão de *RASSF1C* na linhagem de carcinoma renal KRC/Y não foi detectada (Dreijerink et al., 2001). Adicionalmente, não são detectados dados de hipermetilação da região promotora de *RASSF1C* na literatura. Embora, Lorenzato e colaboradores (2012) sugeriram um possível mecanismo de regulação de *RASSF1A* e *RASSF1C* por um fator de sobrevivência celular em câncer de ovário, onde ambos os transcritos são reprimidos e considerados pró-apoptóticos.

RASSF1C é frequentemente descrito como expresso acima dos níveis considerados normais em vários tipos de câncer. Reeves e colaboradores (2013) demonstraram que, em tecidos mamários normais, os níveis de *RASSF1A* são maiores que os de *RASSF1C*, ao mesmo tempo que em 92% das amostras analisadas de tumores de mama, *RASSF1A* teve perda de expressão e em 62% delas *RASSF1C* teve aumento de expressão. Resultados similares foram descritos em tumores pancreáticos endócrinos (Malpeli et al., 2011), câncer de pulmão (Amaar et al., 2006) e carcinoma de células escamosas do esôfago (Guo et al., 2014). As divergências de algumas informações sobre o papel desempenhado por *RASSF1C* sugere que este tenha uma função tecido-específica (van der Weyden e Adams, 2007).

No presente estudo, o padrão metilação da região promotora de *RASSF1C* (ilha CpG 139), diferentemente do observado para as mesmas análises de *RASSF1A* (ilha CpG 84), onde a região aparece frequentemente metilada em linhagens celulares e tumores primários, bem como apresenta alelos não metilados em tecido mamário normal, *RASSF1C* aparece não-metilado em todas as amostras

analisadas, sem diferir em qualquer uma delas. Os mesmos resultados podem ser observados nos dados obtidos pelo Cancer Methylome System (<http://cbbiweb.uthscsa.edu/KMethylomes/>), onde foi analisada a metilação do genoma em diversas amostras de carcinomas mamários e endometriais, além de linhagens celulares e tecidos normais correspondentes (Figura 17).

Prando e colaboradores (2011) investigaram o papel das alterações epigenéticas do *locus RASSF1* e outros nove genes que o flanqueiam. Os autores descreveram que mecanismos epigenéticos estão envolvidos na repressão transcricional de vários genes na região de *RASSF1* em câncer de mama. Esse efeito de espalhamento da supressão epigenética da expressão gênica por toda uma região genômica é conhecida como *long-range epigenetic silencing* (LRES) (Clark, 2007). Porém, esse fato não explica o mecanismo de regulação de *RASSF1A* e *RASSF1C*, uma vez estes transcritos são regulados por promotores distintos cada um associado a ilhas CpG próximas e, ainda assim, a região promotora de *RASSF1C* não encontra-se silenciada por metilação. Estes dados sugerem que *RASSF1C* não é regulado da mesma forma que *RASSF1A*, portanto deve participar de um mecanismo diferente.

