



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Alterações epigenéticas e do número de cópias do gene *SFN* em carcinomas mamários

Danielle Barbosa Brotto

Botucatu-SP

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Julio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Alterações epigenéticas e do número de cópias do gene *SFN* em carcinomas mamários

Danielle Barbosa Brotto

Profa. Dra. Cláudia Aparecida Rainho

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, campus 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

Brotto, Danielle Barbosa.

Alterações epigenéticas e do número de cópias do gene SFN em carcinomas
mamários / Danielle Barbosa Brotto. - Botucatu, 2014

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

Orientador: Cláudia Aparecida Rainho

Capes: 20205007

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

Palavras-chave: Alterações no número de cópias; Câncer de mama; Gene SFN;
Marcador prognóstico; Metilação do DNA.

DANIELLE BARBOSA BROTTTO

Alterações epigenéticas e do número de cópias do gene *SFN* em carcinomas mamários

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Orientador: Profa. Dra. Cláudia Aparecida Rainho

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Cláudia Aparecida Rainho (orientador)
Departamento de Genética, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP

Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira
Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

Dr. Vinícius Santana Nunes
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, UNIFESP

Botucatu, 15 de Setembro de 2014.

“Deves saber que foste criado para gloriosa ascensão, mas que só é fácil descer. Subir exige trabalho, paciência e perseverança. Condições essenciais para o encontro do amor e da sabedoria.”

Emmanuel

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade dos caminhos trilhados.

Aos meus pais, Marcos e Ligia por conduzirem minha formação, bem como dos meus irmãos, através do respeito e da humildade, priorizando e apoiando os estudos. Os principais responsáveis pelo meu sucesso.

Aos meus irmãos Igor, Juninho e Rodrigo pelo apoio fraterno e sincero.

A minha avó Marlene, sempre interessada nos meus estudos, cuja delicada presença se tornou alicerce importantíssimo.

À Rafael Rodrigues pelo total apoio e cuidado que guardo com carinho.

À minha orientadora Dra. Cláudia Aparecida Rainho pela grande oportunidade de aprendizado e pela valorosa orientação.

Às pacientes que fizeram parte do estudo, que tanto contribuíram, e que sem as quais seria impossível a realização desse trabalho.

Ao Dr. José Roberto Fígaro Caldeira pela disponibilidade e pela colaboração na doação das amostras.

À Dra. Érika da Costa Prando pela colaboração no trabalho, complementando o nosso estudo.

À Dra. Luciane Regina Cavalli pela doação das linhagens celulares utilizadas.

Ao Dr. Marco Antonio Rodrigues Fernandes pela valiosa colaboração no trabalho, através da irradiação das células.

À Dra. Maria Isabel Nogueira Cano pelo empréstimo do espectrofotômetro para análise das culturas celulares.

À Comissão examinadora pela disponibilidade e empenho em contribuir para a minha evolução na carreira acadêmica.

Aos amigos da pós-graduação que tornaram a minha vinda para Botucatu mais feliz e prazerosa, agradeço pela amizade e por todos os bons momentos, sempre com muitas risadas. À Ana Paula, pela amizade e também pelo companheirismo no laboratório.

Aos queridos amigos do grupo de inglês, pelo interesse e motivação.

Às amigas de Cuiabá, em especial Joisi, Carol e Greyce que mesmo com a distância, se fizeram presentes.

Ao Conselho de Desenvolvimento Nacional Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro concedido.

Lista de Abreviaturas

5-Aza-dC - 5-Aza-2'-Desoxicitidina

ACS – *American Cancer Society*

BER – *Base Excision Repair* (Reparo por excisão de bases)

CDK – *Cyclin-dependent Kinase* (Cinases dependentes de ciclinas)

cGy - Centigrey

CNV – *Copy Number Variation* (Variação no número de cópias)

COSMIC – *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*

DCIS – *Ductal Carcinoma in situ* (Carcinoma ductal *in situ*)

DNMT - *DNA methyltransferase*

IBC – *Infiltrating Breast Cancer* (Câncer de mama infiltrante)

IDC – *Infiltrating Ductal Carcinoma* (Carcinoma ductal infiltrante)

ILC – *Infiltrating Lobular Carcinoma* (Carcinoma lobular Infiltrante)

INCA - Instituto Nacional do Câncer

IR – *Ionizing Radiation* (Radiação ionizante)

LCIS – *Lobular Carcinoma in situ* (Carcinoma Lobular *in situ*)

LOH – *Loss of heterozygosity* (Perda de heterozigose)

MMR – *Mismatch Repair* (Reparo por perda de pareamento)

NER – *Nucleotide Excision Repair* (Reparo por excisão de nucleotídeo)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

TNBC – *Triple Negative Breast Cancer* (Câncer de mama triplo negativo)

TNM – Classificação de estadiamento do câncer (T: Tumor, N: Linfonodo, M: Metástase)

TSG – *Tumor Suppressor Gene* (Gene supressor tumoral)

UICC - *Union for International Cancer Control*

UTDL - Unidade terminal ducto-lobular

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

Sumário

INTRODUÇÃO	14
Câncer	15
Câncer de mama	19
Historia Natural da Doença	19
Epidemiologia e fatores de risco	20
Parâmetros prognósticos	23
Tipo histológico e envolvimento axilar	23
Tamanho do tumor	23
Classificação molecular	25
Diagnóstico e tratamento	25
Epigenética do câncer	26
A família 14-3-3	30
14-3-3 σ	32
OBJETIVOS	13
Objetivos Gerais	39
Objetivos Específicos	39
MATERIAL E MÉTODOS	40
Amostras biológicas	42
Carcinomas mamários primários	42
Linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários	43
Análise de alterações no número de cópias do gene SFN em carcinomas primários e em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários.	43
Extração do DNA de amostras de carcinomas mamários	44
Análise da metilação do gene SFN em carcinomas primários e em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários	45
Tratamento do DNA com Bissulfito de Sódio	45
Análise da metilação do gene SFN pela técnica de MS-PCR (Methylation Specific – Polymerase Chain Reaction)	46
Análise de expressão do gene SFN em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários	47

Purificação de RNA e síntese de cDNA	47
Padronização do ensaio de expressão gênica em tempo real (qRT-PCR)	49
Análise de expressão gênica do gene SFN em linhagens celulares derivadas de câncer de mama	50
Análise in vitro do efeito do tratamento com o agente desmetilante 5'-Aza-Desoxicitidina e exposição à radiação ionizante	51
Exposição das linhagens celulares de carcinoma mamário à radiação ionizante	51
MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)	52
Análise estatística	52
REFERÊNCIAS	54
MANUSCRITO	67
Abstract	69
Background	70
Results	71
Discussion	74
Materials and Methods	78
Acknowledgments	82
References	83
Figures	92
Tables	95
Supplementary Data	97
CONCLUSÕES	103

Resumo

O gene *SFN* (*stratifin*; 14-3-3sigma) atua como um gene supressor tumoral cuja expressão é induzida em resposta a danos ao DNA, promovendo o bloqueio do ciclo celular no *checkpoint* G2/M. A inativação ou redução da expressão gênica por hipermetilação de sua ilha CpG foi apontada como um mecanismo comum a vários tipos de cânceres humanos e também foi associada com resposta ao tratamento. O objetivo desse estudo foi caracterizar alterações genéticas e epigenéticas do gene *SFN* em carcinomas mamários primários e investigar a sua relação com parâmetros clínicos e histopatológicos. Em adição, linhagens derivadas de epitélio mamário normal e de carcinomas mamários foram utilizadas para a caracterização do efeito do número de cópias e do padrão de metilação do DNA na expressão gênica e para o estudo do efeito combinado do tratamento com o agente desmetilante 5-Aza-dC (5-Aza-2'-Desoxicitidina) e da exposição à radiação nas taxas de sobrevivência celular. O padrão de metilação do DNA foi determinado por MS-PCR (*Methylation Specific-Polimerase Chain Reaction*), após modificação do DNA por bissulfito de sódio, em uma série de 84 carcinomas mamários (76 ductais infiltrantes, 5 lobulares infiltrantes, 1 metaplásico, 1 apócrino e 1 papilífero), bem como em um painel de 20 linhagens celulares (3 normais e 17 derivadas de carcinomas). O número de cópias foi determinado por qPCR (*quantitative Polimerase Chain Reaction*) em 82 destas amostras. Os níveis de expressão do transcrito foram avaliados por RT-qPCR em 8 linhagens celulares selecionadas com base no número de cópias, padrão de metilação e o *status* da proteína p53. O efeito da exposição à radiação ionizante, em uma única dose de 4 Gy em intervalos de tempo de 12, 24, 48 e 72h foi estudado através do ensaio de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) em três linhagens celulares (T47D, MDA-MB-231 e MDA-MB-436) tratadas ou não com o agente desmetilante 5Aza-dC. A metilação do gene *SFN* foi observada em aproximadamente 79% dos carcinomas primários, enquanto as alterações no número de cópias ocorreram em baixas frequências. A análise univariada mostrou que o estadiamento clínico ($p=0,0045$), o envolvimento de linfonodos ($p=0,0189$) e a ocorrência de metástase ($p=0,0003$) foram parâmetros prognósticos independentes associados com as taxas de sobrevida doença-específica. Dentre as 76 amostras de carcinomas ductais infiltrantes, a ausência de metilação do gene *SFN* foi associada a uma menor taxa de sobrevida (teste de *Log-rank*, $p=0,0036$) e com a ocorrência de metástase (teste exato de *Fisher*, $p=0,021$). Conforme esperado, nas linhagens celulares o nível de expressão gênica foi dependente do padrão de metilação e do número de cópias gênicas. O tratamento com 5-Aza-dC reativou a expressão nas linhagens com metilação do

gene *SFN* (BT-483 e MDA-MB-436), porém o aumento de expressão foi modesto na linhagem Hs578T. A análise do efeito combinado do tratamento com 5-Aza-dC e exposição à radiação mostrou a maior sensibilização nas linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-436 (subtipo basal), mas um efeito oposto foi detectado na linhagem T47D (subtipo luminal). Os resultados confirmam que a metilação do gene *SFN* ocorre em alta frequência em carcinomas mamários; porém, pacientes com tumores não metilados possuem um pior prognóstico. As diferenças observadas após o tratamento com 5-Aza-dC seguido da exposição à radiação podem estar correlacionadas com o *status* de metilação primário dessas linhagens. Contudo, estudos adicionais são necessários para investigar a potencial função do gene *SFN* como marcador prognóstico e preditivo.

Palavras-chave: câncer de mama, gene *SFN*, metilação do DNA, alteração do número de cópias, marcador prognóstico.

Abstract

The *SFN* gene (Stratifin; 14-3-3 sigma) plays roles as a tumor suppressor gene and its expression is induced in response to DNA damage by disabling the cell cycle arrest at the G2/M checkpoint. Inactivation or down-regulation of gene expression levels has been generally attributed to the hypermethylation of its CpG island, identified as a common mechanism in a variety of human cancers, also associated to treatment response. The aim of the present study was to characterize epigenetics and genetics alterations of the *SFN* gene in primary breast cancer and to investigate the relationship with clinical and histopathological variables. In addition, cell lines derived from normal breast and breast cancer tissues, were employed to identify the effect of copy number dosage and DNA methylation pattern in gene expression, besides the study of combined response to 5-Aza-dC (5-Aza-2'-Deoxycytidine) and radiation exposure on cell survival. After sodium bisulfite modification, the DNA methylation pattern was determined by Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction (MS-PCR) in a series of 84 Breast cancer samples (76 infiltrating ductal carcinomas, 5 infiltrating lobular, 1 metaplastic, 1 apocrine and 1 papillary) as well as in a panel of 20 human cell lines (3 derived from normal breast and 17 from breast cancer). *SFN* copy number was performed using relative quantification, by qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) in 82 samples. Transcript levels were evaluated by RT-qPCR within a selection of 8 cell lines, based on DNA methylation, *SFN* copy number dosage and p53 *status*. Ionizing radiation effect was studied through MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, by using a single dose of 4 Gy at different time intervals (12, 24, 48 and 72h) in three cell lines (T47D, MDA-MB-231 e MDA-MB-436) treated or not with 5-Aza-dC. *SFN* methylation was observed in 79% of primary breast cancer, while copy number alterations occurred at lower frequencies. Univariate analysis showed that clinical stage ($p=0.0045$), lymph nodes involvement ($p= 0.0189$) and metastasis occurrence ($p= 0.0003$) were independent parameters related to disease-specific survival rate. Amongst 76 infiltrating ductal carcinomas, absence of *SFN* methylation was associated with a decreased overall survival (Log-rank test, $p=0.0036$) and metastasis occurrence (Fisher's exact test, $p= 0, 021$). As expected, breast cell lines showed gene expression levels reliant to methylation pattern and gene copy number. 5-Aza-dC treatment lead to reactivation of *SFN* gene expression in methylated cell lines (BT-483 e MDA-MB-436), with a mild reactivation in Hs578T cell line. The combination of 5-Aza-dC and radiation exposure showed greater effect in MDA-MB-231 and MDA-MB-436 (basal subtype), though the opposite was seen in T47D cell line (luminal subtype). These findings endorse that abnormal *SFN*

methylation occurs in high frequencies in breast cancers, nevertheless, patients with unmethylated tumors exhibit a worst prognosis. Primary methylation status of the cell lines might be related to differences in responses after 5-Aza-dC followed by radiation exposure. However, further studies are necessary to investigate the potential role of the *SFN* gene as useful prognostic and predictive marker.

Key-words: breast cancer, *SFN* gene, DNA methylation, copy number alterations, prognostic marker.

Câncer

O câncer é um problema de saúde global. Não obstante o amplo avanço do conhecimento em relação ao diagnóstico e tratamento, a doença ainda permanece entre as maiores causas de morbidade e mortalidade. No ano de 2012, foram relatados 14,1 milhões de novos casos de câncer na população mundial, 8,2 milhões de mortes e estimou-se que nesse mesmo ano 32,6 milhões de pessoas no mundo viviam com a doença (IARC, 2012).

Estudos indicam que o câncer é uma doença de natureza multifatorial, isto é, ocorre devido a combinações entre fatores genéticos, estilo de vida, hábito reprodutivo e ambiente. Sobretudo, sua origem submete-se essencialmente aos genes e sua adequada expressão. Cerca de 90 a 95% das neoplasias originam-se esporadicamente, a partir de mutações adquiridas em células somáticas, e 5 a 10% dos cânceres são hereditários, devido ao histórico familiar e segregação de mutações presentes na linhagem germinativa (Johnson-Thompson & Guthrie, 2000).

Câncer é um termo genérico para designar o crescimento anormal e descontrolado das células em um tecido. Por sua vez, existem mais de 100 tipos diferentes dessa doença, que pode afetar qualquer tecido do corpo. No entanto, as neoplasias malignas humanas apresentam um desenvolvimento complexo. As células passam por várias etapas até adquirirem características que as tornem tumorigênicas e, finalmente, cancerosas, incluindo alterações nas vias de sinalização de proliferação, bloqueio da ação de genes supressores, evasão do sistema imune, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, promoção da inflamação tumoral e angiogênese com início da invasão e metástases, estando todos esses passos subjacentes à instabilidade genômica (Hanahan & Weinberg, 2011).

Nos tecidos normais, a dinâmica do processo de divisão celular é bastante heterogênea. Ela ocorre por meio de uma série de eventos coordenados e associados a processos nucleares e citoplasmáticos, incluindo mecanismos de controle rigorosos envolvendo genes e proteínas regulatórias que atuam em diferentes etapas do ciclo celular. Dentre as moléculas implicadas nos ciclos de divisões celulares, as cinases dependentes de ciclinas (CDKs) são uma das principais responsáveis pela transição das fases do ciclo em células eucarióticas, sendo estreitamente reguladas por sinais intra e extracelulares. As CDKs agem em conjunto com as ciclinas, na regulação positiva do ciclo celular, acelerando a sua progressão (Van de Heuvel & Harlow, 1993).

Para que a dinâmica tecidual seja íntegra, existe um equilíbrio entre a proliferação e a morte celular (controle do ciclo celular e apoptose, respectivamente), que proporciona a integridade dos tecidos através de um complexo sistema de sinalização intra e extracelulares. A perda desse

equilíbrio é consequência de alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem no genoma e que podem ser associadas a uma maior capacidade de proliferação. Entretanto, para a formação do tumor é necessária a ocorrência de eventos adicionais e sucessivos em diferentes genes (Parmigiani & Camargo, 2010).

Um tumor não é definido apenas como uma massa de células se proliferando, mas compreende um tecido complexo composto por diferentes tipos celulares com funções e interações distintas (Gerlinger *et al.*, 2012). São considerados 3 passos para que ocorra a carcinogênese, que se correlacionam com alterações ou perdas em vias regulatórias: iniciação, promoção e progressão. A iniciação ocorre com o dano primário ao DNA, mutando ou alterando a sequência de genes envolvidos na sinalização, proliferação celular e reparo da fita de DNA. A promoção/progressão é caracterizada pelo aumento da instabilidade genômica, seguida pela proliferação autônoma das células e início da malignização (Yokota, 2000).

Segundo Stratton *et al.*, 2009, é possível estabelecer uma comparação entre a evolução Darwiniana e a patogênese do câncer que ocorre entre populações de células com microambientes diferentes, fornecidos pelos tecidos. Em teoria, a seleção eliminaria células que adquiriram mutações deletérias; no entanto, uma minoria adquire mutações suficientes que permitem a proliferação anormal, invasão dos tecidos vizinhos e a formação de metástases (Stratton *et al.*, 2009).

Durante o processo de carcinogênese, surgem clones derivados das células normais, formados através de divisões mitóticas consecutivas. Assim, o seu genoma é quase idêntico ao das células normais, exceto por ter adquirido inúmeras alterações no DNA que foram transmitidas das células genitoras à prole. A evolução de uma célula normal para uma célula metastática imortalizada requer a perda da regulação de inúmeros processos celulares e as alterações pertinentes ao câncer mais conhecidas são as que alteram a estrutura da molécula de DNA, dentre elas estão as substituições de bases, inserções ou deleções, rearranjos cromossômicos por quebra ou erro de pareamento, aumento ou diminuição do número de cópias que levam às alterações nas funções de genes específicos (Vogelstein & Kinzler, 2004; Stratton *et al.*, 2009).

Com o aprimoramento de estudos na área oncológica, novos conceitos foram desenvolvidos e notáveis progressos acrescentaram outra dimensão de complexidade ao desenvolvimento das neoplasias (Hanahan & Weinberg, 2011). Cada tumor tem características únicas e carrega inúmeras alterações genéticas. Há um grande interesse em identificar fatores que contribuam para a proliferação desordenada das células e determinar os mecanismos de desenvolvimento da doença (Akavia *et al.*, 2010).

A princípio o câncer é uma doença genética. Sabe-se que mutações somáticas podem ocorrer no genoma de todas as células normais, enquanto células cancerosas acumulam mutações adicionais

durante os ciclos de divisão celular, e essa taxa de aquisição e o tipo de mutação que é obtida podem aumentar através da exposição a agentes genotóxicos, que por sua vez, podem ou não serem atenuados pelas vias de reparo do DNA (Stratton, 2011). Dessa maneira, tais mutações se distribuem randomicamente, podendo diferir de forma marcante entre os tipos tumorais e apresentar um padrão de alterações nos diferentes tipos de câncer (Lawrence *et al.*, 2013).

Em vista disso, há um acúmulo de dados que visam identificar a diversidade de processos mutacionais subjacentes à carcinogênese humana, mostrando que existe uma complexidade e diversidade em tais processos, e, conforme cresce em quantidade os estudos de sequenciamento completo do genoma, cresce em precisão as definições dessas assinaturas mutacionais que por sua vez, possibilita a melhor caracterização do genoma do câncer entre uma gama de tipos da doença (Alexandrov *et al.*, 2013; Alexandrov & Stratton, 2014).

Diferentes mecanismos mutacionais podem resultar na variação da função gênica, e os eventos pelos quais acontecem variam entre os tipos tumorais. Dentre as mutações que podem ocorrer no DNA de uma célula, as variações no número de cópias (CNV – *Copy Number Variation*) são componentes importantes da variação genética afetando uma grande fração do genoma e sua caracterização vem revelando a relação com a suscetibilidade a doenças, incluindo o câncer (Feuk *et al.*, 2006). Observou-se que CNVs são muito frequentes em tumores sólidos, e por essa razão, inúmeros estudos buscam identificar genes frequentemente desbalanceados que influenciam na biologia do câncer e que podem ter uma aplicação clínica (Albertson *et al.*, 2003).

As técnicas utilizadas para a identificação de aberrações em genes importantes para o desenvolvimento tumoral, detectam uma gama de anormalidades e desequilíbrios na dosagem de alelos que podem ocorrer por aneuploidia, translocação não-recíproca, ampliações, recombinação mitótica e deleção seguida de duplicação que podem levar à perda de heterozigose (Albertson *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004).

Existe uma classificação didática que separa três categorias de genes que quando alterados podem contribuir para a carcinogênese, que são: oncogenes, os genes das vias de reparo do DNA e os genes supressores tumorais. Células normais são reguladas ou ativadas por vias de transdução de sinais, respondendo a fatores extracelulares como os hormônios. Estas vias agem, por exemplo, induzindo uma sequência de proteínas que realizam o controle positivo da divisão celular. Cada uma dessas proteínas é codificada por genes denominados proto-oncogenes, que controlam a atividade normal do ciclo. Sua forma alterada é denominada oncogene e podem levar à perda da regulação do ciclo celular. A ativação de oncogenes pode resultar de translocações, mutações de ponto e amplificação gênica. Tais alterações tem efeito dominante, e fornecem ganho de função ao gene ou hiperexpressão, podendo aumentar a atividade celular. Como exemplos de oncogenes, pode-se citar o

gene *RAS* (mutação de ponto), o gene *MYC* (translocação), *HER2* (amplificação gênica) (Levine, 1995; Vogelstein & Kinzle, 2004).

Os genes de reparo ao dano, também denominados de *caretakers*, não são capazes de induzir a formação de neoplasias por si só, pois quando alterados não conferem vantagem proliferativa à célula, porém, são importantes para manter a integridade do material genético, evitando a instabilidade genômica. Incluem-se nesse grupo os genes de reparo de *mismatch* (MMR - *mismatch repair*), de reparo por excisão de nucleotídeos (NER- *nucleotide-excision repair*) e reparo por excisão de bases (BER- *base-excision repair*), todos esses genes são responsáveis por reparar danos causados por erro no pareamento ou adição de bases e segregação cromossômica. *BRCA1* e *BRCA2* são exemplos de genes da classe *caretakers* (Vogelstein & Kinzle, 2004).

Diferentemente dos oncogenes e *caretakers*, os produtos de genes supressores tumorais (TSG, do inglês: *Tumor Suppressor Genes*) são componentes de vias de sinalização de inibição e agem regulando negativamente o ciclo celular, diretamente, através dos *checkpoints*, e caso haja um dano ao DNA, a progressão do ciclo é inibida. As mutações que ocorrem em tais genes são recessivas, portanto são necessárias alterações nos dois alelos, materno e paterno, para que ocorra a perda de função. Assim, quando mutados ou silenciados deixam de exercer suas atividades através de processos específicos de cada gene. Contudo, o resultado é o mesmo: perda da regulação negativa do ciclo celular. A perda de função de TSGs se dá através de deleções, rearranjos cromossômicos por quebra ou erro de pareamento, além do silenciamento gênico por processos epigenéticos. Como exemplo de genes supressores tumorais pode-se citar o *TP53* e *RBI* (Levine, 1995; Vogelstein & Kinzle, 2004;).

O primeiro gene supressor tumoral descrito foi o gene *RBI*, que está associado ao desenvolvimento do retinoblastoma. A descoberta desse gene colaborou no entendimento de que o câncer se forma através do acúmulo de mutações no DNA em uma célula, tal hipótese foi proposta pela primeira vez por Carl O. Nordling em 1953 e posteriormente formulada por Alfred G Knudson em 1971. Segundo a hipótese de Knudson (1971), o retinoblastoma é causado por dois eventos mutacionais. Na forma hereditária da doença, uma mutação é herdada através das células germinativas e a outra é adquirida pelas células somáticas. Na forma esporádica, as duas mutações ocorrem em células somáticas (Knudson, 1971).

Nos últimos anos, cresce a lista de genes supressores tumorais (ou genes candidatos a TSGs) que estão inativados por eventos epigenéticos ao invés de mutações clássicas como as deleções. A hipermetilação de promotores de TSGs é um dos eventos mais estudados e também estão relacionados ao câncer, fornecendo pistas das implicações dos eventos epigenéticos e de como estão

envolvidos nos processos neoplásicos (Herman, 1999; Esteller, 2002; Park *et al.*, 2011; Groot *et al.*, 2014).

Câncer de mama

Historia Natural da Doença

A mama é considerada uma glândula modificada, formada por um sistema de ductos ramificados que se dividem em unidade terminal ducto-lobular (UTDL), considerada a unidade anatomo-funcional da mama, e os grandes ductos. No desenvolvimento da mama, o crescimento dos ductos e a diferenciação lobular ocorrem sob o efeito cíclico da secreção de estrogênio e progesterona. Por essa razão, o tecido mamário é considerado hormônio-dependente, além do papel relevante dos hormônios sexuais na diferenciação do tecido, hormônios de crescimento, glicocorticoides e outros fatores de crescimento (EGF-*Epidermal growth factor*, IGF- *Insulin-like growth factor* e TGF- *transforming growth factor*) também contribuem de forma significativa (Shmitt & Gobi, 2011).

Nas mulheres, o desenvolvimento da mama inicia-se na puberdade, com alterações no parênquima mamário, e se prolonga durante os ciclos menstruais. Portanto, na carcinogênese mamária, o período entre a menarca e a primeira gestação a termo é considerado como a época de maior suscetibilidade no processo de iniciação da carcinogênese, devido ao intenso estímulo de hormônios sexuais que mantém a proliferação celular. Por essa razão, a gestação precoce ao induzir a mama ao auge de sua maturação, reduz a suscetibilidade do desenvolvimento neoplásico, enquanto que a exposição estendida aos ciclos hormonais eleva os riscos da carcinogênese (Travis & Key, 2003; Walker *et al.*, 2011).

Os carcinomas mamários podem ser classificados quanto à localização e extensão em carcinoma *in situ* ou invasivo. E ainda, quanto à sua diferenciação, em tipo ductal ou tipo lobular. O carcinoma *in situ* distingue-se do invasivo por ser considerado restrito aos ductos mamários com ausência de infiltração estromal (Shmitt & Gobi, 2011). Apesar disso, o carcinoma *in situ* da mama apresenta muitas vezes um grupo heterogêneo de lesões, reforçado por diferenças histopatológicas e de comportamento clínico variável, que pode ou não evoluir para um carcinoma invasivo (O'Connel *et al.*, 1994).

