

**Érika da Costa Prando**

**O controle epigenético da expressão gênica na  
Carcinogênese mamária:  
investigação de genes Candidatos a supressores  
tumoriais mapeados em 3p21.3**

*Tese apresentada como requisito para a  
obtenção do título de Doutor junto ao Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
área de concentração Genética, do Instituto de  
Biociências da Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, campus de  
Botucatu, SP.*

**Orientadora:  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Aparecida Rainho**

**Botucatu - SP  
Junho/2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Prando, Erika da Costa.

O controle epigenético da expressão gênica na carcinogênese mamária :  
investigação de genes candidatos a supressores tumorais mapeados em 3p21.3 /  
Erika da Costa Prando. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista,  
2011

Orientador: Cláudia Aparecida Rainho

Capes: 20200005

1. Mamas - Câncer. 2. Câncer - Aspectos genéticos. 3. DNA recombinante.

Palavras-chave: Câncer de mama; Epigenética; Expressão Gênica; Genes  
supressores tumorais; Metilação do DNA.

***Dedico este estudo a todos que diariamente padecem  
na árdua batalha contra o câncer.***

## **AGRADEÇO.**

**Aos** meus pais, Antonio Carlos e Roseli, pelo exemplo de vida, de integridade e pelos inestimáveis ensinamentos. Sua experiência guiou meu caminho até aqui, sempre me apoiando e me incentivando em minhas escolhas. Obrigada por tudo o que fizeram por mim em todos os momentos de minha vida.

**Ao** meu amor, Murilo, por participar deste momento tão importante e por me fazer acreditar que eu posso sempre mais. Obrigada por seus conselhos, por sua presença sempre constante, por sua inacreditável paciência, por tornar tudo imensamente mais simples, por me fazer tão feliz!

**À** minha orientadora, professora Dra. Cláudia Aparecida Rainho, que tanto admiro por sua garra, dedicação e paixão por sua profissão. Obrigada por ter me proporcionado tão grande oportunidade e por me acolher desde meus primeiros passos na vida acadêmica. Obrigada por seus conselhos, por sua infinita paciência em me ensinar, por suas cuidadosas correções e sugestões que tanto contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada por compartilhar comigo sua experiência, seus conhecimentos e por toda confiança depositada em mim, me dando suporte, acreditando em meu potencial e me estimulando a continuar, “devagar e sempre”.

**À** Dra. Luciane R. Cavalli, por sua valiosa colaboração e por ceder as linhagens celulares, possibilitando a realização deste estudo.

**À** Dra. Silvana Artioli Schellini pela prestatividade durante o processo de documentação para o recebimento das linhagens celulares no Brasil.

**À** Dra. Maria Isabel Cano por sua generosa contribuição cedendo equipamento empregado durante as análises de imunoprecipitação da cromatina.

**Ao** Dr. Robson Francisco Carvalho, por me auxiliar durante minha muitas dúvidas sobre o HRM.

**Ao** Dr. Ivan de Godoy Maia, por me receber em suas aulas durante meu estágio docência, contribuindo para o meu aprendizado na arte de lecionar.

- A** comissão examinadora, pela disponibilidade para analisar e enriquecer o presente estudo, contribuindo de maneira inestimável para o meu amadurecimento profissional.
- As** amigadas que a Epigenética me proporcionou: Alexandre Fabro, Daniela Zimbardi, Gimena Aguiar, Joana Meyer, Mariana Bisarro, Priscila Manzini, Priscilla Negraes, Natália Carrion. Obrigada por terem tornado minha rotina laboratorial muito mais divertida, por partilharem um pouquinho de suas vidas comigo, por todas as discussões filosóficas, pelas horas de companhia e pelas incontáveis contribuições que complementaram este estudo e a minha vida.
- A** todos os colegas, professores e funcionários do Departamento de Genética e da Seção de Pós-Graduação, pela agradável convivência, pelo grande companheirismo e pela prontidão nos momentos de necessidade.
- A** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa e auxílio financeiro concedidos.
- A** Deus, o maior de todos os autores.

Para ser grande, sê inteiro:  
nada teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa.  
Põe quanto és no mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda brilha,  
Porque alta vive.”

**Fernando Pessoa**

## RESUMO

Atualmente, o silenciamento de genes supressores de tumor por mecanismos epigenéticos é reconhecido como uma característica importante das células tumorais. Estudos recentes mostraram que as alterações da metilação do DNA não estão restritas a genes discretos, mas podem afetar ilhas CpG consecutivas em algumas regiões genômicas, levando à hipótese de que mecanismos epigenéticos coordenados poderiam silenciar simultaneamente a expressão de vários genes. A perda da expressão da isoforma A do gene *RASSF1*, localizado em 3p21.3 (uma região cromossômica frequentemente deletada no câncer), constitui um dos principais exemplos de genes que são inativados tanto por mecanismos genéticos quanto epigenéticos no câncer, incluindo os carcinomas mamários. Este estudo teve como finalidade investigar a ocorrência de alterações epigenéticas em um agrupamento gênico em 3p21.3 contendo vários genes candidatos a supressores tumorais. Foram selecionados 10 genes contíguos (*SEMA3B*, *HYAL3*, *HYAL1*, *HYAL2*, *TUSC2*, ***RASSF1***, *ZMYND10*, *NPRL2*, *TMEM115* e *CACNA2D2*) e um painel de 17 linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários (BT-20, BT-474, BT-483, BT-549, Hs578T, MCF7, MDA-MB-134 IV, MDA-MB-231, MDA-MB-361, MDA-MB-415, MDA-MB-436, MDA-MB-453, MDA-MB-468, SK-BR-3, T-47D, ZR-75-1 e ZR-75-30), uma linhagem epitelial derivada de doença fibrocística benigna da mama (MCF10A) e duas linhagens derivadas de epitélio mamário normal (184A1 e 184B5). Inicialmente, os níveis de expressão foram quantificados por qRT-PCR (*quantitative real time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) após o tratamento das linhagens com as drogas 5-aza-2'-desoxicitidina (5Aza-dC), um agente desmetilante, e tricostatina A (TSA), um inibidor das desacetilases de histonas em comparação com controles não tratados. O efeito destas drogas sobre os níveis de expressão gênica foram utilizados como parâmetro para a seleção dos genes alvos para as análises da metilação do DNA por HRM (*High Resolution Melting*) e de imunoprecipitação da cromatina (ChIP) com anticorpos direcionados à acetilação e à trimetilação da lisina 9 da histona H3. Os dados obtidos mostraram que os transcritos do gene *RASSF1* foram detectados em todas as linhagens celulares; entretanto, a expressão da isoforma *RASSF1A* foi detectada apenas nas linhagens Hs578T e MDA-MB-415. Após os tratamentos com 5Aza-dC e 5Aza-dC/TSA, observou-se a re-expressão dessa isoforma em todas as linhagens. O aumento da quantidade de transcritos do gene *RASSF1* foi positivamente correlacionado com os níveis de expressão dos genes *TUSC2* ( $r=0.63$ ,  $p=0.002$ ), *ZMYND10* ( $r=0.55$ ,  $p=0.01$ ) e *NPRL2* ( $r=0.48$ ,  $p=0.03$ ). Em adição, a análise de correlação de Spearman também revelou correlação positiva entre os pares: *ZMYND10* e *NPRL2* ( $r=0.72$ ;  $p=0.0003$ ) e *NPRL2* e *TMEM115* ( $r=0.62$ ,  $p=0.002$ ). Baseado nestes dados, os genes contíguos *TUSC2*, *RASSF1*, *ZMYND10*, *NPRL2* e *TMEM115* foram selecionados para a quantificação da metilação do DNA e ChIP. A hipermetilação do DNA foi confirmada apenas na ilha CpG da região promotora que regula a isoforma *RASSF1A*. A análise de ChIP revelou uma clara diferença entre os altos níveis de acetilação e baixos níveis de trimetilação da lisina 9 da histona 3 na maioria das linhagens celulares. Em conjunto, estes dados sugerem que marcas repressivas nas histonas poderiam modular os níveis de expressão deste agrupamento gênico contendo prováveis supressores tumorais envolvidos no câncer.

## ABSTRACT

Currently, the silencing of tumor suppressor genes by epigenetic mechanisms is recognized as an important feature of tumor cells. Recent studies have showed that aberrant DNA methylation patterns are not restricted to discrete genes, but also could affect consecutive CpG islands in some genomic regions, which suggested that epigenetically coordinated mechanisms could lead to the simultaneous silencing of cancer-related genes. The loss of expression of the isoform A of the *RASSF1* gene, mapped at 3p21.3 (a chromosomal region frequently deleted in cancer), is listed among those genes inactivated by both, genetic and epigenetic mechanisms in human cancer, including breast carcinomas. The purpose of this study was to investigate the occurrence of epigenetic alterations in a gene cluster at 3p21.3 which contains several candidates to tumor suppressor genes. It was selected 10 contiguous genes (*SEMA3B*, *HYAL3*, *HYAL1*, *HYAL2*, *TUSC2*, *RASSF1*, *ZMYND10A*, *NPRL2*, *TMEM115* and *CACNA2D2*) and a panel of 17 breast cancer cell lines (BT-20, BT-474, BT-483, BT-549, Hs578T, MCF7, MDA-MB-134 IV, MDA-MB-231, MDA-MB-361, MDA-MB-415, MDA-MB-436, MDA-MB-453, MDA-MB-468, SK-BR-3, T-47D, ZR-75-1 and ZR-75-30), one cell line derived from benign fibrocystic disease of the breast (MCF10A) and two cell lines derived from normal mammary epithelium (184A1 and 184B5). Initially, the expression levels were quantified by qRT-PCR (quantitative real time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) after the treatments of the cell lines with the 5-aza-2'-deoxycytidine (5Aza-dc), a DNA demethylating agent and trichostatin A (TSA) a histone deacetylase inhibitor, relative to the untreated controls. The results obtained showed that *RASSF1* transcripts were detected in all cell lines; however, the expression of *RASSF1A* isoform was detected only in the Hs578T and MDA-MB-415 cell lines. After the treatments with 5Aza-dC and TSA, it was observed the re-expression of this isoform in all cell lines. The increasing in the *RASSF1* transcripts levels were positively correlated with the expression of *TUSC2* ( $r=0.63$ ,  $p=0.002$ ), *ZMYND10* ( $r=0.55$ ,  $p=0.01$ ) and *NPRL2* ( $r=0.48$ ,  $p=0.03$ ). In addition, Spearman correlation coefficient also revealed a significant positive correlation between the pairs: *ZMYND10* and *NPRL2* ( $r=0.72$ ;  $p=0.0003$ ), and *NPRL2* and *TMEM115* ( $r=0.62$ ,  $p=0.002$ ). Based on these data, the contiguous genes *TUSC2*, *RASSF1*, *ZMYND10*, *NPRL2* and *TMEM115* were selected for the DNA methylation analysis by HRM (High-Resolution Melting) and chromatin immunoprecipitation (ChIP) employing antibodies directed to acetylation or trimethylation of the lysine 9 of histone H3. The DNA hypermethylation was confirmed in the CpG island located in the promoter region of *RASSF1A* isoform only. ChIP analysis showed a clear difference between acetylation (high levels) and trimethylation (low levels) of lysine 9 of histone H3 in most of the cell lines. Altogether, these data suggest that others histone repressive marks could modulate the expression of this tumor suppressor gene cluster in breast cancer cell.

## ABREVIATURAS

<i>Apaf-1</i>	<i>apoptotic peptidase activating factor 1</i>
<i>ARPP21</i>	<i>cAMP-regulated phosphoprotein, 21kDa</i>
<i>bp</i>	<i>base pair(s)</i>
<i>BTRC</i>	<i>beta-transducin repeat containing</i>
<i>CD44</i>	<i>molecule (Indian blood group)</i>
<i>CDH1</i>	<i>cadherin 1</i>
<i>cDNA</i>	<i>DNA complementar</i>
<i>CSX</i>	<i>NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila)</i>
<i>Ct</i>	<i>Cycle Threshold</i>
<i>DMSO</i>	<i>Dimetilsulfóxido</i>
<i>DNA</i>	<i>Ácido desoxirribonucléico</i>
<i>dNTP</i>	<i>Dinucleotídeos trifosfatados</i>
<i>E2F</i>	<i>E2F transcription factor</i>
<i>Egr-1</i>	<i>early growth response 1</i>
<i>GPR85</i>	<i>G protein-coupled receptor 85</i>
<i>HOX</i>	<i>homeobox</i>
<i>iRNA</i>	<i>interference RNA</i>
<i>Kb</i>	<i>kilo base pairs = 1.000 pb</i>
<i>kDa</i>	<i>kiloDalton</i>
<i>MAGE</i>	<i>melanoma antigen gene</i>
<i>MDM2</i>	<i>Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)</i>
<i>Mb</i>	<i>mega base pairs = 1.000.000 pb</i>
<i>MET</i>	<i>met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)</i>
<i>MYC</i>	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>
<i>MYOD</i>	<i>myogenic differentiation 1</i>
<i>p53</i>	<i>tumor protein p53</i>
<i>pb</i>	<i>pares de bases</i>
<i>PCDH</i>	<i>protocadherin</i>
<i>PH-20</i>	<i>sperm adhesion molecule 1 (PH-20 hyaluronidase, zona pellucida binding)</i>
<i>RAS</i>	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<i>rDNA</i>	<i>DNA ribossômico</i>
<i>RT-PCR</i>	<i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i>
<i>RHAMM</i>	<i>hyaluronic acid-mediated motility receptor</i>
<i>RNA</i>	<i>Ácido ribonucléico</i>
<i>RNAm</i>	<i>RNA mensageiro</i>
<i>SCF</i>	<i>SKP1-cullin-F-box</i>
<i>SP1</i>	<i>Sp1 transcription factor</i>
<i>VHL</i>	<i>von Hippel-Lindau tumor suppressor</i>
<i>VIM</i>	<i>vimentin</i>

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Conceitos em Epigenética

O câncer de mama

Alterações epigenéticas no câncer

1

1

5

7

JUSTIFICATIVA

Genes candidatos a supressores tumorais em 3p21.3 selecionados para este estudo

12

17

OBJETIVOS

26

REFERÊNCIAS

27

ARTIGO

37

Evidence of epigenetic regulation of the tumor suppressor gene cluster flanking  
*RASSF1* in breast cancer cell lines

37

Referências

56

Tabela 1

61

Figura 1

62

Figura 2

63

Figura 3

64

Figura 4

65

Figura 5

66

Material Suplementar - Tabela S1

67

CONCLUSÃO

68

ANEXO

70

APÊNDICE I

71

APÊNDICE II

73

APÊNDICE III

75

APÊNDICE IV

77

APÊNDICE V

83

APÊNDICE VI

87

APÊNDICE VII

88

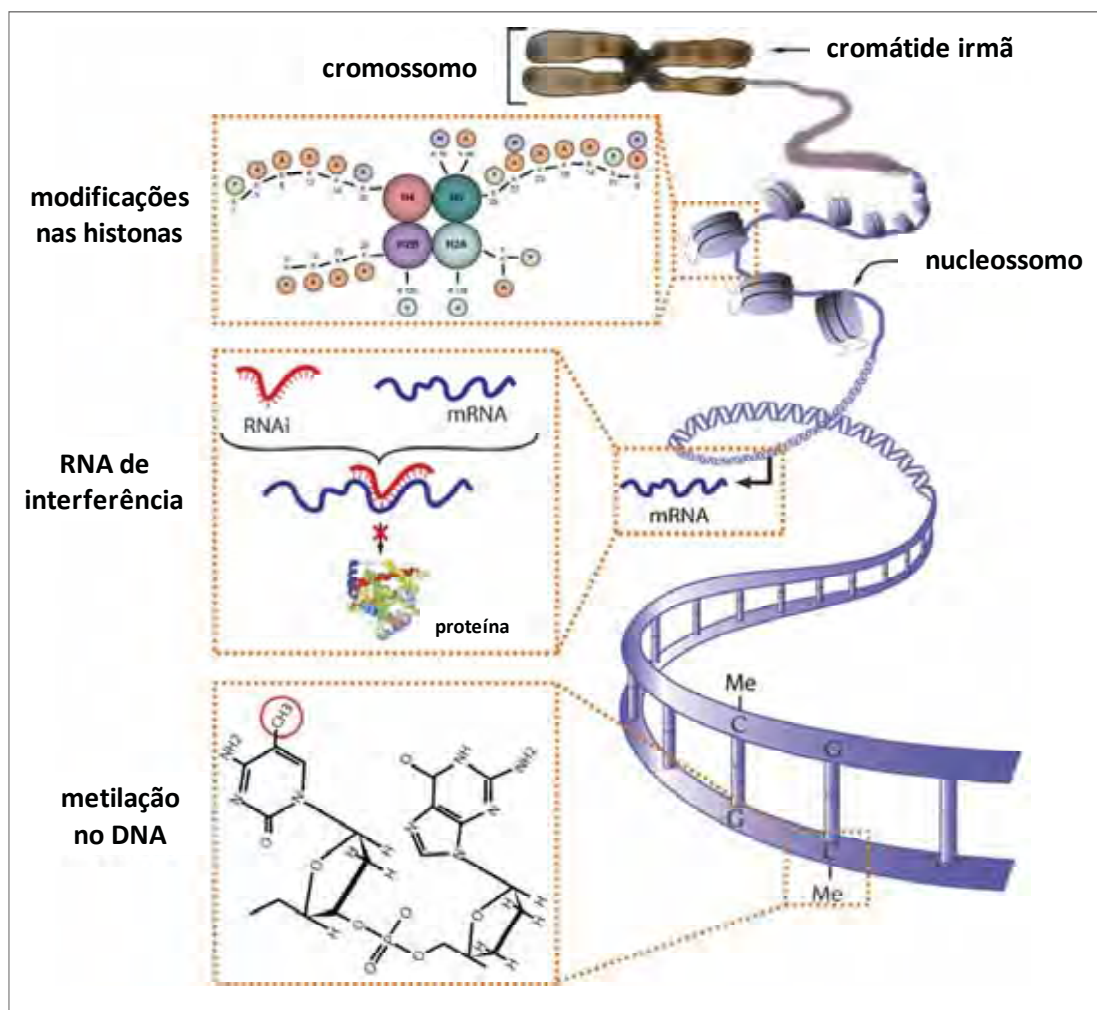
## REVISÃO DA LITERATURA

### Conceitos em Epigenética

Nos últimos anos, muitos estudos têm reforçado a importância das modificações epigenéticas na regulação da expressão gênica. O termo epigenética refere-se à herança de fenótipos em células e organismos que não decorrem de alterações na sequência de nucleotídeos ou no número de cópias da molécula de DNA. Trata-se de um processo normal, reversível (por não alterar a sequência do DNA) e herdável (por ser transmitido de forma estável após sucessivos ciclos de divisão celular) (Razin e Riggs, 1980; Bird, 2007; Goldberg et al., 2007; Berger et al., 2009). A inativação do cromossomo X e o *imprinting* genômico são exemplos de processos regulados epigeneticamente (Chapman et al., 1982; Wolf et al., 1984; Reik e Murrell, 2000; Reik e Walter, 2001a e 2001b).

Nas células eucarióticas, o DNA encontra-se organizado em uma estrutura denominada nucleossomo onde a dupla fita se enrola em torno de um núcleo protéico constituído por um octâmero de histonas (partícula *core*), formado por duas unidades de cada histona: H2A, H2B, H3 e H4. O nucleossomo é a unidade básica da cromatina que, em sua conformação original, é inacessível aos complexos de iniciação da transcrição. No entanto, algumas modificações químicas nas unidades das histonas que compõem o octâmero, e na própria molécula do DNA, são sinais para a ligação de complexos remodeladores da cromatina, que modificam a sua acessibilidade aos complexos da transcrição (Rando, 2006; Kouzarides, 2007).

Em mamíferos, os mecanismos epigenéticos podem ser divididos em quatro categorias principais: a metilação do DNA, as modificações covalentes das histonas, mecanismos não-covalentes (incorporação de variantes de histonas e remodelamento do nucleossomo) e RNAs não-codificantes (ncRNAs) (Figura 1). Estes mecanismos apresentam propriedades únicas e padrões de distribuição distintos nos organismos multicelulares, determinando diferentes epigenomas, que são definidos como o conjunto de modificações bioquímicas da cromatina que determina como o genoma irá se manifestar em diferentes tipos celulares, estágios de desenvolvimento ou sob condições patológicas (Fisher, 2002; Baylin e Schuebel, 2007; Toyota et al., 2009; Sharma et al., 2010).