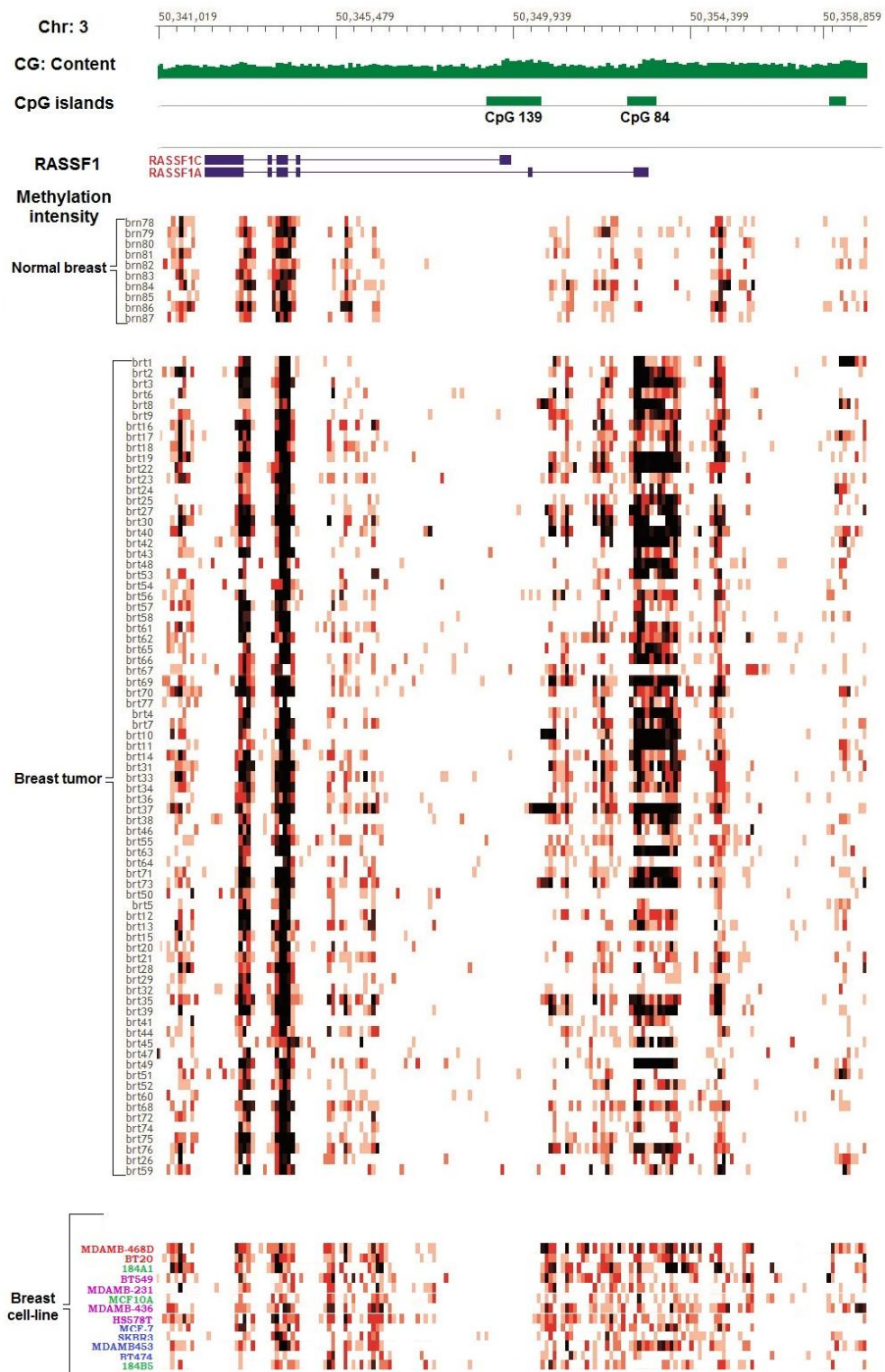


Figura 17. Perfil de metilação de *RASSF1* em tumores de mama, tecido de mama normal e linhagens derivadas de carcinoma mamário e de tecido de mama normal (<http://cbbiweb.uthscsa.edu/KMethylomes/>). Em verde: conteúdo de dinucleotídeos CG e ilhas CpG; em azul: variantes transcricionais do gene *RASSF1*; gráfico de calor: quantidade de metilação em cada região do gene, sendo que quanto mais escuro, mais metilada é a região investigada, quanto mais clara, menos metilada, e o branco demonstra ausência de metilação.

O fato de ocorrer transcrição de milhares de lncRNAs ao longo de mais de 90% do genoma humano sugere importante função para essa atividade, e tem

atraído a atenção da comunidade científica, porém ainda há pouca informação funcional detalhada destes transcritos (Wilusz et al., 2009; Wang et al., 2011; Rinn e Chang 2012; Beckedorff et al., 2013). Uma das características centrais dos lncRNAs que tem sido investigada atualmente é o seu envolvimento em processos celulares fundamentais, como o controle da expressão gênica (Reis e Verjovski-Almeida, 2012). Reis e colaboradores (2004) construíram uma plataforma de microarranjos de transcritos intrônicos para investigar a relevância biológica em condições patológicas, utilizando amostras de câncer de próstata. Foi encontrada uma relação direta entre os níveis de um transcrito intrônico antissense na região de *RASSF1* e grau de diferenciação celular do tumor.

Recentemente, Beckedorff e colaboradores (2013) investigaram a região de *RASSF1* e caracterizaram um transcrito intrônico antissense (denominado pelo grupo *ANRRASF1*), em uma região diferente da encontrada no trabalho de Reis e colaboradores (2004). O grupo de Beckedorff sugere um mecanismo de regulação de *RASSF1A* através da interação de *ANRRASF1* com a ilha CpG 84, o qual recruta o complexo repressivo policombe 2 (PRC2) para a região promotora, silenciando-a epigeneticamente. Esse mecanismo explicaria o motivo pelo qual *RASSF1A* é silenciado e *RASSF1C* permanece ativo. Outra denominação para esse evento seria *RNA-directed DNA methylation* (RdDM), onde ocorre modulação da expressão gênica por interação de RNAs não codificadores (Zhang e Zhu, 2011).

Beckedorff e colaboradores (2013) encontraram uma expressão maior de *ANRRASF1* em linhagens celulares de câncer de mama e câncer de próstata quando comparada com linhagem não tumorigênica, enquanto que para a expressão de *RASSF1A*, o observado é justamente o oposto. Em células HeLa, o grupo observou que o aumento de expressão ectópica de *ANRRASF1* diminuiu a abundância de *RASSF1A* e estimulou a proliferação celular, o oposto foi observado

quando *ANRRASF1* tem expressão diminuída. Para *RASSF1C*, não foi observada qualquer alteração na expressão ou abundância do transcrito em qualquer das situações.

No presente estudo, a metodologia empregada por Beckedorff e colaboradores para a identificação de *ANRRASF1* foi reproduzida, com os ajustes necessários para os objetivos visados, buscando a investigação da possível correlação entre os níveis do transcrito antissense e os níveis de expressão *RASSF1A* e *RASSF1C* em um número maior de linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários, especialmente nas linhagens MDA-MB-415 e Hs578T que expressam ambos os transcritos e que apresentam alelos não metilados ou os alelos metilados e não metilados, respectivamente, e diferindo das linhagens estudadas previamente (MDA-MB-231, MCF7 e MCF10A) que expressam apenas o transcrito *RASSF1C* e apresentam metilação da ilha CpG associada ao transcrito *RASSF1A*.

No conjunto, nossos dados confirmam que enquanto a ilha CpG 84 é frequentemente metilada, a ilha CpG 139 permanece não-metilada em carcinomas mamários; adicionalmente, este padrão de metilação correlaciona-se com o silenciamento do transcrito *RASSF1A* e expressão de *RASSF1C*, respectivamente, nas linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários. Palakurthy et al. (2009), demonstraram que o silenciamento epigenético de *RASSF1A* requer a indução da DNA metiltransferase DNMT3B mediada por HOXB3 bem como o recrutamento proteína da DNMT3B e do complexo repressor Polycomb 2 (PRC2) ao promotor de *RASSF1A*. Recentemente, outros fatores regulatórios e mecanismos epigenéticos subjacentes ao recrutamento de PRC2 foram sugeridos por Beckedorff et al., 2013b. Esses pesquisadores apresentaram um modelo de modulação epigenética *locus*-específica para *RASSF1A* mediada por *non-coding* RNA ao identificar e caracterizar o transcrito *ANRRASF1*: um RNA longo não-codificante (lncRNA), endógeno, não

processado por *splicing* e transcrito a partir da cadeia oposta do gene codificador *RASSF1*. *ANRASSF1* é transcrito pela RNA polimerase II, apresenta o 5'cap e a cauda de 3'Poli(A)+, exibe localização nuclear e tem um meia-vida curta em comparação com outros lncRNAs que se ligam a PRC2.