A composição e estrutura do tecido mamário refletem na história natural do câncer de mama, que é descrita como um processo de múltiplos passos. Primeiramente ocorre a transformação das células normais, através da formação de hiperplasia, seguido pela transição de hiperplasias, para hiperplasias com atipias. O próximo passo pode ser o desenvolvimento do carcinoma *in situ* (ductal ou lobular), e a eventual evolução para o carcinoma invasivo, de forma que sobrevenha a metástase, que é descrita pelo deslocamento de células transformadas do tumor de origem e alcance de outros linfonodos ou mesmo tecidos e órgãos distantes (O’Connel *et al.*, 1994; Kenemans *et al.*, 2008).

Por esse motivo, o carcinoma mamário não é considerado uma entidade única, mas é definido como uma neoplasia que envolve uma variedade de tipos celulares, com morfologia e comportamentos distintos. Existem dois conceitos que buscam explicar a geração dessa enorme heterogeneidade dentro de um único tumor: a hipótese baseada em células tronco tumorais e o modelo de evolução clonal. O primeiro descreve que um subconjunto de células tumorais pode possuir propriedades de células tronco (*Cancer Stem Cells*). Essas células teriam a capacidade de se auto-renovarem e de se diferenciarem produzindo tipos celulares diferentes em um mesmo tumor. Já o modelo de evolução clonal explica que com o tempo as células cancerígenas adquirem várias combinações de mutações dentro do mesmo tumor que levam à seleção natural onde células com maior capacidade de proliferação passam a dirigir a progressão tumoral (Reya *et al.*, 2001; Campbell & Polyak 2007).

Epidemiologia e fatores de risco

O câncer de mama apresenta-se como o tipo de neoplasia com maior incidência em mulheres de todo o mundo. De acordo com estatísticas da Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2011 estimou-se que cerca de 508.000 mulheres morreram devido ao câncer de mama no mundo (Global Health Estimates – WHO, 2013). Os coeficientes de mortalidade aumentam a cada ano, enquanto que os índices de sobrevivência globais apresentam grande variação, de forma que as menores taxas são observadas em países menos desenvolvidos, com destaque para o leste da África, e com as maiores incidências no norte da Europa e na América do Norte (Yip *et al.*, 2006).

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, as taxas de mortalidade também encontram-se elevadas. Em 2011, 13.345 pessoas morreram pela doença, sendo 120 homens e 13.225 mulheres. As estimativas para o ano de 2014 chegam a 57.120 novos casos de câncer de mama. A região Sudeste possui uma estimativa de 30.740 novos casos da doença para o ano 2014. Estima-se que somente o estado de São Paulo possuirá 16.160 novos casos, o que corresponde a um risco

estimado de 73,21 para cada 100 mil mulheres. Contrastando com o sudeste brasileiro, a estimativa de novos casos para a região Centro-Oeste é de 3.800 novos casos, com um risco estimado de 51,30 casos para cada 100 mil mulheres. A disparidade na estimativa entre regiões chama atenção para a influência do estilo de vida e a dieta no desenvolvimento do câncer; ainda mais importante é a implantação de centros especializados em diagnóstico e prevenção (INCA, 2014) [Figura 1].

Se tratado oportunamente, o câncer de mama pode ser considerado de bons fatores prognósticos. Contudo, a carência de centros especializados em diagnóstico e tratamento, bem como a falta de programas que permitam a detecção precoce da doença, resultam em alta proporção de mulheres diagnosticadas em estádios avançados do desenvolvimento neoplásico, especialmente em países menos desenvolvidos (Global Health Estimates – WHO, 2013; INCA, 2014).

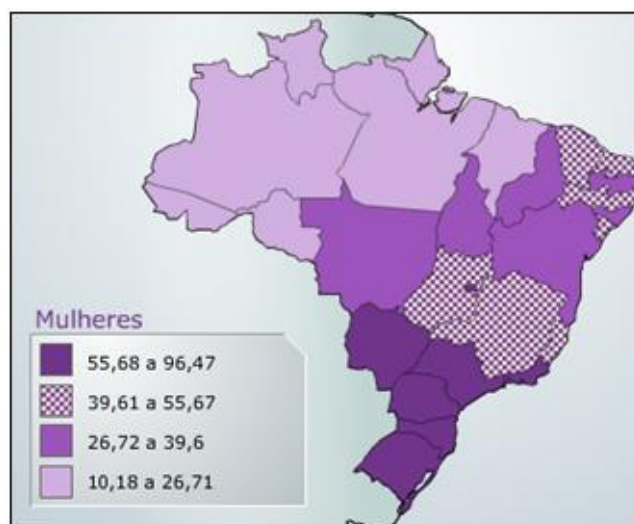


Figura 1. Taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2014, por estados (Neoplasia maligna da mama, retirado do *website* do Instituto nacional do Câncer-INCA. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/mapa.asp?ID=13>. Acesso em: 27 de fevereiro de 2014).

O curso clínico e a sobrevida das pacientes com câncer de mama variam enormemente. No entanto, existem diversos fatores que podem conferir maior ou menor risco para o desenvolvimento e progressão da neoplasia. Apesar do câncer de mama ter base fundamentalmente genética, está comprovado que é igualmente uma doença multifatorial, ou seja, é causada por uma combinação de fatores ambientais e genéticos (Johnson-Thompson & Guthrie, 2000).

Ainda que a etiologia da doença não esteja de fato esclarecida, a história familiar é um dos determinantes de risco mais importantes. Estima-se que cerca de 5 - 10 % dos casos de câncer de

mama são devido à predisposição genética (Kenemans *et al.*, 2004). O câncer de mama hereditário caracteriza-se pela predisposição herdada ao desenvolvimento da doença. Existem genes de alta penetrância que estabelecem um risco alto de desenvolvimento da neoplasia mamária, por exemplo, os genes *BRCA1*, *BRCA2* (*Breast Cancer 1 e 2*), *TP53* (*Tumor Protein p53*) e *PTEN* (*Phosphatase and Tensin Homolog*). Mutações germinativas nesses genes estão associadas ao risco elevado para a carcinogênese mamária (Wooster *et al.*, 2003).

Com relação à parcela da população que não apresenta histórico familiar, há um predomínio de pessoas que desenvolvem o câncer de mama esporádico, que é resultado de um acúmulo de danos e mutações que foram adquiridas, mas não corrigidas nas células somáticas, alterações que geralmente levam a ativação de oncogenes em conjunto com a inativação em genes supressores tumorais. Dessa forma, os principais fatores de risco para o câncer de mama estão ligados à idade, aspectos endócrinos e também genéticos (Kenemans *et al.*, 2004).

A incidência do câncer de mama aumenta com a idade, dobrando a cada 2 anos até a menopausa, quando a taxa de risco diminui significativamente. Os aspectos endócrinos estão relacionados principalmente ao estímulo estrogênico, seja endógeno ou exógeno, com aumento do risco quanto maior for o tempo de exposição (McPherson *et al.*, 2000). Dessa forma, mulheres com história de menarca precoce (idade da primeira menstruação menor que 12 anos), menopausa tardia (após os 50 anos), primeira gravidez após os 30 anos, nuliparidade e terapia de reposição hormonal pós-menopausa, principalmente se prolongada por mais de cinco anos são fatores de risco elevados para o desenvolvimento da doença (Walker *et al.*, 2011).

O risco de câncer em mulheres que tiveram a primeira gestação depois dos 30 anos é cerca de 2 vezes maior do que em mulheres que tiveram o primeiro filho antes dos 20 anos. Para mulheres em que a primeira gestação foi após os 35 anos, o risco é ainda maior. A idade na gestação do segundo filho também é um fator a ser considerado, pois mulheres que tiveram a segunda gestação antes dos 30 anos apresentam menor risco (McPherson *et al.*, 2000).

Somando-se a esses fatores estão hábitos e estilo de vida, como por exemplo, a dieta, visto que a obesidade na pós-menopausa está associada a um risco duas vezes maior de desenvolver essa neoplasia. Um risco elevado também está ligado ao consumo de tabaco e álcool. Em contrapartida, a prática de atividade física e o aleitamento materno são considerados fatores protetores contra o câncer de mama (McPherson *et al.*, 2000; Thomson, 2012).

Além disso, alguns estudos acrescentam que algumas lesões da mama estão implicadas na carcinogênese, como por exemplo, as lesões proliferativas com ou sem atipia (Lakhani *et al.*, 1999). Outras lesões comportam-se como precursoras do câncer invasivo como o carcinoma ductal *in situ* (Aubele *et al.*, 2002; Going, 2003).

Parâmetros prognósticos

Tipo histológico e envolvimento axilar

O tipo e o grau histológico do tumor revelam características importantes em relação a resposta terapêutica. Segundo a *American Cancer Society*, estima-se que cerca de 1 em 5 casos de câncer de mama serão ductal *in situ* (DCIS – *Ductal carcinoma in situ*; também conhecido como carcinoma intraductal). Apesar do DCIS ser considerado um tipo de câncer não-invasivo, o mesmo detém grande importância, pois em muitos casos é o precursor para o carcinoma invasivo ou infiltrante (IBC – *Infiltrating Breast Cancer*). No carcinoma lobular *in situ* (LCIS), não é relatada a evolução para carcinoma invasivo; no entanto, mulheres em tais condições apresentam um risco de 7 a 11 vezes maior para desenvolver o carcinoma invasivo em qualquer uma das mamas (ACS, 2013).

O carcinoma ductal infiltrante (IDC-*Infiltrating ductal carcinoma*) é o tipo de câncer de mama mais comum, estima-se que a cada 10 casos de câncer de mama invasivos, 8 sejam ductais infiltrantes. Menos comum é o carcinoma lobular infiltrante (ILC – *Invasive Lobular Carcinoma*): 1 a cada 10 casos é diagnosticado como lobular infiltrante, além de ser um diagnóstico mais difícil de ser estabelecido (ACS, 2013). Além desses principais tipos de câncer de mama, existem carcinomas variantes com prognósticos distintos, por exemplo, carcinomas tubulares, papilares e mucinosos são considerados de bom prognóstico, enquanto o sarcomatóide é muito agressivo (Shmitt & Gobi, 2011).

Outro fator prognóstico de grande impacto é o envolvimento axilar, pois descreve o envolvimento dos linfonodos e o quanto estão comprometidos. Os linfonodos são órgãos compostos por tecidos linfóides que se encontram no trajeto de vasos linfáticos (Shmitt & Gobi, 2011). Os linfonodos axilares recebem e filtram a linfa proveniente da mama e do braço, o seu comprometimento é um dos principais indicadores de evolução da doença e aumenta a probabilidade de recidiva tumoral. Para que o *status* linfonodal seja considerado negativo, é necessário que pelo menos 10 linfonodos sejam examinados no estudo anatomo-patológico e mostrem ausência de células tumorais (Barros *et al.*, 2001).

Tamanho do tumor

Quanto maior o tamanho do tumor, maior é o número de células malignas e maior é o efeito clonal com risco de metástase. Tumores maiores que 3 cm apresentam taxa de recidiva elevada e

geralmente requerem terapia adjuvante (Barros *et al.*, 2001). A melhor forma de se definir o tratamento e o prognóstico é através da classificação estabelecida pela UICC (*Union for International Cancer Control*), uma padronização aceita internacionalmente, baseada em um sistema anatômico que registra a extensão do tumor primário e regional, além da presença ou ausência de metástase. Dessa forma, o estadiamento do câncer de mama é classificado através das categorias do TNM (T: Tumor, N: Linfonodo, M: metástase), onde a categoria T descreve o local do tumor primário, a categoria N descreve o envolvimento de linfonodos regionais e a categoria M descreve a presença ou não de metástases distantes (UICC, 2013) [Figura 2].

Classificação clínica do câncer de mama pelo sistema TNM	
T - Tumor	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ: carcinoma intraductal ou carcinoma lobular in situ ou doença de Paget da papila sem tumor
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
T1a	tumor com 0,5 cm ou menos em sua maior dimensão
T1b	tumor com mais de 0,5 cm e até 1 cm em sua maior dimensão
T1c	tumor com mais de 1 cm e até 2 cm em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 5 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão
T4	Tumor de qualquer tamanho, com extensão direta à parede torácica ou à pele
T4a	extensão para parede torácica
T4b	edema (incluindo peau d'orange) ou ulceração da pele da mama ou nódulos cutâneos satélites, confinados à mesma mama
T4c	T4a e T4b associados
T4d	carcinoma inflamatório
N - Linfonodais regionais	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados (por ex. foram removidos previamente)
N0	Ausência de metástases nos linfonodos regionais
N1	Metástase em linfonodo(s) auxiliar(es) homolateral (is) móvel (is)
N2	Metástase nos linfonodos axilares homolaterais fixos uns aos outros ou a outras estruturas
N3	Metástase nos linfonodos da cadeia mamária interna homolateral
M - Metástases a distância	
MX	A presença de metástases a distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástases a distância
M1	Metástases a distância (incluindo as metástases nos linfonodos supraclaviculares)

Figura 2. Classificações dos tumores mamários segundo estadiamento TNM. (Retirado do *website* do Projeto Diretrizes da Associação Médica Brasileira. Disponível em: http://www.projetodiretrizes.org.br/novas_diretrizes_sociedades.php - acesso em 27 de março de 2014).

Classificação molecular

Estudos recentes baseados em microarranjos de expressão e a possibilidade de quantificação da expressão simultânea de milhares de transcritos de RNA permitiram descobrir que o câncer de mama não é uma doença única, mas sim um grupo de neoplasias molecularmente distintas (Perou *et al.*, 2000; Casali-da-Rocha *et al.*, 2010; Foulkes *et al.*, 2010). Através dos perfis de expressão gênica, Perou e cols. (2000) caracterizaram 3 classes para tumores mamários, que são: Tumores tipo luminal, tumores do tipo Her2 positivo e tumores *basal like*. Os tumores do tipo luminal expressam os receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PgR), possuindo baixos índices de proliferação celular (Perou *et al.*, 2000). O estrogênio exerce função de ativação de vias de sinalização nuclear iniciada por esteróides, que posteriormente leva à síntese de proteínas cruciais para o crescimento, divisão, proliferação e sobrevivência celular. Por essa razão, a hormonoterapia torna-se uma terapia adjuvante ao tratamento cirúrgico nessa classe de tumores luminais. Atualmente, consideram-se dois subtipos, luminal A e B, onde o tipo B se diferencia por possuir um grau de agressividade maior (Bauer *et al.*, 2007).

Tumores do tipo Her2 positivo apresentam amplificação e altos níveis de expressão do gene *HER2* (*v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*), um proto-oncogene que codifica uma proteína receptora de membrana presente em todas as células do tecido mamário, quando uma célula apresenta a níveis elevados desta proteína podem acarretar em um crescimento tumoral descontrolado. E finalmente, os tumores *basal like*, que correspondem essencialmente ao perfil triplo-negativo (TNBC – *Triple Negative Breast Cancer*) onde há ausência de expressão de ER, PgR e Her-2. Sendo que, as duas últimas classes de tumores possuem maior agressividade clínica, por estarem associadas ao perfil metastático e por apresentarem maior grau histológico, além de elevada taxa de proliferação celular (Perou *et al.*, 2000; Bauer *et al.*, 2007). Acredita-se que as assinaturas moleculares dos tumores revelaram um padrão de expressão gênica que não somente apresentava similaridades e diferenças entre os tumores, mas também apontam para uma interpretação biológica, que podem indicar condutas clínicas mais apropriadas aos pacientes (Casali-da-Rocha *et al.*, 2010; Foulkes *et al.*, 2010).

Diagnóstico e tratamento

Para um bom prognóstico é indispensável que o câncer de mama seja detectado nos estágios iniciais da sua formação, pois quando as lesões são menores que 2 cm de diâmetro há um aumento na probabilidade de cura (Redig *et al.*, 2013). Como estratégia, os exames de imagem para o

rastreamento da população tem o objetivo de identificar lesões sugestivas de câncer de mama. O autoexame também é fundamental para alertar as mulheres a respeito da sua saúde (INCA, 2014).

A conduta terapêutica é escolhida de acordo com o estadio clínico em que a doença é diagnosticada, das características anatomopatológicas, condições clínicas, idade e desejo da paciente. Em décadas passadas, as mulheres com câncer de mama sofreram com tratamentos drásticos. A mastectomia radical proposta por Halsted (1894 *apud* Marta, 2011, p.469) foi o tratamento padrão para o câncer de mama, independente do estadio clínico da doença. A partir da década de 80, a abordagem terapêutica sofreu a influência de tratamentos mais conservadores, sem comprometer sua eficácia. Atualmente, os oncologistas dão prioridade a iniciativas cirúrgicas que eliminam o tumor, mas que conservam a mama, seguidos por radioterapia, sendo a forma de terapia padrão utilizada para doenças em estadios iniciais (Marta *et al.*, 2011).

Segundo a Associação Médica Brasileira, em doenças em estadios iniciais, geralmente quando o tumor possui menos de 2 cm de diâmetro, o tratamento padrão é a conservação da mama, apenas com a retirada do tumor, seguida de radioterapia. Para tumores maiores que 2 cm ou quando não é possível assegurar a obtenção de margens livres em função da extensão tumoral, indicam-se cirurgias não conservadoras, podendo ou não seguir-se de quimioterapia e/ou radioterapia com objetivo de reduzir o risco de metástases e de recidivas, aumentando assim as chances de sobrevida da paciente (Barros *et al.*, 2001).

Epigenética do câncer

O câncer advém de um acúmulo de mutações no DNA. Portanto, acredita-se que eventos diversos possam culminar na perda da função de TSGs ou ganho da atividade oncogênica. De fato, as mutações genéticas não são as únicas causas da perda do controle da expressão gênica no câncer (Laird, 2005).

Há evidências de que alterações na estrutura da cromatina, determinadas por modificações epigenéticas, exercem influência na regulação da expressão dos genes. Além disso, o campo da epigenética tem sido amplamente difundido e revelou-se de grande importância por estar estreitamente relacionada com o desenvolvimento de vários tipos de neoplasias. De fato, tem-se questionado se os eventos epigenéticos possuem papel direto no desenvolvimento do tumor ou se são consequências anormais do fenótipo das células cancerígenas (Sawan *et al.*, 2008; Sandoval & Esteller, 2012).

O crescente entendimento de como a organização da cromatina modula a transcrição evidencia a importância dos mecanismos epigenéticos na iniciação e progressão do câncer humano (Jones & Baylin, 2002). Durante os últimos anos, vários indícios apontam que tais alterações epigenéticas têm o potencial de afetar cada passo de desenvolvimento do tumor e estão associadas à perda de função de genes supressores tumorais, promovendo vantagens às células neoplásicas (Sharma *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011).

O termo epigenética surgiu na metade do século XX, e foi definido pela primeira vez por CH Waddington (1942 *apud* Sharma *et al.*, 2010, p.27). Originalmente, foi descrito por mudanças no desenvolvimento dos organismos que não poderiam ser explicadas por alterações na cadeia de DNA. A princípio, acreditava-se que os eventos epigenéticos estavam somente relacionados com o desenvolvimento embrionário, mas com o aperfeiçoamento do conhecimento na área, observou-se que tais eventos estão intrinsecamente relacionados com uma variedade de processos biológicos (Sharma *et al.*, 2010).

A epigenética abrange um importante grupo de processos celulares, referindo-se ao estudo das alterações hereditárias da expressão gênica que não são atribuídas às mudanças na sequência de bases do DNA. São modificações que ocorrem na fita de DNA e nas histonas, mas assume uma função de informação hereditária, que não altera a sequência de nucleotídeos (Berger *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2010). Tal informação não é uniforme no genoma, e sim localizada regionalmente. A pesquisa na área busca explicar como o padrão de expressão gênica é passado através dos descendentes, a mudança espaço-temporal dessa expressão, a atuação do ambiente na maneira em como esses genes são expressos, além da diferenciação dos tipos celulares (Dawson & Kouzarides, 2012).

Sabe-se que um arranjo preciso da fibra da cromatina, faz da molécula de DNA e todas as suas proteínas associadas, essenciais para a leitura correta da informação contida na dupla hélice. A estrutura da cromatina define em que condição a informação genética está organizada no DNA, e o estado desta estrutura tem grande influência sobre os genes que foram ativados ou silenciados (Espada & Esteller, 2010).

O epigenoma, ou seja, o conjunto de alterações epigenéticas que causam mudanças na expressão gênica sem causar mudanças no código genético é altamente variável e flutua de acordo com as condições de cada célula, ao contrário do genoma, que é uma informação fixa que não pode ser alterada. Inúmeras modificações englobam o termo epigenética, mas existem 3 mais importantes e portanto, mais estudadas: a metilação do DNA, as modificações de histonas que incluem acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, biotinilação e ribosilação e, ainda, a

expressão de RNAs não codificadores, esses por sua vez, agem na regulação pós-transcricional de genes (He & Hannon, 2004; Huang *et al.*, 2011) [Figura 3].

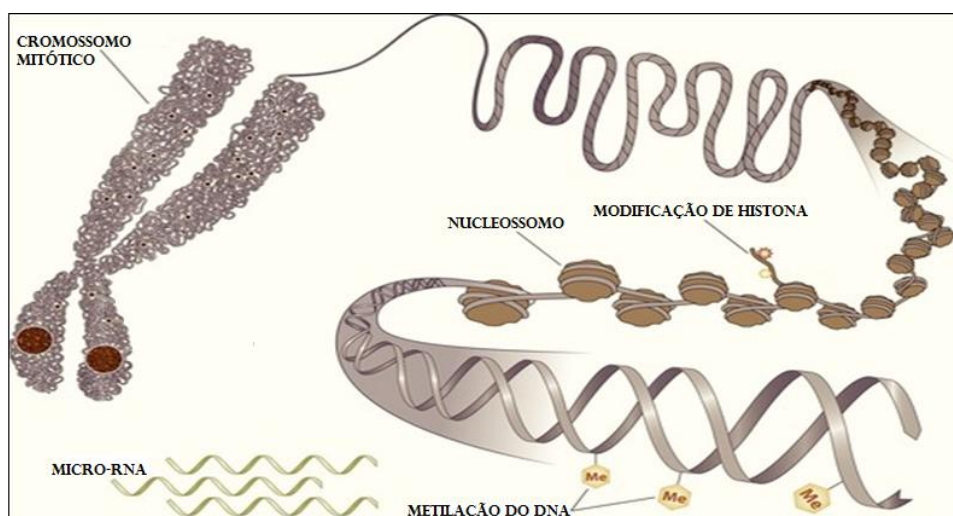


Figura 3. Representação de níveis de modificações epigenéticas da cromatina (Retirado e modificado a partir de www.episona.com)

A marca epigenética mais amplamente estudada é a metilação do DNA, encontrada em eucariotos, os quais exibem metilação exclusivamente em citosinas. Esta marca está mais relacionada com o silenciamento gênico, desempenhando funções no desenvolvimento embrionário, inativação do cromossomo X e bloqueio da cromatina (Bird, 2007; Suzuki & Bird, 2008). A metilação do DNA é o único tipo de modificação química reversível desta macromolécula, que é herdada sem alterar a sequência subjacente de bases nitrogenadas e se baseia na ligação covalente de um grupamento metil (CH_3) ao carbono de posição 5 de uma citosina, essa ligação geralmente ocorre quando existe uma guanina imediatamente adjacente à citosina: dinucleotídeos CpG correspondem à citosina unida na mesma fita de DNA a uma guanina, através de uma ligação fosfodiéster (Suzuki & Bird, 2008; Espada & Esteller, 2010; Oliveira *et al.*, 2010).

Existem regiões no genoma com uma grande proporção de dinucleotídeos CpGs, regiões essas definidas como ilhas CpGs e que estão distribuídas irregularmente no genoma de mamíferos. Tais ilhas CpGs são alvos potenciais de DNA metiltransferases (DNMTs), as enzimas responsáveis pela adição do grupo metil e manutenção da metilação no genoma. Cerca de 70 a 80% dessas ilhas estão associadas a promotores gênicos. Em adição, genes cuja expressão é restrita a apenas alguns ou um único tecido, são descritos por possuírem ilhas CpGs localizadas em seus promotores, indicando a relação com o perfil de expressão tecido-específica (Weber *et al.*, 2007; Illingworth & Bird, 2009).

Além disso, a conformação da cromatina também se correlaciona com a metilação, há indícios de que a metilação de lisinas, por exemplo, caracterize um estado permissivo ou repressivo de transcrição, dependendo do resíduo em que ocorrer a adição do grupo metil (Esteller, 2008). Por sua importância na expressão gênica, defeitos nas vias que codificam essas enzimas podem ser responsáveis por erros na expressão de outros genes levando a uma cascata de erros (Espada & Esteller, 2010; Sharma *et al.*, 2010).

Em células normais, os genes *housekeeping* são usualmente não metilados. No entanto, quando ocorre a metilação nos mesmos, promove-se um mecanismo de silenciamento, que tem um importante papel de regulação da expressão e controle sobre outras proteínas associadas à cromatina. Um papel, inclusive, de controle das várias funções no genoma, impedindo a ligação de fatores de transcrição, bem como de outras proteínas relacionadas com a transcrição de genes, levando em consideração que a atividade destes genes é inversamente correlacionada com a densidade de dinucleotídeos CpG metilados nas respectivas ilhas CpG associadas, tornando tais eventos epigenéticos reconhecidamente comuns em câncer (Sharma *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2012).

Sendo assim, o câncer está incluído entre as doenças causadas por alterações dos padrões de modificações epigenéticas. Nos últimos anos, cresceu o número estudos que descrevem padrões alterados de eventos epigenéticos, relacionados ao desenvolvimento de diferentes tipos de neoplasias (Huang *et al.*, 2011). Dessa forma, procura-se entender o vínculo que as alterações epigenéticas possuem com o desenvolvimento de doenças, acima de tudo, no desenvolvimento do câncer (Figueiroa *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2012) [Figura 4].

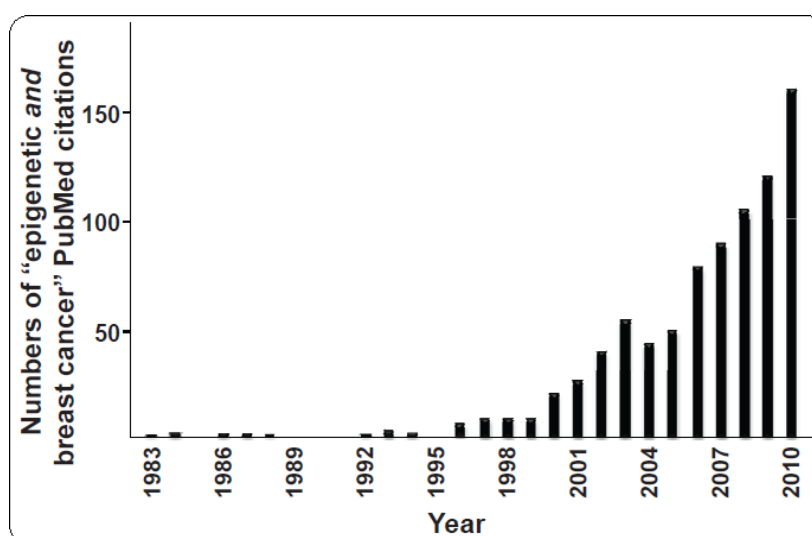


Figura 4. Aumento do número de publicações na área de epigenética e câncer de mama. Os dados são derivados de uma pesquisa por câncer de mama e epigenética (Retirado de Huang *et al.*, 2011).