**Figura 1.** Mecanismos epigenéticos são classificados em três níveis. A metilação do DNA é uma modificação covalente no carbono de posição 5 da citosina, quase que exclusivamente no contexto de dinucleotídeos CpG. As modificações nas histonas incluem as modificações pós-traducionais principalmente nos aminoácidos localizados nas caudas amino-terminais destas proteínas. Um mecanismo epigenético recentemente descoberto envolve os RNAs não-codificantes, como os RNAs de interferência (RNAi) (Modificado de Sawan *et al.*, 2008).

A metilação do DNA provavelmente é a modificação epigenética mais estudada e melhor caracterizada em mamíferos. Em geral, refere-se à ligação covalente de um grupo metil no carbono da posição 5 da citosina seguida por uma guanina, chamado de dinucleotídeo CpG. Estes dinucleotídeos estão distribuídos por todo o genoma incluindo o corpo de genes, repetições endógenas (repetições centroméricas, rDNA etc) e elementos transponíveis. As regiões ricas em dinucleotídeos CpGs são denominadas ilhas CpG e foram primeiramente caracterizadas baseadas em bibliotecas de fragmentos gerados pela enzima *HpaII*, sensível à metilação do DNA. Estes fragmentos, de em média 200 pares de bases,

continham um alto conteúdo de CG e uma razão entre o número de dinucleotídeos CpG observados/esperado maior do que 0,6 (Gardiner-Garden & Frommer, 1987), Atualmente, visando tornar os critérios mais restritivos para melhor definir ilhas CpG associadas a promotores gênicos e relevantes para o processo de transcrição, os parâmetros adotados são: fragmentos de DNA maiores do que 500 pares de bases, com conteúdo de citosinas e guaninas maior do que 55% e onde a razão de dinucleotídeos CpG observados/esperados é igual ou superior a 0,65 (Takai e Jones, 2002). Aproximadamente 60-70% dos genes humanos e 40% daqueles que mostram um perfil de expressão tecido-específico, apresentam ilhas CpG associadas com regiões promotoras (Illingworth e Bird, 2009).

O estabelecimento e a manutenção da metilação do DNA são mediados por proteínas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) na presença do substrato S-adenosilmetionina (SAM) que atua como doadora de grupos metil. As classes de proteínas DNMTs identificadas até o momento incluem as DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L. A DNMT1, a mais abundante em células somáticas, é a enzima responsável por copiar e manter os padrões de metilação do DNA durante a replicação. DNMT3A e 3B atuam principalmente em células embrionárias e não diferenciadas e são conhecidas como DNMTs *de novo* (Bestor, 2000; Espada e Esteller, 2010).

Acredita-se que a hipermetilação de ilhas CpG pode inibir a transcrição e conseqüentemente a expressão gênica pela interferência direta na ligação de fatores de transcrição aos seus sítios de reconhecimento nos promotores ou pelo recrutamento de complexos protéicos que alteram coordenadamente a conformação da cromatina (Bell e Felsenfeld, 2000; Baylin e Herman, 2000; Bird, 2002).

Nas histonas, as modificações pós-traducionais que ocorrem em aminoácidos específicos e preferencialmente nos localizados na porção NH<sub>2</sub> terminal destas proteínas, representam outro grupo de modificações epigenéticas mostrando um maior nível de complexidade e diversidade. Estas modificações envolvem a acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitilação, sumoilação, ADP-ribosilação além da isomerização da prolina. Esses eventos também foram associados à ativação ou repressão da transcrição gênica (Rando, 2006; Sharma et al., 2010). A acetilação é tida como uma marca epigenética associada com a ativação transcricional enquanto que as conseqüências funcionais da metilação dependem do tipo de aminoácido modificado [por exemplo, lisina (K) ou arginina (R)] e do resíduo específico que

recebeu o radical metil (por exemplo: K4, K9, K20, K27). A metilação na lisina da posição 4 da histona H3 (H3K4) foi associada à transcrição enquanto que a metilação das lisinas das posições 9 e 27 da histona H3 (H3K9 e H3K27) bem como da lisina 20 da histona H4 (H4K20) foi associada à repressão transcricional. Várias proteínas que catalisam essas modificações foram identificadas, tais como acetiltransferases específicas (HATs) e as desacetilases de histonas (HDACs); tanto a acetilação quanto a metilação são consideradas modificações reversíveis catalisadas por enzimas apresentando atividades opostas (Esteller, 2007).

Até recentemente, os RNAs eram considerados meros intermediários entre o genoma e as proteínas. Entretanto, muitos estudos têm elucidado a função dos RNAs que não são codificantes. Os RNAs não codificantes (ncRNAs) incluem todas as moléculas de RNA que não são traduzidas em proteínas, embora estas moléculas contenham em sua estrutura informações variadas podendo ter funções especiais em diferentes processos celulares (Mattick e Makunin, 2006). O genoma dos mamíferos codifica milhares de ncRNA, entre eles, temos os RNAs ribossomais (rRNAs), os RNAs transportadores (tRNAs), os pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs), os microRNAs (miRNAs) e os RNAs de interferência (siRNAs). Possuem uma ampla gama de funções biológicas, principalmente em eventos epigenéticos, tais como silenciamento da cromatina e de regiões repetitivas do genoma, na dinâmica dos cromossomos, direcionamento da metilação do DNA, inativação do cromossomo X, modificações nos RNAs, tais como processamento, inibição da tradução e degradação de RNA mensageiro (mRNA) (Mattick e Makunin, 2006; Pang, 2007; Costa, 2008).

A ligação funcional entre a metilação do DNA e as modificações das histonas foi estabelecida inicialmente a partir dos estudos que demonstraram que as HDACs são recrutadas para as sequências de DNA metilados pelas proteínas de ligação a CpG metilados (Rando, 2006). A interação entre a metilação do DNA e as modificações das histonas determina um efeito importante na expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário e na diferenciação celular (Bird, 2002; Esteller, 2007).

## **O câncer de mama**

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, e a cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. É a segunda causa de morbidade e mortalidade relacionadas ao câncer entre as mulheres no mundo, com incidência aumentando 0,5% anualmente, sendo considerado um dos maiores problemas em saúde pública, considerando o número de mulheres que são diagnosticadas e o número das que morrem em decorrência dessa doença. Em 2010, eram esperados 49.240 novos casos de câncer de mama na população brasileira, com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres. Na Região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres, com um risco estimado de 65 casos novos a cada 100 mil mulheres (Inca, 2009).

Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61%, sendo que para países desenvolvidos essa sobrevida aumenta para 73%, já nos países em desenvolvimento fica em 57% (Inca, 2009).

É notável que a identificação de marcadores para discriminar células normais das tumorais bem como os diferentes estágios dessa neoplasia é de importância crítica (Hondermarck et al., 2001). A história natural do câncer de mama é caracterizada pela heterogeneidade intra e inter tumoral, já que pacientes com o mesmo diagnóstico histopatológico podem seguir diferentes cursos clínicos e mostrar respostas distintas à terapia (Osborne et al., 2004).

A etiologia do câncer de mama ainda não está bem definida. Sabe-se que a idade é o fator de risco mais importante. Contudo, outros fatores têm sido relatados como: paridade, idade da primeira gravidez, amamentação, idade da menarca e da menopausa, tratamento com estrógeno após a menopausa, comportamento, estresse e nutrição. A história familiar é outro grande fator de risco, enfatizando a importância de características genéticas nessa condição (Cheung et al., 2000). Apesar disso, a prevenção primária dessa neoplasia não é possível devido à variação dos fatores de risco e às características genéticas que estão envolvidas na sua etiologia. Novas estratégias de rastreamento factíveis para países com

dificuldades orçamentárias têm sido estudadas e, até o momento, a mamografia, para mulheres com idade entre 50 e 69 anos, é recomendada como método efetivo para detecção precoce (Inca, 2009).

Atualmente existem marcadores para facilitar o diagnóstico precoce, a resposta aos tratamentos aplicados e o cálculo de sobrevida ao câncer de mama. Na prática clínica, após a detecção do tumor, sua caracterização como sendo um câncer de mama é realizada histologicamente. Alguns parâmetros, tais como tamanho do tumor e inflamação, grau de diferenciação histológica e envolvimento de linfonodos axilares são utilizados para decidir o tratamento a ser aplicado e avaliar o prognóstico. É importante notar que esses parâmetros são apenas probabilísticos: por exemplo, um paciente com um “bom” grau histopatológico poderá apresentar um curso clínico ruim (Harber, 2000). Contudo, atualmente existem vários marcadores moleculares sendo utilizados clinicamente. A sensibilidade das células tumorais de mama para o estrógeno é bem conhecida - o crescimento de células de câncer de mama está sob o controle de hormônios estrogênicos (estradiol e progesterona), além de outros fatores de crescimento. Estrógenos são necessários para o desenvolvimento de células normais bem como de células cancerosas, o que tem levado a utilização de estratégias terapêuticas anti-estrogênica, representadas pelo uso do tamoxifeno (Osborne, 1998).

De fato, o primeiro marcador biológico com uso recomendado na rotina clínica é a presença de receptores para estradiol e progesterona nos tumores mamários. Essa prática permite a seleção de pacientes que se beneficiarão de terapias anti-estrogênicas. Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de identificar uma associação entre fatores como fatores prognósticos, por exemplo entre a taxa de crescimento do tumor e o potencial de metástases ou ainda fatores relacionando à sensibilidade e/ou resistência a agentes terapêuticos (fatores preditivos) (Ciocca et al., 2000).

O termo câncer de mama engloba vários tipos de tumores que são classificados segundo sua origem e características histológicas. Os sarcomas de mama (tumores malignos originados de tecido conjuntivo) são raramente observados. A maioria dos tumores malignos de mama são os carcinomas (originados do tecido epitelial) os quais são divididos em duas classes: carcinomas *in situ*, caracterizados por células tumorais localizadas nos ductos (DCIS - carcinomas ductais *in situ*) ou nos lóbulos da mama (LCIS - carcinomas lobulares *in*

*situ*) sem a invasão através da membrana basal para o estroma adjacente; e os carcinomas invasivos, com a membrana basal parcial ou totalmente destruída, incluindo mais de 10 tipos de carcinomas. Os carcinomas ductais invasivos (65-80% de todos os cânceres de mama) e os carcinomas lobulares invasivos (5-15%) constituem os dois tipos principais, enquanto outras formas como os medulares, tubulares e apócrinos são menos frequentes (0,1-4%). Além dos carcinomas *in situ* e invasivo, a doença de Paget do mamilo constitui uma forma particular de tumor epitelial maligno. Finalmente, existem ainda as lesões benignas, dentre estas a hiperplasia epitelial atípica é considerada como uma forma pré-maligna (Osborne, 1998).

### **Alterações epigenéticas no câncer**

Acredita-se que a maioria dos cânceres se origina como uma consequência do acúmulo de mutações somáticas adquiridas e que são perpetuadas com a progressão tumoral (Yokota, 2000). Contudo, as alterações epigenéticas na região promotora de genes reguladores do crescimento celular são reconhecidas como um mecanismo alternativo de inativação gênica em cânceres humanos (Jones e Baylin, 2002; Hsieh e Jones, 2003). Em células tumorais, as alterações epigenéticas ocorrem em taxas muito elevadas quando comparadas às alterações genéticas. Estes achados são consistentes com a hipótese de que a perda da regulação epigenética em células progenitoras pode ser uma etapa muito inicial do processo de carcinogênese, o que proporcionaria o surgimento de uma população precursora policlonal nas quais eventos genéticos e epigenéticos subsequentes direcionariam o processo de carcinogênese (Feinberg, 2006; Johnson et al., 2009).

A hipermetilação do DNA é considerada um mecanismo alternativo de inativação de genes supressores de tumor. Nos últimos anos, muitos genes mostrando expressão anormal em vários cânceres esporádicos foram associados à hipermetilação na sua região promotora. A hipermetilação de genes relacionados ao câncer é acompanhada por combinações específicas de alterações epigenéticas nas histonas, incluindo a perda da acetilação nas lisinas das histonas H3 e H4, perda da metilação do resíduo de lisina na posição 4 da histona H3 (H3K4) e ganhos de metilação nas lisinas 9 e 27 da histona H3 (H3K9 e H3K27) (Callinan & Feinberg, 2006). Em vários tipos de cânceres humanos, as alterações epigenéticas das

histonas surgem inicialmente e aumentam durante a progressão tumoral. Estas alterações também incluem a hipoacetilação e a perda da metilação de outros aminoácidos específicos na histona H4 (H4K16 e H4K20, respectivamente) (Esteller, 2008).

Atualmente, os estudos em larga escala têm proporcionado uma visão sem precedentes do panorama das alterações genômicas e epigenômicas do câncer. A abordagem integrada de diferentes dimensões analisadas em paralelo permite a identificação de genes que são frequentemente alterados nas células tumorais por diferentes mecanismos. Um estudo recente mostrou que a análise integrada de múltiplas dimensões genômicas (análise em larga escala para identificar alterações consistentes no número de cópias, na metilação do DNA e perda de alelos por ensaios de perda de heterozigose) identificou pontos comuns em vias bem como genes com significado prognóstico em câncer de mama (Chan et al., 2010).

Também tem sido demonstrado que as regiões genômicas constantemente envolvidas em perdas alélicas (microdeleções) nos vários tipos de cânceres estão, em geral, em concordância com os sítios de hipermetilação no genoma (Chari, 2010). Vários estudos descreveram o silenciamento epigenético como um evento local com efeitos em genes discretos; no entanto, a análise combinada dos mapas de transcriptoma com os dados de *array*-CGH (*Comparative Genomic Hybridization based on microarrays*) evidenciaram regiões genômicas de 100 a 4000 Kb contendo agrupamentos de genes com níveis de expressão diminuídos ou mostrando ausência de expressão independente das alterações no número de cópias em amostras tumorais. Estes dados sugerem que grandes regiões cromossômicas podem ser silenciadas de forma coordenada, um processo denominado de *Long Range Epigenetic Silencing* (LRES).

LRES pode se estender por fragmentos de DNA da ordem de megabases, levando a heterocromatização associada à hipermetilação de agrupamentos de ilhas CpG contíguas contidas na região alvo (Frigola et al., 2006; Clark, 2007). Estudos recentes demonstraram que algumas regiões genômicas encontram-se sob regulação do tipo LRES em diferentes tipos de cânceres humanos (tabela 1).

**Tabela 1.** Regiões cromossômicas identificadas sob regulação do tipo LRES em tumores humanos.

REGIÃO CROMOSSÔMICA	GENES*	TIPO TUMORAL	REFERÊNCIA
2q14.2	<i>EN1, SCTR, INHBB</i>	Colorectal	Frigola et al., 2006
7p15.2	<i>HOXA cluster</i>	Mama	Novak et al., 2006
3p23-21.3	<i>VILL, PLCD1, DLEC1 e ACAA1</i>	Bexiga	Stransky et al., 2006
3p22	<i>ARPP21 ao DLEC1</i>	Colorectal	Hitchins et al., 2007
5q31	<i>PCDHA, PCDHB, PCDHG</i>	Mama	Novak et al., 2008
2q14.2	<i>EN1, SCTR, INHBB</i>	Colorectal	Mayor et al., 2009
5q31	<i>PCDHA, PCDHB, PCDHG</i>	Tumor de Wilms	Dalosso et al., 2009
7q31.1-q31.2	<i>GPR85 ao MET</i>	Próstata	Coolen et al., 2010

\* Principais genes mapeados na região cuja inativação epigenética foi validada experimentalmente.

Acredita-se que, além das alterações genéticas como as deleções e microdeleções, os eventos de LRES tornariam genes contíguos ou proximamente localizados funcionalmente inativos. Desta forma, diversas combinações de alterações genéticas e epigenéticas poderiam contribuir para o estabelecimento de fenótipos celulares anormais, principalmente àqueles decorrentes da perda da função de genes supressores de tumor (Frigola, 2006; Clark, 2007).

Frigola e colaboradores (2006) realizaram um estudo em 112 amostras de carcinoma colorretal pareados com o tecido normal adjacente. Nesse estudo, após a triagem genômica do padrão de metilação do DNA, foi identificada uma região de 4Mb mapeada em 2q14.2 comumente hipermetilada. Este estudo demonstrou que a hipermetilação do DNA não se restringia a ilhas CpG discretas ou a genes isolados mas que expandia-se pela região 2q14.2. Resultados similares foram observados em outros estudos baseados na análise do padrão de metilação de ilhas CpG de um número limitado de genes relacionados funcionalmente, reforçando a idéia de que a inativação epigenética de genes próximos pode constituir um evento frequente no câncer (Nie et al., 2001; van Noesel et al., 2003; Palmisano et al., 2003).

Mayor e colaboradores (2009) também analisaram o silenciamento epigenético em 2q14.2. Pelo menos um de três genes (*EN1 - engrailed homeobox 1*,

*SCTR* - *secretin receptor*, *INHBB* - *inhibin, beta B*) estava hipermetilado em 90% dos carcinomas colorretais. O gene *EN1* estava hipermetilado em 73% e 43% dos carcinomas e adenomas, respectivamente. Os autores sugeriram que o silenciamento epigenético em 2q14.2 é um evento comum em câncer colorretal e que a metilação do gene *EN1* poderia ser um biomarcador para a presença de câncer baseado na análise da metilação deste gene nas células obtidas das fezes de pacientes comparada a controles sem câncer.

Stransky e colaboradores (2006), após a análise dos mapas de transcriptoma combinados com os dados de *array*-CGH identificaram 28 regiões genômicas mostrando agrupamentos de genes com níveis de expressão diminuídos independente das variações no número de cópias em carcinomas de bexiga. Estas regiões foram consideradas como candidatas ao efeito do LRES. Uma delas, localizada em 3p22.3 foi validada experimentalmente: os genes *VILL* (*villin-like*), *PLCD1* (*phospholipase C, delta 1*), *DLEC1* (*deleted in lung and esophageal cancer 1*) e *ACAA1* (*acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1*) foram investigados quanto ao perfil de expressão, *status* de metilação e modificações nas histonas; esta análise confirmou a hipótese de que modificações epigenéticas podem levar à perda de expressão de genes vizinhos (Stransky et al., 2006).

Em outro estudo, Hitchins e colaboradores (2007) mostraram que um *cluster* de genes mapeados em 3p22 são silenciados epigeneticamente na maioria dos cânceres colorretais com instabilidade de microssatélite (*microssatellite instability* - MSI) e hipermetilação do gene *MLH1* (*mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2*), apoiando o modelo de tumorigênese baseado no LRES. Na maioria dos cânceres colorretais com MSI analisados, a região de hipermetilação estendeu-se até 2.4Mb compreendendo 11 genes (do gene *ARPP-21* até os genes *PLCD1* e/ou *DLEC1*). Os promotores hipermetilados desses genes também estavam associados à dimetilação e a perda de acetilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9) na linhagem celular RKO, sugerindo uma estreita relação entre esses mecanismos modificadores da cromatina. Também foi observado que o padrão de metilação das ilhas CpG analisadas eram intimamente correlacionadas com a inativação transcricional dos referidos genes, visto que, após o tratamento com a droga 5-aza-2'-desoxicidina, ocorreu a reativação transcricional dos genes que são normalmente expressos na mucosa colônica normal. Esses achados corroboram que o estado epigenético do

gene *MLH1* interfere sincronicamente com a expressão de vários genes na sua vizinhança.

Curiosamente, três genes dentro do *cluster* analisado não apresentavam hipermetilação embora estivessem transcricionalmente reprimidos, mas com intensidade menor do que os genes hipermetilados (Hitchins et al., 2007). Embora os dados evidenciassem metilação modesta na lisina 9 da histona H3, também foi observada a acetilação deste resíduo. Os autores sugeriram que a inativação desses genes estaria dependente do estado de metilação e acetilação das histonas dos genes vizinhos do que deles próprios.

O fenótipo CIMP (*CpG island methylator phenotype*), caracterizado pela alta frequência de eventos anormais de metilação em ilhas CpG discretas, é observado em 18 a 25% dos cânceres de cólon esporádicos. Karpinski e colaboradores (2008) avaliaram se esta característica estava associada com o LRES em 2q14.2. O padrão de metilação do gene *MHL1* e das três ilhas CpG dos genes *EN1*, *SCTR* e *INHBB*, que identificam os agrupamentos ao longo desta região, foram determinados por MSP (*Methylation-specific PCR*). O número médio de sítios mostrando hipermetilação foi 2,21 em tumores CIMP+ comparado com 1,22 em tumores CIMP-. Adicionalmente, os tumores CIMP+ mostraram hipermetilação em no mínimo um dos três *loci* testados. Baseado no número de *loci* hipermetilados em 2q14.2, os autores consideraram que provavelmente outros genes que flanqueiam a região também estejam hipermetilados, e desta forma, a alta frequência de hipermetilação simultânea dos três *loci* possui potencial para influenciar características específicas dos tumores CIMP+.