No presente estudo, a expressão de *ANRASSF1* foi detectada em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários, bem como em linhagens de células epiteliais derivadas de tecido mamário normal (184A1 e 184B5) ou de doença fibrocística da mama (MCF10A). No estudo de Beckdorff et al. (2013), a expressão endógena de *ANRASSF1* foi maior em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários e prostáticos em comparação com linhagens derivadas de tecidos não-tumorais, um padrão oposto ao observado para os níveis de expressão de *RASSF1A*. Em adição, as alterações nos níveis de *ANRASSF1* induzidas por ensaios de super-expressão e de silenciamento por siRNA não afetaram a abundância do transcrito *RASSF1C*. Os dados do presente estudo corroboram este último achado; entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de expressão de *ANRASSF1* entre as linhagens derivadas de epitélio mamário normal e as derivadas de carcinomas mamários, embora quatro linhagens expressaram altos níveis desse transcrito (MDA-MB-134-IV, MDA-MB-453, T47D, Hs578T) e outras níveis menores (BT-474, MDA-MB-361, SK-BR-3, ZR-75-30 e MDA-MB-231), quando comparado a única linhagem que não apresentava metilação na região promotora de *RASSF1A* (MDA-MB-415). Também, não foram detectadas diferenças no nível de expressão de *ANRASSF1* em função do padrão de metilação dessa região.

Cabe destacar que todas as linhagens estudadas previamente apresentavam a presença de metilação na região promotora de *RASSF1A*. O presente estudo baseou-se na comparação de entre a linhagem MDA-MB-415 em

relação às linhagens que apresentaram metilação dessa região em diferentes níveis. Tomando-se como referência o mecanismo proposto por Beckdorff e colaboradores (2013b), esperaria-se a ausência de expressão de *ANRASSF1*, já que esta linhagem apresenta alelos exclusivamente não metilados. No entanto, os ensaios de expressão gênica em tempo real demonstraram que essa linhagem também expressa esse transcrito, bem como a linhagem Hs578T que possui alelos metilado e não-metilado para *RASSF1A*. Essa discordância pode dever-se ao fato de que lncRNAs possuem papéis múltiplos na regulação gênica, não necessariamente desempenham apenas uma função; portanto, globalmente nossos resultados apoiam o mecanismo proposto (Beckdorff et al., 2013b), já que esses autores também observaram um efeito limitado e não significativo na metilação da região promotora de *RASSF1A* quando o nível de ocupação de PCR2 nesse *locus* foi alterado devido às alterações induzidas nos níveis de expressão de *ANRASSF1* em células HeLa.

CONCLUSÃO

A frequência de metilação das regiões promotoras de *RASSF1A* e *RASSF1C* em carcinomas mamários são opostas: enquanto observa-se uma alta frequência de metilação de *RASSF1A*, há ausência de metilação de *RASSF1C*.

Não foram detectadas associações significativas entre os parâmetros clínicos e histopatológicos e o padrão de metilação de *RASSF1A* em carcinomas mamários primários; porém, quando cada parâmetro foi avaliado isoladamente e considerando-se o tempo de acompanhamento clínico das pacientes, pode-se observar que o estágio clínico, envolvimento de linfonodos e ocorrência de metástase foram indicadores independentes de menor tempo de sobrevivência na casuística estudada. Estes dados sugerem que as alterações de metilação de *RASSF1A* ocorrem nos estágios iniciais da doença e não estão associadas a marcadores de pior prognóstico.

Em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários, enquanto a expressão de *RASSF1A* é silenciada epigeneticamente e associada à metilação da ilha CpG 84, *RASSF1C* é expresso ubiquamente e em maiores níveis em linhagens com padrão de expressão do tipo basal.

A expressão do transcrito antissense ao gene *RASSF1*, denominado *ANRASSF1* não foi correlacionada com os níveis de *RASSF1C* e foi independente do padrão de metilação da região promotora associada à *RASSF1A*. Estes dados corroboram o mecanismo proposto recentemente para a modulação epigenética *locus*-específica para *RASSF1A* mediado por esse lncRNA intrônico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarez C, Tapia T, Cornejo V, Fernandez W, Muñoz A, Camus M, Alvarez M, Devoto L, Carvalho P. Silencing of tumor suppressor genes RASSF1A, SLIT2, and WIF1 by promoter hypermethylation in hereditary breast cancer. *Mol Carcinog*, 52: 475-487, 2013.

Alverenga M. Diagnóstico Histológico do Câncer de Mama (Fatores Anatomopatológicos de Valor Prognóstico do Carcinoma de Mama). eHealth Latin America, 2000. (disponível em <http://www.bibliomed.com.br/bibliomed/bmbooks/oncologi/livro2/cap/cap07.htm>).

Amaar Y, Minera MG, Hatran LK, Strong DD, Mohan S, Reeves ME. Ras association domain family 1C protein stimulates human lung cancer cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 291:1185–1190, 2006.

Aufsatz W, Mette MF, van der Winden J, Matzke AJM, Matzke M. RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *PNAS*, 99:16499-16506, 2002.

Backofen R, Vogel T. Biological and bioinformatical approaches to study crosstalk of long-non-coding RNAs and chromatin-modifying proteins. *Cell Tissue Res*. 356(3):507-26, 2014.

Bae YK, Brown A, Garrett E, Bornman D, Fackler MJ, Sukumar S, Herman JG, Gabrielson E. Hypermethylation in histologically distinct classes of breast cancer. *Clin Cancer Res*, 15;10 (18 Pt 1):5998-6005, 2004.

Bar-Sagi D, Feramisco JR. Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. *Cell*, 42(3):841-848, 1985.

Barrios CH, Bines J, Simon S, Marques R, Costa MA, Azevedo et al. Recomendações para o manejo adjuvante de pacientes com câncer de mama inicial. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica*, 1(5):3-11, 2005.

Baylin SB, Herman JG. DNA Hypermethylation in Tumorigenesis. *Trends Genet*, 16: 168-74, 2000.

Bayling SB, Schuebel KE. The epigenomic era opens. *Nature*, 448: 548-549, 2007.

Beckedorff FC, Ayupe AC, Crocci-Souza R, Amaral MS, Nakaya HI, Soltys DT, Menck CFM, Reis EM, Verjovski-Almeida S. The intronic long noncoding RNA *ANRASSF1* recruits PRC2 to the *RASSF1A* promoter, reducing the expression of *RASSF1A* and increasing cell proliferation. *Plos Genet.*, 9(8): e1003705, 2013a.