Dentre as alterações epigenéticas citadas, a hipermetilação de ilhas CpGs em regiões promotoras de genes supressores tumorais é um dos eventos mais importantes relacionados a origem e desenvolvimento do câncer (Esteller, 2008). Estudos sugerem que milhares de genes possam contribuir para a patofisiologia do câncer quando há perda de regulação por eventos epigenéticos. Na área de epigenética, iniciou-se a pesquisa por meio da demonstração da hipometilação do DNA em alguns tipos de cânceres humanos, seguidos da descrição de hipermetilação em genes supressores tumorais e da inativação por metilação de genes que transcrevem miRNA's, que são pequenas moléculas de RNA, não codificadoras de proteínas, mas reconhecidos por possuírem função significativa na regulação pós-transcricional (Feinberg & Volgstein, 1983; Ferguson *et al.*, 2000; Esteller, 2007; 2008).

A metilação do DNA pode ter efeitos imprevisíveis no desenvolvimento neoplásico e a inativação ou expressão aumentada de genes específicos pode fornecer a alguns tipos tumorais, vantagem durante o crescimento. Dentre as alterações epigenéticas citadas, a hipermetilação de ilhas CpGs em regiões promotoras de genes supressores tumorais é um dos eventos mais importantes relacionados a origem e desenvolvimento do câncer (Esteller, 2007; 2008).

A importância da epigenética na iniciação e progressão do câncer leva a muitas investigações que buscam incorporar esse campo de conhecimento ao desenvolvimento de terapias para a doença, inclusive o desenvolvimento de modificadores epigenéticos que tenham como alvo as moléculas responsáveis por essas alterações (Szyf *et al.*, 2004; Connolly & Stearns, 2012). Alterações epigenéticas que iniciam e dirigem a carcinogênese são alvos promissores para a detecção precoce, pois precedem sinais clínicos do câncer e podem ser detectados em baixos níveis. Na busca da identificação de genes envolvidos neste tipo de regulação, um deles se revela pertinente ao estudo do desenvolvimento do carcinoma mamário, conhecido como *SFN* (*Stratifin*; também conhecido como 14-3-3 σ). Trata-se de um gene que tem sido descrito como um alvo frequente de silenciamento epigenético, levando à perda da expressão do gene em células de tumores mamários (Ferguson *et al.*, 2000; Umbrecht *et al.*, 2001; Zurita *et al.*, 2010).

A família 14-3-3

Inúmeros aspectos da regulação da função proteica requerem interações específicas entre proteínas que levam a execução das funções biológicas necessárias. A família proteica 14-3-3 compreende um grupo de proteínas homólogas altamente conservadas que mediam interações através da ligação com centenas de outras proteínas, realizando a modulação de importantes funções de uma

variedade de processos celulares, incluindo transdução de sinais, apoptose, progressão do ciclo celular e ativação dos *checkpoints* (Yaffe *et al.*, 1997; Gardino & Yaffe, 2011).

O nome 14-3-3 é derivado da combinação dos resultados de fracionamento em cromatografia de celulose (DEAE- *Diethylaminoethyl Celulose*) e a posição da migração após eletroforese (Fu *et al.*, 2000). Em humanos, fazem parte da família, sete genes que codificam sete diferentes isoformas, cada uma designada por uma letra grega (β , γ , ϵ , η , σ , θ e ζ), que estão correlacionados com o reconhecimento de motivos diferentes para ligantes. As proteínas 14-3-3 são pequenos polipeptídeos de ~30KDa e regulam numerosas vias celulares. A falha nessas vias está implicada no desenvolvimento de vários tipos de doenças, inclusive no câncer (Hermeking, 2003; Zhou *et al.*, 2011).

Essas proteínas foram inicialmente descobertas por Moore e Perez, (1984 *apud* Muslin & Xing, 2000, p. 703), como proteínas abundantes em funções relacionadas ao cérebro. Posteriormente, foram definidas como proteínas encontradas em eucariotos, essenciais para a sobrevivência da célula, mas até então sua função não estava muito bem elucidada (Muslin & Xing, 2000). Desde que foram implicadas como moléculas de resposta ao dano do DNA, os estudos na área cresceram enormemente, e um número superior a 100 moléculas já foram encontradas por conter sítios de interação com as proteínas 14-3-3. Dentre as inúmeras classes de proteínas que interagem com esta família, podem ser citadas as proteínas cinases, enzimas, proteínas estruturais e outras envolvidas no controle do ciclo celular (Yaffe, 2002; Hermeking & Benzinger, 2006) [Figura 5].

Atualmente, sabe-se que as proteínas 14-3-3 agem como adaptadoras ou “moléculas chaperonas”, que estão aptas a se movimentar livremente do citoplasma para o núcleo e vice-versa. Dessa forma, por meio de eventos mediados por fosforilação, coordenam a progressão da célula através do ciclo celular, regulando diversas atividades (Muslin *et al.*, 1996; Dougherty & Morrison, 2004).

As proteínas 14-3-3 possuem motivos de ligação RSXpSXP e RXY/FXpSXP que estão presentes em quase todas as isoformas integrantes da família, por esse motivo podem interagir com um grande número de moléculas. A regulação acontece por diversos mecanismos dependentes de fosforilação (adição de um grupo fosfato a um aminoácido), como sequestro entre compartimentos celulares, ativação ou inativação enzimática e promoção ou inibição de interação entre proteínas (Zeng & Piwnica-Worms, 1999; Hermeking, 2003; Jhonson *et al.*, 2010).

Tem-se observado que tais proteínas desempenham função essencial nos *checkpoints* induzidos por danos ao DNA e controle de atividades biológicas de proteínas relacionadas ao controle dos *checkpoints*, através da ligação com outras proteínas. Esses eventos ocorrem devido a

formação de homodímeros e heterodímeros e ao intermédio da fosforilação de serinas/threonina (Yaffe *et al.*, 1997)

14-3-3 σ

A ausência ou a hiperexpressão de genes relacionados ao circuito de sinalização celular está implicada no desenvolvimento do câncer e, de todos os genes desta família, a isoforma σ é a que possui uma associação mais direta (Hermeking, 2003; Lodigyn & Hermeking, 2005).

A expressão de 14-3-3 σ é restrita a células epiteliais aumentando durante a diferenciação epitelial. A sua inativação leva à imortalização de queratinócitos primários e impede a saída do compartimento das células-tronco, indicando que o gene tem propriedades de supressor-tumoral (Dellambra *et al.*, 2000; Hermeking, 2003).

O gene *SFN* está mapeado no cromossomo 1p36, possui apenas um éxon com uma ilha CpG de 216 pares de bases (posição no cromossomo 1: 27.189.913 – 27.190.128). Foi inicialmente identificado como um marcador epitélio-específico, conhecido também como marcador do epitélio mamário humano 1 (HEM1): porém, existem evidências de que é um gene ativado transcricionalmente pela proteína p53, inibindo a progressão do ciclo celular em resposta a danos no DNA (Prasad *et al.*, 1992; Hermeking *et al.*, 1997). Estudos posteriores confirmaram que o gene *SFN* é um ligante direto da proteína p53. Essa proteína é um fator de transcrição, codificada pelo gene supressor tumoral *TP53*, e um sítio funcional de ligação à p53 foi localizado a 1,8 kilobases do sítio de início do gene *SFN* (Chan *et al.*, 1999; Hermeking & Benzinger, 2006).

Chan *et al.* (2000) reportaram que linhagens celulares de câncer colorretal humano denominadas HCT116, negativas para a expressão de 14-3-3 σ (14-3-3 σ -/-), e que sofreram exposição a agentes genotóxicos, não conseguiam manter o bloqueio no *checkpoint* G2/M e consequentemente morriam por catástrofe mitótica. Desse modo, a função normal do gene e a alta frequência de inativação em células tumorais indicam que 14-3-3 σ é a principal isoforma relacionada com o desenvolvimento do câncer (Iwata *et al.*, 2000; Hermeking, *et al.*, 2003).

Já está esclarecido que agentes que causam danos à estrutura do DNA levam a ativação dos *checkpoints* e provocam o bloqueio do ciclo celular, permitindo que o dano seja reparado, e assim, protegem o organismo de um acúmulo ainda maior de mutações deletérias (Hermeking *et al.*, 1997). Na progressão do ciclo celular, é necessária uma sequência ordenada de eventos que determinam o processo de divisão da célula. O *checkpoint* é o mecanismo pelo qual a célula monitora o ciclo celular, na tentativa de identificar danos ocorridos à molécula de DNA. Dessa forma, quando

detectada qualquer alteração no genoma da célula, a célula interrompe o ciclo até que seja reparado o dano, e caso o dano seja muito prejudicial, a célula é levada a apoptose (Van den Heuvel & Harlow, 1993).

Em células normais, a atividade transcricional de *SFN* suprime a atividade das cinases dependentes de ciclinas (CDKs) por um mecanismo alternativo (Laronga *et al.*, 2000). A função normal da 14-3-3 σ é sequestrar a ciclina B, ciclina E e CDC2 no citoplasma, separando-as de seus substratos e impedindo que os complexos mitóticos ‘CDC2-CiclinaB’ e ‘CDK2-Ciclina E’ consigam entrar no núcleo e iniciar a mitose, permitindo assim a parada do ciclo em G2 e consequentemente o reparo dos danos pelas vias de reparo do DNA (Hermeking *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1999).

Após um dano, ocorre a desfosforilação da serina 376 da proteína p53, gerando um motivo de ligação no terminal carboxil da p53. De tal maneira, a proteína 14-3-3 σ se liga à p53 acarretando em um aumento da atividade, tendo um efeito direto na progressão do ciclo, pois afeta a localização de CDK2 E CDC2 (Waterman *et al.*, 1998; Laronga *et al.*, 2000) [Figura 5].

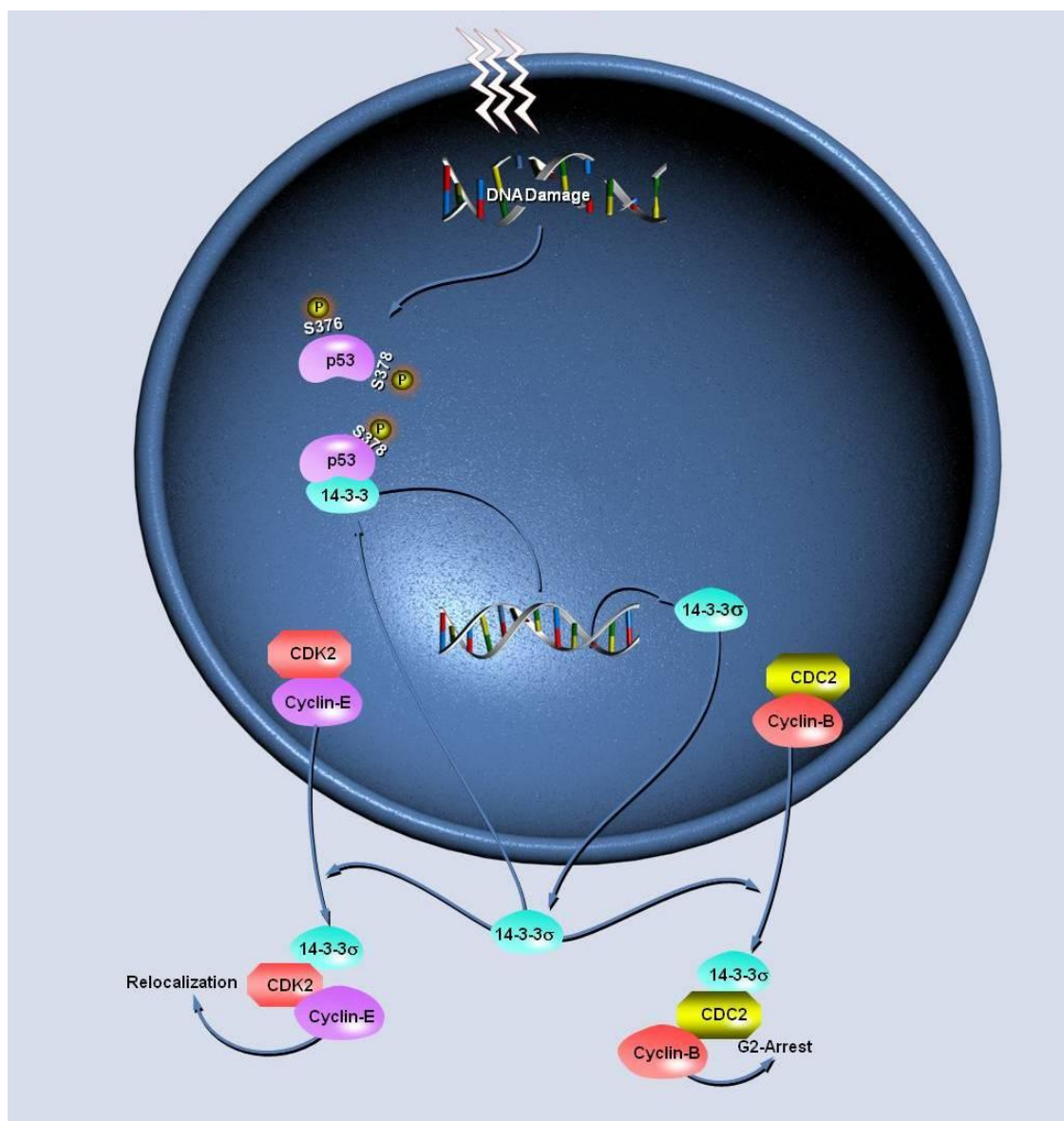


Figura 5. Sinalização da proteína 14-3-3 σ induzida por danos ao DNA (Esta imagem é uma modificação da original de QIAGEN protegida por [Danielle B. Brotto]. A imagem original pode ser encontrada em <https://www.qiagen.com/geneglobe/pathwayview.aspx?pathwayID=135&resultsPerPage=10>).

Por sua grande relevância em eventos que controlam a regulação da proliferação celular, eventos esses que são essenciais no desenvolvimento de neoplasias, o correto funcionamento deste gene e, portanto da proteína é de fundamental importância para o adequado funcionamento de uma célula (Yaffe, 2002; Hermeking, 2003).

Um evento que contribui para a inativação de genes supressores tumorais como o gene em questão é a perda de heterozigosidade (LOH), que se caracteriza pela mudança na dosagem de um alelo em relação ao outro, e pode ocorrer por monossomia cromossômica, deleção de um alelo e

duplicação do outro, *crossing over* mitótico, deleção do gene ou pela mutação em ponto nos dois alelos. A região cromossômica onde o gene *SFN* está mapeado é um alvo frequente de LOH (*Loss of Heterozygosity*) em câncer de mama (Bieche & Lidereau, 1995; Ferguson *et al.*, 2000). De acordo com o catálogo de mutações somáticas em câncer (COSMIC, *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*, disponível em <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), a porcentagem de mutações do gene *SFN* em carcinomas mamários é menor que 1%, portanto não é o principal mecanismo associado com a perda da função desse supressor tumoral). Estudos revelam que padrões de metilação alterados podem modificar a expressão do gene, levando ao seu silenciamento (Lodigyn & Hermeking, 2005).

Após o dano ao DNA, células com deficiência na expressão sofrem com a falta do transcrito do *SFN* e falham em manter o bloqueio do ciclo, conduzindo a célula à catástrofe mitótica que posteriormente culminaria em apoptose. Presumivelmente, devido à incapacidade da célula em bloquear o ciclo celular e reparar os danos (Chan *et al.*, 1999; Hermeking *et al.*, 1997; Hermeking, 2003).

Embora diferentes classes de genes possuam diversos relatos da perda de função por mutação, o *SFN* está frequentemente sujeito ao silenciamento epigenético que ocorre pelos processos referidos anteriormente (Ferguson *et al.*, 2000; Wilker *et al.*, 2007; Horie-Inoue & Inoue, 2006). O silenciamento epigenético do *SFN* por metilação, tem sido detectado em alta frequência em carcinomas mamários (Ferguson *et al.*, 2000; Umbricht *et al.*, 2001). Em estudo publicado por Ferguson e colaboradores (2000), 94% das amostras de tumores primários analisadas não exibiam expressão do transcrito do gene *SFN*, e nenhum tipo de mutação foi identificada. Contudo 91% das amostras de tumores de mama estavam hipermetiladas em sua ilha CpG, sendo este dado relacionado com a falta de expressão do gene (Ferguson *et al.*, 2000). No estudo de Suzuki e colaboradores foi relatada a metilação aberrante desse gene em várias linhagens celulares derivadas de tipos diferentes de câncer (Suzuki *et al.*, 2000).

O estudo da função do gene *SFN* no bloqueio do ciclo em G2/M está sendo esclarecida com relação ao tratamento contra o câncer. Por um lado, a hipermetilação no promotor do gene pode levar à diminuição na sua expressão, correlacionada inversamente com a progressão da doença. Em alguns tratamentos contra câncer, tais como a radioterapia, a expressão do gene pode ser recuperada, pois esses processos estão diretamente relacionados com o bloqueio do ciclo celular em G2/M após o dano causado (Akahira *et al.*, 2004; Iwata, *et al.*, 2000; Niemantsverdriet *et al.*, 2005). Por outro lado, há evidências com relação ao câncer de mama que indicam que a expressão elevada do *SFN* está correlacionada com resistência a agentes genotóxicos, como os quimioterápicos, e que a perda do bloqueio em G2/M pode aumentar o efeito do tratamento anti-câncer como a radioterapia, devido

ao aumento da instabilidade genômica, que leva a célula a morte (Li *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013; Qi & Martinez, 2003).

Recentemente, alguns estudos vêm apontando a metilação do DNA como um biomarcador para detecção precoce do câncer (Lee *et al.*, 2009; Zurita *et al.*, 2010). Devido à característica de processo reversível da metilação e como a perda da função da proteína 14-3-3 σ sensibiliza as células tumorais à radioterapia, a análise da expressão e metilação desse gene podem ser marcadores viáveis para o tratamento do câncer de mama e a modulação das atividades do *SFN* pode ser uma abordagem terapêutica atrativa (Hermeking, 2003; Kim *et al.*, 2012).

Alguns estudos sugerem que a radioterapia pode ser mais efetiva quando o gene está hipermetilado (Kim *et al.*, 2012). No estudo de Qi e Martinez foi encontrado que baixos níveis de expressão deste gene em carcinomas pulmonares leva à resposta à radiação alterada, que resulta em maior morte das células tumorais (Qi & Martinez, 2003; 2005).

A radiação ionizante (IR) além de ser um agente genotóxico e carcinogênico, também é conhecida como um mecanismo terapêutico muito utilizado, devido o seu efeito de indução da morte celular, especialmente em células que estão em divisão. Por esse motivo, a radioterapia é reconhecida com uma das principais modalidades de tratamento contra o câncer (Barcellos-Hoff *et al.*, 2005). Mais importante ainda, há relatos que demonstram que a exposição a IR pode afetar os padrões de metilação do DNA. Demonstrou-se que a exposição a IR tem efeitos específicos para sexo e tecido, além de ser dose-dependente (Pogribny *et al.*, 2004).

A relação entre a eficácia da radioterapia com o *status* de metilação do gene *SFN* é fundamentado com base na conclusão de que o gene na sua atividade normal é responsável pelo bloqueio do ciclo em caso de danos ao material genético. Sendo assim, a diminuição da expressão do gene *SFN* causada pela hipermetilação, poderia até bloquear o ciclo em G2, contudo, não seria suficiente para manter o bloqueio e o reparo não seria realizado, tornando a célula mais sensível à radiação. Tendo isto em vista, o dano causado pela radiação durante a *radioterapia*, levaria as células tumorais hipermetiladas à morte por aumento da instabilidade genômica (Chan *et al.*, 1999; Dhar *et al.*, 2000).

Na tentativa de entender se o *checkpoint* em G2 é necessário para manter a estabilidade genômica em células de mamíferos, o estudo realizado por Dhar e colaboradores (2000) que utilizou uma linhagem celular derivada de câncer colorretal demonstrou que a ausência de expressão do gene 14-3-3 σ (-/-) foi associada com a instabilidade genômica e que também influencia a sobrevivência celular. Segundo o estudo, a instabilidade genômica também é mantida pelos telômeros, estruturas que são fundamentais para proteção do cromossomo de fusões ou degradação, e com os resultados obtidos observou-se que a perda da regulação do *checkpoint* celular em partes devido a ausência de

expressão do 14-3-3 σ levou ao acúmulo de danos não reparados, e que as células com o gene inativado apresentaram frequentes quebras cromossômicas, com completa perda das repetições teloméricas em alguns cromossomos, fusões teloméricas e translocações não balanceadas (Dhar *et al.*, 2000).

Objetivos

Objetivos Gerais

Investigar alterações genéticas e epigenéticas do gene *SFN*, localizado em 1p36, em carcinomas mamários primários, bem como em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários.

Objetivos Específicos

1. Avaliar alterações do número de cópias e do padrão de metilação do gene *SFN* em carcinomas mamários e em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários;
2. Avaliar o efeito das alterações genéticas e epigenéticas do gene *SFN* nos níveis de expressão do mesmo nas linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários;
3. Correlacionar as alterações no número de cópias e da metilação do gene *SFN* com parâmetros prognósticos (clínicos e histopatológicos) e com as taxas de sobrevivência em pacientes portadoras de carcinomas mamários;
4. Avaliar o efeito da exposição à radiação ionizante em um subconjunto de linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários, selecionadas com base nas alterações no número de cópias e no padrão de metilação do gene *SFN*.

Material e Métodos

O esquema abaixo apresenta as principais etapas que foram conduzidas no presente estudo ou que ainda serão incorporadas na versão finalizada do mesmo.

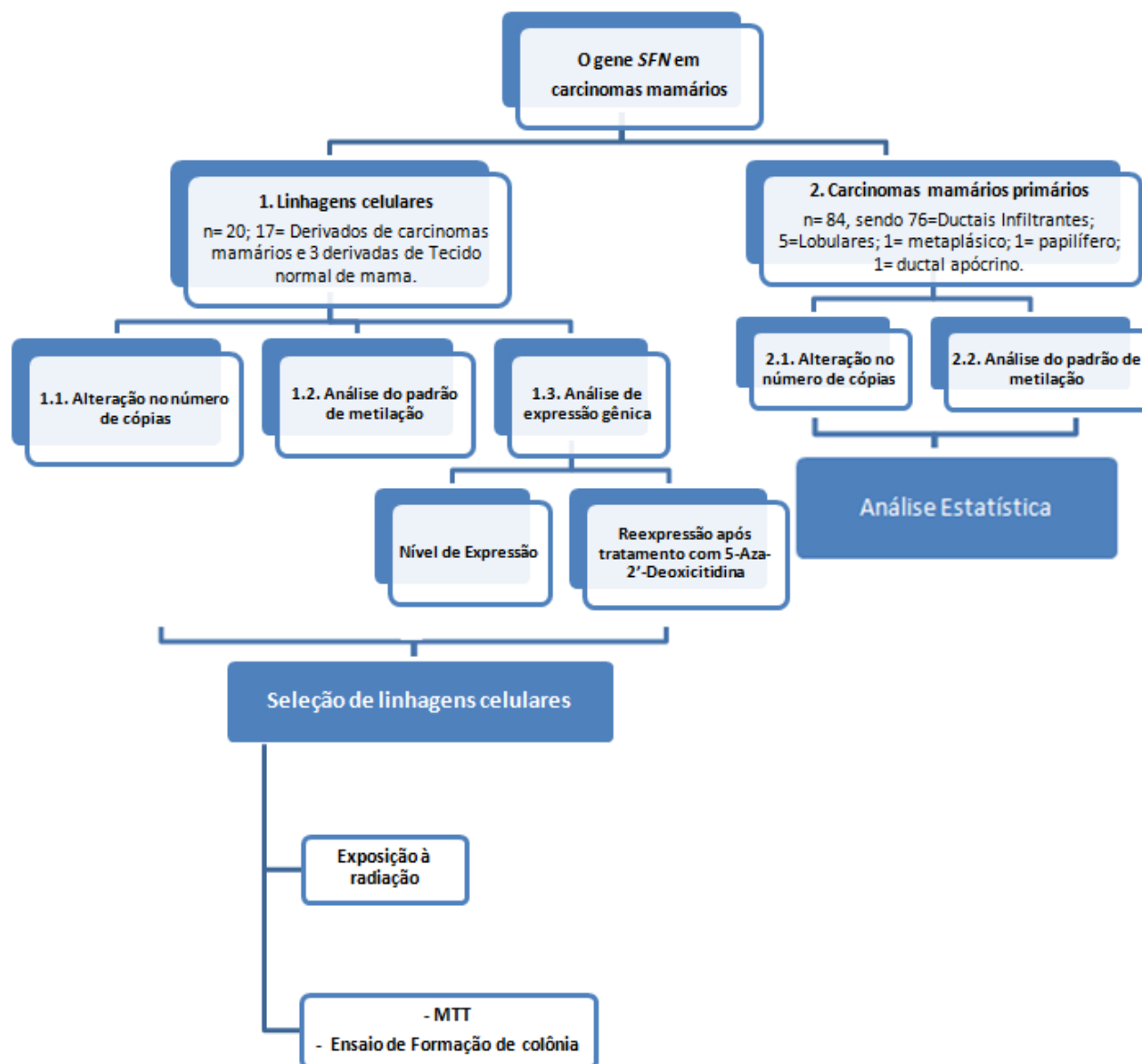


Figura 6. Representação esquemática do estudo visando a caracterização das alterações genéticas e epigenéticas do gene *SFN* em carcinomas mamários primários e em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários.

Amostras biológicas

Carcinomas mamários primários

Este estudo baseou-se em 84 amostras de carcinomas mamários primários (76 carcinomas ductais infiltrantes, 5 carcinomas lobulares infiltrantes, 1 carcinoma ductal apócrino, 1 carcinoma metaplásico e 1 carcinoma papilar) coletadas em colaboração com o Dr. José Roberto Fígaro Caldeira, do Departamento de Mastologia do Hospital Amaral Carvalho de Jaú-SP no período de 2002-2006. Os critérios de inclusão foram diagnóstico confirmado de carcinoma mamário após análise histopatológica e ausência de tratamento quimioterápico e/ou radioterápico anterior à cirurgia em que a coleta da amostra tecidual foi realizada. Todas as pacientes foram avisadas sobre os procedimentos e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este estudo foi realizado com aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do referido hospital. As pacientes foram regularmente acompanhadas após a cirurgia sendo que o seguimento pós-cirúrgico teve um tempo de duração médio de 88,8 meses, variando entre 6 a 153 meses.