Em carcinomas mamários, Novak e colaboradores (2008) identificaram regiões diferencialmente metiladas (DMR) pelo estudo em larga escala e de alta resolução baseado numa plataforma de microarranjos de ilhas CpG (*promoter tiling array*). Os pesquisadores identificaram 3.506 DMRs, das quais 2033 estavam hipermetiladas e 1.473 hipometiladas nas amostras de carcinomas mamários. Dentre as regiões hipermetiladas, estavam os *clusters* gênicos *PCDHA*, *PCDHB*, *PCDHG* e *HOXA*. Estas alterações foram recorrentes e mostravam uma distribuição não casual, com uma tendência a se concentrarem em regiões genômicas relativamente pequenas. Os eventos de hipermetilação foram mais frequentes nas proximidades dos sítios de iniciação da transcrição nas ilhas CpG das regiões promotoras, enquanto a hipometilação estava associada a regiões de duplicações.

Os autores sugeriram que agrupamentos de aberrações epigenéticas são eventos frequentes em carcinomas mamários.

Coolen e colaboradores (2010) identificaram 47 LRES em linhagens celulares e em amostras clínicas de câncer de próstata, envolvendo regiões de até 2 Mb contendo em média 12 genes, entre eles, supressores de tumor e miRNAs. Adicionalmente, este estudo mostrou que estas LRES estão associadas com regiões de desacetilação de histonas combinadas com diferentes padrões de remodelamento da cromatina, envolvendo ganho ou troca de modificações das histonas de caráter repressivo e metilação do DNA.

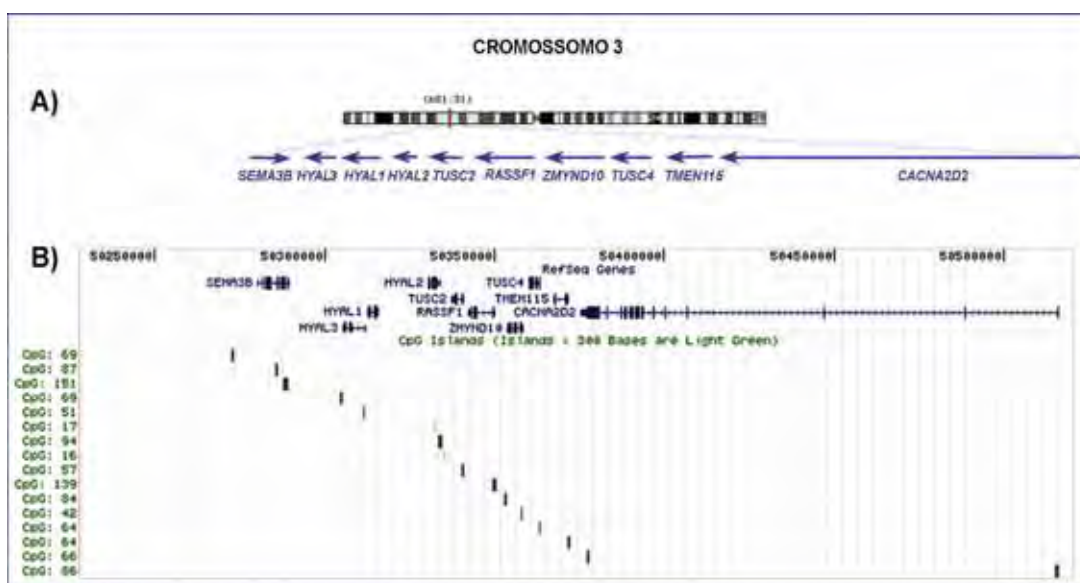
## **JUSTIFICATIVA**

A perda alélica em 3p tem sido relatada como um evento frequente em uma variedade de cânceres como os de pulmão, mama, cabeça e pescoço, ovarianos, cérvix uterina, cólon, pâncreas, entre outros, o que sugere que estas alterações são de importância crítica na patogênese do câncer humano (Zabarovsky et al., 2001; 2002). A perda de heterozigose (LOH) de marcadores polimórficos mapeados em 3p foi detectada nos estágios iniciais do carcinoma mamário (Burbee et al., 2001; Yang et al., 2002) e alguns estudos associaram esta alteração a características clinico-patológicas específicas e de pior prognóstico (Martinez et al., 2001). O uso de vários marcadores microssatélites mapeados em intervalos regulares ao longo do braço curto deste cromossomo permitiu o delineamento das regiões 3p22-24, **3p21.3**, **3p21.2-21.3**, 3p14.3 e 3p12 como os intervalos mínimos das deleções, o que sugere a presença de vários genes supressores tumorais (Maitra et al., 2001; Ji et al., 2005).

No estudo realizado por Hoebbeck e colaboradores (2006), as regiões de perdas em 3p21-p22 foram refinadas pelo uso de uma abordagem baseada na hibridação genômica comparativa em microarranjos de sondas de DNA (*High Resolution Tiling-path BAC Array-Comparative Genomic Hybridization* ou *array-CGH*) em linhagens celulares derivadas de neuroblastomas e de mama. Foram identificadas três regiões mínimas de deleção, denominadas de SROs (*shortest region of overlap*). Este estudo revelou que as regiões mais frequentes de LOH relatadas principalmente em carcinomas de pulmão e da mama coincidem com as duas SROs contidas em 3p21.3 e sugerem que genes supressores comuns podem

ser críticos no desenvolvimento de vários cânceres humanos. A SRO1, mapeada em 3p21.31-p21.2, possui 3,6Mb, contém 87 genes, incluindo o gene *RASSF1* (*Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1*) (Sekido et al., 1996). Embora mutações inativadoras deste gene sejam incomuns, ele tem sido caracterizado como um supressor tumoral frequentemente envolvido em cânceres humanos porque a perda da sua expressão está associada à hipermetilação da sua região promotora (Hesson et al., 2007).

Num estudo anterior, detectamos altas frequências de hipermetilação na região promotora dos genes *RARB* (*retinoic acid receptor, beta*), mapeado em 3p24, e *RASSF1* em carcinomas ductais invasivos da mama: 65/76 (85,5%) dos casos apresentaram a hipermetilação do gene *RASSF1* e 47/76 do gene *RARB* (61,8%), consistente com a função de supressores tumorais inativados na carcinogênese mamária (dados não publicados). A partir destes dados preliminares, foi realizada uma análise *in silico* nos bancos de dados públicos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para revisar e identificar novos potenciais genes candidatos a supressores tumorais contidos no braço curto do cromossomo 3. Foram identificados 356 genes contidos num segmento genômico de 35,6Mb entre os genes *RARB* e *FHIT* (*fragile histidine triad gene*) (3p14). Destes, 37 genes foram previamente relatados em literatura como prováveis supressores tumorais, principalmente devido ao decréscimo significativo dos níveis de expressão em células tumorais comparado aos níveis do tecido normal. Estes dados, confrontados com as planilhas de Hoebeek et al., (2006) (material suplementar disponível em <http://www.interscience.wiley.com/jpages/0020-7136/suppmat>) permitiu a identificação de um agrupamento gênico em 3p21.3 de ~236Kb delimitados pelos genes *SEMA3B* (*sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B*) e *CACNA2D2* (*calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2*) contendo nove genes que flanqueiam o locus *RASSF1*, todos fortes candidatos a supressores tumorais (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema do agrupamento gênico em 3p21.3 alvo deste estudo. **A)** As setas indicam a orientação dos genes. **B)** A posição relativa das ilhas CpG estão identificadas em verde (fonte: *UCSC Genome Bioinformatics*, disponível em <http://genome.ucsc.edu/>).

No conjunto, estes genes atuam em processos biológicos importantes tais como diferenciação celular, proliferação, controle do ciclo celular, transdução de sinais, transporte ou troca de íons e apoptose. Estas atividades foram associadas, direta ou indiretamente, com a atividade supressora de tumor em ensaios funcionais, embora os mecanismos moleculares não sejam conhecidos precisamente (Tabela 2) (Ji et al., 2005).

Um dado importante a ser considerado é a frequência de mutações extremamente baixa para os genes mapeados em 3p21.3: somente poucas mutações levando a proteínas truncadas foram identificadas para apenas alguns desses genes candidatos (incluindo os genes *TUSC2*, *ZMYND10*, *NPRL2*, *HYAL1*) e somente duas mutações *missense* foram detectadas em mais de 200 amostras de tumores primários avaliadas para a pesquisa de mutações no gene *RASSF1* (Burbee et al., 2001; Damman et al., 2003; 2005).

A reversibilidade das modificações epigenéticas é o principal atrativo para as pesquisas que elegeram a hipermetilação do DNA e a hipoacetilação de histonas como novos alvos terapêuticos. Dentre as drogas de ação epigenéticas estão: os inibidores das enzimas DNA metiltransferases, como a 5-aza-2'-desoxicitidina e os inibidores das desacetilases de histonas, como a Tricostatina A. Estas drogas estão

sendo amplamente utilizadas em ensaios experimentais *in vitro*, Entretanto, na prática oncológica, a terapia epigenética tem suas limitações, entre elas, a ativação não específica de genes e elementos transponíveis em células normais, além do potencial de mutagenicidade e carcinogenicidade. Pela própria característica de reversibilidade, uma alteração epigenética corrigida poderia voltar a seu estado prévio, o que levaria à necessidade de tratamento continuado. Contudo, é importante destacar que todos os tipos de cânceres investigados apresentam alterações nos perfis epigenéticos, o que sugere que todo paciente com câncer potencialmente se beneficiaria da terapia epigenética (Kopelovich et al., 2003; Egger et al., 2004; Rodenhiser e Mann, 2006).

**Tabela 2.** Genes mapeados em 3p21.3 pertencentes ao agrupamento de genes candidatos a supressores tumorais.

<b>SÍMBOLO OFICIAL*</b>	<b>NOME OFICIAL*</b>	<b>ALIASES</b>	<b>OBSERVAÇÕES</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>
<b>SEMA3B</b>	<i>sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B</i>	<i>FLJ34863, LUCA-1, SEMA5, SEMAA, SemA, semaV</i>	Possui ação indutora de apoptose: hipermetilação em câncer de pulmão	Castro Riveira et al., 2004; Marsit et al., 2005; Ito et al., 2005; Nair et al., 2007.
<b>HYAL1</b>	<i>hyaluronoglucosaminidase 1</i>	<i>HYAL-1, LUCA1, MGC45987, NAT6</i>	Níveis de expressão anormais em células tumorais	Franzmann et al., 2001; Junker et al., 2003; Lokeshwar et al., 2006; Christopoulos et al., 2006;
<b>HYAL2</b>	<i>hyaluronoglucosaminidase 2</i>	<i>LUCA2, LuCa-2</i>	Níveis de expressão anormais em células tumorais	Delpech et al., 2002; Junker et al., 2003; Danilkovitch-Miagkova et al., 2003;
<b>HYAL3</b>	<i>hyaluronoglucosaminidase 3</i>	<i>LUCA-3, LUCA14, LUCA3, Minna14</i>	Níveis de expressão anormais em células tumorais	Junker et al., 2003;
<b>TUSC2</b>	<i>tumor suppressor candidate 2</i>	<i>C3orf11, FUS1, PAP, PDAP2</i>	Níveis de expressão anormais em células tumorais	Lerman et al., 2000; Kondo et al., 2001
<b>RASSF1</b>	<i>Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1</i>	<i>123F2, NORE2A, RASSF1A, RDA32, REH3P21</i>	Hipermetilação em vários tipos de cânceres	Hesson et al., 2007
<b>ZMYND10</b>	<i>zinc finger, MYND-type containing 10</i>	<i>BLU, FLU</i>	Hipermetilação em vários tipos de cânceres	Lerman et al., 2000; Agathangelou et al., 2003; Liu et al., 2003; Qiu et al., 2004; Ito et al., 2005; Marsit et al., 2005; Tischoff et al., 2005; Martinez et al., 2001;
<b>NPRL2</b>	<i>tumor suppressor candidate 4</i>	<i>TUSC4</i>	Níveis de expressão anormais em células tumorais	Li et al., 2004; Knorr et al., 2006;
<b>TMEM115</b>	<i>transmembrane protein 115</i>	<i>PL6 protein; placental protein 6</i>	Níveis de expressão anormais em câncer de pulmão	Chow et al., 2004;
<b>CACNA2D2</b>	<i>calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2</i>	<i>CACNA2D, KIAA0558, LUAC11.1, gene 26</i>	Deleção homozigótica em vários tipos de cânceres	Gao et al., 2000; Lerman et al., 2000; Li et al., 2004; Braga et al., 2003; Senchenko et al., 2003; Knorr et al., 2006.

\* Wain HM, Bruford EA, Lovering RC, et al. Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics*. 79(4):464-70, 2002. (disponível em <http://www.genenames.org/guidelines.html>).

## **Genes candidatos a supressores tumorais mapeados em 3p21.3 selecionados para este estudo**

### ***SEMA3B***

O gene *SEMA3B* pertence a uma família gênica codificadora das semaforinas que desempenham um papel crítico no direcionamento do crescimento axonal durante o desenvolvimento neuronal com provável ação supressora tumoral por induzir a apoptose (Kolodkin et al., 1993). A semaforina 3B pertence à classe 3 das semaforinas e forma um complexo com as neuropilinas (Np-1 e Np-2) e plexinas na superfície celular. Na literatura há relatos demonstrando que as neuropilinas possuem sítios ligantes para a proteína SEMA3B enquanto as plexinas são responsáveis pela transdução do sinal (Rohm et al., 2000).

As neuropilinas também servem como co-receptores para o fator de crescimento endotelial vascular – tipo A (VEGF-A). Em células neurais, neuropilinas regulam o direcionamento axonal, enquanto que em células endoteliais regulam a angiogênese e migração (Soker et al., 1998; Bernatchez et al., 2002). Assim, acredita-se que as neuropilinas e o VEGF-A desempenham um papel importante na tumorigênese e, junto com as semaforinas, constituem alvos terapêuticos atrativos (Castro-Rivera et al., 2008).

Recentemente, foi estabelecido que SEMA3B e VEGF desempenham papéis antagônicos na regulação da apoptose e da sobrevivência de linhagens celulares de carcinomas de pulmão e de mama (Sekido et al., 1996; Tse et al., 2002; Castro-Rivera, 2004). Esses resultados sugerem que os efeitos supressores de tumor de SEMA3B sejam mediados pelo bloqueio de uma via de sinalização endócrina induzida por VEGF, possivelmente pela competição por ligação aos receptores Np-1 (Castro-Rivera, 2004). Embora as atividades pró-apoptótica e de inibição do crescimento celular designadas ao gene *SEMA3B* em células cancerosas tenham sido mostradas em alguns estudos, a(s) via(s) de transdução de sinais que sustentam essas atividades ainda não estão estabelecidas (Castro-Rivera, 2004).

Além disso, foi demonstrado que SEMA3B suprime significativamente a tumorigenicidade quando introduzido em linhagens celulares de câncer de pulmão e ovário (Tomizawa et al., 2001) e que este gene é altamente expresso em

ganglioneuroma (um tumor neurológico benigno) ao contrário de neuroblastomas malignos, onde sua expressão está ausente (McArdle et al., 2004).

Em outro estudo, Ito e colaboradores (2005) encontraram a hipermetilação da região promotora do gene *SEMA3B* em 47% das 138 amostras de pacientes com câncer de pulmão de células não-pequenas analisadas pela metodologia de MSP. Ao contrário, Zavala e colaboradores (2007) não encontraram hipermetilação significativa em tumores gástricos.

### ***HYAL3, HYAL1 e HYAL2***

A hialuronidase (AHase) é uma endoglicosidase que degrada o ácido hialurônico (AH), um dos principais glicosaminoglicanos presentes em alguns tecidos na matriz extracelular e em fluídos corpóreos, mantendo os tecidos hidratados, o balanço osmótico e a integridade das cartilagens. O AH também participa ativamente da adesão, proliferação, migração e diferenciação celular por meio de interações com receptores de membrana específicos tais como CD44 e RHAMM (*receptor for hyaluronan-mediated motility*) (Herrlich et al., 2000; Turley et al., 2002; Delpech et al., 2002; Stern, 2008).

As concentrações do AH encontram-se elevadas em várias doenças inflamatórias e em vários carcinomas incluído os de mama, bexiga, próstata, pulmão e cólon. Em tumores, o AH pode promover o crescimento e favorecer a ocorrência de metástases, provavelmente por sua participação ativa na migração celular além de conferir proteção contra o sistema imune (Pirinen et al., 2001, Posey et al., 2003; Rein et al., 2003).

No genoma humano, existem seis genes codificadores de AHases identificados. Esses genes, denominados *HYAL*, ocorrem em *clusters* de três componentes em duas localizações cromossômicas diferentes: *HYAL1*, *HYAL2* e *HYAL3* encontram-se mapeados no cromossomo 3p21.3; *PH20*, *HYAL4* e *HYALP1* estão localizados no cromossomo 7q31.3. Com as prováveis exceções de *HYAL4* e *HYALP1*, as demais AHases degradam o ácido hialurônico, gerando pequenos fragmentos de 2 a 25 dissacarídeos; esses fragmentos estimulam a angiogênese por meio da proliferação celular endotelial mediada pelos receptores de superfície

RHAMM e CD44 e pela ativação da via de proteínas quinases ativadoras da mitose (Herrlich et al., 2000; Turley et al., 2002; Stern, 2008).

A AHase tipo 1 codificada pelo gene *HYAL1* é a principal enzima desta classe, está presente no soro e foi detectada em células tumorais da bexiga, próstata e de cabeça e pescoço (Lokeshwar et al., 1998; Hautmann et al., 2001; Franzmann et al., 2001; Lokeshwar et al., 2006). Já a AHase tipo 2, codificada pelo gene *HYAL2*, cliva o AH em fragmentos maiores (aproximadamente 20KDa) e sua relevância em alguns tumores tem sido estudada, como em linfomas de célula B não-Hodgkin's de alto grau cujos níveis dessa proteína encontram-se diminuídos (Bourguignon et al., 2004; Bertrand et al., 2005). Com relação à AHase tipo 3, *HYAL3*, sua expressão foi correlacionada a um *score* de Gleason baixo e a ausência de recorrência no câncer de próstata (de Sá et al., 2008), contudo até o momento, o gene *HYAL3* é o menos estudado e poucos grupos de pesquisa investigaram sua ação no câncer.

Níveis aumentados de hialuronidases (como a *HYAL1*) podem ser empregados como um marcador bioquímico preciso para a detecção de tumores de alto grau em câncer de bexiga e para a recorrência em câncer de próstata (Posey et al., 2003; Ekici et al., 2004). Além disso, foi observado um aumento no nível de hialuronidase em células derivadas de câncer de mama durante o processo metastático (Madan et al., 1999; Victor et al., 1999). Em outro estudo, Lokeshwar e colaboradores (2005) demonstraram que o bloqueio da expressão de *HYAL1* em uma linhagem celular de carcinoma de bexiga invasivo diminuiu de 9 a 17 vezes o crescimento tumoral, inibindo a infiltração e diminuindo a densidade de microvascularizações de 4 a 9 vezes. Essas observações demonstram que as hialuronidases em geral, e a *HYAL1* em particular, podem atuar como estimuladores tumorais (Lokeshwar et al., 2005; Poola et al., 2008).

Algumas isoformas de AHases têm sido descritas como produtos de *splicing* alternativo, sendo responsáveis por variações na atividade enzimática. Padrões heterogêneos na expressão das AHases foram identificados em vários tipos de tumores e podem estar associados a diferenças no comportamento biológico tumoral. Além disso, níveis elevados de *HYAL1* tipo selvagem foram coincidentes com a presença de fragmentos de AH angiogênicos em tecido tumoral prostático (Lokeshwar et al., 1998; Lokeshwar et al., 2006).

Contudo, ao contrário dos efeitos no crescimento tumoral e na promoção de metástase associados ao *HYAL1*, o locus cromossômico onde se encontram os genes *HYAL* apresenta frequências altas de deleção em vários tipos de cânceres (Ji et al., 2002). Adicionalmente, Wang e colaboradores (2008) realizaram um estudo cujos resultados sugerem que a expressão de *HYAL1* ou *HYAL2* leva a inibição do crescimento *in vivo* de carcinomas de pulmão e de rim.