Beckedorff FC, Amaral MS, Deocesano-Pereira C, Verjovski-Almeida S. Long non-coding RNAs and their implications in cancer epigenetics. *Biosci Rep*. 30;33(4), 2013b.

Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, 9(16): 2395-2402, 2000.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16: 6-21, 2002.

Braga E, Pugacheva E, Bazov I, Ermilova V, Kazubskaya T, Mazurenko N, Kissel'ov F, Liu J, Garkavtseva R, Zabarovsky E, Kisselev L. Comparative allelotyping of the short arm of human chromosome 3 in epithelial tumours of four different types. *FEBS Lett*, 454:215–219, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. *Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil*. (disponível em <http://www.inca.gov.br>).

Burbee DG, Forgacs E, Müller SZ, Shivakumar L, Fong K, Gao B, Randle D, Kondo M, Virmani A, Badder S, Sekido Y, Latif F, Milchgrub S, Toyooka S, Gazdar AS, Lerman MI, Zabarovski E, White M, Minna JD. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst*, 93: 691-699, 2001.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490: 7418, 61–70, 2012.

Clark SJ. Action at a distance: epigenetic silencing of large chromosomal regions in carcinogenesis. *Hum Mol Genet*, 16 Spec No 1:R88-95, 2007.

Chari R, Coe BP, Wedseltoft C, Benetti M, Wilson IM, Vucic EA, et al. SIGMA2: a system for the integrative genomic multi-dimensional analysis of cancer genomes, epigenomes, and transcriptomes. *BMC Bioinformatics*, 9: 422, 2008.

Chari R, Coe BP, Vucic EA, Lockwood WW, Lam WL. An integrative multi-dimensional genetic and epigenetic strategy to identify aberrant genes and pathways in cancer. *BMC Syst Biol*, 4:67, 2010a.

Chari R, Thu KL, Wilson IM, Lockwood WW, Lonergan KM, Coe BP, et al. Integrating the multiple dimensions of genomic and epigenomic landscapes of cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 29:73-93, 2010b.

Cheang MC¹, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 101:736–750, 2009.

Chen YC, Hunter DJ. Molecular epidemiology of cancer. *CA Cancer J Clin*. 55: 45-54, 2005.

Cheung, K.L.; Graves C.R.; Robertson J.F. Tumour marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer. *Cancer Treat Rev*, 26(2):91-102, 2000.

Choi JD, Lee JS. Interplay between Epigenetics and Genetics in cancer. *Genomics Inform*, 11 (4): 164-173, 2013.

Coe BP, Chari R, Lockwood WW, Lam WL. Evolving strategies for global gene expression analysis of cancer. *J Cell Physiol*, 217(3):590-597, 2008.

Coolen MW, Stirzaker C, Song JZ, Stathan AL, Kassir Z, Moreno CS, Young AN, Varma V, Speed TP, Cowley M, Lacaze P, Kaplan W, Robinson MD, Clark SJ. Consolidation of the cancer genome into domains of repressive chromatin by long-range epigenetic silencing (LRES) reduces transcriptional plasticity. *Nat Cell Biol*, 3(12): 235-246, 2010.

Croce LD, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, Fuks F, Lo Coco F, Kouzarides T, Nervi C, Minucci S, Pelicci PG. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science*, 295: 1079-1081, 2002.

Damman R, Schagdarsurengin U, Seidel C, Strunnikova M, Rastetter M, Baier K, Pfeifer GP. The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update. *Histol Histopathol*. 20(2):645-63, 2005.

Dawson MA, Kouzarides T. Cancer Epigenetics: From Mechanism from Therapy. *Cell*, 150: 12-27, 2012.

de Oliveira MM, de Oliveira SF, Lima RS, de Andrade Urban C, Cavalli LR, de Souza Fonseca Ribeiro EM, Cavalli IJ. Differential loss of heterozygosity profile on chromosome 3p in ductal and lobular breast carcinomas. *Hum Pathol*. 43(10):1661-7, 2012.

Di Goia S, Bianchi P, Destro A, Grizzi F, Malesci A, Laghi L, Levrero M, Morabito A, Roncalli M. Quantitative evaluation of RASSF1A methylation in the non-lesional, regenerative and neoplastic liver. *BMC Cancer*, 6:89, 2006.

Dreijerink K, Braga E, Kuzmin I, Geil L, Duh FM, Angeloni D, Zbar B, Lerman MI, Stanbridge EJ, Minna JD, Protopopov A, Li J, Kashuba V, Klein G, Zabarovsky ER. The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(13):7504-9, 2001.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*, 61(8): 3225-9, 2001.

Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and hystone-modification maps. *Nat Rev Genet*, 8: 286-298, 2007.

Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*, 358(11):1148-59, 2008.

Estrabaud E, Lassot I, Blot G, Le Rouzic E, Tanchou V, Quemeneur E, Daviet L, Margottin-Goguet F, Benarous R. RASSF1C, an isoform of the tumor suppressor RASSF1A, promotes the accumulation of beta-catenin by interacting with betaTrCP. *Cancer Res*, 67(3): 1054-1061, 2007.

Esteva FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res*, 6: 109-118, 2004.

Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in Vertebrate Genomes. *J Mol Biol*, 196: 261-282, 1987.

Graziano F, Humar B, Guilford P. The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice. *Ann Oncol*, 14(12):1705-13, 2003.

Gomes AQ, Nolasco S, Soares H. Non-Coding RNAs: Multi-Tasking Molecules in the Cell. *Int J Mol Sci*. 14(8): 16010–16039, 2013.

Guo W, Cui L, Wang C, Guo Y, Shen S, Kuang G, Dong Z. Decreased expression of RASSF1A and up-regulation of RASSF1C is associated with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metastasis*, 10.1007/s10585-014-9646-5, 2014.

Hagrass HA, Pasha HF, Shaheen MA, Abdel Bary EH, Kassem R. Methylation status and protein expression of RASSF1A in breast cancer patients. *Mol Biol Rep*, 41(1):57-65, 2014.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 4;144(5): 646-74, 2011.

Hesson LB, Cooper WN, Latif F. The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis Markers*, 23(1-2):73-87, 2007.