Imediatamente após a cirurgia, as amostras de tecido tumoral foram congeladas à -80°C e posteriormente macrodissecadas na tentativa de se obter ao menos 80% de tecido tumoral. Todas as amostras foram avaliadas histopatologicamente pelo Serviço de Patologia do mesmo hospital e os prontuários médicos dos pacientes foram consultados para obtenção dos dados clínicos e histopatológicos (idade, estágio clínico, tamanho do tumor, envolvimento de linfonodos axilares, ocorrência de metástase, diagnóstico histopatológico, grau tumoral). Os dados da análise imunohistoquímica para as proteínas: receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PgR), Her2, p53 e Ki-67 foram obtidos em estudos prévios do grupo (Caldeira *et al.*, 2006). O diagnóstico histopatológico foi estabelecido de acordo com WHO *International Classification of Disease for Oncology* e o estadiamento clínico foi classificado pelo sistema TNM (WHO, 1990; Sabin & Wittekind, 1998).

Linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários

Foram utilizadas 20 linhagens de células epiteliais derivadas a partir do tecido mamário: duas derivadas de tecido mamário normal (184A1 e 184B5), uma derivada de doença fibrocística benigna da mama (MCF10A) e 17 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 Regina Cavalli. As linhagens celulares já haviam sido previamente cultivadas segundo as recomendações e encontravam-se armazenadas em alíquotas de 1×10^6 céls/ml em meio de cultura suplementado com 10% de soro bovino fetal e 10% de DMSO, mantidas em nitrogênio líquido, conforme descrito por Prando *et al.*, (2011).

A classificação molecular dessas linhagens e o *status* do gene *TP53* foram retirados a partir do *American Type Culture Collection (ATCC)* e também foram baseados no estudo de Neve *et al.*, 2006. Dentre as linhagens utilizadas, 18 delas foram agrupadas em 3 subtipos quanto à classificação molecular, são elas: 11 Luminais (MDA-MB-361, MDA-MB-415, MDA-MB-453, MCF7, ZR-75-1, ZR-75-30, MDA-MB-134 IV, BT-474, BT-483, SKBR3, T47D,), 2 Basal-Like A (BT20 e MDA-MB-468,) e 3 Basal-Like B (MDA-MB-231, Hs578T, MDA-MB-436, BT-549). As Linhagens 184-A1, 184-B5 e MCF10A são linhagens derivadas de epitélio mamário normal ou de tumores benignos da mama, portanto, não tumorigênicas e serviram de controle para os experimentos, a fim de se estabelecer um padrão de comparação.

Análise de alterações no número de cópias do gene *SFN* em carcinomas primários e em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários.

A investigação de alterações do número de cópias do gene *SFN* foi realizada em 82 das 84 amostras de carcinomas mamários. A determinação do número de cópias do gene *SFN* foi realizada pela técnica de PCR quantitativa em tempo real. Foi utilizado o *TaqMan® Copy Number Assay (Hs01918768_cn)* da empresa Life Technologies [Figura

7]. Para cada reação foram utilizados 2µl de DNA (concentração de 5ng/µl), 0,5 µl do *mix* de reação contendo o par de *primers* e sonda *TaqMan*[®], 0,5 µl do *mix* de reação para detecção do gene controle RNase P (*primers* e sonda *TaqMan*[®]) e 2µl de água ultra pura estéril, com a reação totalizando 10 µl. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas. Foi utilizada uma amostra calibradora para comparação com as amostras testes, para isso foi obtido um *pool* de amostras de DNA de células de sangue periférico doadas por voluntários saudáveis. Os dados da qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) foram analisados pelo programa CopyCaller[®] Software v2.0 (Life Technologies).

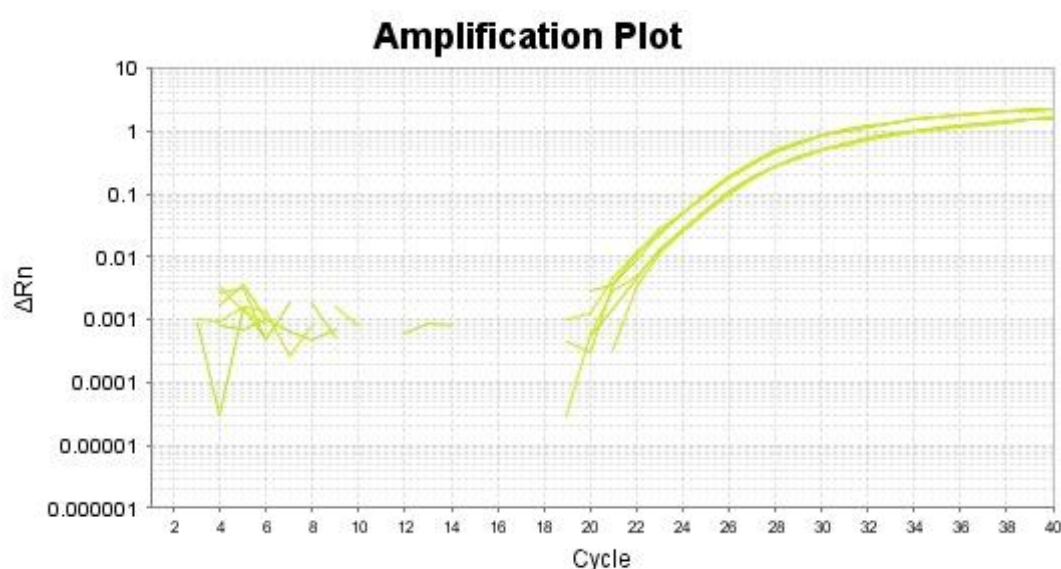


Figura 7. Curva de amplificação da análise de número de cópias do gene *SFN* por PCR quantitativa em tempo real, utilizando o ensaio de *TaqMan*[®] Copy Number. Representativo de uma única amostra com perdas genômicas.

Extração do DNA de amostras de carcinomas mamários

DNA genômico foi preparado a partir de linhagens celulares de câncer de mama por digestão através de proteinase K seguida de extração convencional usando um protocolo padrão de purificação por fenol/clorofórmio.

Análise da metilação do gene *SFN* em carcinomas primários e em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários

Tratamento do DNA com Bissulfito de Sódio

A modificação do DNA pelo bissulfito de sódio foi realizada segundo protocolo descrito por Paulin et al. (1998), com modificações. Aproximadamente 2µg do DNA genômico foram diluídos em água ultrapura estéril para completar um volume final de 18µl. Este DNA foi desnaturado pela adição de 2µl de uma solução de NaOH 3M (para obter uma concentração final de 0,3M) a 40°C durante quinze minutos, ao abrigo da luz. Adicionaram-se 208µl da solução de bissulfito de sódio 4M/uréia 6,25M e 12µl de hidroquinona 10mM (concentração final de 0,5mM). Ambas as soluções foram preparadas imediatamente ao uso. O conteúdo foi gentilmente homogeneizado por inversão e submetido a 20 ciclos de 15 minutos a 55°C, separados por um período de desnaturação de 30 segundos a 95°C em um termociclador. Ao DNA resultante do processo de modificação pelo bissulfito de sódio foi adicionado 1ml de resina (Kit Wizard DNA Clean-Up System - Promega), homogeneizados por inversão. Em seguida, fazendo uso do equipamento Vacuum Manifold (Promega), uma seringa de 3ml desprovida de êmbolo foi adaptada a uma mini-coluna e o DNA ligado à resina foi a ela transferido. Adicionou-se, então, 2ml de isopropanol 80% que foram passados através da mini-coluna por pressão com o auxílio de uma bomba de vácuo. Após desconectada, a mini-coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5ml e centrifugada a 14000rpm durante três minutos para remoção do excesso de álcool. A eluição foi realizada pela adição de 45µl de água (pré-aquecida a 65-80°C) à mini-coluna. Passado um minuto, centrifugou-se a mini-coluna adaptada ao tubo de microcentrífuga durante três minutos para que o DNA pudesse ser recuperado. A mini-coluna foi removida e descartada. A modificação do DNA foi finalizada com a adição de 5ml de NaOH 3M (concentração final de 0,3M) a temperatura ambiente por 15 minutos para a dessulfonação das uracilas. A precipitação foi realizada pela adição de 30ml de acetato de amônio 5M (pH 7,0) aguardando 5 minutos para a completa deaminação. Na sequência, acrescentou-se 350 ml de etanol 100% gelado e 1,0ml de glicogênio (20mg/ml) incubando o DNA a – 20°C *overnight*. Para a ressuspensão, este conteúdo foi centrifugado por 20 minutos a 14000rpm a temperatura ambiente. Depois de removido o sobrenadante, adicionou-se ao

DNA 500µl de etanol 70% (temperatura ambiente) e procedeu-se nova centrifugação por 20 minutos a 14000rpm. Dispensou-se o álcool e os tubos foram mantidos invertidos para secar o sedimento de DNA. Após a secagem, o precipitado foi ressuspensionado em 50µl de tampão de eluição estéril e mantido a temperatura ambiente por uma hora.

Análise da metilação do gene *SFN* pela técnica de MS-PCR (*Methylation Specific – Polymerase Chain Reaction*)

O DNA, depois de modificado e purificado, foi utilizado para a avaliação do padrão de metilação do gene pela amplificação por PCR com a utilização de pares de oligonucleotídeos específicos para as sequências metilada e não metilada. Os conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores foram selecionados com base em estudo prévio de Ferguson *et al.* (2000) (Tabela 1). Espera-se a amplificação produto 106pb e 104pb para os alelos não metilado e metilado, respectivamente. As condições da PCR foram as seguintes: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos; 31 ciclos de 95°C por 45 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; e um ciclo a 72°C por 4 minutos. As condições para as reações de amplificação já estavam padronizadas no grupo (Negraes *et al.*, 2008); as reações de amplificação ocorreram em tubos separados e foram conduzidas em um volume de 25 µl contendo 0,25 µM de cada primer, 200 µM de cada dNTP, 15 mM de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM KCl, 2,5 mM de MgCl₂ e 1U de *AmpliTaq Gold* (Applied Biosystems). Na sequência, os produtos amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e coloração com nitrato de prata. Controles negativos e positivos para a metilação foram utilizados preliminarmente para a avaliação da especificidade de cada par de oligonucleotídeos. A análise e interpretação dos resultados foram realizadas através de uma abordagem qualitativa, mediante a presença de uma banda representando o produto amplificado após a PCR (Sanguinetti *et al.*, 1994; Herman *et al.*, 1996). Os dados da análise do padrão de metilação do gene *SFN* foram obtidos em um estudo prévio do grupo que incluiu um total de 84 carcinomas mamários: 76 carcinomas ductais infiltrantes, 5 carcinomas lobulares infiltrantes, um carcinoma metaplásico, um carcinoma papilífero e um apócrino.

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos e temperatura de anelamento para análise por MS-PCR.

Gene <i>SFN</i>	Primers 5'-3'	Temperatura de Anelamento dos <i>Primers</i>	Referência
Alelo Metilado	TGGTAGTTTTTATGAAAGGCGTC (F)	56°	Ferguson <i>et al.</i> , 2000
	CCTCTAACCGCCCACCACG (R)		
Alelo Não Metilado	ATGGTAGTTTTTATGAAAGGTGTT (F)	56°	
	CCCTCTAACCACCCACCACA (R)		

Análise de expressão do gene *SFN* em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários

Purificação de RNA e síntese de cDNA

Para as análises de expressão do gene *SFN*, foram selecionadas linhagens celulares demonstrando padrões distintos de metilação do gene *SFN* e/ou alterações do número de cópias. Em adição, outro parâmetro utilizado foi a presença ou não de mutação do gene *TP53* e a classificação molecular baseada em dados da literatura (para revisão, Neve *et al.*, 2006). O RNA total foi extraído das linhagens celulares usando o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) e subsequentemente analisado quanto à sua integridade pelo Agilent 2100 Bioanalyzer [Figura 8], e então tratado com DNase I para remoção de resíduos contaminantes de DNA genômico. Nesta etapa, foi utilizado o kit *DNase I Amplification grade* da Invitrogen®, seguindo as recomendações do fabricante. A seguir, o cDNA foi sintetizado utilizando o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* da Applied Biosystems®, onde foi adicionado à preparação de RNA purificado na concentração de 1ng/μl: tampão 10X concentrado; dNTP Mix 25X; RT Random Primers 10X; a enzima *Multiscribe Reverse Transcriptase*; RNase Inhibitor e água Nuclease-free. Essa preparação foi incubada a 25°C por 10 min; 37°C por 120 min e

85°C por 5 min. Aliquotas de cDNA foram utilizadas como molde durante a qPCR. As reações foram realizadas em triplicatas em um volume final de 15µl.

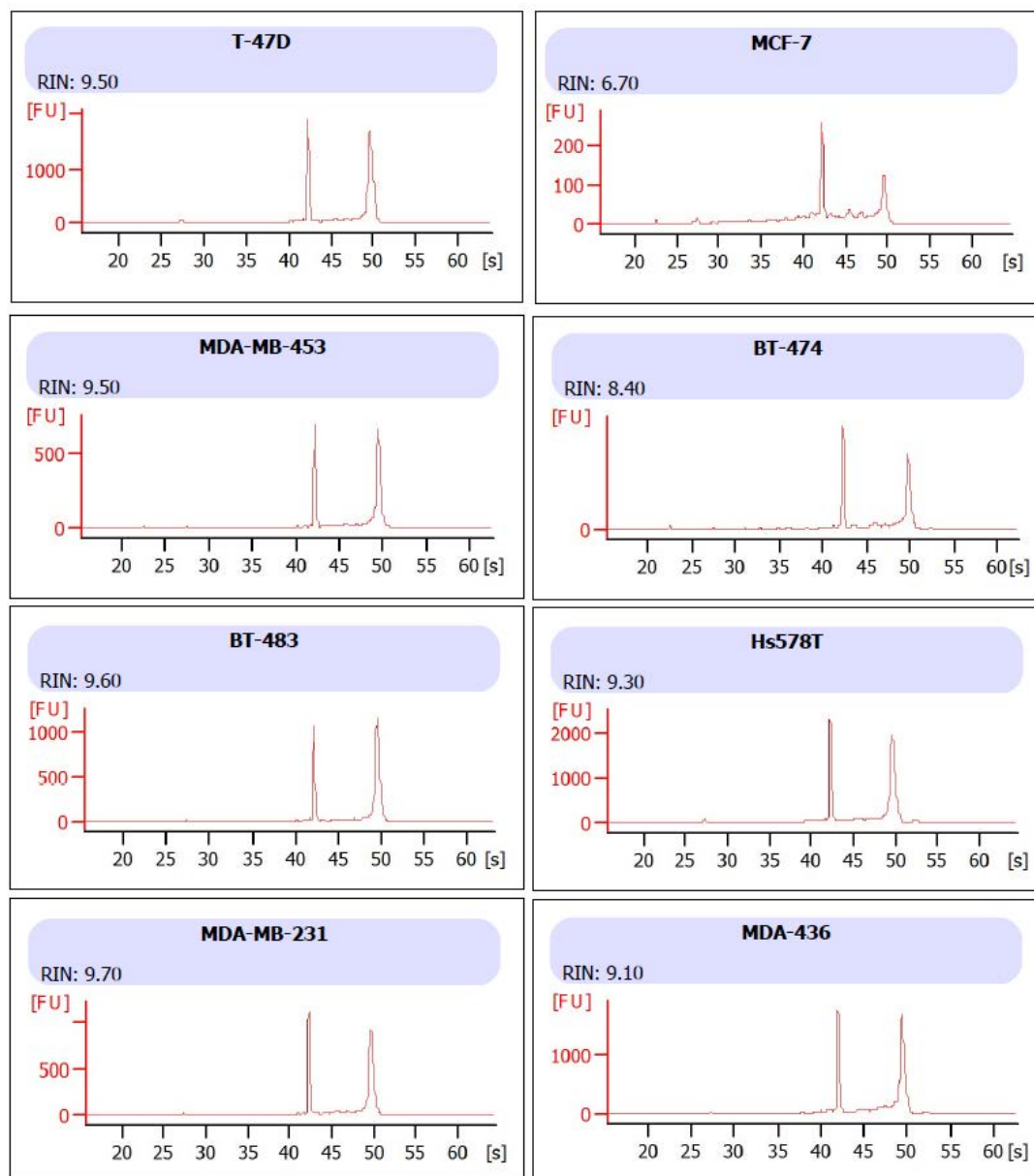


Figura 8. Análise de integridade do RNA das 8 linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários utilizadas no ensaio de expressão gênica. Ensaio: Eukaryote Total RNA Nano 2100 (Agilent Technologies). Os picos indicam as frações 18S e 28S do RNA ribossômico, respectivamente. RIN, *RNA Integrity Number*.

Padronização do ensaio de expressão gênica em tempo real (qRT-PCR)

Para a determinação do nível de expressão do gene *SFN*, inicialmente foi realizada a análise da eficiência de amplificação de cada par de primer: do gene alvo (*SFN*) e o controle endógeno (*GAPDH*). Para tanto, foi elaborada uma curva de amplificação baseada no uso de 6 diferentes pontos de diluição do cDNA (1/10; 1/20; 1/40; 1/80; 1/160). Inicialmente, o cDNA obtido de uma única linhagem foi selecionado, dada a preferência a uma linhagem não metilada (MDA-MB-468); contudo, não foram obtidos resultados satisfatórios. Em seguida, foram escolhidas 4 amostras de cDNAs obtidos de diferentes linhagens celulares e a partir desses, foi elaborado um *pool* dos mesmos para a padronização do experimento. Para a definição da concentração dos oligonucleotídeos para a análise de expressão foi realizada a titulação dos *primers*, onde através de uma reação padrão em tempo real foram feitas triplicatas com diferentes concentrações. Como melhor resultado, obtivemos a concentração de 75nM para ambos os pares de *primers*. O gráfico de amplificação e a curva de eficiência para os dois conjuntos de *primers* (gene alvo e normalizador) encontram-se nas figuras 9 e 10.

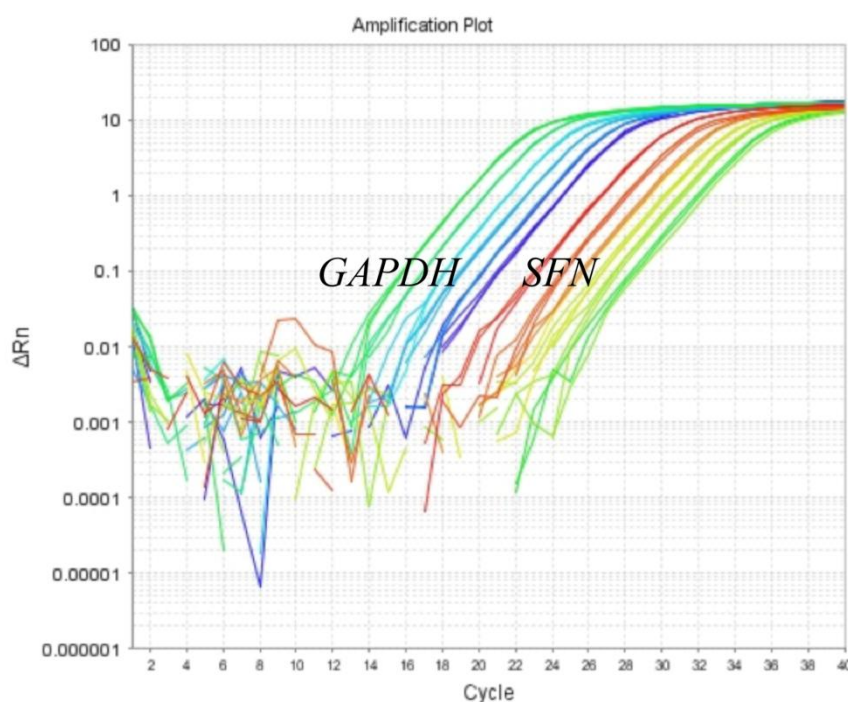


Figura 9. Padronização do ensaio de PCR em tempo real. Gráfico de amplificação dos genes *SFN* (alvo) e controle endógeno (*GAPDH*) a partir de diluições seriadas do cDNA obtido a partir de um *pool* de linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários.

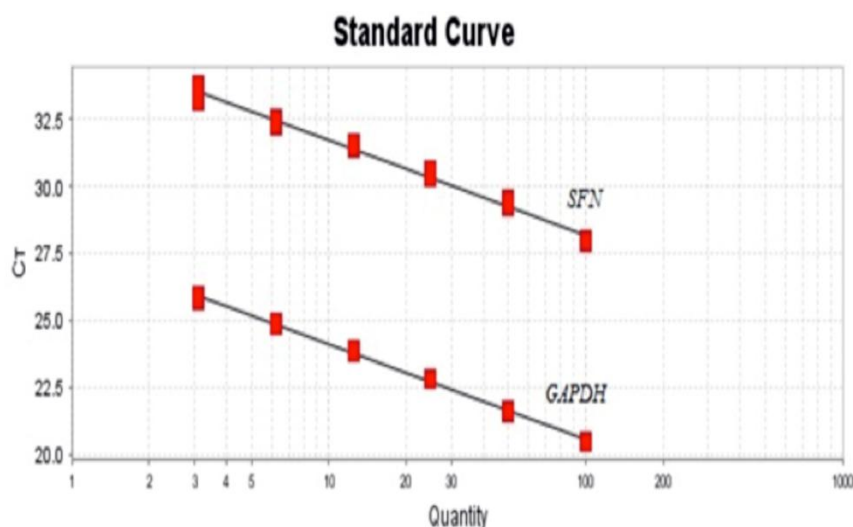


Figura 10. Curva padrão formada pelo teste de eficiência, destacando os pontos de diluição utilizados na análise. Para o gene *SFN*, os parâmetros obtidos foram: $slope=-3,576$; $Y-Inter+ 35.336$; $R^2= 0,988$ e eficiência igual a 90,406%; e para o gene *GAPDH* foram: $slope= -3.571$; $Y-Inter=27.696$; $R^2: 0,998$ e eficiência igual a 90,568%.

Análise de expressão gênica do gene *SFN* em linhagens celulares derivadas de câncer de mama

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento *Step One Real time PCR System* (Applied Biosystems®) utilizando o *QuantiFast SYBR® Green PCR Kit* (Qiagen®), nas seguintes condições: um período de aquecimento de ativação inicial de 95°C por 5 min seguido por 35 ciclos de 2 passos com desnaturação a 95°C por 10s e anelamento combinado à extensão a 60°C por 30s. Para cada linhagem, foram realizadas análises em culturas em duplicatas não tratadas ou tratadas com 5-Aza-2'-Desoxicitidina, um agente desmetilante utilizado comumente para se avaliar o efeito da metilação do DNA na repressão transcricional inferida indiretamente pelo aumento da expressão quando não há sítios metilados na ilha CpG associada ao gene após o tratamento com a droga, para tal experimento foram utilizadas amostras cujo tratamento foi realizado em estudo prévio do grupo (Prando *et al.*, 2011). A quantificação relativa foi calculada pelo uso do *software* do próprio equipamento (*StepOne™ Software v2.3*).

Análise *in vitro* do efeito do tratamento com o agente desmetilante 5'-Aza-Desoxicitidina e exposição à radiação ionizante

As linhagens celulares foram cultivadas em meio de cultura específicos em frascos de cultura de 25 cm³ e encubadas em estufa apropriadamente umidificadas a 37°C e 5% de CO₂. O meio DMEM contendo 10% Soro fetal bovino (FBS) foi utilizado nas linhagens celulares MDA-MB-231 e MDA-MB-436, e o RPMI contendo 10% de FBS foi usado na cultura da linhagem T-47D. Para cada linhagem, foram estabelecidas culturas em duplicatas não tratadas e tratadas com 5-Aza-2'-Desoxicitidina, um agente desmetilante utilizado comumente para se avaliar o efeito da metilação do DNA na repressão transcricional. O tratamento das linhagens utilizou o seguinte protocolo: 1 × 10⁶ células foram semeadas em frascos de cultura de 25 cm³ em meio de cultura suplementado com 10% de soro bovino fetal. Após 24 horas, adicionou-se 5-Aza-2'-desoxicitidina na concentração de 1 μM e as células foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ durante 96 horas. Devido à instabilidade química da droga, o meio de cultura foi renovado a cada 24 horas durante 5 dias (Prando et al., 2011).

Exposição das linhagens celulares de carcinoma mamário à radiação ionizante

O efeito das alterações do número de cópias e da metilação aberrante na resposta à radiação ionizante foi avaliado nas linhagens MDA-MB-231, MDA-MB-436 e T47D. Esta etapa do estudo contou com a colaboração do Físico Médico Prof. Dr. Marco Antonio Rodrigues Fernandes, do Departamento de Dermatologia e Radioterapia, da Faculdade de Medicina da UNESP. As células foram mantidas em cultivo *in vitro* em monocamada em placas de cultura celular específica que foram irradiadas utilizando-se uma energia de 6MV (raios x) a partir de um acelerador linear de elétrons (Clinac 2100C) a uma taxa de dose de 320 cGy/min, segundo estudo de Wang *et al.* (2013). Após a exposição, as mesmas retornaram à incubadora a 37°C e 5% CO₂ para a finalização do ensaio de citotoxicidade celular por MTT.

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

Um total de 5000 células/poço foram semeadas em placas de cultura de 96 poços em meio adequado para cada linhagem celular. Após 24 horas para a aderência das células, as mesmas foram expostas à radiação em uma dose de 4Gy e incubadas à 37°C, 5% de CO₂, por um período de tempo variável (12, 24, 48, 72 e 96 horas). Decorrido este período, o meio de cultura foi removido e então foi adicionado meio de cultura contendo 5mg/ml de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Ao final deste período, a mistura da reação foi cuidadosamente aspirada e serão acrescentados em cada poço 200µl de Dimetil Sulfóxido (DMSO). Após 10 minutos a leitura foi realizada em Espectrofotômetro para microplacas Epoch (BioTec®) a um comprimento de onda de 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

Análise estatística

Foram utilizados parâmetros como média e desvio padrão para descrever os dados das pacientes e o *status* de metilação do gene *SFN*. As diferentes variáveis clínicas e histopatológicas foram obtidas no prontuário das pacientes e foram agrupadas como variáveis dicotômicas que foram definidas *a priori* para as análises baseadas na intensidade de coloração dos marcadores imunohistoquímicos (ER, PgR, HER2, p53 e Ki67) ou redução/ausência de imunocoloração. 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 sobrevivência, foram censurados os tempos das pacientes que permaneceram vivas até a data final do seguimento clínico; 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 $\lambda(t; z)$. 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 IBB, UNESP.

Referências

ACS - American Cancer Society. **Breast Cancer Facts & Figures**, 2013-2014.

ACS - American Cancer Society. **Breast cancer, 2013**. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-breast-cancer-types>. Acesso em: 21 de Abril de 2014.