## ***TUSC2***

O gene *TUSC2*, mais conhecido como *FUS1*, foi sugerido como um dos novos candidatos a supressores tumorais, já que está mapeado em uma região frequentemente deletada em vários tipos de cânceres (Kondo et al., 2001). Uno e colaboradores (2004) demonstraram que a indução da expressão do gene *TUSC2* inibiu significativamente o crescimento celular *in vitro* de linhagens de câncer de pulmão de células não-pequenas, bem como levou à indução da apoptose e à alterações na cinética do ciclo celular; além disso, o crescimento tumoral e a ocorrência de metástases foram eficientemente suprimidos *in vivo*.

Outro estudo *in vivo*, baseado no tratamento sistemático com uma construção contendo o gene *TUSC2* associado à nanopartículas combinado com a terapia com a droga cisplatina, em modelo animal para o câncer de pulmão, aumentou drasticamente a eficácia terapêutica da cisplatina. Também foi observado que o aumento da quimiosensibilidade foi associado com a diminuição da expressão do gene *MDM2*, que codifica uma proteína antagonista da p53 (que participa da regulação da parada do ciclo celular e de seu restabelecimento após o reparo de danos ao DNA). Consequentemente foi notado o acúmulo da proteína p53 e a ativação da via de apoptose dependente de Apaf-1 (Deng et al., 2008).

Adicionalmente, Lee e colaboradores (2007) demonstraram que o microRNA *miR-378* direciona-se ao transcrito do gene *TUSC2* reprimindo sua expressão, levando a um aumento da sobrevivência celular, ao crescimento tumoral e à angiogênese.

Ainda há poucas informações a respeito do gene *TUSC2*, sendo necessários mais estudos para um melhor entendimento de seu papel nos processos celulares normais assim como em células tumorais.

## **RASSF1**

O gene *RASSF1* possui sete isoformas incluindo as *RASSF1A*, *RASSF1B* e *RASSF1C*, derivadas de *splicing* alternativo ou de variações na utilização de seus promotores. O gene *RASSF1* codifica uma proteína com domínio de associação a proteínas RAS (p21<sup>ras</sup>) e participa da regulação da fase G1/S do ciclo celular, transdução de sinal, trocas e transporte de íons, apoptose e morte celular (Ji et al., 2005). Estudos demonstraram que a proteína RAS se liga a um grupo de diversas moléculas efetoras mediando tanto processos oncogênicos como supressores de tumor (Bar-Sagi et al., 1985; Mayo et al., 1997). Além disso, a expressão exógena de *RASSF1A* diminui a formação de colônias *in vitro*, suprime o crescimento dependente de ancoragem e reduz dramaticamente a tumorigenicidade *in vivo* (Dammann et al., 2000; Burbee et al., 2001).

A hipermetilação da isoforma *RASSF1A* é frequentemente relatada em carcinomas de mama, pulmão, ovário, tireóide, bexiga e carcinomas gástricos (Yeo et al, 2005), bem como em amostras de DNA presentes no plasma de pacientes com câncer de mama (Dulaimi et al, 2004; Müller et al, 2003) e de aspirados de lesões mamárias com agulha fina (Krassenstein et al, 2004). Euhus e colaboradores (2008) encontraram em seu estudo que a metilação de *RASSF1A* aumentou linearmente entre as pacientes com idades de 32 a 55 anos e foi altamente correlacionada com o risco aumentado de câncer de mama, com achados citológicos atípicos e com doenças de mama benignas requerendo biópsias. Contudo, outro estudo, evidenciou que a isoforma *RASSF1A* também possui sua região promotora densamente metilada no epitélio de mamas normais (Yan et al., 2006). Tem sido proposto que a metilação do DNA em epitélio normal funcionaria como um relógio biológico epigenético registrando o número de ciclos celulares sofridos pela célula; esse conceito é bem ilustrado por estudos de análise da metilação nos genes *CSX* e *MYOD* em células-tronco das criptas intestinais (Kim et al., 2005).

Em câncer de pulmão, a perda alélica da região onde este gene está mapeado é frequentemente associada à hipermetilação, sugerindo que tantos mecanismos genéticos quanto epigenéticos estão envolvidos na inativação do gene *RASSF1* neste tipo de câncer (Agathangelou et al., 2001). Em outro estudo, Bagadi

e colaboradores (2008) encontraram a associação da metilação do gene *RASSF1A* e a presença de metástases nodais em pacientes com câncer de mama.

### **ZMYND10**

O gene *ZMYND10*, também conhecido como *BLU*, codifica uma proteína de 50KDa contendo um *motif* de ligação em sua região N-terminal para a proteína DUF500 e domínios de ligação ao DNA do tipo dedos de zinco MYND em sua região C-terminal, comumente encontrado em repressores de transcrição. Suspeita-se da participação do gene *ZMYND10* na progressão do ciclo celular além da resposta ao estresse mediada pelo gene *E2F* (Lerman et al., 2000; Liu et al., 2003).

Alguns estudos revelaram que *ZMYND10* sofre diminuição de sua expressão em câncer de células não-pequenas de pulmão, em carcinoma de células escamosas de esôfago e em carcinoma nasofaríngeo (Qiu et al., 2004; Ito et al., 2005). Agathangelou e colaboradores (2003) avaliaram o papel de *ZMYND10* na tumorigênese por meio da análise do padrão de metilação da sua região promotora em linhagens de células tumorais, detectando a hipermetilação em 39% das linhagens derivadas de câncer de pulmão estudadas, 42% de mama, 50% de rim, 86% de neuroblastoma e 80% das derivadas de carcinoma nasofaríngeo. Adicionalmente, a hipermetilação encontrada foi correlacionada com a diminuição da expressão de *ZMYND10* nas linhagens tumorais analisadas, sendo restabelecida após o tratamento das linhagens com 5-aza-2'-desoxicitidina.

Em outro estudo, foi observado que células de neuroblastoma e de câncer de pulmão transfectadas com *ZMYND10* resultaram em 40-80% de inibição na proliferação celular, apoiando fortemente as evidências de seu papel como supressor tumoral. Contudo, a expressão exógena de *ZMYND10* praticamente não suprimiu a tumorigenicidade em ratos *nude* sugerindo que outras proteínas devam participar deste processo (Yi et al., 2006).

### **NPRL2**

O gene *NPRL2* (*Nitrogen Permease Regulator Like 2*), também conhecido como *TUSC4*, codifica uma proteína com interação a quinase-1 dependente de 3-

fosfoinositídeo (PDK1), um importante regulador da proliferação e da transdução de sinais de sobrevivência celular, além de participar do mecanismo de reparo de mal pareamento do DNA (Lerman et al., 2000; Schenk et al., 2003; Li et al., 2004).

O gene *NPRL2* é expresso em muitos tecidos normais, incluindo o coração, o fígado, o músculo esquelético, rins e o pâncreas. Em alguns cânceres, como de pulmão, rim e mama, deleções na região cromossômica onde este gene encontra-se mapeado são frequentemente observadas (Zabarovsky et al., 2002). Além disso, tem sido relatado que a expressão aumentada do gene *NPRL2* inibe a proliferação celular e promove a apoptose em uma variedade de linhagens de células tumorais. Outro estudo mostrou que *NPRL2* torna as células mais suscetíveis a ação de drogas antitumorais e/ou quimioterápicos. Entretanto, o mecanismo pelo qual o produto deste gene suprime a proliferação celular necessita ser melhor estudado (Ji et al., 2002).

Li e colaboradores (2004) realizaram uma busca por mutações neste gene em um painel de linhagens celulares derivadas de cânceres; dentre os resultados obtidos foram encontradas deleções homozigóticas na região 3' em 2/7 linhagens renais, 3/5 pulmonares e 1/7 cervicais; essas deleções poderiam resultar em anormalidades no *splicing*, levando a perda da função do RNAm do gene *NPRL2*

Outro estudo sugeriu que o gene *NPRL2* como potencial biomarcador de predição de resposta a cisplatina em pacientes com câncer de pulmão e como um agente terapêutico molecular para o aumento da resposta e re-sensibilização de pacientes insensíveis ao tratamento (Ueda et al., 2006).

### ***TMEM115***

O gene *TMEM115*, também denominado *PL6*, é altamente conservado sendo expresso em vários tecidos, como pulmão, mama e rim e, aparentemente, codifica uma proteína receptora de membrana plasmática com seis a oito domínios transmembrana; entretanto, não possui uma função biológica estabelecida (Lerman et al., 2000). Apesar disso, a presença de um *motif rhomboid-like* em seu domínio de ligação a feromônio pode sugerir seu envolvimento em cascatas de regulação do ciclo celular (Wasserman et al., 2000).

Ivanova e colaboradores (2008) analisaram a expressão do gene *TMEM115* em tecidos normais embrionários e adultos bem como em alguns tipos de carcinomas e, baseado nos resultados obtidos, foi sugerido que o gene *TMEM115* codifica uma proteína residente no complexo de Golgi e cuja expressão encontra-se reduzida em carcinomas renais de células claras quando comparada ao rim normal, a outros tipos de tumores renais e a carcinomas de outras origens. Adicionalmente, foi demonstrado que a expressão do gene *TMEM115* foi significativamente menor em linhagens celulares portadoras de mutação no gene *VHL* apresentando insensibilidade a hipóxia, sugerindo que o gene *TMEM115* é regulado pelo *VHL*. Interessantemente, o restabelecimento da função do gene *VHL* em linhagens celulares de carcinomas renais de células claras *in vitro* induziu a re-expressão do gene *TMEM115*, sugerindo que a perda de sua provável função secretória devido à deficiência de *VHL* seja um evento inicial e de grande importância, podendo promover a iniciação e o crescimento tumoral. Entretanto, não foram encontradas mutações nem a hipermetilação da região promotora do gene *TMEM115*, inicialmente postulados como possíveis mecanismos reguladores da expressão desse gene em carcinomas renais.

### ***CACNA2D2***

Os canais de cálcio são compostos por quatro subunidades (alfa-1, alfa-2/delta, beta e gama) e permitem o influxo de íons cálcio para dentro da célula por meio da polarização da membrana plasmática. Os níveis de expressão de cada subunidade variam de acordo com o tecido: por exemplo, a subunidade alfa-2/delta é altamente expressa no pulmão e testículo (Gong et al., 2001; Davies et al., 2007). A subunidade alfa-2/delta do canal de cálcio dependente de voltagem é codificado pela família gênica *CACNA2D1*, *CACNA2D2*, *CACNA2D3* e *CACNA2D4*.

Recentemente, Ghosh e colaboradores (2008) analisaram alterações em alguns genes candidatos a supressores tumorais, incluindo o gene *CACNA2D2*, mapeados em 3p21.31 e associados ao desenvolvimento precoce de lesões displásicas de cabeça e pescoço. Dentre os resultados obtidos, foi encontrado tanto deleções como a metilação da região promotora do gene *CACNA2D2*, bem como a diminuição dos seus níveis de expressão.

Em outro estudo, após a análise do padrão de metilação da região promotora do gene *CACNA2D2* em 32 amostras de tumores gástricos coletadas de diferentes pacientes e em sete linhagens celulares de câncer gástrico, somente uma linhagem celular apresentou a hipermetilação. Além disso, nenhuma alteração na expressão gênica de *CACNA2D2* foi observada após o tratamento com a droga 5-aza-2'-desoxicitidina sugerindo que outros eventos possam estar envolvidos na regulação gênica de *CACNA2D2* em tumores gástricos (Wanajo et al., 2008). Resultados semelhantes foram observados por Hesson e colaboradores (2004) ao analisar gliomas, encontrando baixa frequência de hipermetilação dos genes *CACNA2D2* e *SEMA3B*.

## **OBJETIVOS**

A pesquisa experimental sistemática de genes com níveis de expressão alterados no câncer é fundamental para a identificação de genes envolvidos na progressão tumoral. A análise combinada dos níveis de expressão gênica, metilação do DNA e modificações nas histonas permite a identificação de novos genes candidatos a supressores de tumor regulados epigeneticamente e, conseqüentemente, poderá levar à identificação de novos grupos de tumores suscetíveis à terapia epigenética. Considerando a estrutura da região alvo deste estudo em 3p21.3, a densidade de ilhas CpG observada, a função individual de cada gene e as evidências em literatura que mostram decréscimo dos níveis de expressão em carcinomas humanos, propomos este estudo com a finalidade de investigar se este agrupamento gênico flanqueando o gene supressor tumoral *RASSF1* encontra-se inativado epigeneticamente em carcinomas mamários e se um mecanismo coordenado de regulação do tipo *Long-Range Epigenetic Silencing* poderia levar à perda simultânea da função de múltiplos genes neste loco.

### **Objetivos específicos**

- 1- Identificar se o agrupamento gênico selecionado, compreendendo 5 genes mapeados *upstream* ao gene *RASSF1* (*SEMA3B*, *HYAL3*, *HYAL1*, *HYAL2* e *TUSC2*) e 4 genes *downstream* (*ZMYND10*, *NPRL2*, *TMEM115* e *CACNA2D2*) é regulado epigeneticamente evidenciado pelo níveis diferenciais de expressão após o tratamento com 5-aza-2'desoxicitidina (5Aza-dC), com Tricostatina A (TSA), isolados ou combinados, em 20 linhagens celulares derivadas de epitélio mamário (normais e tumorais);
- 2- Analisar o padrão de metilação das respectivas ilhas CpG para os genes que mostrarem evidências de regulação epigenética nas respectivas linhagens celulares;
- 3- Avaliar o padrão de metilação e acetilação da lisina 9 da histona H3 para os mesmos genes;
- 4- Correlacionar os dados de expressão gênica, metilação do DNA e metilação/acetilação da lisina 9 da histona H3.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agathangelou A, Dallol A, Zochbauer-Muller S, et al. Epigenetic inactivation of the candidate 3p21.3 suppressor gene BLU in human cancers. *Oncogene*. 22(10):1580-8, 2003.
- Agathangelou, A, Honorio, S, Macartney, DP, et al. Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene*, 20:1509-18, 2001.
- Bagadi SA, Prasad CP, Kaur J, et al. Clinical significance of promoter hypermethylation of RASSF1A, RARbeta2, BRCA1 and HOXA5 in breast cancers of Indian patients. *Life Sci*. 82(25-26):1288-92, 2008.
- Bar-Sagi D, Fernandez A, Feramisco JR. Regulation of membrane turnover by ras proteins. *Biosci Rep*. 7(5):427-34, 1987.
- Baylin SB, Herman JG. DNA Hypermethylation in Tumorigenesis. *Trends Genet* 16:168-74, 2000.
- Baylin SB, Schuebel KE. Genomic biology: the epigenomic era opens. *Nature*. (7153):548-9, 2007.
- Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* 405:482-85, 2000.
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhhattar R, et al. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* Apr 1;23(7):781-3, 2009.
- Bernatchez PN, Rollin S, Soker S, et al. Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: role of neuropilin-1. *J Cell Biochem* 85:629-39, 2002.
- Bertrand P, Courel MN, Maingonnat C, et al. Expression of HYAL2 mRNA, hyaluronan and hyaluronidase in B-cell non-Hodgkin lymphoma: relationship with tumor aggressiveness. *Int J Cancer* 113:207-12, 2005.
- Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*. 9(16):2395-402, 2000.
- Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*; 16:6-21, 2002.
- Bird AP. Perceptions of epigenetics. *Nature* 447:396-8, 2007.
- Bourguignon LYW, Singleton PA, Diedrich F, et al. CD44 interaction with Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion, *J. Biol. Chem*. 279:26991-27007, 2004.
- Braga EA, Kashuba VI, Maliukova AV, et al. ER New tumor suppressor genes in hot spots of human chromosome 3: new methods of identification. *Mol Biol (Mosk)*. 37(2):194-211, 2003.

- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2009. 98p.
- Burbee DG, Forgacs E, Müller SZ, et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Nat Cancer Inst* 93:691-99, 2001.
- Callinan PA, Feinberg AP. The emerging science of epigenomics. *Hum Mol Genet* 15:R95-R101, 2006.
- Castro-Rivera E, Ran S, Thorpe P, et al. Semaphorin 3B (SEMA3B) induces apoptosis in lung and breast cancer, whereas VEGF165 antagonizes this effect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(31):11432-7, 2004.
- Castro-Rivera E, Ran S, Brekken RA, et al. Semaphorin 3B inhibits the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway through neuropilin-1 in lung and breast cancer cells. *Cancer Res.* 15; 68(20):8295-303, 2008.
- Chan R, Coe BP, Vucic EA, et al. An integrative multi-dimensional genetic and epigenetic strategy to identify aberrant genes and pathways in cancer. *BMC Systems Biology*, 4:67-81, 2010.
- Chapman VM, Kratzer PG, Siracusa L D, et al. Evidence for DNA modification in the maintenance of X-chromosome inactivation in adult tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5357-61, 1982.
- Chari R, Coe BP, Vucic EA, et al. An integrative multi-dimensional genetic and epigenetic strategy to identify aberrant genes and pathways in cancer. *BMC Syst Biol.*; 4:67-81, 2010.
- Cheung, K.L.; Graves C.R.; Robertson J.F. Tumour marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 26(2):91-102, 2000.
- Chow LS, Lo KW, Kwong J, et al. RASSF1A is a target tumor suppressor from 3p21.3 in nasopharyngeal carcinoma *Int J Cancer.* 109(6):839-47, 2004.
- Christopoulos TA, Papageorgakopoulou N, Theocharis DA, et al. Hyaluronidase and CD44 hyaluronan receptor expression in squamous cell laryngeal carcinoma. *Biochim Biophys Acta.* 1760(7):1039-45, 2006.
- Ciocca DR, Elledge R. Molecular markers for predicting response to tamoxifen in breast cancer patients. *Endocrine*, 13(1):1-10, 2000.
- Clark SJ. Action at a distance: epigenetic silencing of large chromosomal regions in carcinogenesis. *Hum Mol Genet.* 15;16 Spec No 1:R88-95, 2007.
- Coolen MW, Stirzaker C, Song JZ et al. Consolidation of the cancer genome into domains of repressive chromatin by long-range epigenetic silencing (LRES) reduces transcriptional plasticity. *Nature Cell Biology*; 12:235, 2010.
- Costa FF. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. *Gene*, 410:9-17, 2008.
- Dallosso AR, Hancock AL, Szemes M, et al. Frequent long-range epigenetic silencing of protocadherin gene clusters on chromosome 5q31 in Wilms' tumor. *PLoS Genet.* 2009; 5:e1000745.

- Dammann R, Li C, Yoon JH, et al. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat. Genet.*, 25: 315-19, 2000.
- Damman R, Schagdarsurengin U, Liu L, et al. Frequent RASSF1 promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene* 22(24):3806-12, 2003.
- Damman R, Schagdarsurengin U, Seidel C, et al. The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update. *Histol Histopathol.* 20(2):645-63, 2005.
- Danilkovitch-Miagkova A, Duh FM, Kuzmin I, et al. Hyaluronidase 2 negatively regulates RON receptor tyrosine kinase and mediates transformation of epithelial cells by jaagsiekte sheep retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(8):4580-5, 2003.
- Davies A, Hendrich J, Van Minh AT, et al. Functional biology of the subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends Pharmacol Sci* 28:220-28, 2007.
- de Sá VK, Canavez FC, Silva IA, et al. Isoforms of hyaluronidases can be a predictor of a prostate cancer of good prognosis. *Urol Oncol.* 27(4):377-81, 2009.
- Delpech B, Laquerriere A, Maingonnat C, et al. Hyaluronidase is more elevated in human brain metastases than in primary brain tumours. *Anticancer Res.* 22(4):2423-7, 2002.
- Deng WG, WU G, Ueda K, et al. Enhancement of antitumor activity of cisplatin in human lung cancer cells by tumor suppressor FUS1. *Cancer Gene Ther.* 15(1):29-39, 2008.
- Dulaimi E, Hillinck J, Ibanez De Caceres I, et al. Tumor Suppressor Gene Promoter Hypermethylation In Serum Of Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res*, 10(18 Pt 1), 6189-93. 2004.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429 (27):457-63, 2004.
- Ekici S, Cerwinka WH, Duncan R, et al. Comparison of the prognostic potential of hyaluronic acid, hyaluronidase (HYAL-1), CD44v6 and microvessel density for prostate cancer. *Int J Cancer* 112:121-9, 2004.
- Espada J, Esteller M. DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. *Semin Cell Dev Biol.* 21(2):238-46, 2010.
- Esteller M. Cancer epigenomics: DNA Methylomes and Histone-Modification Maps. *Nat Rev Genet*, 6:1-13. 2007.
- Esteller M. Epigenetics in cancer. *New Eng J Med.* 358:1148-59, 2008
- Euhus DM, Bu D, Milchgrub S, et al. DNA methylation in benign breast epithelium in relation to age and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 17(5):1051-9, 2008.
- Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 7:21-33, 2006.
- Fisher AG. Cellular identity and lineage choice. *Nat Rev Immunol.* 2(12):977-82, 2002.
- Franzmann EJ, Schroeder GL, Goodwin WJ, et al. Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck tumors. *Int J Cancer.* 106(3):438-45, 2001.