Hirata BKB, Oda JMM, Guembarovski RL, Ariza CB, Oliveira CEC, Watanabe MAE. Molecular markers for breast cancer prediction on tumor behavior. *Dis Markers*, 2014: 1-12, 2014.

Hoebeeck J, Michels E, Menten B, Van Roy N, Eggert A, Schramm A, De Preter K, Yigit N, De Smet, De Paepe A, Laureys G, Vandesompele J, Speleman F. High resolution tiling-path BAC array deletion mapping suggests commonly involved 3p21-p22 tumor suppressor genes in neuroblastoma and more frequent tumors. *Int J Cancer Suppl*, 120: 533-538, 2006.

Huang Y, Nayak S, Jankowitz R, Davidson NE, Oesterreich S. Epigenetics in breast cancer: what's new? *Breast Cancer Res*, 13: 225, 2011.

Jeronimo C, Monteiro P, Henrique R, Dinis-Ribeiro M, Costa I, Costa VL, Filipe L, Carvalho AL, Hoque MO, Pais I, Leal C, Teixeira MR, Sidransky D. Quantitative hypermethylation of a small panel of genes augments the diagnostic accuracy in fine-needle aspirate washings of breast lesions. *Breast Cancer Res Treat*, 109(1):27-34, 2008.

Ji L, Minna JD, Roth JA. 3p21.3 tumor supressor cluster: prospects for translational research. *Future Oncol*, 1:79-72, 2005.

Jiang Y, Cui L, Chen WD, Shen SH, Ding LD. The prognostic role of RASSF1A promoter methylation in breast cancer: a meta-analysis of published data. *PLoS One*, 7(5):e36780, 2012.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Rev Genet*, 3:415–428, 2002.

Jones PA. The DNA methylation paradox. *Trends Genet*, 15(1): 34-7, 1999.

Kajabova V, Smolkova B, Zmetakova I, Sebova K, Krivulcik T, Bella V, Kajo K, Machalekova K, Fridrichova I. RASSF1A promoter methylation levels positively correlate with estrogen receptor expression in breast cancer patients. *Transl Oncol*, 6(3): 297–304, 2013.

Karray-Chouayekh S, Trifa F, Khabir A, Boujelbane N, Sellami-Boudawara T, Daoud J, Frikha M, Jlidi R, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. Aberrant methylation of RASSF1A is associated with poor survival in Tunisian breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*, 136(2):203-10, 2010.

Kikuyama M, Takeshima H, Kinoshita T, Okochi-Takada E, Wakabayashi M, Akashi-Tanaka S, Ogawa T, Seto Y, Ushijima T. Development of a novel approach, the epigenome-based outlier approach, to identify tumor-suppressor genes silenced by aberrant DNA methylation. *Cancer Lett*, 2012 Sep 28;322(2):204-12.

Krasseinstein R, Sauter E, Dulaimi E, Battagli C, Ehya H, Szanto AK, Cairns P. Detection of breast cancer in nipple aspirate fluid by CpG Island Hypermethylation. *Clin Cancer Res*, 10: 28-32, 2004.

Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*, 15;351, 2:289-305, 2000.

Levine AJ. P53, the cellular geterkeeper for growth and division. *Cell*, 88: 323-331, 1997.

Li G, Zhang H, Wan X, Yang X, Zhu C, Wang A, He L, Miao R, Chen S, Zhao H. Long noncoding RNA plays a key role in metastasis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int*. 2014;780521, 2014.

Liu J, Bai G, Zhang C, Chen W, Zhou J, Zhang S, Chen Q, Deng X, He XJ, Zhu JK. An atypical component of RNA-directed DNA methylation machinery has both DNA methylation-dependent and -independent roles in locus-specific transcriptional gene silencing. *Cell Res*, 21: 1691-1700, 2011.

Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, Diebold J, Hermeking H. Functional Epigenomics Identifies Genes Frequently Silenced in Prostate Cancer. *Cancer Res*, 65(10): 4218-4227, 2005.

Lorenzato A, Martino C, Dani N, Oligschläger Y, Ferrero AM, Biglia N, Calogero R, Olivero M, Di Renzo MF. The cellular apoptosis susceptibility CAS/CSE1L gene protects ovarian cancer cells from death by suppressing RASSF1C. *FASEB J*, 26(6):2446-56, 2012.

Lorković ZJ, Naumann U, Matzke AJ, Matzke M. Involvement of a GHKL ATPase in RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 22(10):933-938, 2012.

Maass PG, Luft FC, Bähring S. Long non-coding RNA in health and disease. *J Mol Med (Berl)*. 92(4):337-46, 2014.

Mahfouz MM. RNA-directed methylation. *Plant Signal Behav*, 5(7): 806-816, 2010.

Maitra A, Wistuba II, Washington C, Virmani AK, Ashfaq R, Milchgrub S, Gazdar AF, Minna JD. High-resolution chromosome 3p allelotyping of breast carcinomas and precursor lesions demonstrates frequent loss of heterozygosity and a discontinuous pattern of allele loss. *Am J Pathol*, 159: 119-130, 2001.

Malpeli G, Amato E, Dandrea M, Fumagalli C, Debattisti V, Boninsegna L, Pelosi G, Falconi M, Scarpa A. Methylation-associated down-regulation of RASSF1A and up-regulation of RASSF1C in pancreatic endocrine tumors. *BMC Cancer*, 11:351, 2011.

Martinez A, Walker RA, Shaw JA, Dearing SJ, Maher ER, Latif F. Chromosome 3p allele loss in early invasive breast cancer: detailed mapping and association with clinicopathological features. *J Clin Pathol*, 54: 300-306, 2001.

Mercer TR, Mattick JS. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nat Struct Mol Biol.*, 20(3):300-7, 2013.

Morris KV. Non-coding RNAs, epigenetic memory, and the passage of information to progeny. *RNA Biol*, 6: 242-247, 2009.

Morris KV. Modulation of gene-specific epigenetic states and transcription by non-coding RNAs. *Clin Epigenetics*, 2: 433-437, 2011.

Murr R. Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms. *Adv Genet.* 70:101-41, 2010.

Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, De Vries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 10: 515-527, 2006.

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M, Perou CM. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10:5367–5374, 2004.