AKAHIRA, J.; SUGIHASHI, Y.; SUZUKI, T.; ITO, K.; NIKUURA, H.; MORYIA, T.; NITTA, M.; OKAMURA, H.; INOUE, S.; SASANO, H.; OKAMURA, K.; YAEHASHI, N. Decreased Expression of 14-3-3 Is Associated with Advanced Disease in Human Epithelial Ovarian Cancer: Its Correlation with Aberrant DNA Methylation. **Clinical Cancer Research**. 10: 2687–2693, 2004. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0510

AKAVIA, U.D.; LITVIN, O.; KIM, J.; SANCHEZ-GARCIA, F.; KOTLIAR, D.; CAUSTON, H.C.; POCHANARD, P.; MOZES, E.; GARRAWAY, L.A.; PE’ER, D. An Integrated Approach to Uncover Drivers of Cancer. **Cell**. 143: 1005-1017, 2010. doi 10.1016/j.cell.2010.11.013

ALBERTSON, D.G.; COLLINS, C.; MCCORMICK, F.; GRAY, J.W. Chromosome aberrations in solid tumors. **Nature Genetics**. 34: 369–376, 2003. doi:10.1038/ng1215

ALEXANDROV, L.B.; NIK-ZAINAL, S.; WEDGE, D.C.; APARÍCIO, A.J.R.; BEHJATI, S. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**. 500(7463): 415-421, 2013. doi:10.1038/nature12477

ALEXANDROV, L.B.; STRATTON, M.R. Mutational signatures: the patterns of somatic mutations hidden in cancer genomes. **Curr Opin Genet Dev**. 24:52 – 60, 2014. doi: 10.1016/j.gde.2013.11.014

AUBELE, M.; WERNER, M.; HOFER, H. Genetic alterations in presumptive precursor lesions of breast carcinomas. **Anal Cell Pathol**. 24:69-76, 2002.

BARCELLOS-HOFF, M.H.; PARK, C.; WRIGHT, E.G. Radiation and the microenvironment-tumorigenesis and therapy. **Nat. Rev. Cancer**. 5: 867–875, 2005. doi:10.1038/nrc1735

BARROS, A.C.S.D.; BARBOSA, E.M.; GEBRIM, L.H. Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama. In: Projeto Diretrizes Médicas. **Associação Médica Brasileira & Conselho Federal de Medicina**, 2001.

BAUER, K.R.; BROWN, M.; CRESS, R.D.; PARISE, C.A.; CAGGIANO, V. Descriptive Analysis of Estrogen Receptor (ER)-Negative, Progesterone Receptor

(PR)-Negative, and HER2-Negative Invasive Breast Cancer, the So-called Triple-Negative Phenotype: A Population-Based Study From the California Cancer Registry. **Cancer**. 109: 1721-1728, 2007. doi 10.1002/cncr.22618

BERGER, S.L.; KOUZARIDES, T.; SHIEKHATTAR, R.; SHILATIFARD, A. An operation definition of epigenetics. **Genes & Development**. 23:781–783, 2009. doi: 10.1101/gad.1787609

BIECHE, I. & LIDEREAU, R. Genetic alterations in breast cancer. **Genes Chromosomes Cancer**. 14: 227–251, 1995.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**. 47: 396-98, 2007. doi:10.1038/nature05913

CALDEIRA, J.R.F.; PRANDO, E.C.; QUEVEDO, F.C.; NETO, F.A.M.; RAINHO, C.A.; ROGATTO, R.S. *CDHI* promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. **BMC Cancer**. 6:48, 2006. doi:10.1186/1471-2407-6-48

CAMPBELL, L.L. & POLIAK, K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution?. **Cell cycle**. 6: 2332-2338, 2007. doi: 10.4161/cc.6.19.4914

CARVALHO, D.; SHARMA, S.; YOU, J.S.; SU, S.; TABERLAY, P.C.; KELLY, T.K.; YANG, X.; LIANG, G.; JONES, P.A. DNA methylation screening identifies driver epigenetic events of cancer cell survival. **Cancer Cell**. 21: 655–667, 2012. doi: 10.1016/j.ccr.2012.03.045

CASALI DA ROCHA, J.C.; RAMIREZ, R.; DA COSTA, S.C.V. Câncer de Mama. In: Ferreira; Casali-Da-Rocha (Ed). **Oncologia Molecular**. 2. Ed. São Paulo: Atheneu, 2010. P. 217-225.

CHAN, T.A.; HERMEKING, H.; LANGAUER, C.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. 14-3-3 sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. **Nature**. 401: 616–620, 1999. doi:10.1038/44188

CONNOLLY, R. & STEARNS, V. Epigenetics as a Therapeutic Target in Breast Cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**. 17:191-204, 2012. doi 10.1007/s10911-012-9263-3

COSMIC. **Catalogue of somatic mutations in cancer**. Disponível em: <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>. Acesso em 27 de Abril de 2014.

DAWSON, M.A. & KOUZARIDES, T. Cancer Epigenetics: From mechanism to therapy. **Cell**. 150(1): 12-27, 2012. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.013

DELLAMBRA, E.; GOLISANO, O.; BONDANZA, S.; SIVIERO, E.; LACAL, P.; MOLINARI, M.; D'ATRI, S.; DE LUCA, M. Downregulation of 14-3-3 σ prevents clonal evolution and leads to immortalization of primary human Keratinocytes. **The Journal of Cell Biology**. 149: 1117-1129, 2000. doi: 10.1083/jcb.149.5.1117

DHAR, S.; SQUIRE, J.A.; HANDE, M.P.; WELLINGER, R.J.; PANDITA, T.K. Inactivation of 14-3-3s Influences Telomere Behavior and Ionizing Radiation-Induced Chromosomal Instability. **Molecular and Cellular Biology**. 20(20): 7764–72, 2000. doi: 10.1128/MCB.20.20.7764-7772.2000

DOUGHERTY, M.K. & MORRISON, D.K. Unlocking the code of 14-3-3. **Journal of Cell Science**. 117(10): 1875-84, 2004. doi:10.1242/jcs.01171

ESPADA, J.; ESTELLER, M. DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. **Semin Cell Dev Biol**. 21(2): 238-46, 2010. doi:10.1016/j.semcdb.2009.10.006

ESTELLER, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. **Oncogene**. 21: 5427 – 5440, 2002. doi:10.1038/sj.onc.1205600

ESTELLER, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nature Reviews**. 8: 286-298, 2007. doi:10.1038/nrg2005

ESTELLER, M. Epigenetics in Cancer. **New England Journal of Medicine**. 358: 1148-59, 2008. doi: 10.1056/NEJMra072067

FEINBERG, A.P. & VOLGSTEIN, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. **Nature**. 301: 89-92, 1983.

FERGUSON, A.T.; EVRON, E.; UMBRIGHT CB, PANDITA TK, CHAN TA, HERMEKING H.; MARKS, J.R.; LAMBERS, A.R.; FUTREAL, P.A.; STAMPFER, M.R.; SAKUMAR, S. High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 locus leads to gene silencing in breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Science**. 97: 6049–54, 2000. doi: 10.1073/pnas.100566997

FEUK, L.; CARSON, A.R.; SCHERER, S.W. Structural variation in the human genome. **Nat Rev Genet**. 7:85-97, 2006. doi:10.1038/nrg1767

FIGUEROA, M.E.; LUGTHART, S.; LI, Y.; ERPELINCK-VERSCHUEREN, C.; DENG, X.; CHRISTOS, P.J.; SCHIFANO, E.; BOOTH, J.; PUTTEN, W.V.; SKRABANEK, L.; CAMPAGNE, F.; MAZUMDAR, M.; GREALLY, J.M.;

VALK, P.J.M.; LO^W WENBERG, B.; DELWEL, R.; MELNICK, A. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. **Cancer Cell**. 17: 13–27, 2010. doi 10.1016/j.ccr.2009.11.020

FOULKES, W.D.; SMITH, I.E.; REIS-FILHO, J.S. Triple-negative breast cancer. **N Engl J Med**. 363: 1938–48, 2010. doi: 10.1056/NEJMra1001389

FU, H.; SUBRAMANIAN, R.R.; MASTERS, S.C. 14-3-3 PROTEINS: Structure, Function, and Regulation. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 40:617–47, 2000. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.40.1.617

GARDINO, A.K.; YAFFE, M.B. 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**. 22: 688-95, 2011. doi: 10.1016/j.semcd.2011.09.008

GERLINGER, M.; ROWAN, A.J.; HORSWELL, S.; LARKIN, J.; ENDESFELDER, D.; *et al.* Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. **New England J Med**. 366(10): 883-92, 2012. doi: 10.1056/NEJMoa1113205

GOING, J.J. Stages on the way to breast cancer. **Journal of Pathol**. 199: 1–3, 2003. doi: 10.1002/path.1281

GROOT, J.S.; PAN, X.; MEELDIJK, J.; WALL, E.V.D.; DIEST, P.J.V.; MOELANS, C.B. Validation of DNA promoter hypermethylation biomarkers in breast cancer — a short report. **Cellular Oncology**. 37: 297-303, 2014. DOI 10.1007/s13402-014-0189-1

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell Review**. 4;144(5): 646-74, 2011. doi 10.1016/j.cell.2011.02.013

HE, L. & HANNON, G.J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nat Rev Genet**. 5:522-531, 2004. doi:10.1038/nrg1379

HERMAN, J.G. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 9(5): 359–367, 1999. doi: 10.1006/scbi.1999.0138

HERMAN, J.G.; GRAFF, J.R.; MYOHANEN, S.; NELKIN, B.D.; BAYLIN, S.B. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proceedings of the National Academy of Science**. 93: 9821-26, 1996.

HERMEKING, H. The 14-3-3 cancer connection. **Nature Reviews of Cancer**. 97(11): 931–43, 2003. doi:10.1038/nrc1230

HERMEKING, H.; BENZINGER, A. 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. **Seminars in Cancer Biology**. 16: 183–192, 2006. doi:10.1016/j.semcancer.2006.03.002

HERMEKING, H.; LENGAUER, C.; POLYAK, K.; HE, T. C.; ZHANG, L.; THIAGALINGAM, S.; KINZLER, K. .; VOGELSTEIN, B. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. **Molecular Cell**. 1: 3-11, 1997. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80002-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80002-7)

HORIE-INOUE, K. & INOUE, S. Epigenetic and proteolytic inactivation of 14-3-3 in breast and prostate cancers. **Seminars in cancer biology**. 16: 235-39, 2006. doi: 10.1016/j.semcancer.2006.03.006

HUANG, Y.; NAYAK, S.; JANKOWITZ, R.; DAVIDSON, N.E.; OESTERREICH, S. Epigenetics in breast cancer: what's new?. **Breast Cancer Research**. 13(6):225-238, 2011. doi: 10.1186/bcr2925

IARC- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Globocan 2012**: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence in worldwide in 2012. Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx Acessado em 17 de março de 2014.

ILLINGWORTH, R.S.; BIRD, A.P. CpG islands – ‘A rough guide’. **FEBS Letters**. 583(11):1713-20, 2009. doi: 10.1016/j.febslet.2009.04.012

IWATA, N.; YAMAMOTO, H.; SASAKI, S.; ITOH, F.; SUZUKI, H.; KIKUCHI, T.; KANETO, H.; IKU, S.; OZEKI, I.; KARINO, Y.; SATOH, T.; TOYOTA, J.; SATOH, M.; ENDO, T.; IMAI, K. Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 s gene in human hepatocellular carcinoma. **Oncogene**. 19: 5298-5302, 2000. doi: 10.1038/sj.onc.1203898

JOHNSON, C.; JOHNSON, S.; STAFFORD, M.J.; CAMPBELL, D.G.; TOTH, R.; MACKINTOSH, C. Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites. **Biochemistry Journal**. 427: 69–78, 2010. doi:10.1042/BJ20091834

JONES, P.A. & BAILYN, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature Reviews Genetics**. 3: 415–428, 2002. doi:10.1038/nrg816

JOHNSON, C.; CROWTHER, S.; STAFFORD, M.J.; CAMPBELL, D.G.; TOTH, R.; MACKINTOSH, C. Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites. **Biochem J**. 427: 69-78, 2010. doi:10.1042/BJ20091834

- JOHNSON-THOMPSON, M.C. & GUTHRIE, J. Ongoing Research to Identify Environmental Risk Factors in Breast Carcinoma. **Cancer Supplement**. 88(5): 1224-29, 2000. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142
- KENEMANS, P.; VERSTRAETEN, R.A.; VERHEIJEN, R.H.M. Reprint of oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. **Maturitas**. 2004; 61(1):141-150. doi: 10.1016/j.maturitas.2008.11.010
- KIM, H.J.; KIM, J.H.; CHIE, E.K.; YOUNG, P.D.; KIM, I.A.; KIM, H. DNMT (DNA methyltransferase) inhibitors radiosensitize human cancer cells by suppressing DNA repair activity. **Radiation Oncology**. 7(1): 39-48, 2012. doi:10.1186/1748-717X-7-39
- KNUDSON JR, A.G. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. **Proc. Nat. Acad. Sci**. 68(4): 820-823, 1971.
- LAIRD, P.W. Cancer epigenetics. **Human Molecular Genetics**. 14(1): 65-76, 2005. doi:10.1093/hmg/ddi113
- LAKHANI, S.R. The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. **J. Pathol**. 187: 272–278, 1999. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896
- LARONGA, C.; YANG, H.; NEAL, C.; LEE, M. Association of the Cyclin-dependent Kinases and 14-3-3 Sigma Negatively Regulates Cell Cycle Progression. **The Journal of Biological Chemistry**. 275(30): 23106–23112, 2000. doi:10.1074/jbc.M905616199
- LAWRENCE, M.S.; STOJANOV, P.; POLAK, P.; *et al.* Mutational Heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. **Nature**. 499: 214-218, 2013. doi:10.1038/nature12213
- LEE, B.B.; LEE, E.J.; JUNG, E.H.; CHUN, H.K.; CHANG, D.K.; SONG, S.Y.; PARK, J.; KIM, D.H. Aberrant methylation of *APC*, *MGMT*, *RASSF2A*, and *Wif-1* genes in plasma as a biomarker for early detection of colorectal cancer. **Clin. Cancer Res**. 15: 6185–6191, 2009. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0111
- LEVINE, A.J. Tumor suppressor genes. **Science & Medicine**. 2(1):28-37, 1995.
- LI, Z.; DONG, Z.; MYER, D.; YIP-SHNEIDER, M.; LIU, J.; CUI, P.; SCHMITD, M.C.; ZHANG, J. Role of 14-3-3 σ in poor prognosis and in radiation and drug resistance of human pancreatic cancers. **BMC Cancer**. 10: 598, 2010. doi:10.1186/1471-2407-10-598

LODYGIN ,D. & HERMEKING, H. The role of epigenetic inactivation of 14-3-3 in human cancer. **Cell Research**. 15: 237–46, 2005. doi:10.1038/sj.cr.7290292

MARTA, G.N.; HANNA, S.A.; MARTELLA, E.; SILVA, J.L.S.; CARVALHO, H.A. Câncer de mama estágio inicial e radioterapia: atualização. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 57(4):468-474, 2011. doi: 10.1590/S0104-42302011000400024

MCPHERSON, K.; STEEL, C.M.; DIXON, J.M. ABC of breast diseases. Breast cancer: epidemiology, risk factors, and genetics. **BMJ**. 309:1003–6, 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - **INCA**. Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>. Acesso em: 26 de Março de 2014.

MUSLIN, A.J.; TANNER, J.W.; ALLEN, P.M.; SHAW, A.S. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. **Cell**. 84:889-97, 1996. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81067-3

NEGRAES, P.D.; FAVARO, F.P.; CAMARGO, J.L.; OLIVEIRA, M.L.C.S.; GOLDBERG, J.; RAINHO, C.A.; SALVADORI, D.M. DNA methylation patterns in bladder cancer and washing cell sediments: a perspective for tumor recurrence detection. **BMC Cancer**. 8:238, 2008. doi:10.1186/1471-2407-8-238

NEVE, R.M.; CHIN, K.; FRIDLYAND, J.; YEH, J.; BAEHNER, F.L.; FEVR, T.; CLARK, L.; BAYANI, N.; COPPE, J.P.; TONG, F.; SPEED, T.; SPELLMAN, P.T.; DEVRIES, S.; LAPUK, A.; WANG, N.J.; KUO, W.L.; STILWELL, J.L.; PINKEL, D.; ALBERTSON, D.G.; WALDMAN, F.M.; MCCORMICK, F.; DICKSON, R.B.; JOHNSON, M.D.; LIPPMAN, M.; ETHIER, S.; GAZDAR, A.; GRAY, J.W. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. **Cancer Cell**. 10: 515–527, 2006. doi: 10.1016/j.ccr.2006.10.008

NIEMANTSVERDRIET, M.; JONGMANS, W.; BACKENDORF, C. Radiation response and cell cycle regulation of p53 rescued malignant keratinocytes. **Exp Cell Res**. 310:237–47, 2005. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.07.016

NORDLING, C.O. A new theory on the cancer-inducing mechanism. **Br J Cancer**. 7(1):68-72, 1953.

OLIVEIRA, N.F.P.; PLANELLO, A.C.; ANDIA, D.C.; PARDO, A.P.S. Metilação de DNA e câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 56(4): 493-499, 2010.

O'CONNEL, P.; PEKKEL, V.; FUQUA, S.; OSBORNE, C.K.; ALLRED, D.C. Molecular genetic studies of early breast cancer evolution. **Breast Cancer Res Treat.** 32: 5-12, 1994. doi: 10.1007/BF00666201

PARK, S.Y.; KWON, H.J.; LEE, H.E.; RYU, H.S.; KIM, S-W.; KIM, J.H.; KIM, I.A.; JUNG, N.; CHO, N-Y.; KANG, G.H. Promoter CpG Island hypermethylation during breast cancer progression. **Virchows Arch.** 458: 73-84. doi: 10.1007/s00428-010-1013-6

PARMIGIANI, R.B. & CAMARGO, A.A. O genoma humano e o câncer. In: Ferreira; Casali-Da-Rocha (Ed). **Oncologia Molecular**. 2. Ed. São Paulo: Atheneu, 2010. P. 3-13.

PAULIN, R.; GRIGG, G.W.; DAVEY, M.W. Urea improves efficiency of bisulfite mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. **Nucleic Acid Research.** 26: 5009:5010, 1998. doi: 10.1093/nar/26.21.5009

PEROU, C.M.; SÜRLIE, T.; EISEN, M.B.; RIJN, M.V.; JEFFREYK, S.; REES, C.A.; *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature.** 406(6797):747–752, 2000. doi:10.1038/35021093

PRANDO, E.C.; CAVALLI, L.R.; RAINHO, C.A. Evidence of epigenetic regulation of the tumor suppressor gene cluster flanking RASSF1 in breast cancer cell lines. **Epigenetics.** 6(12):1413-24, 2011. doi: 10.4161/epi.6.12.18271

PRASAD, G.L.; VALVERIUS, E.M.; MCDUFFIE, E.; COOPER, H.L. Complementary DNA cloning of a novel epithelial cellmarker protein, HME1, that may be down-regulated in neoplastic mammary cells. **Cell Growth Differ.** 3: 507–513, 1992.

POGRIBNY, I.; RAICHE, J.; SLOVACK, M.; KOVALCHUK, O. Dose-dependence, sex- and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes. **Biochemical and Biophysical Research Comm.** 320: 1253–1261, 2004. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.06.081

QI, W.; LIU, X.; QIAO, D.; MARTINEZ, J.D. Isoform-Specific Expression of 14-3-3 Proteins in Human Lung Cancer Tissues. **International Journal of Cancer.** 113: 359–363, 2005. doi: 10.1002/ijc.20492

QI, W. & MARTINEZ, J.D. Reduction of 14-3-3 proteins correlates with increased sensitivity to killing of human lung cancer cells by ionizing radiation. **Radiation Research.** 160: 217:23, 2003.

REYA, T.; MORRISON, S.J.; CLARKE, M.F.; WEISSMAN, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**. 414:105-11, 2001. doi:10.1038/35102167

REDIG, A.J. & MCALLISTER, S.S. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. **J Intern Med**. 274: 113–126, 2013. doi: 10.1111/joim.12084

SABIN, L.H. & WITTEKIND, C.H. **TMN Classification of Malignant Tumours**. 5th edition. John Wiley & Sons. Inc. Publication, 1998.

SANDOVAL, S. & ESTELLER, M. Cancer epigenomics: beyond genomics. **Current Opinion in Genetics & Development**. 22:50–55, 2012. doi: 10.1016/j.gde.2012.02.008

SANGUINETTI, C.J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Bio Tech**. 17(5):914-21, 1994.

SAWAN, S. & VAISSIÈRE, T.; MURR, R.; HERCEG, Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. **Mutation Research**. 642: 1–13, 2008. doi:10.1016/j.mrfmmm.2008.03.002

SHARMA, S.; KELLY, T.K.; JONES, P.A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**. 31(1): 27-36, 2010. doi:10.1093/carcin/bgp220

SHMITT, F.C.L. & GOBBI, H. Mama. In: Filho, G.B. (Aut). **Bogliolo-Patologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2011. p. 651-682.

STRATTON, M.R.; CAMPBELL, P.J.; FUTREAL, P.A. The cancer genome. **Nature Reviews**. 458: 719-724, 2009. doi:10.1038/nature07943

STRATTOM, M.R. Exploring the Genomes of Cancer Cells: Progress and Promise. **Science**. 331: 1553, 2011. doi: 10.1126/science.1204040

SUZUKI, M.M. & BIRD, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. **Nature reviews**. 9: 465-476, 2008. doi:10.1038/nrg2341

SUZUKI, H.; ITOH, F.; TOYOTA, M.; KIKUCHI, T.; KAKIUCHI, H.; IMAI, K. Inactivation of the 14-3-3 gene is associated with 5 CpG island hypermethylation in human cancers. **Cancer Research**. 60: 4353–7, 2000.

SZYF, M., POUYA PAKNESHANB, SHAFAT A. RABBANI. DNA methylation and breast cancer. **Biochemical Pharmacology**. 68: 1187–1197, 2004. doi:10.1016/j.bcp.2004.04.030

TRAVIS, R.C. & KEY, T.J.; Oestrogen exposure and breast cancer risk. **Breast Cancer Res.** 5:239-247, 2003. doi 10.1186/bcr628

THOMSON, C.A. Diet and breast cancer: understanding risks and benefits. **Nutr Clin Pract.** 27(5): 636-50, 2012. doi: 10.1177/0884533612454302

UICC - Union for International Cancer Control. **TNM: classification of malignant tumors, 2013.** Disponível em: <http://www.uicc.org/resources/tnm>. Acesso em: 21 de Abril de 2014.

UMBRICHT, C.B.; EVRON E, GABRIELSON E, FERGUSON A, MARKS J, SUKUMAR S. Hypermethylation of 14-3 3 (stratfin) is an early event in breast cancer. **Oncogene.** 20: 3348–53, 2001. doi: 10.1038/sj.onc.1204438

VAN DEN HEUVEL, S. & HARLOW, E. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. **Science.** 262: 205 -2054, 1993. doi: 10.1126/science.8266103

VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K.W. Cancer genes and the pathways they control. **Nature Medicine.** 10: 789 – 799, 2004. doi:10.1038/nm1087

WALKER, K.; BRATTON, D.J.; FROST, C. Premenopausal endogenous oestrogen levels and breast cancer risk: a meta-analysis. **Br J Cancer.** 105(9): 1451-7, 2011. doi:10.1038/bjc.2011.358

WANG, Z.; CUMMINS, J.M.; SHEN, D.; CAHILL, D.P.; JALLEPALLI, P.V.; WANG, T.L.; PARSONS, D.W.; TRAVERSO, G.; AWAD, M.; SILLIMAN, N.; PTAK, J.; SZABO, S.; WILLSON, J.K.; MARKOWITZ, S.D.; GOLDBERG, M.L.; KARESS, R.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B.; VELCULESCU, V.E.; LENGAUER, C. Three classes of genes mutated in colorectal cancers with chromosomal instability. **Cancer Research.** 64:2998-3001, 2004. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0587

WANG, L.; ZHANG, Y.; LI, R.; CHEN, Y.; PAN, X.Y.; LI, G.Y.; DAI, F.; YANG, J. 5-aza-2'-deoxycytidine Enhances the Radiosensitivity of Breast Cancer Cells. **Cancer Biot Radiopharmaceuticals.** 28 (1): 34-44, 2013. doi:10.1089/cbr.2012.1170.

WATERMAN, M.J.; STAVRIDIS, E.S.; WATERMAN, J.L.; HALAZONETIS, T.D. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. **Nature Genetics.** 19(2):175-8, 1998. doi:10.1038/542

WEBER, M., HELLMANN, I., STADLER, M.B., RAMOS, L., PAABO, S., REBHAN, M. AND SCHUBELER, D. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. **Nat. Genet.** 39, 457–466, 2007. doi:10.1038/ng1990

WILKER, E.W.; VAN, VUGT M.A.; ARTIM, S.A.; HUANG, P.H.; PETERSEN, C.P.; REINHARDT, H.C.; FENG, Y.; SHARP, P.A.; SONENBERG, N.; WHITE, F.M.; YAFFE, M.B. 14-3-3 sigma controls mitotic translation to facilitate cytokinesis. **Nature.** 446(7133): 329-32, 2007. doi:10.1038/nature05584

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Estimates: Breast cancer prevention and control, 2013.** disponível em: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/> acesso em 23 de Março de 2014.

WHO. World Health Organization: **International of diseases for oncology.** 2nd edition. World Health Organization, Geneva; 1990.

WOOSTER, R.; WEBER, B.L. Breast and ovarian cancer. **N Engl J Med.** 348:2339–47, 2003. doi: 10.1056/NEJMra012284

YAFFE, M.B. How do 14-3-3 proteins work? Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. **FEBS Letters.** 513: 53-57, 2002. doi: 10.1016/S0014-5793(01)03288-4

YAFFE, M.B.; RITTINGER, K.; VOLINIA, S.; CARON, P.R.; AITKEN, A.; LEFFERS, H.; GAMBLIN, S.J.; SMERDON, S.J.; CANTLEY, L.C. The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. **Cell.** 91: 961- 71, 1997. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80487-0

YIP, C.H.; TAIB, N.A.M.; MOHAMED, I. Epidemiology of Breast Cancer in Malaysia. **Asian Pacific J Cancer Prev.** 7: 369-374, 2006.

YOKOTA, J. Tumor progression and metastasis. **Carcinogenesis.** 21(3):497-503, 2000. doi: 10.1093/carcin/21.3.497

ZENG, Y. & PIWNICA-WORMS, H. DNA damage and replication checkpoints in Fission Yeast require nuclear exclusion of the Cdc25 phosphatase via 14-3-3 binding. **Molecular and Cellular Biology.** 19(11): 7410–7419, 1999.