- Frigola J, Song J, Stirzaker C,. Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet.* 38:540-49, 2006.
- Gao B, Sekido Y, Maximov A, et al. Functional properties of a new voltage-dependent calcium channel  $\alpha(2)\delta$  auxiliary subunit gene (CACNA2D2). *J Biol Chem.* 275(16):12237-42, 2000.
- Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG island in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196:261-82, 1987.
- Ghosh S, Ghosh A, Maiti GP, et al. Alterations of 3p21.31 tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma: Correlation with progression and prognosis. *Int J Cancer.* 123(11):2594-604, 2008.
- Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell.* Feb 23;128(4):635-8, 2007.
- Gong HC, Hang J, Kohler W, et al. Tissue-specific expression and gabapentin-binding properties of calcium channel subunit subtypes. *J Membr Biol* 184:35-43, 2001.
- Harber, D. Roads leading to breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 343:1566-68, 2000.
- Hautmann SH, Lokeshwar VB, Schroeder GL, et al. Elevated tissue expression of hyaluronic acid and hyaluronidase validates the HA-HAase urine test for bladder cancer, *J Urol* 165:2068-74, 2001.
- Herrlich P, Morrison H, Sleeman J, et al. CD44 acts both as a growth and invasiveness-promoting molecule and as a tumor-suppressing cofactor. *Ann NY Acad Sci.* 910:106 – 18, 2000.
- Hesson L, Bieche I, Krex D, et al. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A and BLU genes located within the critical 3p21.3 region in gliomas. *Oncogene.* 23(13):2408-19, 2004.
- Hesson LB, Cooper WN, Latif F. The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis Markers.* 23(1-2):73-87, 2007.
- Hitchins MP, Lin VA, Buckle A, et al. Epigenetic inactivation of a cluster of genes flanking MLH1 in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Cancer Res* 67:9107-16, 2007.
- Hoebeek J, Michels E, Menten B, et al. High resolution tiling-path BAC array deletion mapping suggests commonly involved 3p21-p22 tumor suppressor genes in neuroblastoma and more frequent tumors. *Int J Cancer* 120:533-38, 2006.
- Hondermarck, h; Vercoutter-edouart, a.s.; Révillion, F.; et al. Proteomics of breast cancer for marker discovery and signal pathway profiling. *Proteomics*, 1:1216-32, 2001.
- Hsieh CL, Jones PA. Meddling with methylation. *Nat Cell Biol* 5(6):502-04, 2003.
- Illingworth RS, Bird AP. CpG islands: a rough guide. *FEBS* 583: 1713-20, 2009.
- Ito M, Ito G, Kondo M, et al. Frequent inactivation of RASSF1A, BLU, and SEMA3B on 3p21.3 by promoter hypermethylation and allele loss in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 225(1):131-9, 2005.

- Ivanova AV, Vortmeyer A, Ivanov SV . Loss of PL6 protein expression in renal clear cell carcinomas and other VHL-deficient tumours. *J Pathol.* 214(1):46-57, 2008.
- Ji L, Minna JD, Roth JA. 3p21.3 tumor suppressor cluster: prospects for translational research. *Future Oncology*, 1:79-92, 2005.
- Ji L, Nishizaki M, Gao B et al. Expression of several genes in the human chromosome 3p21.3 homozygous deletion region by an adenovirus vector results in tumor suppressor activities in vitro and in vivo. *Cancer Res* 62:2715-20, 2002.
- Johnson KJ, Springer NM, Bielinsky AK, et al. Developmental origins of cancer. *Cancer Res* 69:6375-77, 2009.
- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3(6):415-28, 2002.
- Junker N, Latini S, Petersen LN, et al. Expression and regulation patterns of hyaluronidases in small cell lung cancer and glioma lines. *Oncol Rep.* 10(3):609-16, 2003.
- Karpinski P, Ramsey D, Grzebieniak Z, et al. The CpG island methylator phenotype correlates with long-range epigenetic silencing in colorectal cancer. *Mol Cancer Res* 6:585-91, 2008
- Kim JY, Siegmund KD, Tavare S, et al. Age-related human small intestine methylation: evidence for stem cell niches. *BMC Med.* 3:10, 2005.
- Knorr C, Beck J, Beuermann C, et al. Chromosomal assignment of porcine oncogenic and apoptotic genes CACNA2D2, TUSC4, ATP2A1, COL1A1, TAC1, BAK1 and CASP9. *Anim Genet.* 37(5):523-5, 2006.
- Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS. The semaphoring genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75:1389-99, 1993.
- Kondo M, Ji L, Kamibayashi C, et al. Overexpression of candidate tumor suppressor gene FUS1 isolated from the 3p21.3 homozygous deletion region leads to G1 arrest and growth inhibition of lung cancer cells. *Oncogene.* 20(43), 6258-62, 2001.
- Kopelovich L, Crowell JA, Fay JR. The epigenome as a target for cancer chemoprevention. *J Nat Cancer Inst* 95(23):1747-57, 2003.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their functions. *Cell* 128:693-705, 2007.
- Krassenstein R, Sauter E, Dulaimi E, et al. Detection of breast cancer in nipple aspirate fluid by CpG island hypermethylation. *Clin Cancer Res* 10:28-32, 2004.
- Lee DY, Deng Z, Wang CH, et al. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18;104(51):20350-5, 2007.
- Lerman MI, Minna JD. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. *Cancer Res.* 60(21):6116-33, 2000.

- Li J, Wang F, Haraldson K, Protopopov A, et al. Functional characterization of the candidate tumor suppressor gene NPRL2/G21 located in 3p21.3C. *Cancer Res.* 64(18):6438-43, 2004.
- Li J, Wang F, Protopopov A, et al. Inactivation of RASSF1C during in vivo tumor growth identifies it as a tumor suppressor gene. *Oncogene.* 5;23(35):5941-9, 2004.
- Liu XQ, Chen HK, Zhang XS, et al. Alterations of BLU, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p21.3, in human nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer.* 106(1):60-5, 2003.
- Lokeshwar VB, Obek C, Soloway MS, et al. Tumor associated hyaluronic acid: A new sensitive and specific urine marker for bladder cancer. *Cancer Res* 58:31-41, 1998.
- Lokeshwar VB, Rubinowicz D, Schroeder GL, et al. Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase in prostate cancer. *J Biol Chem* 276:11922-32, 1998.
- Lokeshwar VB, Cerwinka WH, Lokeshwar BL. HYAL1 hyaluronidase: a molecular determinant of bladder cancer growth and progression. *Cancer Res* 65:2243-50, 2005.
- Lokeshwar VB, Estrella V, Lopez L, et al. HYAL1-v1, an alternatively spliced variant of HYAL1 hyaluronidase: a negative regulator of bladder cancer. *Cancer Res.* 66(23):11219-27, 2006.
- Madan AK, Yu K, Dhurandhar N, et al. Association of hyaluronidase and breast adenocarcinoma invasiveness. *Oncol Rep* 6:607-9, 1999.
- Maitra A, Wistuba II, Washington C, et al. High-resolution chromosome 3p allelotyping of breast carcinomas and precursor lesions demonstrates frequent loss of heterozygosity and a discontinuous pattern of allele loss. *Am J Pathology* 159:119-30, 2001.
- Marsit CJ, Kim DH, Liu M, et al. Hypermethylation of RASSF1A and BLU tumor suppressor genes in non-small cell lung cancer: implications for tobacco smoking during adolescence. *Cancer.* 114(2):219-23, 2005.
- Martinez A, Walker RA, Shaw JA, et al. Chromosome 3p allele loss in early invasive breast cancer: detailed mapping and association with clinicopathological features. *J Clin Pathol* 54:300-6, 2001.
- Mattick JS & Makunin IV. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet*, 15:17-29, 2006.
- Mayo MW, Wang CY, Cogswell PC, et al. Requirement of NF- $\kappa$ B activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. *Science* 278:1812-15, 1997.
- Mayor R, Casadomé L, Azuara D, et al. Long-range epigenetic silencing at 2q14.2 affects most human colorectal cancers and may have application as a non-invasive biomarker of disease. *Br J Cancer* 100:1534-9, 2009.
- Mcardle L, Mcdermott M, Purcell R, et al. Oligonucleotide microarray analysis of gene expression in neuroblastoma displaying loss of chromosome 11q. *Carcinogenesis* 25:1599e609, 2004.
- Müller HM, Widschwendter A, Fiegl H, et al. DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res* 63:7641-45, 2003.

- Nair PN, Mcardle L, Cornell J, et al. High-resolution analysis of 3p deletion in neuroblastoma and differential methylation of the SEMA3B tumor suppressor gene. *Cancer Genet Cytogenet.* 174(2):100-10, 2007.
- Nie Y, Yang G, Song Y, et al. DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis.* 22:1615-23, 2001.
- Novak P, Jensen T, Oshiro MM, et al. Epigenetic inactivation of the HOXA gene cluster in breast cancer. *Cancer Res* 66:10664-70, 2006.
- Novak P, Jensen T, Oshiro MM, et al. Agglomerative epigenetic aberrations are a common event in human breast cancer. *Cancer Res* 68:8616-25, 2008.
- Osborne, C.K. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 339:1609-1618, 1998.
- Osborne, C.; Wilson, P.; Tripathy, D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *The Oncologist*, 9:361-377, 2004.
- Palmisano WA, Crume KP, Grimes MJ, et al. Aberrant promoter methylation of the transcription factor genes PAX5 alpha and beta in human cancers. *Cancer Res.* 63:4620-5, 2003.
- Pang KC, Stephen S, Dinger ME, et al. NADB 2.0-an expanded database of mammalian non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 35(Database issue):D178-D182, 2007.
- Pirinen R, Tammi R, Tammi M, et al. Prognostic value of hyaluronan expression in non-small cell lung cancer: Increased stromal expression indicates unfavorable outcome in patients with adenocarcinoma. *Int J Cancer* 95:12-7, 2001.
- Poola I, Abraham J, Marshalleck JJ, et al. Molecular Risk Assessment for Breast Cancer Development in Patients with Ductal Hyperplasias *Clin Cancer Res.* Feb 15;14(4):1274-80, 2008.
- Posey T, Soloway MS, Ekici S, et al. Evaluation of the prognostic potential of hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) for prostate cancer. *Cancer Res* 63:2638-44, 2003.
- Qiu GH, Tan LK, Loh KS, et al. The candidate tumor suppressor gene BLU, located at the commonly deleted region 3p21.3, is an E2F-regulated, stress-responsive gene and inactivated by both epigenetic and genetic mechanisms in nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene.* 23(27):4793-806, 2004.
- Rando OJ. Chromatin structure in the genomics era. *Trends Genet* 33:67-73, 2006.
- Razin A, Riggs AD. DNA methylation and gene function. *Science.* 7;210(4470):604-10, 1980.
- Reik W, Murrel A. Genomic imprinting, silence across the border. *Nature* 405:408-9, 2000.
- Reik W and Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature Rev. Genet.* 2:21-32, 2001.
- Reik W, Walter J: Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote. *Nat Genet* 27:255-6, 2001.

- Rein DT, Roehrig K, Schondorf T, et al. Expression of the hyaluronan receptor RHAMM in endometrial carcinomas suggests a role in tumor progression and metastasis. *J Cancer Res Clin Oncol* 129:161-4, 2003.
- Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ* 174(3):341-8, 2006.
- Rohm B, Ottemeyer A, Lohrum M, et al. Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mech Dev* 93:95-104, 2000.
- Schenk PW, Brok M, Boersma AW et al. Anticancer drug resistance induced by disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* NPR2 gene: a novel component involved in cisplatin- and doxorubicin-provoked cell kill. *Mol Pharmacol* 64:259-68, 2003
- Sekido Y, Bader S, Latif F, et al. Human semaphorins A(V) and IV reside in the 3p21.3 small cell lung cancer deletion region and demonstrate distinct expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4120-5, 1996.
- Senchenko V, Liu J, Braga E, et al. Deletion mapping using quantitative real-time PCR identifies two distinct 3p21.3 regions affected in most cervical carcinomas. *Oncogene*. 22(19):2984-92, 2003.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31:27-36, 2010.
- Sawan C, Vaissiere T, Murr R, et al. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutat Res*. 642(1-2):1-13, 2008.
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, et al. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92:735-45, 1998.
- Stern R. Hyaluronidases in cancer biology *Seminars in Cancer Biology* 18:275-80, 2008.
- Stransky N, Vallot C, Reyat F, et al. Regional copy number-independent deregulation of transcription in cancer. *Nat Genet* 38:1386-96, 2006.
- Takai, D & Jones, PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99:3740-45, 2002.
- Tischoff I, Markwarth A, Witzigmann H, et al. Allele loss and epigenetic inactivation of 3p21.3 in malignant liver tumors. *Int J Cancer*. 115(5):684-9, 2005.
- Tomizawa Y, Sekido Y, Kondo M, et al. Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(24):13954-9, 2001.
- Toyota M, Suzuki H, Yamashita T, et al. Cancer epigenomics: implications of DNA methylation in personalized cancer therapy. *Cancer Sci* 100:787-91, 2009
- Tse C, Xiang RH, Bracht T, et al. Human semaphoring 3B (SEMA3B) located at chromosome 3p21.3 suppresses tumor formation in an adenocarcinoma cell line. *Cancer Res* 62:542-6, 2002.
- Turley EA, Noble PW, Bourguignon LYW. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem* 277:4589-92, 2002.

- Ueda K, Kawashima H, Ohtani S et al. The 3p21.3 tumor suppressor NPRL2 plays an important role in cisplatin-induced resistance in human non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Res* 66:9682-90, 2006.
- Uno F, Sasaki J, Nishizaki M, et al. Myristoylation of the FUS1 protein is required for tumor suppression in human lung cancer cells. *Cancer Res* 64:2969-76, 2004.
- van Noesel MM, Van Bezouw S, Voûte PA, et al. Clustering of hypermethylated genes in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 38:226-33, 2003.
- Victor R, Chauzy C, Girard N, et al. Human breastcancer metastasis formation in a nude-mouse model: studies of hyaluronidase, hyaluronan and hyaluronanbinding sites in metastatic cells. *Int J Cancer* 82:77-83, 1999.
- Wanajo A, Sasaki A, Nagasaki H et al. Methylation of the calcium channel-related gene, CACNA2D3, is frequent and a poor prognostic factor in gastric cancer. *Gastroenterology* 135(2):580-90, 2008.
- Wang, F; Grigorieva, EV; LI, J.; et al. HYAL1 and HYAL2 Inhibit Tumour Growth In Vivo but Not In Vitro. *PLoS ONE*. 22;3(8):e3031, 2008.
- Wasserman JD, Urban S, Freeman M. A family of rhomboidlike genes: *Drosophila* rhomboid-1 and roughoid/rhomboid-3 cooperate to activate EGF receptor signalling. *Genes Dev* 14(13):1651-63, 2000.
- Wolf SF, Jolly DJ, Lunnen KD., et al. Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human inactive X chromosome: implications for X-chromosome inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81:2806-10, 1984.
- Yan PS, Venkataramu C, Ibrahim A, et al. Mapping geographic zones of cancer risk with epigenetic biomarkers in normal breast tissue [see comment]. *Clin Cancer Res* 12:6626-36, 2006.
- Yang Q, Yoshimura G, Mori I, et al. Chromosome 3p and Breast Cancer. *J Hum Genet* 47:453-59, 2002.
- Yeo W, Wong WI, Wong N, et al. High Frequency of Promoter Hypermethylation of RASSF1A in Tumorous and Non-Tumorous tissue of Breast Cancer. *Pathology* 37:125-30. 2005.
- Yi LO PH, Chung Leung AC, Xiong W et al. Expression of candidate chromosome 3p21.3 tumor suppressor genes and down-regulation of BLU in some esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Lett*. 28;234(2):184-92, 2006.
- Yokota J. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*. 21(3):497-503, 2000.
- Zabarovsky E, Kuzmin I, Lerman M, et al. Overexpression of candidate tumor suppressor gene FUS1 isolated from the 3p21.3 homozygous deletion region leads to G1 arrest and growth inhibition of lung cancer cells. *Oncogene*. 20:6258-62, 2001.
- Zabarovsky ER, Lerman MI, Minna JD. Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene*. 21:6915-35, 2002.

Zavala GL, Luengo JV, Ossandón CF, et al. Hierarchical clustering analysis to detect associations between clinical and pathological features of gastric tumors and hypermethylation of suppressor genes. *Rev Med Chil.* 135(1):17-25, 2007.

**A ser submetido para publicação na revista *Epigenetics*.**

RESEARCH PAPER

**Evidence of epigenetic regulation of the tumor suppressor gene cluster  
flanking *RASSF1* in breast cancer cell lines**

Érika da Costa Prando<sup>1</sup>, Luciane Regina Cavalli<sup>2</sup> and Cláudia Aparecida Rainho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Epigenetics, Department of Genetics, Biosciences Institute, Sao Paulo State University - UNESP, Botucatu, Sao Paulo, CEP 18618-970, Brazil;

<sup>2</sup>Department of Oncology, Lombardi Comprehensive Cancer Center, Georgetown University School of Medicine, Washington, DC 20057, USA.

Key words:

DNA methylation, histone modification, gene expression, breast cancer cell lines, tumor suppressor genes, *RASSF1*

### Abstract

Epigenetic mechanisms are frequently deregulated in cancer cells and can lead to the silencing of genes with tumor suppressor activities. Although isoform A of the Ras-association domain family member 1 (*RASSF1A*) gene is one of the most frequently silenced transcripts in human tumors, few studies have simultaneously investigated epigenetic abnormalities associated with the 3p21.3 tumor suppressor gene cluster flanking *RASSF1* (i.e., *SEMA3B*, *HYAL3*, *HYAL2*, *HYAL1*, *TUSC2*, *RASSF1*, *ZMYND10*, *NPRL2*, *TMEM115*, and *CACNA2D2*). This study aimed to investigate the role of epigenetic changes to these genes in seventeen breast cancer cell lines and in three non-tumorigenic epithelial breast cell lines (184A1, 184B5, and MCF10A) and to evaluate the effect on gene expression of treatment with the demethylating agent 5-Aza 2'-deoxycytidine and/or Trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor. We report that, although *RASSF1A* was determined to be epigenetically silenced in 15 of 17 breast cancer cell lines, all cell lines expressed the *RASSF1C* isoform. Six cell lines overexpressed *RASSF1C*, compared with the normal epithelial cell line 184A1. Furthermore, the genes *HYAL1* and *CACNA2D2* were significantly overexpressed after the treatments. After the combination treatment, *RASSF1A* re-expression was accompanied by an increase in expression levels of the flanking genes. The Spearman's correlation coefficient indicated a positive co-regulation of the following gene pairs: *RASSF1* and *TUSC2* ( $r=0.64$ ,  $p=0.002$ ), *RASSF1* and *ZMYND10* ( $r=0.58$ ,  $p=0.007$ ), *RASSF1* and *NPRL2* ( $r=0.48$ ,  $p=0.03$ ), *ZMYND10* and *NPRL2* ( $r=0.71$ ;  $p=0.0004$ ), and *NPRL2* and *TMEM115* ( $r=0.66$ ,  $p=0.001$ ). Interestingly, the genes *TUSC2*, *NPRL2* and *TMEM115* were found to be unmethylated in each of the untreated cell lines. Chromatin immunoprecipitation using antibodies against the acetylated and trimethylated lysine 9 of histone H3 demonstrated low levels of histone methylation in these genes, which are located closest to *RASSF1*. These results provide direct evidence that epigenetic repression is involved in the down-regulation of multiple genes at 3p21.3 in breast cancer cells.