Palakurthy RK, Wajapeyee N, Santra MK, Gazin C, Lin L, et al. Epigenetic silencing of the RASSF1A tumor suppressor gene through HOXB3- mediated induction of DNMT3B expression. *Mol Cell* 36: 219–230, 2009.

Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA. Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acids Res*, 26(21):5009-10, 1998.

Perou, CM, Sorlie, T, Eisen, MB, van de Rijn, M, Jeffrey, SS, Rees, CA, Pollack, JR, Ross, DT, Johnsen, H, Akslen, LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lenning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406, 747–752, 2000.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9): e45, 2001.

Ponting CP, Benjamin DR. A novel family of Ras-binding domains. *Trends Biochem Sci*, 21 (11): 422-5, 1996.

Prando EC, Cavalli LR, Rainho C. Evidence of epigenetic regulation of the tumor suppressor gene cluster flanking RASSF1 in breast cancer cell lines. *Epigenetics*, 6(12):1413-1424, 2011.

Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans F. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *Oncologist*, 11: 868-877, 2006.

Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, El-Sayed ME, Benhasouna A, Brunet JS, Akslen LA, Evans AJ, Blamey R, Reis-Filho JS, Foulkes WD, Ellis IO. Triple-Negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res*, 15:2302–2310, 2009.

Rando, OJ. Chromatin structure in the genomics era. *Trends Genet*, 33: 67-73, 2006.

Reeves ME, Baldwin SW, Baldwin ML, Chen S-T, Moretz JM, Aragon RJ, Li X, Strong DD, Mohan S, Amaar Y. Ras-association domain family 1C protein promotes breast cancer cell migration and attenuates apoptosis. *BMC Cancer*, 10: 562, 2010.

Reeves ME, Firek M, Chen ST, Amaar Y. The RASSF1 Gene and the Opposing Effects of the RASSF1A and RASSF1C Isoforms on Cell Proliferation and Apoptosis. *Mol Biol Int*, 145096 doi: 10.1155/2013/145096, 2013.

Reis EM, Nakaya HI, Louro R, Canavez FC, Flatschart AVF, Almeida GT, Egidio CM, Paquola AC, Machado AA, Festa F, Yamamoto D, Alvarenga R, da Silva CC, Brito GC, Simon SD, Moreira-Filho CA, Leite KR, Camara-Lopes LH, Campos FS, Gimba E, Vignal GM, El-Dorry H, Sogayar MC, Barcinski MA, da Silva AM, Verjovski-Almeida S. Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. *Oncogene*, 23: 6684-6692, 2004.

Reis EM, Verjovski-Almeida S. Perspectives of Long Non-coding RNAs in Cancer Diagnostics. *Front Genet*, 8:3:32, 2012.

Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem*, 81:145-66, 2012.

Rivoire WA, Corleta HVE., Brum IS., Capp E. Biologia molecular do câncer cervical. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, 6:447-451, 2006.

Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in healthy and disease. *Nature Rev Genet*, 1(1): 11-19, 2000.

Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene*, 20:3156–3165, 2001.

Sawan C, Vaissière T, Murr R, Herceg Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutat Res*, 642: 1-13, 2008.

Schnitt SJ. Local Outcomes in Ductal Carcinoma In Situ Based on Patient and Tumor Characteristics. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 41: 158-161, 2010.

Singh DK, Prasanth KV. Functional insights into the role of nuclear-retained long noncoding RNAs in gene expression control in mammalian cells. *Chromosome Res*. 21(6-7):695-711, 2013.

Sociedade Brasileira de Mastologia. Subtipos moleculares do câncer de mama. 2011. (Disponível em <http://www.sbmastologia.com.br/cancer-de-mama/tipos-cancer-de-mama/subtipos-moleculares-do-cancer-de-mama-18.htm>).

Strathdee G, Brown R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Expert Rev Mol Med*, 4(4):1-17, 2002.

Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature Rev*, 458: 719-724, 2009.

Taft RJ, Pheasant M, Mattick JS. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *Bioessays*, 29: 288-299, 2007.

Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (6): 3740-3745, 2002.

Ting AH, McGarvey KM, Baylin SB. The cancer epigenome – components and functional correlates. *Genes Dev*, 20: 3215-3231, 2006.

Toyota M, Issa J-PJ. CpG Island Methylator Phenotypes in Aging and Cancer. *Cancer Biol*, 9: 349-357, 1999.

UCSC Genome Browser website. 2014. (Disponível em: <http://genome.ucsc.edu/>).

Union for International Cancer Control. TNM. 2013. (Disponível em <http://www.uicc.org/resources/tnm>).

van der Weyden L, Adams DJ. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1776(1): 58-85, 2007.

van 't Veer LJ, Dai H, Vijver MJ van de, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, Kooy K van der, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415(6871):530-536, 2002.

Volodko N, Gordon M, Salla M, Ghazaleh HA, Baksh S. RASSF tumor suppressor gene family: biological functions and regulation. *FEBS Lett*. 19;588(16):2671-84, 2014.

Vos MD, Ellis CA, Bell A, Birrer MJ, Clark GJ. Ras uses the novel tumor suppressor RASSF1 as an effector to mediate apoptosis. *Journal Biol Chem*, 275, 35669-35672, 2000.

Walsh AL, Tuzova AV, Bolton EM, Lynch TH, Perry AS. Long noncoding RNAs and prostate carcinogenesis: the missing 'linc'? *Trends Mol Med*. 20(8):428-436, 2014.

Wang Y, Fischle W, Cheung W, Jacobs S, Khorasanizadeh S, Allis CD. Beyond the double helix: writing and reading the histone code. *Novartis Found Symp*, 259: 3–17, 2004.

Wang X, Song X, Glass CK, Rosenfeld MG. The long arm of long noncoding RNAs: roles as sensors regulating gene transcriptional programs. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(1):a003756, 2011.

Wang S, Dorsey TH, Terunuma A, Kittles RA, Ambros S, Kwabi-Addo B. Relationship between tumor DNA methylation status and patient characteristics in African-American and European-American women with breast cancer. *PLoS One*, 7(5):e37928, 2012.

Wijnhoven BP, Dinjens WN, Pignatelli M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg*, 87(8): 992-1005, 2000.