ZHOU, W.; TANG, F.; XU, J.; WU, X.; FENG, Z.; LI, H.; LIN, D.; SHAO, C.; LIU, Q. Aberrant upregulation of 14-3-3 σ expression serves as an inferior prognostic biomarker for gastric cancer. **BMC Cancer.** 11: 397- 387, 2011. doi:10.1186/1471-2407-11-397

ZURITA, M.; LARA, P.C.; MORAL, R.; TORRES, B.; LINÁRES-FERNÁNDEZ, J.L.; ARRABAL, S.R.; MARTÍNEZ-GALÁN, J.; OLIVER, F.J.; ALMODÓVAR, J.M.R. Hypermethylated 14-3-3- σ and *ESR1* gene promoters in serum as candidate biomarkers for the diagnosis and treatment efficacy of breast cancer metastasis. **BMC Cancer**. 10:217, 2010. doi:10.1186/1471-2407-10-217

Manuscrito

Research Article

Title

Integrated analysis of copy number and DNA methylation alterations of the *SFN* gene in primary breast cancer and breast cancer cell lines

Danielle B Brotto¹; Érika C Prando¹; José RF Caldeira²; Marco AR Fernandes³; Rogério A Oliveira⁴; Luciane R Cavalli⁵; Silvia R Rogatto^{6,7}; Cláudia A Rainho¹

¹Department of Genetics, Biosciences Institute, Sao Paulo State University-UNESP, Botucatu, SP, Brazil

²Department of Senology, Amaral Carvalho Hospital, Jaú, SP, Brazil

³Department of Demartology and Radiotherapy, Faculty of Medicine, Sao Paulo State University-UNESP, Botucatu, SP, Brazil

⁴Department of Biostatistics, Biosciences Institute, Sao Paulo State University-UNESP, Botucatu, SP, Brazil

⁵Department of Oncology, Lombardi Comprehensive Cancer Center, Georgetown University, Washington, DC, USA

⁶International Center of Research and Training (CIPE), A. C. Camargo Cancer Center, Sao Paulo, SP, Brazil

⁷Department of Urology, Faculty of Medicine, Sao Paulo State University-UNESP, Botucatu, SP, Brazil

Correspondence to: Cláudia Aparecida Rainho, Department of Genetics, Biosciences Institute, Sao Paulo State University, UNESP, Botucatu, Sao Paulo, Brazil, 18618-970 (E-mail: rainho@ibb.unesp.br)

Keywords: breast cancer, *SFN* gene, DNA methylation, copy number alterations, prognostic marker, 5-Aza-dC.

Abbreviations: 5-Aza-dC, 5-Aza-2'-Deoxycytidine; LOH, loss of heterozygosity; IDC, infiltrating ductal carcinomas; ILC, infiltrating lobular carcinomas; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; HR, hazard ratio; CI, confidence interval; qMSP, quantitative methylation-specific PCR; cGy, centigray.

Abstract

Integrated analysis of genetic and epigenetic data is an effective approach for the study of the mechanisms driving cancer development. The *SFN* gene (stratifin; 14-3-3 σ) is a direct target of the p53 tumor suppressor protein, whose expression is induced in response to DNA damage leading to the inhibition of cell cycle progression at the G2/M checkpoint. Down-regulation of *SFN* expression has been generally attributed to the hypermethylation of its gene-body CpG Island; however, the prognostic value and underlying mechanisms of *SFN* downregulation remains unclear. Indeed, the present study aims to characterize of genetic and epigenetic alterations of the *SFN* gene in a cohort of 84 breast cancer samples as well as in 20 cell lines (3 derived from normal breast epithelium and 17 from breast carcinomas). *SFN* methylation was observed in approximately 79% of primary breast cancer, while copy number alterations were detected at lower frequencies. *SFN* unmethylated breast tumors were associated with a decreased overall survival ($p=0.0036$) and metastasis occurrence ($p=0.021$) when compared to the group of infiltrating ductal carcinomas with methylated alleles. As expected, breast cell lines showed gene expression levels reliant to the methylation pattern and copy number dosage. Moreover, the combined effect of 5-Aza-dC treatment and radiation exposure revealed differences in the radiosensitivity between basal (MDA-MB-231 and MDA-MB-436) and luminal subtype (T47D) cell lines. Taking together, these findings endorse that *SFN* hypermethylation occurs in high frequencies in breast cancers; nevertheless, patients with unmethylated breast tumors may be associated with poor outcome. Our preliminary *in vitro* analysis also indicates that the radiotherapy response might be related to the primary methylation *status* of breast cancer cell lines in a molecular subtype-specific manner. Additional studies are necessary to determine if *SFN* methylation patterns could be used for prognostic and predictive purposes.

Background

Human breast cancer remains among the commonest diagnosed cancer and the leading causes of cancer death between women worldwide, although in the least years the number of cancer survivors continues to increase.¹ The recent reduction in the breast cancer mortality in high-income countries resulted from improvements in early detection and treatment. However, while the incidence in developing countries is lower than in developed countries, the mortality is much higher,²⁻⁴ probably due to the diagnosis at advanced stages of tumor progression.

SFN gene (stratifin; also known as 14-3-3 σ) encodes a member of the highly homologous 14-3-3-protein family, found in all eukaryotic cells. This large family comprises seven isoforms in human cells (β , γ , ϵ , η , σ , θ and ζ), each encoded by individual genes. The *SFN* gene is located at 1p36.11 and while the most of the isoforms are ubiquitous, its expression is restricted to epithelial cells. Moreover, this protein plays an important role in regulatory process such as signal transduction pathways, cell cycle regulation, checkpoints activations and apoptosis.^{5,6} This regulation happens through phospho-dependent binding to a wide range of intracellular molecules.

The *SFN* gene is a direct target of the p53 protein since a response element recognized as a p53-binding motif is located at 1.8 kilobases from its transcription start site, acting as a direct target of p53. Thus, *SFN* gene expression is induced in response to DNA damage, such as, by ionizing radiation.⁷⁻⁹ After DNA damage, *SFN* is trans-activated by p53 to promote cell cycle arrest and leads the cell to the repair system.⁵ reported that 14-3-3 σ induces a G2/M-arrest by sequestering cyclin B and E from the cytoplasm, separating from their nuclear substrates and preventing the entry into mitosis. Consequently, 14-3-3 σ -deficient cells falls into maintain the arrest and undergo mitotic catastrophe.^{5,10} Recently, targeted proteomics approaches indicate novel 14-3-3 σ -associated proteins involved in diverse cellular processes, which may become deregulated after disruption of 14-3-3 σ expression in cancer cells.¹¹

Inactivation of tumor suppressor genes is mediated by genetic and epigenetic mechanisms. In some cases, genetic and epigenetic events complement each other resulting in biallelic inactivation of the gene function.^{6,12} In fact, the epigenetic inactivation of the *SFN* gene occurs at an early stage of tumor development and may allow evasion from senescence and promote genomic instability.¹³⁻¹⁶ *SFN* gene has a CPG-rich region (CpG island) located within its single exon that has been shown as frequently hypermethylated in most type of cancers.¹⁷ Additionally, this CpG island

hypermethylation is correlated with loss of *SFN* transcription in breast,^{14,18-20} ovarian,²¹⁻²³ endometrial,²³ prostate,²³⁻²⁶ hepatocellular,^{17,27} gastric,¹⁷ oral²⁸ and lung cancers,²⁹ among others. Hence, lost or reduced protein expression might be relevant to tumor formation and progression.^{6,7} Despite the *SFN* gene localizes in a region frequently studied for loss of heterozygosis (LOH), according to Ferguson and co-workers (2000),¹⁸ genetic mutations might be late events and not the main mechanism for loss of gene expression.

The effectiveness of cancer therapy may be closely associated with apoptosis or mitotic catastrophe. The DNA damage-induced genes such as *TP53* and *SFN* regulate cell-cycle arrest and triggers apoptosis following DNA damage. The *SFN* epigenetic silencing may result in failure in maintain G2-phase arrest and the cell could not begin the repair damages mechanism, leading the cell to undergo mitotic catastrophe.³⁰ Thus, it has been proposed that DNA methylation of *SFN* gene might become a biomarker for breast cancer therapy and further help in early detection in cancer.²⁰ On the other hand, a few reports had shown that disabling of G2/M checkpoint leads the cells to apoptosis due to increase of genomic instability, raising questions about radiosensitivity of the tumoral cells.^{5,13}

The aim of the present study was to investigate the clinical relevance of the methylation *status* and copy number alterations of the *SFN* gene in primary breast cancer, especially in infiltrating ductal subtypes. We also have characterized a panel of breast cancer cell lines in order to support future studies aiming to investigate the effects of disruption of the G2/M checkpoint due to the loss of *SFN* function as well as its underlying mechanisms.

Results

Combined DNA methylation and copy number analysis of *SFN* gene in primary breast cancer

The present study was aimed to characterize alterations in the DNA methylation and copy number of the *SFN* gene in 84 primary breast cancers, including 76 infiltrating ductal carcinomas (IDCs), 5 infiltrating lobular carcinomas (ILCs), and 3 cases diagnosed as other subtypes. The mean age at diagnosis was 56.7 ± 15.7 years. MSP (Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction) was used to detect *SFN* methylation

after sodium bisulfite treatment. Both methylated and unmethylated alleles were detected in 67 out of 84 samples (79.8%). Copy number determination by qPCR was performed in 82 out of 84 tumoral samples and revealed 10 cases of losses and 4 cases of gains of *SFN* gene. The combined analysis of DNA methylation and copy number alterations showed that among the 68 cases disomic at this locus, 16 of them presented exclusively unmethylated alleles, while methylated alleles were detected in the remaining 52 tumoral samples. Besides, all cases showing copy number alterations were also methylated (**Table S1; Fig. S1**).

Taking in account that the present cohort consists mainly of IDCs, this subgroup of breast cancer samples was selected for consecutive statistical analysis. No association was found between *SFN* copy number alterations and clinical and histopathological parameters. Table 1 shows the details of pairwise associations between *SFN* gene methylation and clinical and histological variables in the group of 76 IDCs (60 cases showing methylated alleles and 16 samples showing exclusively the amplification of unmethylated alleles). The distribution of *SFN* methylation pattern was significantly associated with metastasis occurrence: among the group of 60 patients with methylated breast tumoral samples, 3 developed metastasis, whereas among the group of 16 patients with unmethylated tumors, 6 evolved to metastasis ($p = 0.021$). Although not significant, it was also observed a trend of association between tumor size and the *SFN* methylation pattern. Interestingly, *SFN* methylation was associated with a longer survival compared to the group of patients with unmethylated carcinomas ($p = 0.0036$) (**Fig. 1**). Similar to the findings observed in Kaplan-Meier curve, breast cancer patients with tumors showing *SFN* unmethylated pattern were associated to a higher risk of disease-specific death ($HR = 8.246$; $95\% CI = 1.563-43.501$; $p = 0.0129$) (**Table 2**).

Univariate analysis also showed that clinical stage ($p = 0.0045$), lymph node involvement ($p = 0.0189$), and metastasis occurrence ($p = 0.0003$) were prognostic parameters uncommitted associated with disease-specific survival rates (**Table 2**). However, after multivariate analysis, it was detected that metastasis was the only parameter to correlate significantly with a higher risk of death.

Effect of genetic and epigenetic changes in the expression of *SFN* gene in breast cancer cell lines

Since methylation-dependent transcriptional silencing of *SFN* could lead to mitotic catastrophe and sensitize epithelial cells to DNA-damaging agents, we first performed a

comprehensive analysis in order to evaluate the effect of copy number alterations and aberrant DNA methylation of *SFN* in its expression level in a panel of 20 breast epithelial cells. This panel included 3 normal epithelial breast cells and 17 breast cancer cell lines. Normal epithelial breast cell lines (184A1, 184B5, and MCF10A) were unmethylated and disomic. It was noted that 9 breast cancer cell lines showed genomic losses at this locus (MDA-MB-361, MCF7, ZR-75-1, ZR-75-30, SK-BR-3, BT-474, BT-483, MDA-MB-468, and MDA-MB-436) and two others showed genomic gains (MDA-MB-453 and Hs578T). Aberrant DNA methylation was detected in one luminal (BT-483) and in one basal (MDA-MB-436) subtype cell lines. In both cell lines, this epigenetic change was associated to the single copy retained. Further, Hs-578T cell line exhibited, additionally to gains of copies, both methylated and unmethylated alleles (**Fig. 2**).

Based on the above results, 8 breast cancer cell lines were selected to the evaluation of the effect of *SFN* genetic and epigenetic alterations in the gene transcriptional levels: T47D, MCF7, MDA-MB-453, BT-474, BT-483 (luminal subtype), MDA-MB-231, Hs578T, and MDA-MB-436 (basal subtype cell lines. Molecular subtype and p53 status was also considered. As expected, *SFN* copy number dosage and DNA methylation were inversely correlated with *SFN* transcript levels (normalized by *GAPDH* gene expression). Also, it was observed a synergistic effect of copy loss and DNA methylation in downregulation of this gene (**Fig. 3A**).

In order to confirm the effect of *SFN* gene body methylation in the transcriptional downregulation, these 8 cell lines were pharmacologically demethylated by treatment with the DNA methyltransferase inhibitor 5-Aza-2'deoxyctidine (5-Aza-dC). *SFN* expression levels were not altered by 5-Aza-dC treatment in unmethylated cells lines (T47D, MCF7, MDA-MB-453, BT-474, and MDA-MB-231), but the reactivation of the single allele was evident in BT-483 and MDA-MB-436 cells. Interestingly, a modest effect was observed in Hs578T cell after 5-Aza-dC treatment (**Fig. 3B**).

Effect of radiation exposure after treatment with 5-Aza-dC in breast cancer cell lines

Three breast cancer cell lines were selected for the evaluation of the effect of 5-Aza-dC on radiosensitivity: two cell lines disomic and unmethylated (T47D and MDA-MB-231) and one cell line showing concomitant *SFN* loss and DNA methylation (MDA-MB-436). As can be seen in Fig. 3C, demethylation induced by 5-Aza-dC treatment resulted

in differential survival rates as compared to untreated cells ($p < 0.0001$). There was a statistically significant difference in survival fraction among luminal *versus* basal cells. Interestingly, the effect of DNA demethylation in T47D (luminal subtype) differs from that observed in MDA-MD-231 and MDA-MB-436, both classified as basal subtype. While 5-Aza-dC treatment in T47D cells increased survival rates after radiation exposure, in the other cells this treatment was associated with radiosensitivity. Compared to untreated cells, the survival fraction after treatment with 5-Aza-dC differs statistically in T47D ($p = 0.0012$) and MDA-MD-231 ($p = 0.0061$); however, in the MDA-MB-436 it was observed a trend to lower survival rate after this treatment ($p = 0.0855$). Further, the increase on radiosensitivity in MDA-MB-231 cells was more evident when compared to MDA-MB-436 (MDA-MB-231+5-Aza-dC *versus* MDA-MB-436+5-Aza-dC, $p = 0.0971$), although not statistically significant. Altogether, these findings indicate that genetic and epigenetic of *SFN* could, at least in part, explain this differences.

Discussion

Reports of clinical significance of deregulation of the *SFN* gene in prognosis of cancer patients are scarce and controversial. In the present study, we aimed to investigate genetic and epigenetic mechanisms associated with loss of *SFN* gene expression in sporadic breast cancer samples and their association with clinical and histopathological parameters as well as with patient outcome. Since point mutations of the *SFN* gene are rarely detected in human cancers (approximately 0.1% of all tumoral samples according data from the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer – COSMIC, <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>),³¹ this study investigated copy number and DNA methylation alterations of the *SFN* gene in a group of 84 breast cancer samples, 90% of them diagnosed as infiltrating ductal carcinomas (IDCs). After an average follow-up period of 87.2 months (ranging from 6 to 153 months), it was observed that *SFN* methylation pattern was associated with prognosis in this subtype of breast cancer patients.

SFN hypermethylation and consequent loss of expression of the 14-3-3 σ protein is frequently identified in human cancers,^{6,17} including breast cancer.^{14,18-20,32} Epigenetic silencing of the *SFN* gene by CpG methylation has been detected in high frequencies in

breast carcinoma. The first study of Ferguson *et al.* (2000)¹⁸ demonstrated that after conventional MSP analysis, all six DNA samples of microdissected mammary epithelial cells obtained from reduction mammoplasty specimens were unmethylated; in contrast, all 32 samples of DNA from microdissected breast carcinomas were methylated at this locus. Subsequently, it was demonstrated that *SFN* hypermethylation occurs at an early stage in the progression to invasive disease; although could also be detected in histologically normal adjacent tumoral tissue.¹⁴ The potential of *SFN* methylation as diagnostic marker was investigated by quantitative methylation-specific PCR (qMSP) approach in bisulfite-modified DNA from 66 breast carcinomas, 31 fibroadenomas and 12 normal breast tissues: statistically significant differences for *SFN* methylation levels were observed among groups of tissue samples, among other genes (*DAPK*, *CCND2*, *RASSF1A*, *CALCA*, *APC*, *HIN1*, *RARB*, *TIG1*, and *GSTP1*).³³ Interestingly and contrarily to previous data,¹⁸ the *SFN* methylation levels found in normal tissue were higher than those found in breast cancer samples. Since conventional MSP has been unsuccessful in discriminating cancerous from non-cancerous breast lesions, Jeronimo *et al.* (2003)³⁴ suggested that qMSP analysis of *SFN* gene using appropriate cut-off values could be part of a selected gene panel in order to identify breast malignancy.

In the present study, using a non-quantitative methylation-specific PCR (MSP) technique, we report high methylation frequencies of *SFN* gene in sporadic breast cancer (60/76 IDCs, 4/5 ILCs, as well as in the apocrine, metaplastic and papillary carcinomas). Even considering that MSP may be prone to detecting low-level of methylation, and consequently we are not able to differentiate DNA methylation levels in the group of breast cancer samples classified as methylated, our data showed that unmethylated *SFN* gene was associated with poor prognosis in infiltrating ductal carcinomas: among the group of 60 IDC patients presenting *SFN* methylated alleles, only 3 progressed to metastasis, while from 16 IDC cases unmethylated, 6 evolved to metastasis ($p=0.021$). Also, patients carrying *SFN* unmethylated tumors showed lower disease-specific survival rates ($p=0.0036$). However, the clinical relevance of these data remains to be clarified since it has been previously reported that in breast cancer patients the medium of serum levels of methylated *SFN* gene differs between metastatic patients and healthy control as well as between disease-free and metastatic patients, but not between health controls and breast cancer free-patients.²⁰

The effect of epigenetic silencing of *SFN* gene and the altered expression levels of the protein 14-3-3 σ in human cancer yet are contradictory. Few studies fall into

demonstrated the value of *SFN* as a prognostic or predictive biomarker.³⁵ *SFN* downregulation induced by DNA hypermethylation is frequently detected in several cancer types and its expression levels has been negatively correlated with advanced disease and poor outcome, such as previous reports in ovarian cancer,^{21,36,37} intrahepatic cholangiocarcinoma,³⁸ melanoma,³⁹ nasopharyngeal carcinoma,⁴⁰⁻⁴² neuroblastoma,^{43,44} and uterine papillary serous carcinoma.⁴⁵ On the other hand and similar to our findings of poor survival and occurrence of metastasis in the group of breast cancer patients with unmethylated *SFN*, in non small cell lung cancer the survival was significantly longer in the methylated group after a median follow-up period of 9.8 months.⁴⁶ Increased 14-3-3 σ expression levels due to *SFN* gene hypomethylation was correlated with malignant progression of endometrial carcinoma.⁴⁷ Further, intense immunostaining of 14-3-3 σ protein was seen in 8/10 metastatic tumors from ovarian cancer patients while the primary tumors without metastasis at diagnosis showed moderate immunostaining for this protein.⁴⁸ These findings suggest that might be a correlation between *SFN* methylation patterns and consequent impaired expression with invasive ability and metastatic potential of the tumor.

14-3-3 σ is an epithelial cell marker whose expression is induced by DNA damage after p53 trans-activation and has been shown to prevent mitotic catastrophe, usually associated with G2/M arrest.⁴⁹ Thus, 14-3-3 σ expression is reactivated as a result of cancer therapy, including irradiation and cytotoxic chemotherapy.⁵⁰ Beyond that, it is possible that epigenetic silencing of *SFN* gene and the lower 14-3-3 σ levels contributes to malignant transformation by impairing the G2/M cell cycle checkpoint function, thus allowing an accumulation of genetic defects meanwhile after chemo/radiotherapy, the induced DNA damage could lead the cell to death by genomic instability. In endometrial cancer cell lines, G2/M arrest induced by DNA demethylation treatment was tightly correlated with inhibition of cell proliferation and cell cycle arrest in G2/M phase, but not with apoptosis; the antiproliferative effect was correlated with substantial induction of p21 and 14-3-3 σ expression.⁵¹ According to these authors, the lack of apoptotic cell death in the studied endometrial cancer cell lines could be explained by substantial upregulation of p21, an anti-apoptotic protein.⁵² On the other hand, it has been demonstrated that G2/M arrest inhibitors may augment cancer cell death after exposure to ionizing radiation and DNA-damaging chemotherapeutic agents.^{53,54} Also, in breast cancer there is evidence that 14-3-3 σ upregulation is correlated with drug resistance.⁵⁵ Although the underlying mechanisms are not still clear, this evidence

should explain the association of unmethylated *SFN* with poor prognosis in the present study.

In order to add to the current knowledge of the role of *SFN* gene in human cancer, new studies are clearly necessary. These studies should be based on *in vitro* approaches by using specific *SFN* gene disruption assays as well as forced overexpression. Thus, initially we selected a panel of epithelial breast and breast cancer cell lines to characterize *SFN* copy number, DNA methylation and mRNA expression. These data should be useful to future investigators make decisions regarding to what cell line should be the most adequate for their proposal. Copy number alterations were detected in 55% of the cell lines investigated while DNA methylation in just 3 of them. These frequencies contrast to those observed in primary breast cancer samples: high frequency of DNA methylation changes and just 14 out of 82 breast cancer samples showing copy number alterations (approximately 12% of losses and 5% of gains). In general, these data are in accordance to those from COSMIC database. Also, there is no association between *SFN* copy number alterations and prognosis of breast cancer patients. However, loss of *SFN* gene cooperates with DNA methylation in downregulate transcription. As expected, treatment with the DNA methyltransferase inhibitor 5-Aza-dC leads to gene reactivation in a gene dosage dependent manner. Also, we detected that treatment with 5-Aza-dC lead to different effects on survival of breast cancer cell lines: while the treatment enhances the radiosensitivity in basal breast cancer cells (MDA-MB-231 and MDA-MB-436) the opposite effect was observed in T47D cells (luminal subtype). Since the treatment induced reactivation of the only *SFN* methylated allele of MDA-MB-436, but not altered *SFN* expression levels of MDA-MB-231 (which is disomic and unmethylated), it is probable that the effect observed could be explained by the primary methylation status of other genes involved in radiotherapy response. Wang et al. (2013)⁵⁶ demonstrated that combined 5-Aza-dC treatment and irradiation induced growth suppression *in vitro* in MDA-MB-231 cells. It has been previously reported that 14-3-3 regulation by p53 mediates a chemotherapy response to 5-fluorouracil in MCF-7 breast cancer cells via Akt inactivation.⁵⁷ To these authors, decreased p53 expression, but not promoter hypermethylation, was responsible for the downregulation of 14-3-3 σ in MCF-7/5-Fu cells. The data of methylation absence combined to loss of *SFN* copies in MCF-7 in our study corroborates this finding. However, our preliminary data of the combined effect of 5-Aza-dC and irradiation are p53 independent, since the three cells analyzed have mutations in *TP53* gene. Targeted

proteomic analysis of 14-3-3 σ indicated that cancer-specific loss of 14-3-3 σ expression by epigenetic silencing or p53 mutations contribute to cancer formation by multiple routes,¹¹ including genes involved in regulation of cytoskeletal dynamics, polarity, adhesion, mitogenic signaling, and motility, besides of inhibitory effect on G2/M arrest. Thus, the different radiosensitizing effects observed in the luminal *versus* basal cell lines detected in our preliminary data may be due to the distinct methylation profile of these cells, similar to that observed in primary breast cancer. Kamalakaran et al. (2011)⁵⁸ demonstrated that DNA methylation patterns in luminal breast cancers differ from non-luminal subtypes and correlates with relapse risk independent of other clinical variables. In conclusion, our data add evidence that *SFN* methylation should be involved in patient outcome and therapy response. Future studies using strategies based on combined 5-Aza-dC treatment with chemo/radiotherapy in selected breast cancer cell lines according to *SFN* methylation pattern, copy number dosage, and p53 status should identify the pathways controlled by 14-3-3 σ protein and advance our understanding of the roles of *SFN* breast cancer subtypes and their clinical implications.

Materials and Methods

The present study included 84 breast carcinoma samples (76 infiltrating ductal, 5 infiltrating lobular, 1 apocrine ductal, 1 metaplastic, and 1 papillary) obtained from patients at Amaral Carvalho Hospital, Jaú, São Paulo, Brazil. The patients were advised of the procedures and provided written informed consent. The Institutional Research Ethics Committee approved the study. The patients were accrued consecutively and the inclusion criteria were no previous histologic diagnosis of breast cancer. The patients had undergone segmental resection or mastectomy and none of them had received radiotherapy or chemotherapy before sample collection. Patients were followed prospectively with a mean follow-up of 87.2 ± 35.12 months.

Seventeen breast cancer cell lines were also selected: 11 classified as luminal subtype (MDA-MB-361, MDA-MB-415, MDA-MB-453, MCF7, MDA-MB-134 IV, ZR-75-1, ZR-75-30, BT-483, SKBR3, BT-474, and T47D), two Basal-Like A (BT20 and MDA-MB-468), and four Basal-Like B (MDA-MB-231, Hs 578T, MDA-MB-436, BT-549) and three non-tumorigenic cell lines 184-A1, 184-B5 and MCF-10A. Breast cancer cell line cultures were performed at 37°C in a humidified environment containing 5% CO₂

and appropriate medium containing 10% fetal bovine serum as previously described by Prando et al. (2006).⁵⁹

Immunohistochemical analysis

Standard immunohistochemical detection was previously performed, as described by Caldeira et al., (2006)⁶⁰ on sections from archival paraffin embedded tissue. Protein expression was determined using specific antibodies. Positive and negative controls for each marker were routinely performed during experiments.

DNA extraction

Genomic DNA was prepared from frozen tumor tissues by standard SDS/proteinase K digestion followed by phenol and chloroform extraction and ethanol precipitation.