## Introduction

Within the past few decades, it has been well-established that genetic and epigenetic alterations are hallmarks of human cancer. The recent advances in genome-wide profiling methods have provided a means to integrate our knowledge of the different mechanisms leading to aberrant gene expression and have led to the identification of biological pathways dysregulated in cancer cells.<sup>1-2</sup> In this context, it has been established that genetic (such as gene mutations, deletions, and copy number alterations) and epigenetic (such as aberrant DNA methylation and histone modifications) abnormalities may cooperate at all stages of cancer development, resulting in the silencing of key regulatory genes with demonstrated functions in tumor suppression, DNA mismatch repair, and cell cycle regulation.<sup>3</sup> Currently, the aberrant DNA methylation content (global genome hypomethylation) and patterns of cytosine methylation, especially promoter-specific CpG island hypermethylation, are known to be associated with the development of human cancer.<sup>4-5</sup>

In breast cancer, there is evidence that agglomerative epigenetic aberrations are a common event. This observation has led to the hypothesis that DNA hypermethylation could affect not only discrete genes as a local event but could span across a large chromosomal region, such as was observed for the homeobox gene cluster (*HOXA* and *HOXD*) and the protocadherin family (*PHDC* genes).<sup>6-7</sup> Long Range Epigenetic Silencing (LRES) is the term proposed to describe the coordinate suppression of neighboring genes based on the interplay between the hypermethylation of clusters of contiguous CpG islands within a genomic region and histone modifications.<sup>8</sup> Aberrant DNA methylation associated with LRES can extend over genomic regions varying from 100 to 2-4000 Kb in size. Evidence for LRES has been described in colon<sup>9-12</sup>, bladder<sup>13</sup>, and prostate cancers<sup>14-15</sup> and in Wilms tumor.<sup>16</sup> It has been proposed that epigenetic events associated with LRES have the same effects expected from genetic alterations, such as deletions/microdeletions of contiguous genes, because epigenetic

modifications linked to a repressed chromatin state (such as densely methylated CpG islands and methylation of lysine 9 and 27 of histone H3) could lead to the functional inactivation of cancer-related genes.

In this context, the short arm of human chromosome 3 (3p) has attracted special interest because multiple genes exhibit varying degrees of tumor suppressive activity, suggesting that these genes may function as an integrated tumor suppressor region through their diverse biological activities. Initial allelotyping studies have demonstrated that allelic losses on 3p are frequently observed in a broad spectrum of human cancers. Interestingly, the LOH (loss of heterozygosity) pattern along 3p in breast carcinomas and preneoplastic epithelial foci was revealed to be discontinuous and was characterized by at least nine small discrete intervals of common microdeletions. LOH along 3p was detected in more than 80% of breast carcinomas and has been associated with early stages and with prognostic parameters. The 3p21.3 region was most frequently involved in LOH.<sup>17-18</sup>

The gene *RASSF1*, located at 3p21.3, is a member of the Ras-Association Domain Family (*RASSF*). This gene encodes seven distinct transcripts that are generated by the differential usage of two promoters and by alternative splicing. However, only two isoforms (*RASSF1A* and *RASSF1C*) have been attributed with a relevant biological role in cancer cells. These isoforms are transcribed from the upstream and downstream promoter, respectively, and each is located within a CpG-island. Previous studies have demonstrated that only the upstream promoter is frequently hypermethylated in different tumor types and cancer cell lines.<sup>19</sup> Interestingly, the *RASSF1* gene is found in the central position of the 3p21.3 tumor suppressor cluster,<sup>20-21</sup> identified by the overlapping regions of minimal deletions detected by LOH analysis in matched normal and cancer tissue pairs as well as by the occurrence of homozygous deletions in cancer cell lines.<sup>22-23</sup> These studies have indicated that at least 19 genes are located in the ~630 Kb region at 3p21.3, and one ~120 Kb subregion within this

area contains the following eight genes flanking *RASSF1*: *CACNA2D2* (calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2), *TMEM115* (transmembrane protein 115 or placental protein 6, *PL6*), *CYB561D2* (cytochrome b-561 domain containing 2/*I01F6*), *NPRL2* (nitrogen permease regulator-like 2, primed named tumor suppressor candidate 4 or TUSC4), *ZMYND10* (zinc finger, MYND-type containing 10, *BLU* or *FLU*), *RASSF1*, *TUSC2* (tumor suppressor candidate 2, also named *FUS1*), *HYAL2* and *HYAL1* (hyaluronidase type 2 and type 1) and the genes *HYAL3* and *SEMA3B* (semaphorin 3B originally named *LUCA1*) immediately adjacent to them. Genetic analysis of lung and breast tumors indicated that none of these candidate tumor suppressor genes (TSG) were frequently mutated.

These putative tumor suppressor genes may affect and regulate many important biological processes, such as cell proliferation, cell cycle kinetics, signal transduction, ion exchange, and apoptosis and could have a synergistic effect in cancer cells. Thus, because the genes in 3p21.3 tumor suppressor cluster are rarely inactivated in human cancer by somatic mutations, we have designed this study to investigate whether alternative epigenetic mechanisms may play a role in the inactivation of resident candidate TSG flanking *RASSF1* in breast cancer cell lines.

## Results

Our goal was to investigate whether epigenetic changes are a common event associated with the downregulation/inactivation of the contiguous genes mapped across 3p21.3. Initially, the expression levels of *RASSF1* transcripts and its neighbors within a genomic region of ~236 Kb, limited by *SEMA3B* (chr3:50,280,044-50,289,576) and *CACNA2D2* (chr3:50,375,235-50,515,896), which contained nine genes (*SEMA3B*, *HYAL3*, *HYAL1*, *HYAL*, and *TUSC2* located upstream of *RASSF1* and *ZMYND10*, *NPRL2*, *TMEM11*, and *CACNA2D2* located downstream) were evaluated in three non-tumorigenic cell lines

derived from human breast epithelial cells (184A1, 184B5) and fibrocystic disease (MCF10A) as well as in a series of 17 breast cancer cell lines (Figure 1). The expression levels of the *RASSF1* gene were assessed using a primer set and probe targeting exons 5 and 6 (common to all isoforms) and by another real-time RT-PCR assay designed to detect the *RASSF1A* isoform. Although only two breast cancer cell lines expressed the *RASSF1A* isoform (MDA-MB-415 and Hs578T), transcripts of the *RASSF1* gene were detected in all of the analyzed cell lines. Interestingly, when the non-tumorigenic and tumorigenic cell lines were compared, a trend of high *RASSF1* transcript levels was observed in the breast cancer cell lines (Mann Whitney test,  $p = 0.0720$ ) (Figure 2A). Expression levels of the *RASSF1* gene were found to be elevated in five cell lines (BT-20, BT-549, MDA-MB-231, MDA-MB-468 and T47D), by at least 2-fold, compared with the normal epithelial cells 184A1. In addition, among the other nine genes, only two exhibited differential expression levels in breast cancer compared to non-tumorigenic cell lines; the transcripts of *HYAL2* and *TUSC2* genes were detected at higher levels in cancer cell lines (Mann Whitney test,  $p=0.0199$  and  $p=0.0443$ , respectively) (Figure 1). The *HYAL1* and *CACNA2D2* genes demonstrated lower levels of expression in the panel of cell lines studied.

DNA methylation of the *RASSF1A* promoter region was measured by High Resolution Melting (HRM) analysis. As expected, the silencing of this isoform was correlated with DNA hypermethylation of CpG island 1. Concordant results were observed in 13/17 breast cancer cell lines (76%), which showed 100% methylation and an absence of *RASSF1A* gene expression. On the other hand, ~50% methylation was detected in MDA-MB-453 and 25% in BT-20 cell lines. Furthermore, the two cell lines expressing the A isoform of *RASSF1* showed 0% and 25% of methylation (MDA-MB-415 and Hs578t, respectively). However, despite the lack of methylation observed in 184A1 and 184B5 cells and the 25% methylation in MCF10A cells, these cells did not express *RASSF1A*. When the copy number of the *RASSF1* locus was

evaluated, 11/20 cell lines showed allelic losses. The comparison between the expression level of the *RASSF1* transcript and gene copy number revealed a significant correlation (correlation coefficient  $r=0.44$ ,  $p=0.0003$ ) (Figure 2B). In contrast, the two breast cell lines that expressed *RASSF1A* presented no alterations in the copy number at this locus.

In a second step, the panel of 20 epithelial breast cell lines was treated with the demethylating nucleoside analog 5-Aza 2'-deoxycytidine (5-Aza-dC) and the histone deacetylase inhibitor Trichostatin A (TSA), either alone or in combination. After the treatments, the same assays were used to evaluate whether these drugs were able to induce the re-expression of the *RASSF1A* isoform and to evaluate the drugs' effect on the expression levels of the neighboring genes.

The treatment with 5-Aza-dC alone or in combination with TSA led to the re-expression of *RASSF1A* in 17 breast epithelial cell lines (Figure 3). The treatment with TSA alone was not able to significantly modulate the expression levels. However, the two cell lines expressing *RASSF1A* showed differential responses to the treatments, as *RASSF1A* was upregulated in Hs578T cells and downregulated in MDA-MB-415 compared to the untreated controls. The non-tumorigenic 184A1 cell line showed the lowest variation in the expression levels of all transcripts evaluated after treatments with 5-Aza-dC and 5-Aza-dC with TSA. To evaluate the effects of the demethylating agent and the histone deacetylase inhibitor on the transcription of the genes flanking *RASSF1*, the expression levels were determined as fold-change relative to the respective untreated controls. In addition, we performed unsupervised hierarchical clustering analysis based on the Euclidean distance to calculate the average linkage, which grouped together untreated controls and cell lines treated only with TSA and split apart the cell lines treated with 5-Aza-dC or 5-Aza-dC with TSA. The expression profiles in Hs578T, MDA-MB-415 (unmethylated at the *RASSF1A* locus) and BT-20 cells (25% methylated) did not significantly change upon the treatments and were distinct, compared

with the other cell lines. A group of five genes were found to be more similar to the *RASSF1A/RASSF1* expression levels before and after the treatments, including *SEMA3B*, *TMEM115*, *HYAL2*, *TUSC2* and *NPRL2* (Figure 4). Although all genes were positively regulated by the epigenetic drugs, this effect was more pronounced for *HYAL1* and *CACNA2D2* (Figure 5).

A pairwise Spearman correlation coefficient was then calculated for each pair of genes to create a correlation coefficient matrix (Table 1). After 5-Aza-dC treatment, a positive correlation was observed between *RASSF1* and *NPRL2* and *TMEM115* and between *ZMYND10* and *NPRL2*. Moreover, after the combined treatment with 5-Aza-dC and TSA, *RASSF1* expression levels were positively correlated with *TUSC2* and *ZMYND10*. Because *TUSC2* expression was positively correlated with *ZMYND10*, which in turn correlated with *NPRL2*, and this gene also positively correlated with *TMEM115*, the contiguous genes mapped in the central portion of the 3p21.3 cluster flanking *RASSF1* (i.e, from telomere to centromere: *TUSC2*, *RASSF1*, *ZMYND*, *NPRL2*, and *TMEM115*) were selected for DNA methylation analysis and chromatin immunoprecipitation (ChIP).

In contrast to the high hypermethylation frequencies observed in *RASSF1A* after the HRM approach, the CpG islands in the promoter regions of the *TUSC2*, *NPRL2* and *TMEM115* genes were unmethylated in all 20 cell lines analyzed. Figure 6 shows the enrichment status over the input fraction for the five genes evaluated after ChIP using antibodies to detect two modifications of histone H3 (lysine 9 acetylation and trimethylation, H3K9ac and H3K9me3, respectively). Marked differences in the levels of histone H3 acetylation and methylation at the promoters of the *TUSC2*, *RASSF1*, *ZMYND10*, *NPRL2*, and *TMEN115* genes were detected, with a clear predominance of acetylation. H3K9 acetylation and the absence of trimethylation at the same site were observed at five loci in the two cell lines with unmethylated *RASSF1A*. In contrast, the non-tumorigenic cell lines (184A1, 184B5

and MCF10A) manifested enrichment of H3K9me, which could explain the inactivation of the *RASSF1A* gene despite the absence or low levels of DNA methylation.

### Discussion

Recently, “omics”-based integrative analysis has predicted regions of the human genome that are probably subjected to mechanisms of coordinated epigenetic suppression in different tumor types.<sup>13,15,24</sup> In fact, some of these predictions have been experimentally validated on chromosomes 2p14.2<sup>9,11,12</sup>, 3p22.3<sup>13,25</sup>, 5q31<sup>7,16</sup>, 7p15.2<sup>6</sup>, 7q31.1-q31.3<sup>15</sup>, and 16p11.2.<sup>24</sup> These studies have provided new approaches for the characterization of discrete regions of LRES, supporting the hypothesis that this alternative mechanism may be a common phenomenon in cancer<sup>8</sup> and could lead to the identification of new genes involved in tumor progression and of genomic regions that can be targeted for epigenetic therapy.

Genetic and epigenetic abnormalities at 3p21.3 are frequently observed in several tumor types, and a particular focus has been on *RASSF1A* promoter hypermethylation, which is one of the most frequent epigenetic alterations in human cancers. However, despite this, few studies have been dedicated to the investigation of the DNA methylation patterns of the other genes mapped to the 3p21.3 tumor suppressor cluster. Moreover, only a few reports have simultaneously analyzed the epigenetic status of more than two genes at this locus.<sup>25-29</sup>

In the present study, the expression levels of ten contiguous genes mapped to the 3p21.3 tumor suppressor cluster were compared among non-tumorigenic and tumorigenic epithelial breast cell lines, before and after treatment with 5-Aza-dC and TSA alone or in combination. Initially, the expression levels of each gene were compared among the cell lines. The *RASSF1* gene, and specifically the *RASSF1A* isoform, received a special focus because epigenetic modification, i.e., DNA methylation of the promoter-associated CpG island, has frequently been reported in breast cancer.<sup>30</sup>

Our data showed that, although epigenetic silencing of *RASSF1A* was detected in 18/20 epithelial breast cell lines, all of them expressed the *RASSF1* gene. This gene encodes seven isoforms (*RASSF1A-G*), of which *RASSF1A* and *RASSF1C* are ubiquitously expressed in normal tissues and are controlled by two distinct promoter regions associated with CpG islands.<sup>19</sup> The *RASSF1B* isoform is expressed in hematopoietic cells and has a different 5' exon (exon 1 $\beta$ ), and the *RASSF1D-G* isoforms, which are splice variants of *RASSF1A*, are transcribed from the promoter associated with the first CpG island. The biological function of these additional transcripts is not clear; however, all the *RASSF1* isoforms that are transcribed from the first CpG island are frequently missing in a variety of tumors as a result of epigenetic inactivation of the *RASSF1A* promoter.

Additionally, because the second CpG island associated with the *RASSF1C* promoter did not present abnormal DNA methylation in cancer cells<sup>31</sup>, the *RASSF1* transcripts detected in the panel of 20 epithelial breast cells are probably from the *RASSF1C* isoform. Thus, the present study has demonstrated that, in breast cancer cell lines, although *RASSF1A* is commonly epigenetically silenced, *RASSF1C* remains expressed. Interestingly, although all cell lines expressed *RASSF1C*, this transcript was differentially expressed in the non-tumorigenic and breast cancer cell lines, with 5/17 cell lines (BT-20, BT-549, MDA-MB-231, MDA-MB-468 and T47D) over-expressing this isoform.

Our findings are in accordance with those recently reported for the MDA-MB-231 and T47D cell lines, in which the down-regulation of caspase 3 via overexpression of *RASSF1C* was demonstrated to reduce the sensitivity of breast cancer cells to apoptosis. *RASSF1C* overexpression also enhanced T47D cell invasion/migration in vitro.<sup>32</sup> A study from Estrabaud et al.<sup>33</sup> demonstrated that, when the balance of *RASSF1C* and *RASSF1A* is disrupted, by the absence of *RASSF1A* or by *RASSF1C* overexpression, the function of SCF <sup>$\beta$ TrCP</sup> is inhibited, leading to the accumulation of  $\beta$ -catenin. In this sense, it is possible that

*RASSF1C* could have an opposite effect to *RASSF1A* in the process of carcinogenesis. Although previous reports have attributed *RASSF1C* with tumor suppressor activity, other studies have suggested that *RASSF1C* could activate osteoblast cell proliferation.<sup>31</sup> Together, these data suggest that *RASSF1C*, unlike *RASSF1A*, is not a tumor suppressor, but instead may play a role in stimulating proliferation and invasion in breast cancer cells.

*HYAL1* and *CACNA2D2* were the most positively modulated genes after treatments with 5-Aza-dC alone or with TSA. Non-tumorigenic cell lines were found to have even higher expression levels of these genes after the treatments. *HYAL1* belongs to the hyaluronidase (HAases) family of enzymes that degrade hyaluronic acid (HA). There are six hyaluronidase genes in the human genome. Three are arranged at the 3p21.3 suppressor tumor cluster (*HYAL1*, *HYAL2*, and *HYAL3*). HAase levels were demonstrated to be elevated in breast tumors, and RT-PCR analysis has detected the expression of *HYAL2* and *HYAL3* in breast cancer tissues<sup>34</sup>, suggesting an association between HAase and the tumor invasive/metastatic phenotype.<sup>35-36</sup>

In accordance with the data from the present study demonstrating higher levels of *HYAL2* in breast cancer cells compared to non-tumorigenic cell lines, previous reports have shown that, whereas less invasive breast cancer cells expressed *HYAL3*, highly invasive cells expressed *HYAL2*.<sup>34</sup> The promoter region of these genes is characterized by a CpG island, but the expression levels were not significantly increased by the treatments. However, the promoter region of the *HYAL1* gene has a CpG-rich promoter that does not meet the established criteria for a CpG island, similar to that observed in the *MASPIN* gene (which encodes a serine protease inhibitor with tumor-suppressor activity) and the *MAGE* family (for which promoter hypermethylation is responsible for the restricted expression of the tumor-associated MAGE antigens). Like *MASPIN* and *MAGE*, the present study suggests that the *HYAL1* gene is clearly up-regulated by epigenetic therapy.<sup>3</sup> Recently, it was described that

*HYAL1* expression is regulated by methylation of cytosine at positions -71 and -59, which constitute portions of the binding sites for the transcription factors SP1/Egr-1.<sup>37</sup> More studies are clearly necessary to establish a correlation between the regulation of tissue-specific expression and methylation at non-CpG islands and how this could play a role in breast cancer cells.

The *HYAL-1* gene encodes the major tumor-derived HAase. In bladder, prostate, and head and neck carcinomas, higher levels of HA and HAases were found in tumor cells, tissues, and related blood fluids and serve as biomarkers to detect high grade bladder tumors.<sup>38</sup> In breast cancer cells, HAase levels were associated with the ability to invade through matrigel, and silencing of *HYAL1* gene expression by iRNA induced cell cycle arrest and inhibition of proliferation *in vitro*. Tan et al.<sup>36</sup> showed that *HYAL1* was overexpressed in the breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7, in invasive duct cancer tissues and in metastatic lymph nodes, compared with in the nonmalignant breast cell line HBL-100 and in normal breast tissues.

In the present study, although slightly higher levels were detected in the MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines, the majority of breast cancer-derived cells showed lower expression levels. Furthermore, after treatments with 5-Aza-dC and TSA, non-tumorigenic cell lines showed a 50-150 fold increase in the expression of *HYAL1* mRNA, whereas breast cancer cell lines manifested a change of up to 50-fold relative to untreated controls. These data are important because at present, it is unknown whether *HYAL1* is a tumor-promoter or tumor-suppressor gene. These controversial questions are highlighted by previous studies demonstrating that silencing of *HYAL1* reduced tumor growth and invasion, suggesting a tumor promoting function. In contrast, the over-expression of *HYAL-1* in tumor cells induced apoptosis and inhibited tumor formation.<sup>38</sup> Our data indicate that epigenetic modifications of *HYAL1* could affect *HYAL1* expression in epithelial breast cells.

The *CACNA2D2* gene was also downregulated in breast cancer cells, and expression levels were reversed by treatment with 5-Aza-dC in the presence or absence of TSA. This gene encodes a member of the alpha-2/delta subunit family, a protein of the voltage-dependent calcium channel complex. Initial studies demonstrated frequent loss of *CACNA2D2* expression in lung cancer cell lines.<sup>20,21</sup> In nasopharyngeal and glioma cell lines, loss of *CACNA2D2* expression occurred concomitantly with DNA methylation. However, DNA methylation was less frequently observed in primary tumors.<sup>39-40</sup> Over-expression of *CACNA2D2* induced apoptosis in lung cell lines, in which the levels of intracellular free Ca(2+) were elevated in Ad*CACNA2D2*-transduced cells compared with the controls, followed by depolarization of the mitochondrial membrane. These results led to the suggestion that re-expression of this gene could induce apoptosis.<sup>41</sup> The findings of the present study provide additional evidence that *CACNA2D2* may be a putative tumor suppressor gene that is epigenetically regulated in breast cancer cells.