Wilusz JE, Sunwoo H, Spector DL. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev*, 23(13):1494-504, 2009.

World Health Organization. Who. 2014. (Disponível em: <http://www.who.int/en/>).

Xu J, Qian J, Hu Y, Wang J, Zhou X, Chen H, Fang JY. Heterogeneity of Li-Fraumeni Syndrome links to unequal gain-of-function effects of p53 mutation. *Sci Rep*, 4:4223, 2014.

Yamamoto T, Taya S, Kaibuchi K. Ras-induced transformation and signaling pathway. *J Biochem*, 126(5):799-803, 1999.

Yang Q, Yoshimura G, Mori I, Sakurai T, Kakudo K. Chromosome 3p and Breast Cancer. *J Hum Genet*, 47: 453-59, 2002.

Yokota J. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 21(3):497-503, 2000.

Zabarovsky ER, Lerman MI, Minna JD. Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene*, 21(45):6915-35, 2002.

Zhang H, Zhu JK. RNA-directed DNA methylation. *Curr Opin Plant Biol*, 14(2):142-7, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE II

A figura abaixo ilustra a análise de integridade do RNA das 20 linhagens celulares derivadas de carcinoma mamário, mostrando amostras com alta qualidade (*RIN* ou *RNA Integrity Number* >8,0).

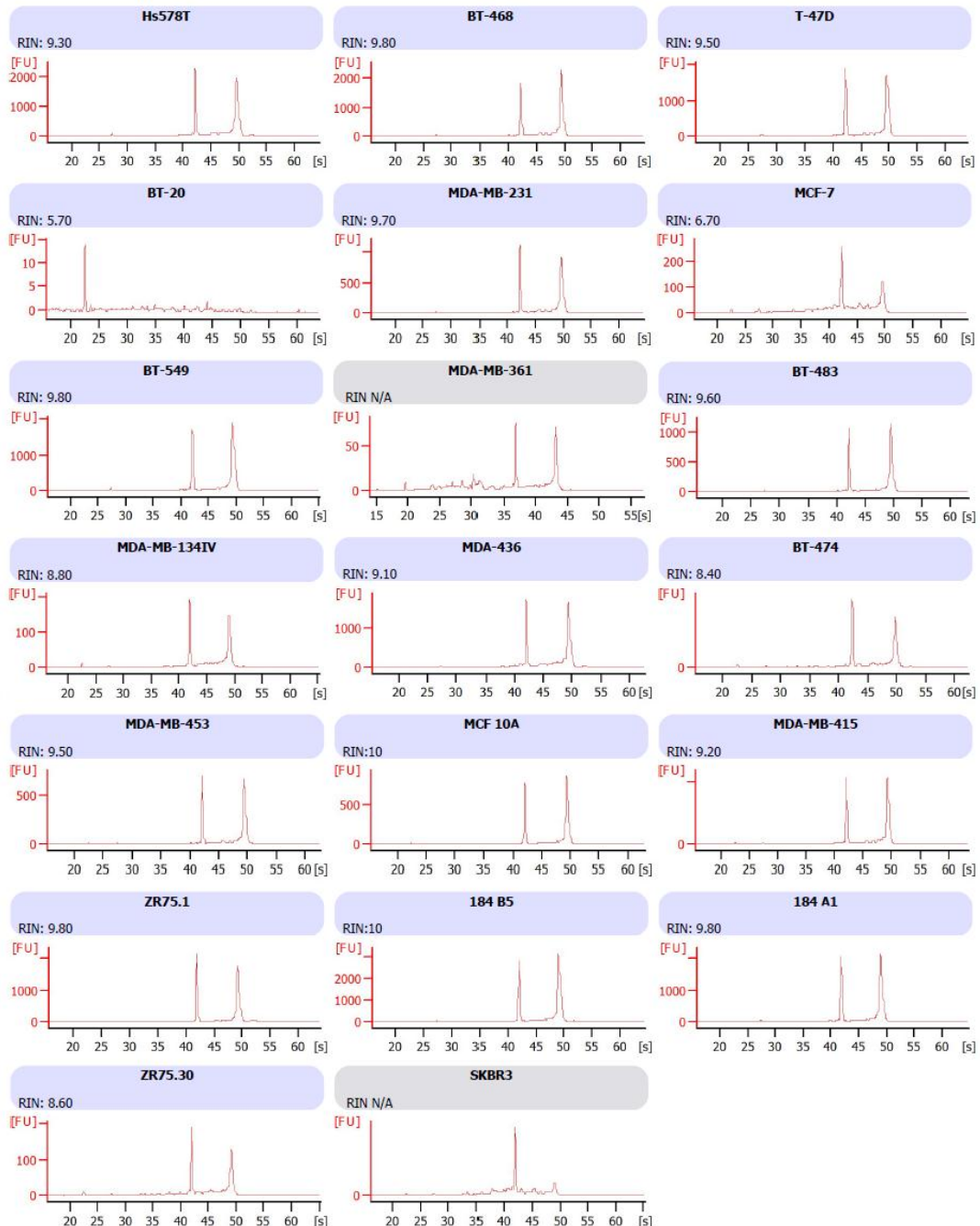


Figura 1. Análise de integridade do RNA após eletroforese microfluídica.

APÊNDICE III

Para a padronização dos ensaios de MS-PCR, foram utilizados DNA hipermetilado e hipometilado, disponíveis comercialmente. Após a modificação do DNA pelo tratamento com bissulfito de sódio, as reações de MS-PCR foram conduzidas com ambos os pares de *primers* em cada amostra. Conforme esperado, o produto correspondente ao alelo metilado foi detectado somente na amostra de DNA controle hipermetilado e o inverso na amostra de DNA controle hipometilado (Figura 2).

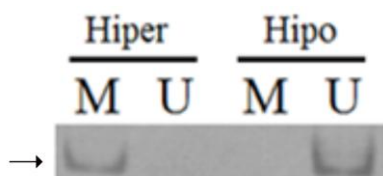


Figura 2. Teste de especificidade do ensaio de MS-PCR para a ilha CpG 139. Hiper: reação com DNA hipermetilado; Hipo: reação com DNA hipometilado; M: reação com *primers* que identificam região metilada; U: reação com *primers* que identificam região não-metilada. A seta indica o produto de 115 pb (M: 115pb; U: 113pb).