Sodium Bisulfite modification and Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction (MSP)

The conversion of DNA by sodium bisulfite was performed as previously described.⁵⁸ Modified DNA was used for assessing the methylation status of the *SFN* gene by PCR amplification, using specific primers pairs for methylated [5'-TGGTAGTTTTTATGAAAGGCGTC-3' (sense) and 5'-CCTCTAACCGCCCACCACG-3' (antisense)] and unmethylated sequences [5'-ATGGTAGTTTTTATGAAAGGTGTT-3' (sense) and 5'-CCCTCTAACCACCCACCACA-3' (antisense)]. The set of primers were selected based on previous study by Ferguson et al., (2000).¹⁸ The amplification reactions were performed on separate microtubes and were conducted in volume of 25µL, containing 0.25 mM of each primer, 200 mM of each dNTP, 15 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂ and 1U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems). The PCR conditions were as follows: 1 cycle at 95°C for 5 minutes; 31 cycles at 95°C for 45 seconds; 56°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds, and one cycle at 72°C for 4 minutes. The amplified products were visualized after electrophoresis in 6% polyacrylamide gel and stained with silver nitrate.⁶²

***SFN* Copy Number Determination**

Relative *SFN* copy number dosage was obtained by quantitative real time PCR using the TaqMan® Copy Number Assay *Hs01918768_cn* (Life Technologies). For each

reaction, 2µl of genomic DNA (concentration 5ng/µL) were mixed with 0.5µL of the target sequence probe (containing a pair of primers and TaqMan ® probe), 0.5µL of RNase P gene probe (primers and TaqMan ® probe) and 2µL of ultrapure water. A pool of DNA samples from healthy volunteers was used as calibrator and all samples were analyzed in triplicates. Cycling conditions were as follows: 10 min at 95°C, then 40 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min, followed by a final melt curve stage. Finally, the data were analyzed by qPCR CopyCaller ® Software v2.0 (Life Technologies).

Cell treatment with 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC)

Breast cancer cell lines were seeded at 5×10^5 cells in 25 cm³ culture flask in culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum. After 48h of growth, 1 µM 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC; Sigma) was added, and the cells were incubated for 96h. Due to its chemical instability, 5-Aza-dC was added to the fresh medium every 24h. A mock treatment was done with only medium and all experiments were performed in duplicates. The cells were then allowed to recover for 48 h prior to harvesting. Total RNA was extracted from the cell lines after the drug treatments and was used for cDNA synthesis and qRT-PCR analysis.

***SFN* expression levels**

Total RNA was extracted from the untreated and 5-Aza-dC treated cultured breast cell lines using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and subsequently purified with DNase I amplification grade (Invitrogen). RNA integrity was assessed by Agilent 2100 Bioanalyzer and RNA nano chips (Agilent Technologies). Total RNA was reverse transcribed with High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). The reaction was primed with random primers in a 20 µL volume, according to the manufacturer's instructions. The reverse transcription reaction was diluted 1:10 with sterile water before addition to the qRT-PCR reaction. The diluted reverse transcription reaction (2 µL) was used in a 15 µL reaction with 2x QuantiFast SYBR® Green PCR Kit (Qiagen®) by using the *SFN*-specific primers 5'-ACTCTTCTTGACAGCTGTTGAGC-3' (forward) and 5'-AACGAATTTGGCTACAGCAACA-3' (reverse), as following conditions: 1 cycle at 95°C for 5 min followed by 35 cycles of two steps: denaturation at 95°C for 10s and

annealing/extension at 60°C for 30s. The reactions were performed in triplicate in the StepOne Real-time PCR System (Applied Biosystems), and the results were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ -method normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) expression levels (forward 5'-CAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAA-3' and reverse 5'-TGTTGCTGTAGCCAAATTCGTT-3'). This endogenous control was experimentally chosen in a previous study of the group.⁶¹

Analysis of the effect of radiation exposure after treatment with 5-Aza-dC

Based on results of SFN methylation and copy number alteration analysis, three cells lines (MDA-MB-436, MDA-MB-231 and T47D) were selected to a pilot analysis of the combined effect of 5-Aza-dC and radiation exposure on cell survival. Cells were maintained in monolayer cultures with the appropriate medium and were irradiated using 6 MV X-rays from linear accelerator (Clinac 2100C) with a dose rate of 320 cGy/min and 1.5 cm bolus as compensators and then incubated at 37° C and 5% CO₂ until survival rate estimation by MTT assay.⁵⁶

Cell viability determination

Cell viability was determined through tetrazolium dye reduction with formazan particles. Untreated and treated with 5-aza-dC cell cultures were trypsinized and seeded into 96-well plates at 5000 cells/well with a complete culture medium. Allowing the time for cell attach, the plates were irradiated with a dose of 4Gy and then incubated at 37°C. At the indicated times after irradiation (12h, 24h, 48h, and 72h), the culture medium was removed, and 3-(4,5)-dimethylthiazolium-(-z-yl)-3,5-di-phenyltetrazolium romide (MTT) dye (5 mg/mL) was added to each well, followed by incubation for a further 4 hours. The reaction was terminated by the addition of dimethyl sulfoxide (DMSO), and absorbance was measured at a wavelength of 570nm in a microplate spectrophotometer Epoch (BioTec®). Experiments were made in triplicates.

Statistical analysis

Clinical and histopathological variables were obtained from patient's records. Immunohistochemical analyzes was based on staining intensity of markers (ER, PgR, HER2, p53 and Ki67) or reduction/absence of immunostaining. These pairwise tests utilized the following dichotomous variables, which were defined prior to any analysis on the basis of the staining index defined as absent/reduced expression levels (scores 0,

1, and 2) and positive/maximum staining (score 3) for ER, PgR, and HER2. To p53 protein, the expression level was categorized as negative (scores 0 and 1) or positive (scores 2 and 3). Survival analysis was performed by non-parametric Kaplan-Meier method and differences were evaluated by the log-rank test. The duration disease-specific overall survival was the interval between diagnosis and death. Observation time was the interval between diagnosis and last contact (death or last follow-up). Data were censored at the last follow-up for patients with no evidence of recurrence or progression; due deaths unrelated to breast cancer and for those with loss of follow-up was considered the date referred to the last follow-up according to the medical record as the censorship date. As multivariate statistical analysis, Cox model was used to evaluate the combined effects of clinical and histopathological variables, denoted by the vector z . We used the stepwise method to find which variables could significantly explain the risk function $\lambda(t, z)$. The significance level was 5% and statistical tests were performed using the statistical software package SAS/STAT, version 6.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) and GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

The author's declare that they have no competition interests.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Profix-CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grant# 07/59110-9) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Capes, Brazil. (Fapesp), Brazil.

The Tissue Culture Shared Resource (TCSR) of Georgetown University Lombardi Comprehensive Cancer Center is partially supported by NIH/NCI Cancer Center Support Grant (CCSG) Grant P30-CA51008, to the Lombardi Comprehensive Cancer Center.

References

1. DeSantis C, Jemal A, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013; 64: 52–62. doi: 10.3322/caac.21203
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69–90. doi:10.3322/caac.20107
3. World Health Organization. WHO. Cancer: Early detection. Breast cancer prevention and control. Geneva: World Health Organization; Available at: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/> 2014. Accessed 01 August 2014.
4. Yip CH, Taib NA. Breast health in developing countries. *Climacteric* 2014; 17: 1-6. doi: 10.3109/13697137.2014.947255
5. Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler, KW, Vogelstein B. 14-3-3 sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 1999; 401: 616–620. doi:10.1038/44188
6. Hermeking H. The 14-3-3 cancer connection. *Nature Reviews of Cancer* 2003; 97: 931–43. doi:10.1038/nrc1230
7. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, et al. 14-3-3 Sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1997; 1: 3–11. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80002-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80002-7)
8. Wilker EW, Grant RA, Artim SC, Yaffe MB. A structural basis for 14-3-3sigma functional specificity. *J Biol Chem* 2005; 280: 18891–8.
9. Rajagopalan S, Sade RS, Townslay FM, Fersht AR. Mechanistic differences in the transcriptional activation of p53 by 14-3-3 isoforms. *Nucleic Acids Research* 2010; 38: 893–906.

10. Laronga C, Yang HY, Neal C, Lee MH. Association of the cyclin dependent kinases and 14-3-3sigma negatively regulates cell cycle progression. J Biol Chem 2000; 275: 23106–12. doi:10.1074/jbc.M905616199
11. Benzinger A, Muster N, Koch HB, Yates JR, Hermeking H. Targeted Proteomic Analysis of 14-3-3 , a p53 Effector Commonly Silenced in Cancer. Molecular & Cellular Proteomics 2005; 4: 785-795. doi:10.1074/mcp.M500021-MCP200
12. Sandoval J, Esteller M. Cancer epigenomics: beyond genomics. Current Op Gen Develop 2012; 22: 50–55. doi 10.1016/j.gde.2012.02.008
13. Dhar S, Squire JA, Hande MP, Wellinger RJ, Pandita TK. Inactivation of 14-3-3s Influences Telomere Behavior and Ionizing Radiation-Induced Chromosomal Instability. Molecular and Cellular Biology 2000; 20: 7764–72. doi: 10.1128/MCB.20.20.7764-7772.2000
14. Umbricht CB, Evron E, Gabrielson E, Ferguson A, Marks J, Sukumar S. Hypermethylation of 14-3 3 (stratifin) is an early event in breast cancer. Oncogene 2001; 20: 3348–53. doi: 10.1038/sj.onc.1204438
15. Kunze E, Wendt M, Schlott T. Promoter hypermethylation of the 14-3-3, SYK and CAGE-1 genes is related to the various phenotypes of urinary bladder carcinomas and associated with progression of transitional cell carcinomas. Int J Mol Med 2006; 18: 547-557. doi: 10.3892/ijmm.18.4.547
16. Lodgyn D, Hermeking H. The role of epigenetic inactivation of 14-3-3σ in human cancer. Cell Research 2005; 15: 237-246. doi:10.1038/sj.cr.7290292
17. Suzuki H, Itoh F, Toyota M, Kikuchi T, Kakiuchi H, Imai K. Inactivation of the 14-3-3 σ gene is associated with 5 CpG island hypermethylation in human cancers. Cancer Research 2000; 60: 4353–7.

18. Ferguson AT, Evron E, Umbricht CB, Pandita TK, Chan TA, Hermeking H, et al. High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 σ locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 6049–54. doi: 10.1073/ypnas.100566997

19. Luo J, Feng J, Lu J, Wang Y, Tang X, Xie F, Li W. Aberrant Methylation profile of 14-3-3 sigma and its reduced transcription/expression levels in Chinese sporadic female breast carcinogenesis. *Medical Oncology* 2010; 27: 791–797. doi: 10.1007/s12032-009-9287-8

20. Zurita M, Lara PC, Moral R, Torres B, Lináres-Fernández JL, Arrabal SR, Martínez-Galán J, Oliver FJ, Almodóvar JMR. Hypermethylated 14-3-3- σ and ESR1 gene promoters in serum as candidate biomarkers for the diagnosis and treatment efficacy of breast cancer metastasis. *BMC Cancer* 2010; 10: 217. doi:10.1186/1471-2407-10-217

21. Akahira J, Sugihashi Y, Suzuki T, Ito K, Niikura H, Moriya T, Nitta M, Okamura H, Inoue S, Sasano H, Okamura K, Yaegashi N. Decreased Expression of 14-3-3 σ Is Associated with Advanced Disease in Human Epithelial Ovarian Cancer: Its Correlation with Aberrant DNA Methylation. *Clinical Cancer Research* 2004; 1: 2687–2693. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0510

22. Kaneuchi M, Sasaki M, Tanaka Y, Shiina H, Verma M, Ebina Y, et al. Expression and methylation status of 14-3-3 sigma gene can characterize the different histological features of ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 1156–62. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.02.171

23. Mhawech P, Benz A, Cerato C, Greloz V, Assaly M, Desmond JC, Koeffler HP, Lodygin D, Hermeking H, Herrmann F, Schwaller J. Downregulation of 14-3-3 σ in ovary, prostate and endometrial carcinomas is associated with CpG island methylation. *Modern Pathology* 2005; 18: 340–348. doi:10.1038/modpathol.3800240

24. Lodygin D, Diebold J, Hermeking H. Prostate cancer is characterized by epigenetic silencing of 14-3-3 σ expression. *Oncogene* 2004; 23: 9034–41. doi:10.1038/sj.onc.1208004
25. Cheng L, Pan CX, Zhang JT, Zhang S, Kinch MS, Li L, et al. Loss of 14-3-3 σ in prostate cancer and its precursors. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3064–8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0652
26. Urano T, Takahashi S, Suzuki T, Fujimura T, Fujita M, Kumagai J, et al. 14-3-3 σ is down-regulated in human prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 319: 795–800. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.05.056
27. Iwata N, Yamamoto H, Sasaki S, Itoh F, Suzuki H, Kikuchi T, Kaneto H, Iku S.; Ozeki, I, Karino Y, Satoh T, Toyota J, Satoh M, Endo T, Imai K. Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 sigma gene in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2000; 19: 5298– 5302. doi: 10.1038/sj.onc.1203898
28. Gasco M, Bell AK, Heath V, Sullivan A, Smith P, Hiller L, Yulug I, Numico G, Merlano M, Farrell PJ, Tavassoli M, Gusterson B, Crook T. Epigenetic inactivation of 14-3-3 sigma in oral carcinoma: association with p16(INK4a) silencing and human papillomavirus negativity. *Cancer Res* 2002; 62: 2072–2076.
29. Osada H, Tatematsu Y, Yatabe Y, Nakagawa T, Konishi H, Harano T, et al. Frequent and histological type-specific inactivation of 14-3-3 sigma in human lung cancers. *Oncogene* 2002; 21: 2418–24. doi: 10.1038/sj.onc.1205303
30. Kim H.J, Kim J.H, Chie, E.K, Young PD, Kim IA, Kim H. DNMT (DNA methyltransferase) inhibitors radiosensitize human cancer cells by suppressing DNA repair activity. *Radiation Oncology* 2012; 7: 39-48. doi:10.1186/1748-717X-7-39
31. COSMIC. Catalogue of somatic mutations in cancer. Available at: <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>. Accessed in April 27, 2014.

32. Martínez-Galán J, Torres B, del Moral R, Muñoz-Gámez JA, Martín-Oliva D, Villalobos M, Núñez MI, Luna JD, Oliver FJ, Almodóvar JMR. Quantitative detection of methylated ESR1 and 14-3-3- σ gene promoters in serum as candidate biomarkers for diagnosis of breast cancer and evaluation of treatment efficacy. *Cancer Biology & Therapy* 2008; 7: 958-965. doi: 10.4161/cbt.7.6.

33. Jeronimo C, Monteiro P, Henrique R, Costa MI, 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* 2008; 109: 27–34. doi 10.1007/s10549-007-9620-x

34. Jeronimo C, Costa I, Martins MC, Monteiro P, Lisboa S, Palmeira C, Henrique R, Teixeira MR, Lopes C. Detection of gene promoter hypermethylation in fine needle washings from breast lesions. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3413-7.

35. Mhawech-Fauceglia P, Herrmann FR, Andrews C, South S, Beck A, Lele S, Odunsi K. 14-3-3s Expression and prognostic value in patients with epithelial ovarian carcinoma: A high throughput tissue microarray analysis. *EJSO* 2009; 35: 763-767. doi:10.1016/j.ejso.2008.10.014

36. Montavon C, Gloss BS, Warton K, Barton CA, Statham AL, Scurry JP, Tabor B, Nguyen TV, Qu W, Samimi G, Hacker NV, Sutherland RL, Clark SJ, O'Brien PM. Prognostic and diagnostic significance of DNA methylation patterns in high grade serous ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 2012; 124: 582–588. doi:10.1016/j.ygyno.2011.11.026

37. Flanagan JM, Wilhelm-Benartzi CS, Metcalf m, Kaye B, Brown R. Association of somatic DNA methylation variability with progression-free survival and toxicity in ovarian cancer patients. *Annals of Oncology* 2013; 24: 2813–2818. doi:10.1093/annonc/mdt370

38. Kuroda Y, Aishima S, Taketomi A, Nishihara Y, Iguchi T, Taguchi K, Maehara Y, Tsuneyoshi M. 14-3-3 σ negatively regulates the cell cycle, and its down-regulation is associated with poor outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Human Pathology* 2007; 38: 1014–1022. doi:10.1016/j.humpath.2006.12.014
39. Schultz J, Ibrahim SM, Vera J, Kunz M. 14-3-3 σ gene silencing during melanoma progression and its role in cell cycle control and cellular senescence. *Molecular Cancer* 2009; 8: 53. doi:10.1186/1476-4598-8-53
40. Cheng AL, Huang WG, Chen ZC, Peng F, Zhang PF, Li MY, Li F, Li JL, Li C, Yi H, Yi B, Xiao ZQ. Identification of novel nasopharyngeal carcinoma biomarkers by laser capture microdissection and proteomic analysis. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 435–445. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1215
41. Yi B, Tan S-X, Tang C-E, Huang W-G, Cheng A-L, Li C, Zhang P-F, Li M-Y, Li J-L, Yi H, Peng F, Chen Z-CC, Xiao Z-Q. Inactivation of 14-3-3 s by Promoter Methylation Correlates With Metastasis in Nasopharyngeal Carcinoma. *Journal of Cellular Biochemistry* 2009; 106: 858–866. doi: 10.1002/jcb.22051
42. Chan SY-Y, To F-F, Leung S-F, Yip WW-L, MaK MK-F, Chung GT-Y, Lo K-W. 14-3-3 σ expression as a prognostic marker in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Oncology Reports* 2010; 24: 949-955. doi: 10.3892/or_00000941
43. Banelli B, Bonassi S, Casciano I, Mazzocco K, Di Vinci A, Scaruffi P, Brigati C, Allemanni G, Borzi` L, Tonini GP, Romani M. Outcome prediction and risk assessment by quantitative pyrosequencing methylation analysis of the SFN gene in advanced stage, high-risk, neuroblastic tumor patients. *International Journal of Cancer* 2010; 126: 656–668. doi: 10.1002/ijc.24768
44. Banelli B, Merlo DM, Allemanni G, Forlani A, Romani M. Clinical Potentials of Methylator Phenotype in Stage 4 High-Risk Neuroblastoma: An Open Challenge. *Plos One* 2013; 8(5): e63253. doi:10.1371/journal.pone.0063253

45. Suzuki F, Nagase S, Suzuki K, et al. Decreased Expression of 14-3-3 σ Is Predictive of Poor Prognosis for Patients with Human Uterine Papillary Serous Carcinoma. *Tohoku Journal Exp Med* 2013; 231: 193-199. doi: 10.1620/tjem.231.193
46. Ramirez JL, Rosell R, Taron M, Sanchez-Ronco M, Alberola V, Peñas R, Sanchez JM, Moran T, Camps C, Massuti B, Sanchez JJ, Salazarand F, Catot S. 14-3-3 σ Methylation in Pretreatment Serum Circulating DNA of Cisplatin-Plus-Gemcitabine-Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Predicts Survival: The Spanish Lung Cancer Group. *Journal Of Clinical Oncology* 2005; 23: 36 9105-9112. doi: 10.1200/JCO.2005.02.2905
47. Nakayama H, Sano T, Motegi A, Oyama T, Nakajima T. Increasing 14-3-3 sigma expression with declining estrogen receptor α and estrogen-responsive finger protein expression defines malignant progression of endometrial carcinoma. *Pathology International* 2005; 55: 707–715. doi: 10.1111/j.1440-1827.2005.01900.x
48. Ravi D, Chen Y, Karia B, Brown A, Gu TT. 14-3-3 s Expression Effects G2/M Response to Oxygen and Correlates with Ovarian Cancer Metastasis. *Plos One* 2011; 6. doi:10.1371/journal.pone.0015864
49. Lodygin D, Hermeking H. Epigenetic silencing of 14-3-3sigma in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 2006; 16: 214–224. doi:10.1016/j.semcancer.2006.03.008
50. Okumura H, Natsugoe S, Matsumoto M, Yokomakura N, Uchikado Y, Takatori H, et al. Predictive value of p53 and 14-3-3sigma for the effect of chemoradiation therapy on esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2005; 91: 84–9. doi: 10.1002/jso.20279
51. Steiner M, Clark B, Tang J-Z, Zhu T, Lobie PE. 14-3-3 σ mediates G2–M arrest produced by 5-aza-2'-deoxycytidine and possesses a tumor suppressor role in endometrial carcinoma cells. *Gynecologic Oncology* 2012; 127: 231–240. doi:10.1016/j.ygyno.2012.06.039

52. Sohn D, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Janicke RU. p21 blocks irradiation-induced apoptosis downstream of mitochondria by inhibition of cyclin-dependent kinase-mediated caspase-9 activation. *Cancer Res* 2006; 66: 11254–62. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1569

53. Bucher N, Britten CD. G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *British Journal of Cancer* 2008; 98: 523–528. doi:10.1038/sj.bjc.6604208

54. Sturgeon CM, Cinel B, Diaz-Marrero AR, McHardy LM, Ngo M, Andersen RJ, et al. Abrogation of ionizing radiation-induced G2 checkpoint and inhibition of nuclear export by Cryptocarya pyrones. *Cancer Chemother Pharmacol* Mar 2008;61(3): 407–13. doi 10.1007/s00280-007-0483-y

55. Liu Y, Liu H, Han B, Zhang JT. Identification of 14-3-3sigma as a contributor to drug resistance in human breast cancer cells using functional proteomic analysis. *Cancer Res* Mar 15 2006; 66(6):3248–55. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3801

56. Wang L, Zhang Y, Li R, Chen Y, Pan XY, Li GY, Dai F, Yang J. 5-aza-2'-deoxycytidine Enhances the Radiosensitivity of Breast Cancer Cells. *Cancer Biot Radiopharmaceuticals* 2013; 28: 34-44. doi:10.1089/cbr.2012.1170.

57. Zheng G, Xiong Y, Yi S, Zhang W, Peng B, Zhang Q, He Z. 14-3-3 σ regulation by p53 mediates a chemotherapy response to 5-fluorouracil in MCF-7 breast cancer cells via Akt inactivation. *FEBS Letters* 2012; 586: 163–168. doi:10.1016/j.febslet.2011.11.034

58. Kamalakaran S, Varadan V, Russnes HEG, et al. DNA methylation patterns in luminal breast cancers differ from non-luminal subtypes and can identify relapse risk independent of other clinical variables. *Molecular Oncology* 2011; 5: 77-92. doi:10.1016/j.molonc.2010.11.002

59. Prando EC, Cavalli LR, Rainho CA. Evidence of epigenetic regulation of the tumor suppressor gene cluster flanking RASSF1 in breast cancer cell lines. *Epigenetics* 2011, 6: 1413-24. doi: 10.4161/epi.6.12.18271
60. Caldeira JRF, Prando EC, Quevedo FC, Neto FAM, Rainho CA, Rogatto SR: CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. *BMC cancer* 2006, 6: 48. doi:10.1186/1471-2407-6-48
61. Negraes, P.D.; FAVARO, F.P.; CAMARGO, J.L.; OLIVEIRA, M.L.C.S.; GOLDBERG, J.; Rainho, C.A.; Salvadori, D.M. DNA methylation patterns in bladder cancer and washing cell sediments: a perspective for tumor recurrence detection. *BMC Cancer*. 8:238, 2008. doi:10.1186/1471-2407-8-238
62. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ: Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994; 17: 914-921.

Figures

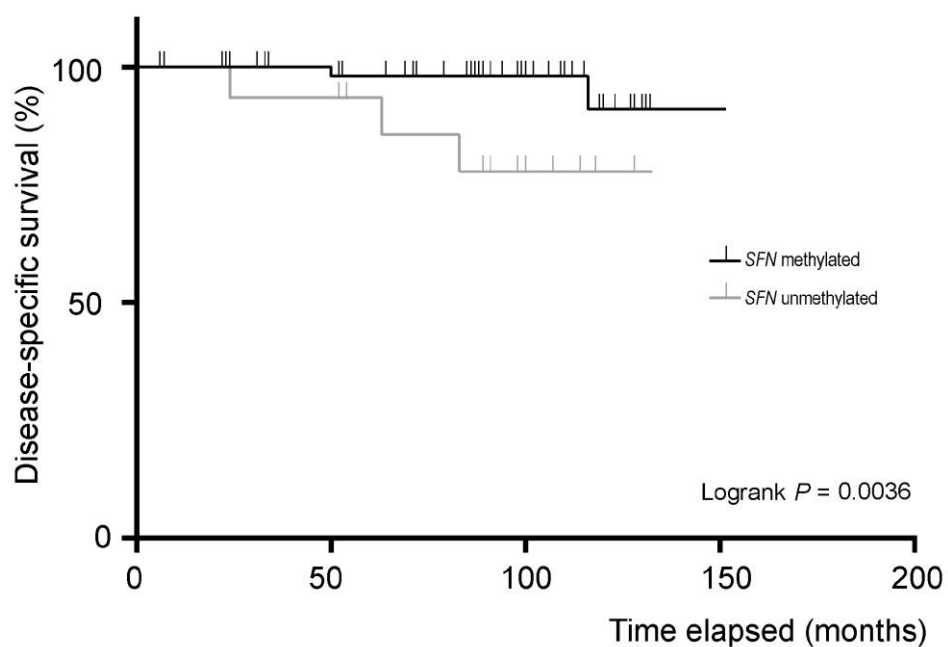


Figure 1. Disease-specific survival curve according to *SFN* methylation status in patients diagnosed with infiltrating ductal carcinoma (Kaplan-Meier curve, $p=0.0021$ determined by Log-rank test).

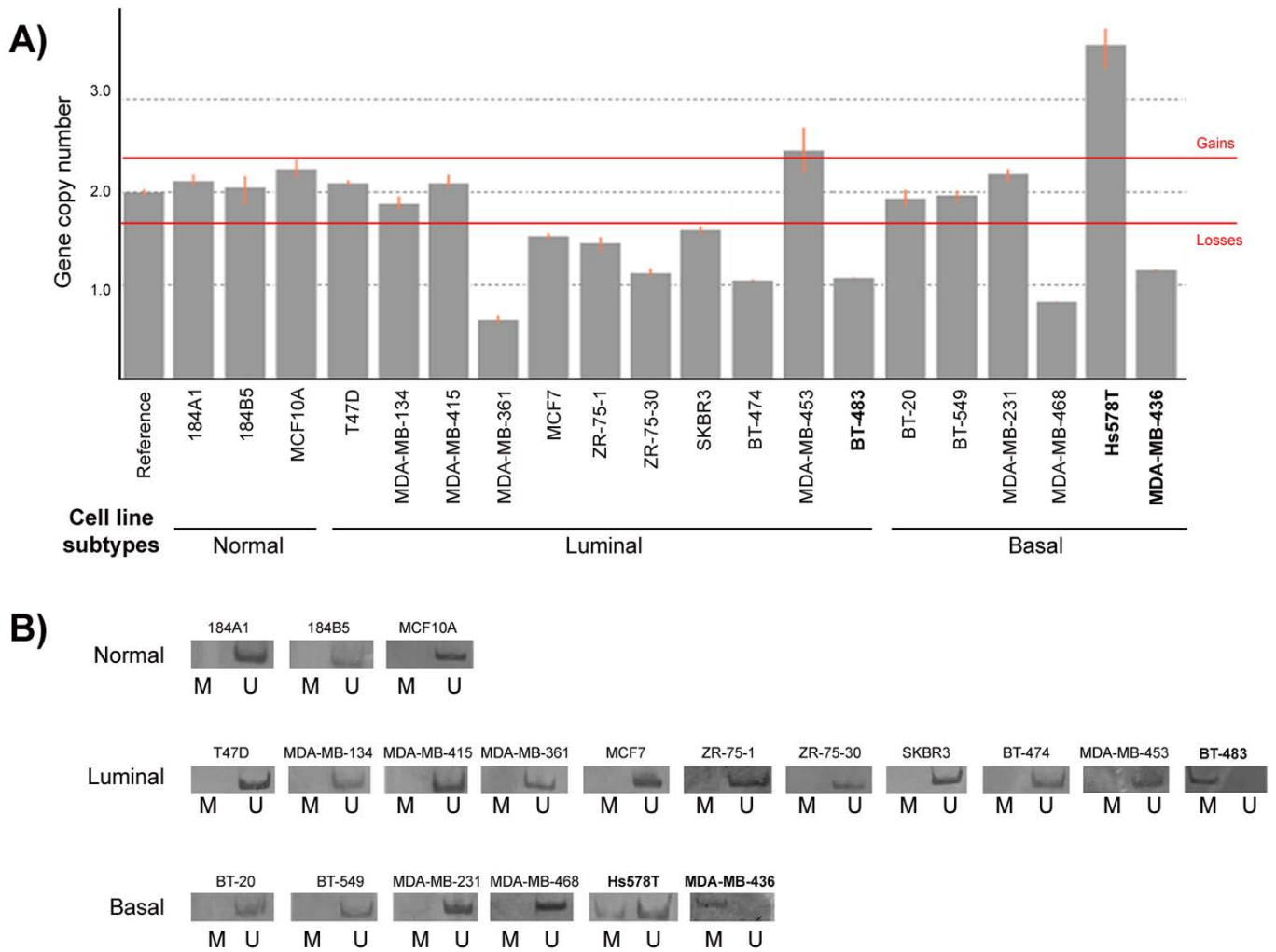


Figure 2. Copy number and DNA methylation analysis of *SFN* gene in normal, non-tumorigenic breast cell lines (184A1, 184B5 and MCF 10A), and 17 breast cancer cell lines. (A) Relative copy number dosage: horizontal red lines indicate the cut-off limits to gains (copy number >2.4) and losses (copy number <1.6). (B) DNA methylation pattern determined by MSP analysis after bisulfite modification of cell lines distributed according to molecular subtype; (M) methylated alleles, (U) unmethylated alleles; BT-483, Hs578T and MDA-MB-436 (bold) showed both methylation and copy number alterations at *SFN* locus.