Among the genes located between *HYAL1* and *CACNA2D2*, expression of three genes (*TUSC2*, *ZMYND10*, and *NPRL2*) positively correlated with *RASSF1* or with the closest gene (i.e., *ZMYND10* positively correlated with *NPRL2* and *NPRL2* with *TMEM115*) after the combined treatment with the DNA demethylating and the histone deacetylase inhibitor drugs. These findings indicate that the genes flanking *RASSF1* were simultaneously up-regulated by the epigenetic treatment. As previously suggested, epigenetic changes in cancer cells could occur at the neighborhood level, in which the expression of genes residing in the same vicinity could be affected by hypermethylation of a flanking gene, leading to coordinate downregulation or inactivation mediated by chromatin modifications. However, it was observed that the promoter-associated CpG islands of the *TUSC2*, *NPRL2*, and *TMEM115* genes were unmethylated and showed varying degrees of enrichment of the H3K9me3 fraction after ChIP in the untreated cells. Similar findings were first reported by Frigola et al.

<sup>9</sup> in colorectal cancer in which genes located at a ~4 Mb cluster on chromosome 2q14.2 were epigenetically suppressed even though the involved CpG islands remain unmethylated. Despite the unmethylated CpG islands, the repression of these genes was relieved by demethylating drug treatment. The effect of the 5Aza-dC on global gene expression showed that this drug results in variable changes in expression depending on the functional categories of genes and that most genes that demonstrated altered expression levels were not regulated by promoters displaying DNA methylation prior to the treatment.<sup>42</sup>

Furthermore, the fact that the expression levels of the unmethylated genes located close to *RASSF1* were up-regulated in tumor cell lines treated with 5Aza-dC suggests an effect of this nucleoside analog on histone modification.<sup>43</sup> In light of the results obtained from the ChIP assays, which showed less enrichment of H3K9me3 in breast cancer cells, it is possible that other histone repressive marks could modulate expression levels detected before treatments in the set of breast cancer cell lines studied. Distinct repressive histone modifications have been frequently investigated in human cancer, H3K9me2, H3K9me3 and H3K27me. Besides the interactions between DNA methylation and H3K9me, which may establish and reinforce a silencing loop, Polycomb group proteins can modify the methylation status of histone H3 on lysine 27 and recruit other members of repressor complex, including PRC1, which is able to prevent transcriptional activation.<sup>44</sup>

Unlike previous studies that have identified genomic regions showing coordinated epigenetic deregulation of neighboring genes in cancer cells as an event independent from copy number alterations, the 3p21.3 region is frequently involved in LOH and deletions in the most common human tumors, including breast cancer, implicating these genetic abnormalities in the impairment of the gene expression levels described in the present study. However, although not completely characterized, epigenetic changes at 3p21.3 also contribute to the repression of several TSG. Altogether, these data suggest that genetic and epigenetic changes

to this tumor suppressor cluster could affect a wide spectrum of biological pathways and lead to the characterization of deregulated networks in human cancer.

### Conclusion

In summary, we have described that, among the candidate TSGs mapped to 3p21.3, the *RASSF1A* isoform was epigenetically silenced in most of the epithelial breast cell lines analyzed, but the *RASSF1C* isoform was overexpressed in a subset of breast cancer cell lines. Treatment with 5Aza-dC, alone or in combination with TSA, led to a significant increase in the expression levels of the *HYAL1* and *CACNA2D2* genes. Genes mapped closest to *RASSF1* showed a more modest increase in expression levels, but pair-wise analysis showed that the *RASSF1* gene was co-regulated with *TUSC2*, *ZMYND10*, and *NPRL2*. Furthermore, the promoter regions of these genes were unmethylated at the associated CpG islands in the untreated cells and showed low levels of trimethylation at lysine 9 of the H3 histone. These data provide direct evidence that epigenetic repression is involved in the down-regulation of multiple genes at 3p21.3 in breast cancer cells but suggest that other repressive chromatin modifications should mediate this regulation.

### Materials and Methods

**Cell lines and cell culture.** Seventeen human breast cancer cell lines (BT-20, BT-47D4, BT-483, BT-549, Hs578T, MCF7, MDA-MB-134 IV, MDA-MB-231, MDA-MB-361, MDA-MB-415, MDA-MB-436, MDA-MB-453, MDA-MB-468, SK-BR-3, T-47DD, ZR-75-1, and ZR-75-30) and three non-tumorigenic epithelial breast cell (184A1, 184B5, and MCF10A) were obtained in the Lombardi Comprehensive Cancer Center, Georgetown University Medical Center, Washington DC. Cell lines were cultured at 37°C in a humidified environment containing 5% CO<sub>2</sub>. DMEM medium containing 10% fetal bovine serum (FBS)

was used for the MDA-MB-134 IV, SK-BR-3, MDA-MB-453, MDA-MB-231, MDA-MB-361, MDA-MB-415, MDA-MB-436 and MDA-MB-468 cell lines. This medium was supplemented with 1% Non-Essential Amino Acids (NEAA) for the BT-20 and MCF7 cells and with 10 µg/ml insulin for the Hs578T cells. RPMI medium containing 10% FBS was used in cultures of T-47DD cells and was supplemented with 1% pyruvate for the ZR-75-1 and ZR-75-30 cells. The BT-549, BT-483 and BT-47D4 cells were maintained in RPMI medium containing 10% FBS supplemented with 10µg/ml insulin and 1% pyruvate. The 184A, 184B5 and MCF10A cells were cultured in serum-free Mammary Epithelial Basal Medium (MEBM) supplemented with Epidermal Growth Factor (EGF), hydrocortisone, L-glutamine and insulin using Singlequot reagent packs from Lonza, along with 0.005 mg/mL transferrin for 184A1 and 5% horse serum for MCF10A.

**5-Aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A treatment of cells.** The breast cell lines were seeded at a density of  $1 \times 10^6$  cells in duplicate 25 cm<sup>3</sup> culture flasks. After 24 h of growth, 1 µM 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC; Sigma) was added to the medium, and the cells were incubated for 96 h. Due to its chemical instability, 5-Aza-dC was added to the fresh medium every 24 h. Alternatively, the cells were treated with 150 ng/ml trichostatin A (TSA; Sigma) for 24 hours. To assess the combined effect of both drugs, we performed the co-treatment of cells with 5-Aza-dC and TSA as follows: 5-Aza-dC was added initially for 96 hours, after which it was removed, and TSA was added for an additional period of 24 hours. All experiments were performed in duplicate. A mock treatment was done with DMSO. The cells were then allowed to recover for 24 h prior to harvesting. The genomic DNA and total RNA were extracted from the cell lines after the drug treatments and were used for HRM analysis and reverse transcription-PCR.

**Total RNA extraction and quantitative real-time RT-PCR.** The expression of the *SEMA3B*, *HYAL3*, *HYAL1*, *HYAL2*, *TUSC2*, *RASSF1*, *ZMYND10*, *NPRL2*, *TMEM115*, and

*CACNA2D2* genes in the breast cell lines were analyzed by quantitative real-time RT-PCR. Total RNA was extracted from the untreated and treated cultured breast cell lines using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and subsequently treated with DNase I to degrade any contaminating genomic DNA. mRNA was reverse transcribed from 1 µg of total RNA using the 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 1:20 with sterile H<sub>2</sub>O before addition to the RT-PCR reaction. The diluted reverse transcription reaction (1 µL) was used in a 10 µL reaction with 2X TaqMan Universal PCR Master Mix and 0.5 µL of the 20X TaqMan Gene Expression Assay (primer/probe sets) (Applied Biosystems) for *SEMA3B* (Hs01090156\_m1), *HYAL3* (Hs00185910\_m1), *HYAL1* (Hs00201046\_m1), *HYAL2* (Hs00186841\_m1), *TUSC2* (Hs00200725\_m1), *RASSF1* (Hs00200394\_m1 all transcripts and Hs00945257\_m1 for isoform A), *ZMYND10* (Hs00210720\_m1), *NPRL2* (Hs00198012\_m1), *TMEM115* (Hs00183656\_m1), and *CACNA2D2* (Hs01021049\_m1). The reactions were performed in duplicate 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 and as reference mock treatment with DMSO. This endogenous control was experimentally chosen based on amplification of cDNA obtained from treated and untreated MCF7 and MDA-MD-231 cells in the TaqMan® Human Endogenous Control Plate (Applied Biosystems). The data were evaluated using GeNorm software to detect the most stable genes under these experimental conditions.

**Chromatin Immunoprecipitation assays.** Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed on breast cell lines using the MAGnify Chromatin Immunoprecipitation System (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. The fixed chromatin complexes were immunoprecipitated using 1 µg of either an anti-trimethyl-histone H3K9

antibody or an anti-acetyl-histone H3K9 antibody (Invitrogen). Controls were also performed using rabbit and mouse antibodies and showed negligible levels of background precipitation. Immunoprecipitated DNA was quantified by quantitative real-time PCR. Oligonucleotide primer sequences for the *TMEM115*, *TUSC2*, *NPRL2* and *ZMYND10* genes were designed using the Primer Express Software (Applied Biosystems), as indicated in **Supplementary Table 1**. The amount of immunoprecipitated target was measured using the StepOne Real-time PCR System (Applied Biosystems). Reactions containing 10  $\mu$ L volume were set up using 2X SYBR GREEN PCR Master Mix (*Applied Biosystems*), 200 nM of each primer and 2  $\mu$ L of immunoprecipitated DNA, no-antibody control, or input chromatin for each PCR. Each experiment was set up in duplicate. The cycling conditions were as follows: 95°C for 10 minutes, 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute, repeated for 40 cycles, followed by a melt curve stage. The data were normalized using the input control and the chromatin enrichment was calculated based on the formula  $\text{Input Enrichment} = 2^{(\text{Average Ct}_{\text{Input}} - \text{Average Ct}_{\text{IP}})} \times \text{dilution factor}$ .

**DNA isolation and sodium bisulfite treatment.** Genomic DNA was prepared from untreated breast cell lines by proteinase K digestion followed by conventional extraction using a phenol/chloroform protocol. One microgram of genomic DNA was subjected to sodium bisulfite treatment using the EpiTect® Bisulphite Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Ten nanograms of eluted DNA were used directly for the HRM assays.

**High Resolution Melting (HRM) analysis.** After DNA sodium bisulfate treatment, PCR amplification and HRM were performed on the StepOne Real-time PCR System (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. The primer sequences for *RASSF1*, *TMEM115*, *TUSC2* and *NPRL2* are listed in **Supplementary Table 1**. PCR was performed in a 20  $\mu$ L volume containing 1X MeltDoctor HRM Master Mix (Applied Biosystems), 200 nM

of each primer, and 10 ng bisulfite-treated DNA template. A standard curve with known methylation ratios (100, 75, 50, 25 and 0 percent) was included in each assay to estimate the methylation ratio of each sample using CpG Methylated HeLa Genomic DNA (New England BioLabs) and Epitect Unmethylated Human Control DNA as references. Methylation standards were performed in duplicate, and cell line samples were performed in triplicate. The cycling conditions were as follows: 1 cycle of 95°C for 10 minutes, 40 cycles of 95°C for 15 seconds, 60°C for 1 minute; followed by an HRM step of 95°C for 15 seconds, 60°C for 1 minute, 95°C for 15 seconds, and continuous acquisition from 60 to 95°C at 0.3%. HRM data were analyzed using the High Resolution Melting Software (Applied Biosystems). The data were visualized as normalized melting curves and difference plots.

**Analysis of DNA copy number by qPCR.** The primer sequences for the *RASSF1*, *TMEM115*, *TUSC2*, *NPRL2*, and *ZMYND10* genes are the same as used in the ChIP analysis. Reactions of 10  $\mu$ L were set up using 2X SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems), 200 nM of each primer, and 10 ng of DNA in each PCR reaction, set up in duplicate. The cycling conditions were as follows: 10 min at 95°C, then 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute, followed by a melt curve stage, in a total volume 10  $\mu$ L, in duplicate. The qPCR data were analyzed using the  $2(-\Delta\Delta ct)$ -method based on the DNA copy number ratio of the target gene compared to glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) as a reference gene in a given cell line sample relative to two standard deviations from the normal pool DNA sample.

**Statistical analysis.** All data are presented as the mean  $\pm$ SD of independent measurements. For statistical comparisons of gene expression levels between two groups (non-tumorigenic vs. breast cancer cells), the non-parametric Mann-Whitney test was used. The Spearman correlation coefficient  $r$  was determined for every paired data set after each treatment. All data were analyzed using GraphPad Prism for Windows, version 5.0. P values of  $<0.05$  were

regarded as statistically significant. Data Assist<sup>TM</sup> software (Applied Biosystems) was used to display graphically the results of the hierarchical clustering analysis of gene expression levels before and after each treatment, based on Euclidean distance and average linkage.

### **Acknowledgements**

This study was supported by 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. We are grateful to the Natália Carrion Teodoro for her technical assistance.

### **References**

1. Chari R, Coe BP, Vucic EA, Lockwood WW, Lam WL. An integrative multi-dimensional genetic and epigenetic strategy to identify aberrant genes and pathways in cancer. *BMC Biosystems Biology* 2010; 4:67-80.
2. Chari J, Thu KL, Wilson IM, Lockwood WW, Lonergan KM, Coe BP, Mallof CA, Gazdaz AF, Lam S, Garnis C, MacAulay CE, Alvarez CE, Lam WL. Integrating the multiple dimensions of genomic and epigenomic landscapes of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29:73-79.
3. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128:683-692.
4. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358:1148-59.
5. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010; 31:27-36.
6. Novak P, Jensen T, Oshiro MM, Wozniak RJ, Nouzova M, Watts GS, Klimecki WT, Kim C, Futscher BW. Epigenetic inactivation of the HOXA gene cluster in breast cancer. *Cancer Res* 2006; 66:10664-70.
7. Novak P, Jensen T, Oshiro MM, Watts GS, Kim CJ, Futscher BW. Agglomerative epigenetic aberrations are a common event in human breast cancer. *Cancer Res* 2008; 68:8616-8625.
8. Clark SJ. Action at a distance: epigenetic silencing of large chromosomal regions in carcinogenesis. *Hum Mol Genet* 2007; 16:R88-R95.

9. Frigola J, Song J, Storzaker C, Hinshelwood RA, Peinado MA, Clark SJ. Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet* 2006; 38:540-9.
10. Hitchins MP, Lin VA, Buckle A, Cheong K, Halani N, Ku S, Kwok CT, Packham D, Suter CM, Meagher A, Storzaker C, Clark S, Hawkins NJ, Ward RL. Epigenetic inactivation of a cluster of genes flanking MLH1 in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Cancer Res* 2007; 67:9107-16.
11. Karpinski P, Ramsey D, Grzebleniak Z, Sasiadek MM, Blin N. The CpG island methylator phenotype correlates with long range epigenetic silencing in colorectal cancer. *Mol Cancer Res* 2008; 6:585-591.
12. Mayor R, Casadomé L, Azuara D, Moreno V, Clark SJ, Capellà G, Peinado MA. Long-range epigenetic silencing at 2q14.2 affects most human colorectal cancers and may have application as a non-invasive biomarker of disease. *Br J Cancer*. 2009; 100:1534-9.
13. Stransky N, Vallot C, Reyal F, Bernard-Pierrot I, de Medina SG, Segraves R, de Rycke Y, Elvin P, Cassidy A, Spraggon C, Graham A, Southgate J, Asselain B, Allory Y, Abbou CC, Albertson DG, Thiery JP, Chopin DK, Pinkel D, Radvanyi F. Regional copy number-independent deregulation of transcription in cancer. *Nat Genet*. 2006; 38:1386-96.
14. Devaney J, Storzaker C, Qu W, Song JZ, Statham AL, Patterson KI, Horvath LG, Tabor B, Coolen MW, Hulf T, Kench JG, Henshall SM, Pe Benito R, Haynes AM, Mayor R, Peinado MA, Sutherland RL, Clark SJ. Epigenetic deregulation across chromosome 2q14.2 differentiates normal from prostate cancer and provides a regional panel of novel DNA methylation cancer biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011; 20:148-59.
15. Coolen MW, Storzaker C, Song JZ, Statham AL, Kassir Z, Moreno CS, Young AN, Varma V, Speed TP, Cowley M, Lacaze P, Kaplan W, Robinson MD, Clark SJ. Consolidation of the cancer genome into domains of repressive chromatin by long-range epigenetic silencing (LRES) reduces transcriptional plasticity. *Nat Cell Biol*. 2010; 12:235-46.
16. Dallosso AR, Hancock AL, Szemes M, Moorwood K, Chilukamarri L, Tsai HH, Sarkar A, Barasch J, Vuononvirta R, Jones C, Pritchard-Jones K, Royer-Pokora B, Lee SB, Owen C, Malik S, Feng Y, Frank M, Ward A, Brown KW, Malik K. Frequent long-range epigenetic silencing of protocadherin gene clusters on chromosome 5q31 in Wilms' tumor. *PLoS Genet*. 2009; 5:e1000745.

17. Maitra A, Wistuba II, Washington C, Virmani AK, Ashfaq R, Milchgrub S, Gazdar AF, Minna JD. High-resolution chromosome 3p allelotyping of breast carcinomas and precursor lesions demonstrates frequent loss of heterozygosity and a discontinuous pattern of allele loss. *Am J Pathol* 2001; 159:119-30.
18. Martinez A, Walker RA, Shaw JA, Dearing SJ, Maher ER, Latif F. Chromosome 3p allele loss in early invasive breast cancer: detailed mapping and association with clinicopathological features. *Mol Pathol* 2001; 54:300-6.
19. Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH. The RASSF proteins in cancer: from epigenetic silencing to functional characterization. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1796:114-128.
20. Hesson LB, Cooper WN, Latif F. Evaluation of the 3p21.3 tumour-suppressor gene cluster. *Oncogene* 2007; 6:7283-301.
21. Ji L, Minna JD, Roth JA. 3p21.3 tumor suppressor cluster: prospects for translational applications. *Future Oncol* 2005; 1:79-92.
22. Sekido Y, Ahmadian M, Wistuba I, Latif F, Bader S, Wei MH, Duh FM, Gazdar A, Lerman M, Minna J. Cloning of a breast cancer homozygous deletion junction narrows the region of search for a 3p21.3 tumor suppressor gene. *Oncogene* 1998; 16:3151-3157.
23. Lerman MI, Minna JD. The 630Kb lung cancer homozygous deletion region on chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. *Cancer Res* 2000; 60:6116-6133.
24. Hsu PY, Hsu HK, Singer GAC, Yan PS, Rodriguez BAT, Liu JC, Weng YI, Deatherage DE, Chen Z, Pereira JS, Lopez R, Russo J, Wang Q, Lamartiniere CA, Nephew KP, Huang TH-M. Estrogen-mediated epigenetic repression of large chromosomal regions through DNA looping. *Genome Res* 2010; 20:733-744.
25. Hesson L, Bièche I, Krex D, Criniere E, Hoang-Xuan K, Maher ER, Latif F. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A and BLU genes located within the critical 3p21.3 region in gliomas. *Oncogene* 2004; 23:2408-19.
26. Ito M, Ito G, Kondo M, Uchiyama M, Fukui T, Mori S, Yoshioka H, Ueda Y, Shimokata K, Sekido Y. Frequent inactivation of RASSF1A, BLU, and SEMA3B on 3p21.3 by promoter hypermethylation and allele loss in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 2005; 225:131-9.
27. Senchenko VN, Anedchenko EA, Kondratieva TT, Krasnov GS, Dmitriev AA, Zabarovska VI, Pavlova TV, Kashuba VI, Lerman MI, Zabarovsky ER. Simultaneous down-regulation of tumor suppressor genes RBSP3/CTDSPL, NPRL2/G21 and RASSF1A in primary non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2010; 1:10:75.