Para a detecção do *non-coding* RNA intrônico do gene *RASSF1* (*ANRRASF1*), inicialmente testes preliminares para a padronização das condições de reações foram realizadas com amostras de DNA de linhagens celulares selecionadas ao acaso (Figura 3). Em adição, para o par de *primers* número 1, foi realizada uma reação de PCR com DNA genômico da linhagem MDA-MB-453 com diferentes temperaturas de *annealing*, como tentativa de eliminar bandas inespecíficas e verificar qual das temperaturas é a mais eficiente para obtenção do produto (Figura 3).

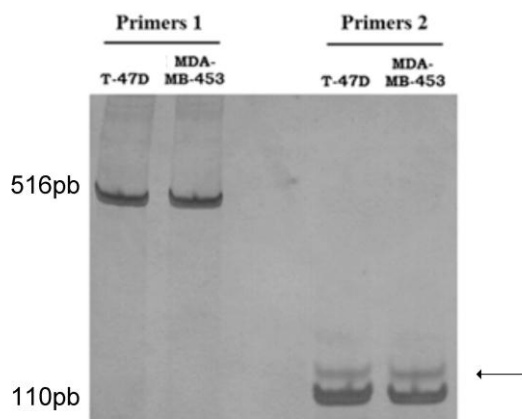


Figura 3. Reação de PCR para validação dos pares de *primers* para detecção do *ANRRASF1*, utilizando como molde na PCR DNA genômico das linhagens T-47D e MDA-MB-453. Os pares de *primers* 1 e 2 correspondem aos descritos na tabela 3 do item Material e Métodos. A seta indica fragmento amplificado inespecífico.

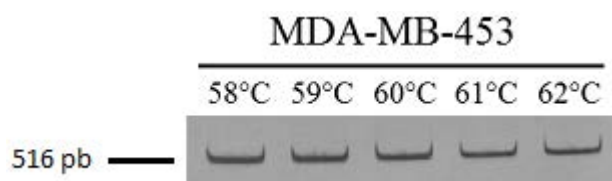


Figura 4. Reação de PCR com *primer* número 1, utilizando como molde DNA genômico da linhagem MDA-MB-453, com gradiente de temperatura de *annealing*.

Para a determinação dos níveis de expressão de *ANRASSF1* por RT-PCR quantitativa em tempo real, foram realizados testes preliminares para a determinação da eficiência do transcrito alvo e do controle endógeno (*GAPDH*), utilizado como normalizador (Figura 5).

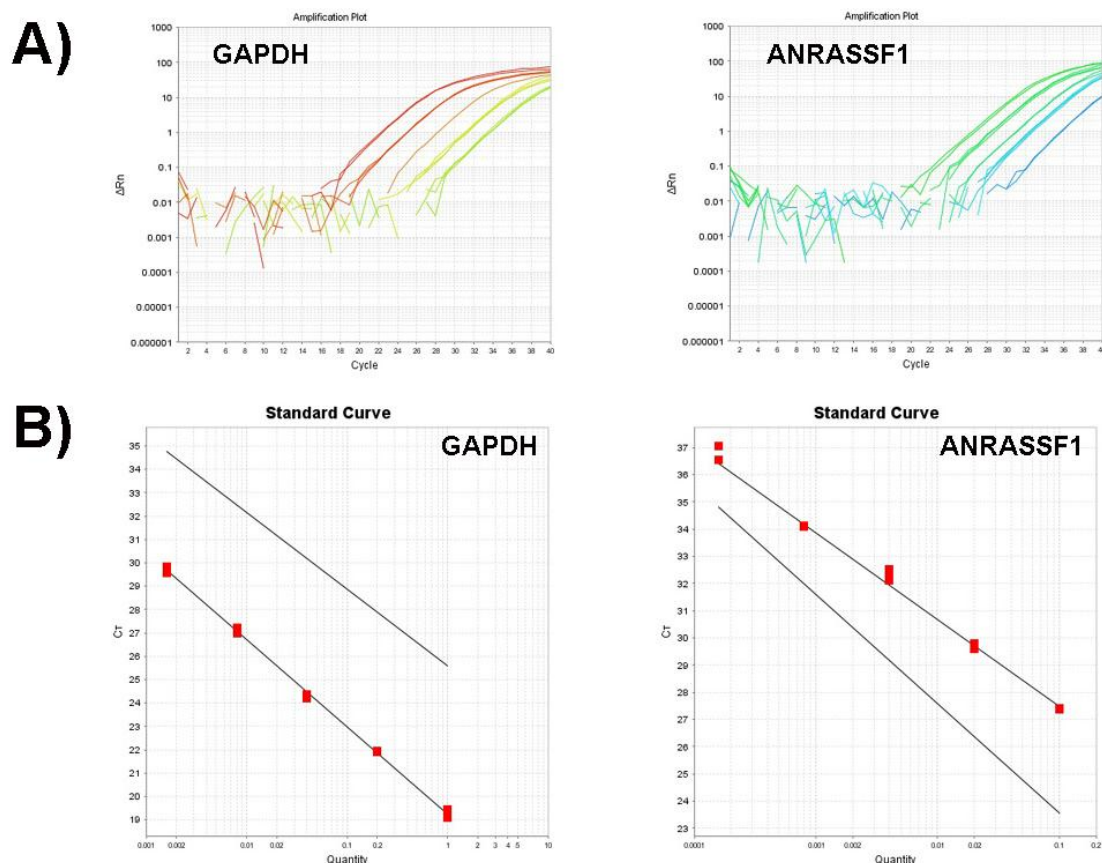


Figura 5. Avaliação da eficiência de reação a partir de diluições seriadas utilizadas na construção da curva padrão. *Amplification plot* e curva padrão do transcrito alvo *ANRASSF1* e do gene de referência *GAPDH*. (*ANRASSF1*: slope=-3,188; Y-intercept=24,299; $R^2 = 0,987$ e Eficiência = 105,886%; *GAPDH*: slope=-3,72; Y-intercept= 19,264; $R^2 = 0,998$ e Eficiência = 85,715%).