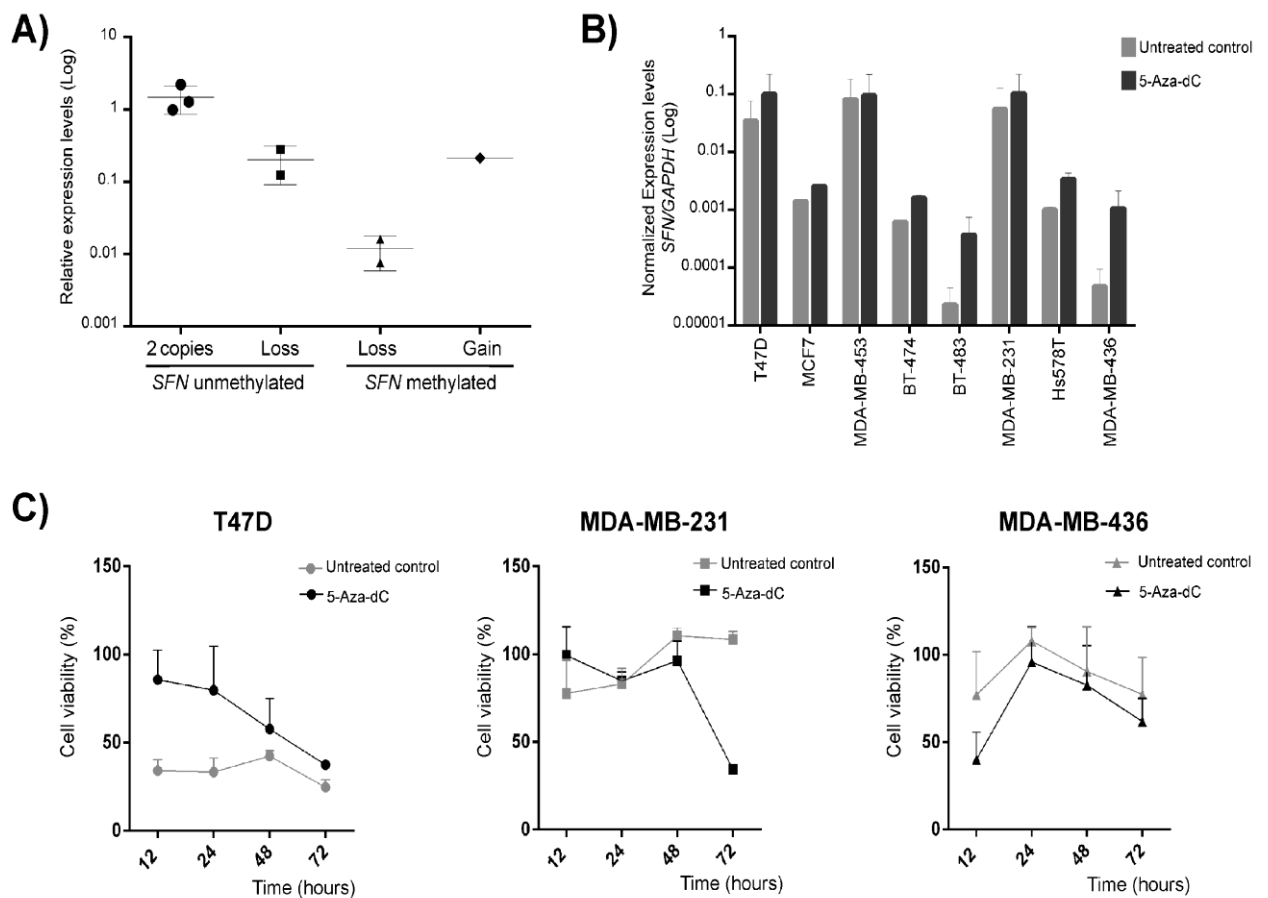


Figure 3 Effect of *SFN* methylation and copy number dosage on gene expression levels and impact of demethylation on cell viability after radiation exposure. **(A)** Relative *SFN* expression levels of 8 breast cancer cell lines according to copy number alterations and DNA methylation. **(B)** RT-qPCR confirmed that treatment with 5-Aza-dC leads to re-expression of *SFN* gene in methylated cell lines (BT-483 and MDA-MB-436), but not in unmethylated cells. **(C)** Effect on cell viability of combined treatment with the demethylating agent 5-Aza-dC and radiation exposure on luminal (T47D) and basal subtype cell lines (MDA-MB-231 and MDA-MB-436).

Tables

Table 1. Distribution of methylation patterns of *SFN* gene according to clinical and histopathological variables, and immunohistochemical markers in 76 infiltrating ductal carcinomas.

Variables	N	SFN [N(%)]		P value
		Methylated	Unmethylated	
Age (years)				
≤ 55	76	26 (34.2)	9 (11.9)	0.468
> 55		34 (44.7)	7 (9.2)	
Clinical stage				
I , IIA, IIB	75	50 (66.7)	13 (17.3)	0.711
IIIA, IIIB		9 (12)	3 (4)	
Tumor size (mm)				
≤ 20	74	17 (23)	1 (1.3)	0.097
> 20		41 (55.4)	15 (20.3)	
Histologic grade				
I, II	76	32 (42.1)	9 (11.9)	1
III		28 (36.8)	7 (9.2)	
Lymph node involvement				
≤ 4	75	49 (65.3)	11 (14.7)	0.286
>4		10 (13.3)	5 (6.7)	
Metastasis				
Presence	76	3 (3.9)	6 (7.9)	0.021
Absence		57 (75)	10 (13.2)	
Protein expression levels by immunohistochemical analysis				
ER				
Negative/Reduced	75	41 (54.7)	10 (13.3)	0.763
Positive		18 (24)	6 (8)	
PgR				
Negative/Reduced	75	42 (56)	10 (13.3)	0.548
Positive		17 (22.7)	6 (8)	
Her-2				
Negative/Reduced	75	53 (70.7)	13 (17.3)	1
Positive		7 (9.3)	2 (2.7)	
p53				
Negative	71	45 (63.4)	13 (18.3)	0.721
Positive		11 (15.5)	2 (2.8)	
Ki-67				
Low	76	35 (46.0)	11 (14.5)	0.569
High		25 (32.9)	5 (6.6)	

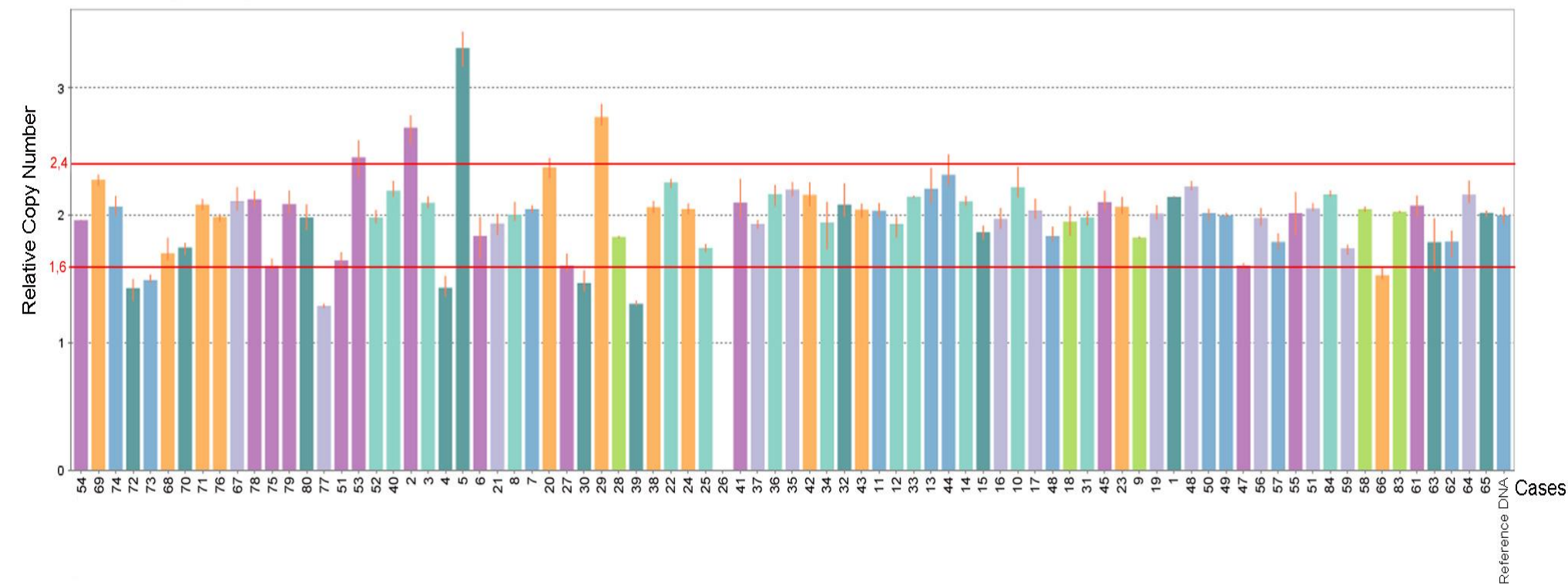
P-value obtained by Fisher's exact test.

Table 2. Disease-specific survival analysis.

Variables	Univariate		Multivariate	
	HR (95% CI)	<i>P value</i>	HR (95% CI)	<i>P value</i>
Age (years) ≤ 55 versus > 55	2.738 (0.526 - 14.262)	0.2315	-	-
Clinical stage * I, IIA, IIB versus IIIA, IIIB	11.803 (2.150 - 64.801)	0.0045	-	-
Lymph node involvement ≤ 4 versus > 4	7.338 (1.390 - 38.745)	0.0189	-	-
Metastasis Absence versus Presence	23.225 (4.179 - 129.072)	0.0003	23.056 (4.144 - 128.286)	0.0003
Histologic grade I, II versus III	1.648 (0.368 - 7.381)	0.5134	-	-
ER* Negative/Reduced versus Positive	2.783 (0.610 - 12.689)	0.1860	-	-
PgR* Negative/Reduced versus Positive	0.715 (0.082 - 6.207)	0.7607	-	-
Her-2* Negative/Reduced versus Positive	1.217 (0.141 - 10.479)	0.8582	-	-
Ki-67 Low versus High	0.968 (0.216 - 4.342)	0.9665	-	-
SFN methylation pattern Unmethylated versus Methylated	8.246 (1.563 - 43.501)	0.0129	-	-

(*) data available for 75/76 cases; (HR) Hazard Ratio; (95% CI) 95% confidence interval; P-value obtained by Cox Regression (Proportional Hazard Model)

Supplementary Data



Supplementary figure 1. *SFN* gene copy number dosage calculated by copy caller software in 82 primary breast cancers samples. References DNA represents a DNA pool of healthy volunteers.

Supplementary table 1. Clinical and histopathological features, immunohistochemistry and adjuvant treatment data from 84 breast cancer patients.

Case	Age	<i>SFN</i> gene	Clinical and histopatological analysis					Immunohistochemistry					Therapy		Follow-up (months)
		Methylation	Copy number	TNM	Tumor size	Histologic grade	Metastasis	ER	PgR	Her-2	p53	<i>Ki-67</i>	RT	CT	
Infiltrating Ductal Carcinoma															
1	54	+	N	IIB	> 2 - 5	I	-	3	3	1	0	Low	+	+	Alive; tumor free (99)
2	56	+	G	IIB	> 2 - 5	III	-	-	-	-	2	High	+	-	Dead; with cancer (153)
3	51	+	N	IIB	> 2 - 5	II	-	3	3	-	0	Low	+	+	Alive; tumor free (132)
4	49	+	L	IIIB	> 2 - 5	III	-	-	-	3	0	High	+	-	Alive; tumor free (131)
5	49	+	G	IIA	> 2 - 5	III	-	-	-	-	0	High	+	-	Alive; with cancer (131)
8	85	+	N	IIA	0 - 2	II	-	3	3	-	0	Low	+	-	Lost to follow-up (64)
9	36	-	N	IIIA	> 2 - 5	III	-	-	1	2	0	Low	+	+	Dead; other causes (98)
10	70	+	N	I	0 - 2	II	-	3	3	-	0	Low	+	-	Alive; tumor free(100)
11	83	+	N	IIIA	0 - 2	II	-	3	-	-	0	0	+	-	Alive; tumor free (110)
12	51	-	N	IIB	> 2 - 5	II	-	3	-	1	0	Low	+	+	Dead; with cancer (134)
13	69	-	N	IIIA	> 2 - 5	III	Pleura	3	-	2	0	High	+	-	Dead; with cancer (63)
14	67	-	N	IIB	> 2 - 5	II	Bone	3	2	-	0	Low	+	+	Lost to follow-up (52)
15	91	+	N	IIA	> 2 - 5	II	-	-	-	1	0	Low	+	-	Lost to follow-up (100)
16	48	+	N	I	0 - 2	I	-	2	2	-	0	Low	+	-	Alive; tumor free (106)
17	78	+	N	IIB	> 2 - 5	II	-	3	2	-	0	0	+	-	Lost to follow up (53)
18	65	+	N	IIB	> 2 - 5	III	-	-	-	-	0	0	+	+	Alive; tumor free (100)
19	44	-	N	IIB	> 2 - 5	II	-	1	3	-	0	0	+	+	Alive; tumor free (100)
21	50	+	N	I	0 - 2	II	-	2	-	-	0	High	+	-	Alive; tumor free (131)

22	30	-	N	IIB	> 2 - 5	II	Bone	2	-	1	0	Low	+	+	Los to follow-up (54)
23	42	+	N	IIA	0 - 2	II	-	2	3	-	0	0	+	+	Alive; tumor free (109)
24	57	+	N	IIA	0 - 2	II	-	2	2	-	0	Low	+	+	Alive; tumor free (123)
25	49	+	G	IIB	> 2 - 5	III	-	-	-	1	0	High	+	-	Alive; tumor free (130)
26	57	+	na	I	0 - 2	II	-	-	-	2	0	High	+	-	Los to follow-up (71)
27	59	+	L	IIB	> 2 - 5	I	Lung	3	2	1	0	Low	+	+	Alive; tumor Free (130)
28	66	-	N	IIB	> 2 - 5	II	-	1	2	1	0	Low	+	-	Alive; tumor Free (128)
29	88	+	G	IIIB	> 2 - 5	II	-	1	-	-	0	0	+	-	Dead; other causes (120)
30	46	+	L	IIA	0 - 2	II	-	2	2	3	0	Low	+	+	Alive; tumor free (130)
31	63	-	N	IIA	> 2 - 5	I	-	3	2	-	0	0	-	+	Dead; with cancer (83)
32	71	+	N	I	0 - 2	III	-	-	-	3	1	High	+	-	Alive; with cancer (115)
33	77	+	N	IIIA	> 2 - 5	III	-	2	-	-	2	0	+	-	Dead; other causes (22)
34	57	-	N	IIB	> 2 - 5	II	-	3	-	1	2	Low	+	+	Alive; tumor free (114)
35	44	-	N	IIB	> 2 - 5	III	Skin	2	3	2	0	High	-	-	Dead; with cancer (24)
36	48	-	N	IIA	> 2 - 5	II	-	2	3	3	0	Low	-	+	Alive; tumor free (118)
38	42	+	N	I	0 - 2	III	-	-	-	-	0	High	+	-	Alive; tumor free (127)
39	52	+	L	I	0 - 2	III	-	3	-	1	2	Low	+	-	Alive; tumor free (128)
40	46	+	N	IIB	> 2 - 5	I	Pleura	2	2	-	0	Low	+	+	Alive; tumor free (102)
41	36	+	N	I	0 - 2	III	-	-	-	1	0	High	+	-	Alive; tumor free (119)
42	30	+	N	IIB	> 2 - 5	III	-	-	-	-	2	0	-	+	Lost to follow-up (0)
43	68	+	N	IIB	> 2 - 5	I	-	3	3	-	0	Low	+	-	Alive; tumor free (112)
44	79	+	N	IIB	> 2 - 5	III	-	3	-	1	2	High	-	-	Dead; other causes (52)
45	77	-	N	IIIB	> 5	III	Lung	2	-	-	0	0	+	+	Dead; with cancer (107)
46	38	+	N	IIB	> 2 - 5	III	-	3	-	-	0	High	+	-	Alive; tumor free (98)

47	71	+	N	IIA	> 2 - 5	III	-	3	-	-	2	Low	+	-	Dead; other causes (79)
48	49	+	N	IIA	0 - 2	III	-	-	-	1	1	High	+	-	Alive; tumor free (100)
49	68	+	N	IIIA	> 2 - 5	III	-	2	3	-	0	0	+	-	Dead; other causes (7)
50	52	+	N	IIB	> 5	II	-	-	-	-	0	High	+	-	Alive; tumor free (98)
51	84	+	N	IIIB	> 2 - 5	II	Lung	3	1	3	1	Low	+	-	Dead; with cancer (50)
53	60	+	G	IIB	> 2 - 5	III	-	-	-	3	0	High	+	-	Alive; tumor free (94)
54	81	+	N	IIIB	na	II	-	-	-	3	2	High	+	-	Lost to follow-up (72)
55	34	-	N	IIB	> 5	II	-	1	-	-	0	Low	+	+	Alive; tumor free (91)
56	73	+	N	IIIB	> 2 - 5	I	-	2	2	-	0	Low	+	+	Alive; tumor free (91)
57	94	+	N	IIIB	> 2 - 5	II	-	3	3	1	0	Low	-	-	Lost to follow-up (na)
58	49	+	N	IIA	> 2 - 5	II	-	2	3	-	0	High	-	-	Alive; tumor free (89)
59	59	-	N	IIA	> 2 - 5	III	-	3	-	3	1	High	+	-	Alive; tumor free (89)
60	35	-	N	I	0 - 2	III	-	1	3	2	2	High	+	-	Alive; tumor free (89)
62	77	+	N	IIA	> 2 - 5	III	-	3	3	-	0	High	-	-	Lost to follow-up (34)
63	48	+	N	IIA	> 2 - 5	I	-	2	-	-	0	Low	-	+	Alive; tumor free (89)
64	61	+	N	IIIB	> 2 - 5	III	-	-	-	-	0	High	+	-	Dead; with cancer (116)
65	75	+	N	IIA	> 2 - 5	II	-	3	3	-	0	Low	+	-	Lost to follow-up (69)
66	56	+	L	IIA	> 2 - 5	III	-	-	-	2	0	Low	-	+	Alive; tumor free (88)
67	51	+	N	IIA	> 2 - 5	II	-	-	-	-	0	0	-	+	Alive; tumor free (87)
68	61	+	N	IIA	0 - 2	II	-	2	1	1	0	Low	+	+	Dead; other causes (6)
69	60	+	N	IIB	> 2 - 5	II	-	2	2	-	0	0	+	+	Alive; tumor free (87)
70	72	+	N	IIA	> 2 - 5	III	-	-	-	1	3	0	-	-	Dead; other causes(23)
71	39	+	N	IIA	> 2 - 5	III	-	-	-	-	1	High	-	-	Alive; tumor free (86)
72	56	+	L	IIB	> 2 - 5	II	-	2	3	1	0	0	+	+	Alive; tumor free (86)

74	41	+	N	IIA	0 - 2	I	-	3	3	-	2	High	+	-	Alive; tumor free (87)
75	65	+	L	IIB	> 5	III	-	3	3	1	0	High	+	-	Alive; with cancer (85)
76	59	+	N	I	0 - 2	III	-	-	-	-	3	High	+	-	Alive; tumor free (85)
77	43	+	L	IIA	> 2 - 5	III	-	1	3	-	1	High	+	-	Alive; tumor free (85)
78	83	+	N	IIA	> 2 - 5	III	-	-	-	-	3	High	-	-	Alive; tumor free (85)
80	45	+	N	IIA	> 2 - 5	II	-	1	3	2	na	Low	na	na	Lost to follow-up (23)
81	51	+	N	IIA	> 2 - 5	III	-	-	-	3	na	High	na	na	Lost to follow-up (24)
82	39	-	na	IIA	> 2 - 5	III	Lung	2	3	2	na	High	na	na	Lost to follow-up (23)
83	41	+	N	IIB	> 2 - 5	II	-	2	3	-	na	Low	na	na	Lost to follow-up (31)
84	42	+	N	na	na	III	-	na	na	na	na	0	na	na	Lost to follow-up (33)
Infiltrating Lobular Carcinoma															
6	59	+	N	IIIB	> 2 - 5	na	-	-	-	-	0	High	+	-	Alive; tumor free (131)
7	45	+	N	I	0 - 2	na	-	3	3	1	0	0	-	+	Alive; tumor free (130)
37	52	+	N	IIB	> 2 - 5	na	-	3	-	1	0	Low	+	-	Alive; tumor free (118)
52	84	+	N	IIA	0 - 2	III	-	3	3	1	0	Low	+	-	Dead; with cancer (89)
61	77	-	N	I	0 - 2	na	-	3	3	-	0	Low	+	+	Lost to follow-up (70)
Metaplastic Carcinoma															
20	67	+	N	IIB	> 2 - 5	III	-	-	-	-	3	High	-	-	Dead; other causes (na)
Apocrine Ductal Carcinoma															
73	77	+	L	IIIB	> 5	III	Lung	-	3	3	0	High	+	-	Dead; with cancer (39)
Papillary Carcinoma															
79	76	+	N	IIA	> 2 - 5	na	-	1	3	-	0	Low	na	-	Dead; with cancer (18)

Supplementary table 2. Characterization of cell lines derived from normal breast epithelium and breast cancer according to methylation pattern and copy number alterations of *SFN* gene and *TP53* gene status.

Molecular subtype	Cell line	SFN			TP53*		
		DNA methylation	Copy number §	Protein expression *	Mutation	mRNA expression	Protein expression
Normal							
	184A1	U	D	na	na	na	na
	184B5	U	D	+	na	na	na
	MCF10A	U	D	++	na	na	na
Luminal							
	T47D	U	D	±	mut	+	++
	MDA-MB-134 IV	U	D	-	wt	+	±
	MDA-MB-415	U	D	±	na	na	na
	MDA-MB-361	U	L	-	mut	+	±
	MCF7	U	L	±	wt	+	++
	ZR-75-1	U	L	±	wt	+	+
	ZR-75-30	U	L	-	wt	+	+
	SKBR3	U	L	-	mut	++	++
	BT-474	U	L	-	mut	++	++
	MDA-MB-453	U	G	++	del	na	+
	BT-483	M	L	-	mut	+	na
Basal							
	BT-20	U	D	-	mut	+	++
	BT-549	U	D	-	mut	++	++
	MDA-MB-231	U	D	+	mut	++	++
	MDA-MB-468	U	L	na	mut	+	++
	Hs578T	M/U	G	-	mut	++	++
	MDA-MB-436	M	L	na	mut	C	±

(*) Data obtained from previous reports: Neve *et al.* (2006) and Hollestelle *et al.* (2010);

(§) Relative copy number dosage was determined by using a pool of peripheral blood samples from volunteers as reference: (L) copy number <1.6 or loss; (G) copy number >2.4 or gain; (D) copy number <1.6 and >2.4 or disomic; (M) Methylated allele; (U) Unmethylated allele; (mut) point mutation; (wt) wild type; (+) positive expression; (±) reduced expression levels; (++) high expression levels; (na) data not available.

Conclusões

- As alterações no número de cópias do gene *SFN* ocorrem em baixa frequência em carcinomas ductais infiltrantes, enquanto a metilação deste gene ocorrem em altas frequências em todos os subtipos histológicos.
- A metilação do gene *SFN* em carcinomas ductais infiltrantes foi correlacionada com maior taxa de sobrevida, menor risco de desenvolvimento de metástases e de morte por câncer quando comparada com pacientes de carcinomas sem metilação neste locus.
- Nas linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários, o nível de expressão transcricional correlacionou-se inversamente com a presença de metilação do DNA e alterações no número de cópias do gene *SFN*. Esses eventos epigenético e genético atuam em sinergia na redução do nível de expressão.
- A desmetilação farmacológica pelo tratamento com o inibidor de DNA metiltransferase 5-Aza-dC restaurou a expressão do alelo retido nas linhagens BT-483 e MDA-MB-436; no entanto, na linhagem Hs578T o efeito desse tratamento foi modesto.
- A linhagem celular T47D, classificada pelo padrão global de expressão gênica como luminal, difere na sensibilidade aos danos do DNA causado pela radiação ionizante, quando comparada às linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-436, ambas classificadas como do subtipo basal.
- O tratamento com 5-Aza-dC aumentou a radiosensibilidade das linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-436, embora na segunda tenha sido detectada uma tendência à significância estatística. Na linhagem T47D, houve um efeito inverso. Estes dados podem ser, em parte, explicados pelos diferentes níveis de expressão do gene *SFN* devido à deleção de uma cópia na linhagem MDA-MB-436, além do efeito da desmetilação e reativação do conjunto de genes previamente silenciados epigeneticamente nessas linhagens celulares.