28. Lai HC, Lin YW, Chang CC, Wang HC, Chu TW, Yu MH, Chu TY. Hypermethylation of two consecutive tumor suppressor genes, BLU and RASSF1A, located at 3p21.3 in cervical neoplasias. *Gynecol Oncol* 2007;104:629-35.
29. Lai HC, Lin YW, Chang CC, Wang HC, Chu TW, Yu MH, Chu TY. Hypermethylation of two consecutive tumor suppressor genes, BLU and RASSF1A, located at 3p21.3 in cervical neoplasias. *Gynecol Oncol* 2007; 104:629-35.
30. Dworkin AM, Huang TH, Toland AE. Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. *Semin Cancer Biol* 2009; 19:165-71.
31. van der Weyden L, Adams DJ. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1776:58-85.
32. Reeves ME, Baldwin SW, Baldwin ML, Chen ST, Moretz JM, Aragon RJ, Li X, Strong DD, Mohan S, Ameer YG. Ras-association domain family 1C protein promotes breast cancer cell migration and attenuates apoptosis. *BMC Cancer* 2010; 10:562.
33. Estrabaud E, Lassot I, Blot G, Le Rouzic E, Tanchou V, Quemeneur E, Daviet L, Margottin-Goguet F, Benarous R. RASSF1C, an isoform of the tumor suppressor RASSF1A, promotes the accumulation of beta-catenin by interacting with betaTrCP. *Cancer Res* 2007; 67:1054-61.
34. Udabage L, Brownlee GR, Nilsson SK, Brown TJ. The over-expression of HAS2, Hyal-2 and CD44 is implicated in the invasiveness of breast cancer. *Exp Cell Res* 2005; 310:205–217.
35. Bertrand P, Girard N, Duval C, d'Anjou J, Chauzy C, Menard JF, et al. Increased hyaluronidase levels in breast tumor metastases. *Int J Cancer* 1997; 73:327–346.
36. Tan JX, Wang XY, Li HY, Su XL, Wang L, Ran L, Zheng K, Ren GS. HYAL1 overexpression is correlated with the malignant behavior of human breast cancer. *Int J Cancer* 2011;128:1303-15.
37. Lokeshwar VB, Gomez P, Kramer M, Knapp J, McCornack MA, Lopez LE, Fregien N, Dhir N, Scherer S, Klumpp DJ, Manoharan M, Soloway MS, Lokeshwar BL. Epigenetic regulation of HYAL-1 hyaluronidase expression. identification of HYAL-1 promoter. *J Biol Chem*. 2008 Oct 24;283(43):29215-27.
38. Lokeshwar VB, Selzer MG. Hyaluronidase: both a tumor promoter and suppressor. *Semin Cancer Biol* 2008; 18:281-7.
39. Chow LS, Lo KW, Kwong J, To KF, Tsang KS, Lam CW, Dammann R, Huang DP. RASSF1A is a target tumor suppressor from 3p21.3 in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2004; 109:839-47.

40. Hesson L, Bièche I, Krex D, Criniere E, Hoang-Xuan K, Maher ER, Latif F. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A and BLU genes located within critical 3p21.3 region in gliomas. *Oncogene* 2004; 23:2408-19.
41. Carboni GL, Gao B, Nishizaki M, Xu K, Minna JD, Roth JA, Ji L. CACNA2D2-mediated apoptosis in NSCLC cells is associated with alterations of the intracellular calcium signaling and disruption of mitochondria membrane integrity. *Oncogene*. 2003; 22:615-26.
42. Komashko VM, Farnham PJ. 5-azacytidine treatment reorganizes genomic histone modification patterns. *Epigenetics* 2010;5: 1-12.
43. Nguyen CT, Weisenberger DJ, Velicescu M, Gonzales FA, Lin JC, Liang G, Jones PA. Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* 2002; 62:6456-61.
44. Kondo Y. Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. *Yonsei Med J* 2009; 50:455-63.

**Table 1.** Pair-wise correlation coefficient matrix of expression levels of contiguous genes mapped across 3p21.3 after treatment with 5Aza-dC and 5Aza-dC with TSA.

After treatment with 5Aza-dC										
	<i>SEMAB3</i>	<i>HYAL3</i>	<i>HYAL1</i>	<i>HYAL2</i>	<i>TUSC2</i>	<i>RASSF1</i>	<i>ZMYND10</i>	<i>NPRL2</i>	<i>TMEM115</i>	<i>CACNA2D2</i>
<i>SEMAB3</i>										
<i>HYAL3</i>	-0,02									
<i>HYAL1</i>	0,16	0,16								
<i>HYAL2</i>	0,02	0,14	<b>0,43</b> $p=0.05$							
<i>TUSC2</i>	-0,02	<b>0,62</b> $p=0.0003$	0,05	<b>0,51</b> $p=0.02$						
<i>RASSF1</i>	0,02	0,36	0,07	0,24	<b>0,45</b> $p=0.04$					
<i>ZMYND10</i>	0,37	0,38	-0,25	-0,15	0,39	0,18				
<i>NPRL2</i>	<b>0,42</b> $p=0.06$	0,32	-0,13	0,27	<b>0,69</b> $p=0.0008$	<b>0,56</b> $p=0.09$	<b>0,58</b> $p=0.007$			
<i>TMEM115</i>	0,39	0,41	0,02	0,24	<b>0,42</b> $p=0.06$	<b>0,57</b> $p=0.008$	0,16	<b>0,46</b> $p=0.04$		
<i>CACNA2D2</i>	-0,18	0,27	<b>0,50</b> $p=0.02$	<b>0,48</b> $p=0.03$	0,38	0,23	0,07	0,10	-0,25	
After treatment with 5Aza-dC and TSA										
	<i>SEMAB3</i>	<i>HYAL3</i>	<i>HYAL1</i>	<i>HYAL2</i>	<i>TUSC2</i>	<i>RASSF1</i>	<i>ZMYND10</i>	<i>NPRL2</i>	<i>TMEM115</i>	<i>CACNA2D2</i>
<i>SEMAB3</i>										
<i>HYAL3</i>	0,05									
<i>HYAL1</i>	0,18	0,14								
<i>HYAL2</i>	0,03	0,15	0,12							
<i>TUSC2</i>	0,01	<b>0,56</b> $p=0.01$	-0,05	0,36						
<i>RASSF1</i>	0,08	<b>0,49</b> $p=0.02$	-0,06	0,38	<b>0,64</b> $p=0.002$					
<i>ZMYND10</i>	0,23	<b>0,57</b> $p=0.009$	-0,19	-0,12	<b>0,58</b> $p=0.007$	<b>0,54</b> $p=0.01$				
<i>NPRL2</i>	<b>0,51</b> $p=0.02$	0,30	-0,11	0,04	0,35	<b>0,48</b> $p=0.03$	<b>0,71</b> $p=0.0004$			
<i>TMEM115</i>	<b>0,69</b> $p=0.0008$	0,17	-0,01	0,15	0,24	0,24	0,29	<b>0,66</b> $p=0.001$		
<i>CACNA2D2</i>	<b>-0,42</b> $p=0.06$	<b>0,48</b> $p=0.03$	0,24	0,34	<b>0,51</b> $p=0.02$	<b>0,49</b> $p=0.02$	0,21	0,10	-0,06	

Statically significant correlation coefficients (r) are indicated in bold,  $p < 0.05$ .

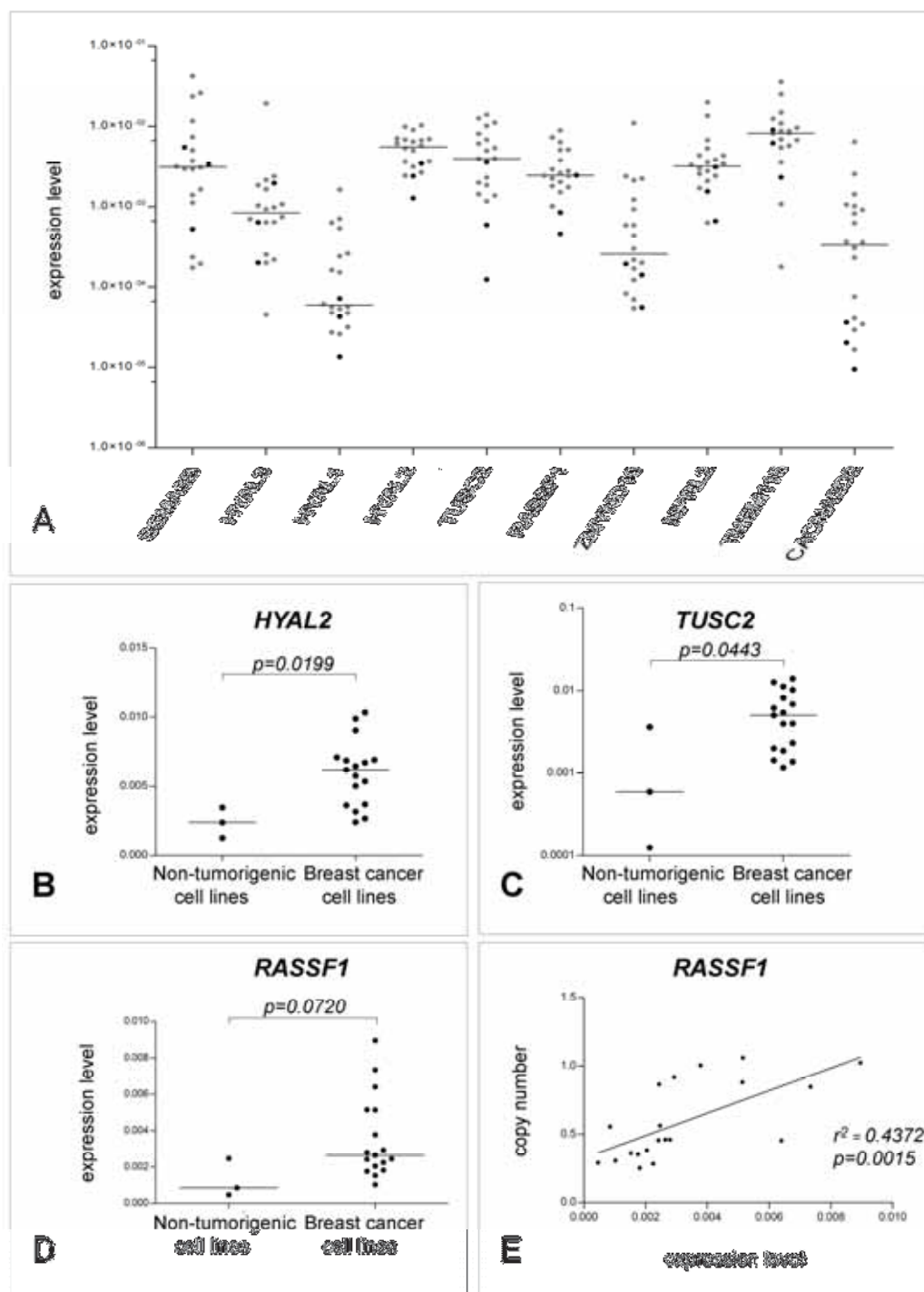


Figure 1. Expression levels of candidate tumor suppressor genes, organized according to their physical location on 3p21.3, in breast cancer cell lines and in epithelial breast cells. **A**) Differential gene expression among breast cancer cell lines (gray circles) and non-tumorigenic breast cells (black circles). **B and C**) The *HYAL2* and *TUSC2* genes were differentially expressed in breast cancer compared to non-tumorigenic cell lines. **D**) Global *RASSF1* transcripts showed a trend to overexpression in breast cancer cells lines compared with non-tumorigenic epithelial breast cells. **E**) Relationship between *RASSF1* transcripts levels and copy number at this locus.

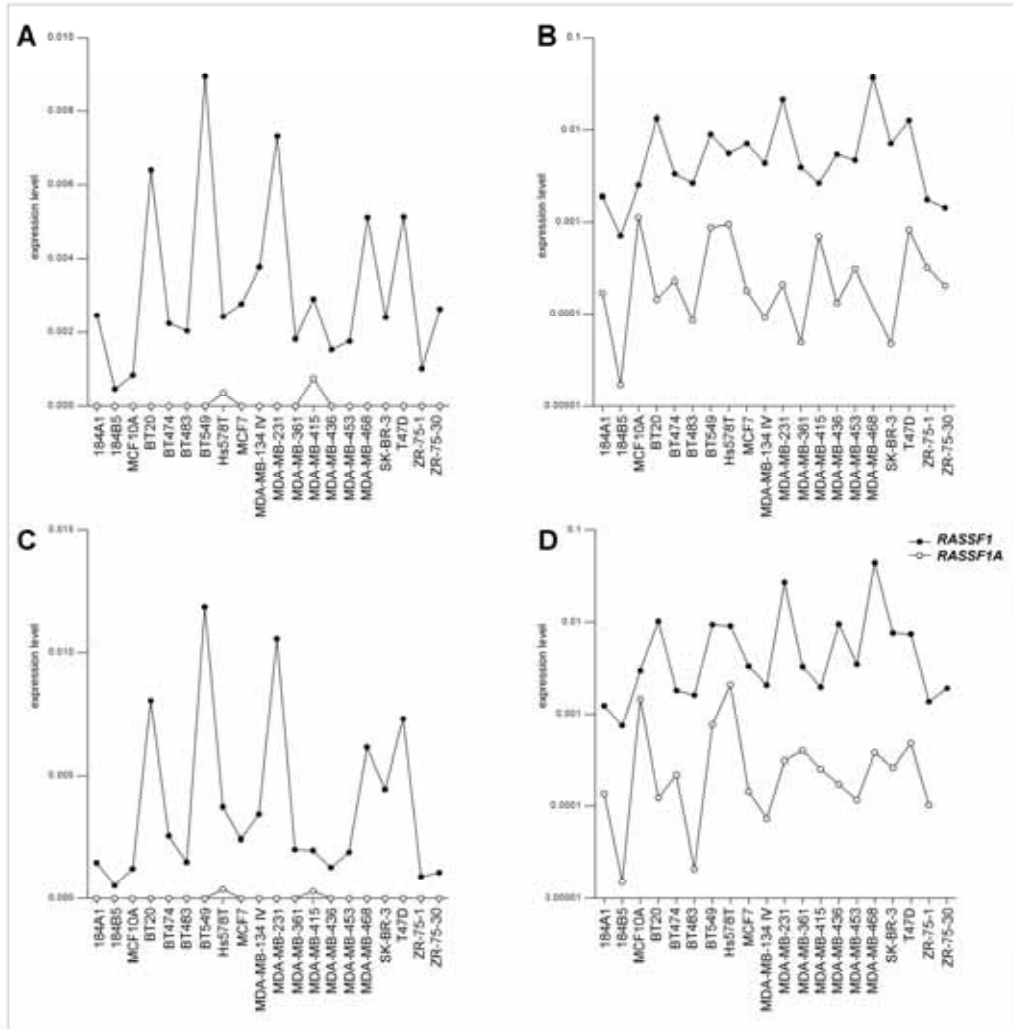


Figure 2. Expression levels of *RASSF1* transcripts (black circles) and A isoform of *RASSF1* gene (open circles) in untreated cell lines (A), treated with 5Aza-dC (B), trichostatin A (TSA) (C), and with 5Aza-dC with TSA (D).

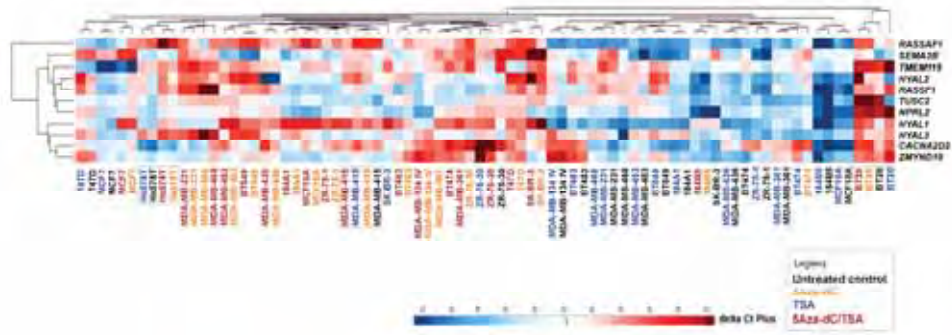


Figure 3. Expression profile summarized in a heat map. Effect of treatments with 5Aza-dC and with 5Aza-dC combined with TSA leading to the increase in the expression levels of the tumor suppressor cluster, except in the cell lines that were unmethylated at CpG island 1 of *RASSF1A* promoter (MDA-MB-415) or showing low levels of methylation (Hs578T and BT20).

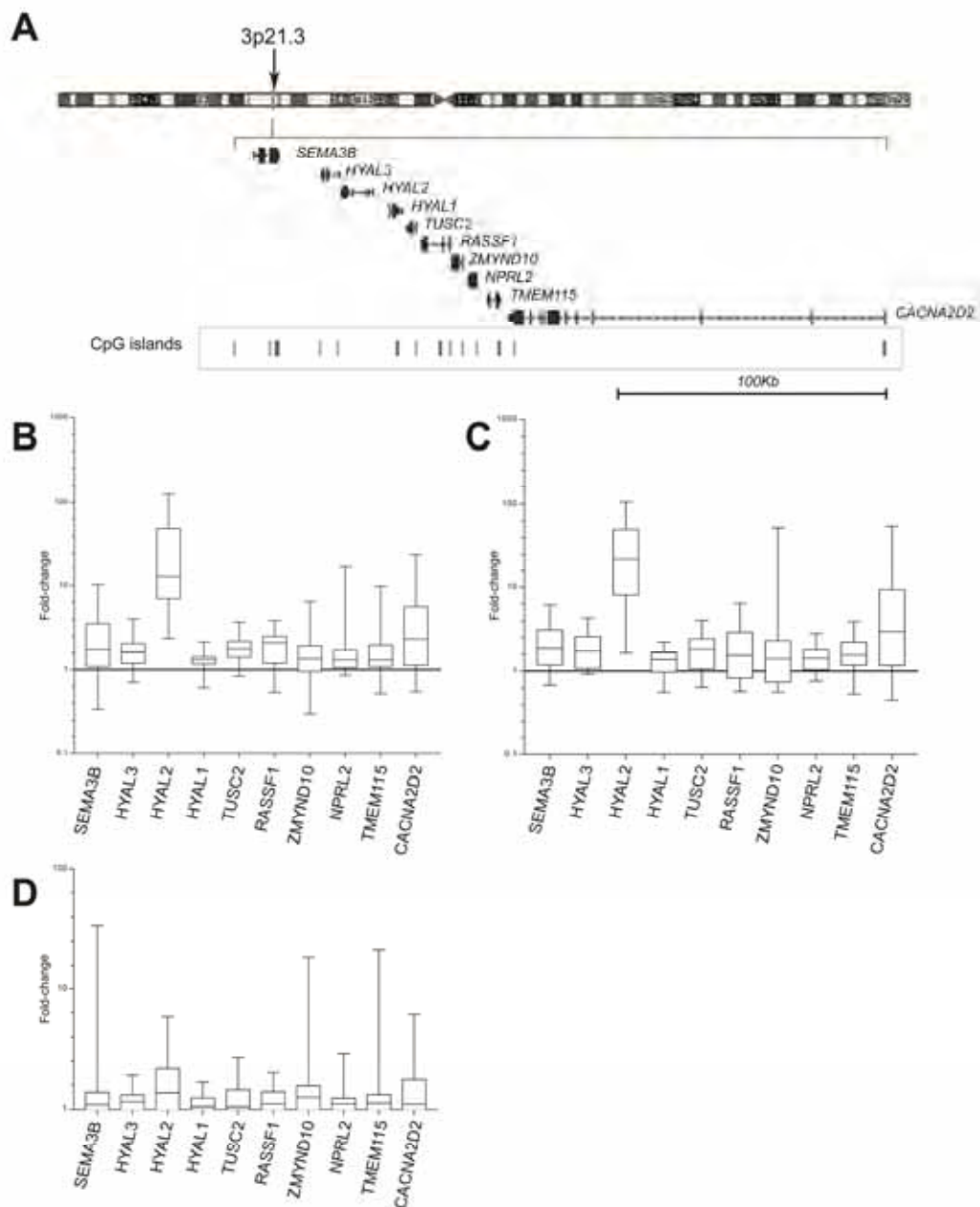


Figure 4. Effect of 5Aza-dC and trichostatin A (TSA) treatment on gene expression across 3p21.3. **A**) Chromosomal location of genes and CpG islands on 3p21.3 tumor suppressor genes cluster. Although all genes were up-regulated by treatments, the genes *HYAL1* and *CACNA2D2* were pronouncedly affected by 5Aza-dC and 5Aza-dC/TSA (**B** and **C**, respectively). **D**) Genes transcript effects after isolated treatment with TSA.

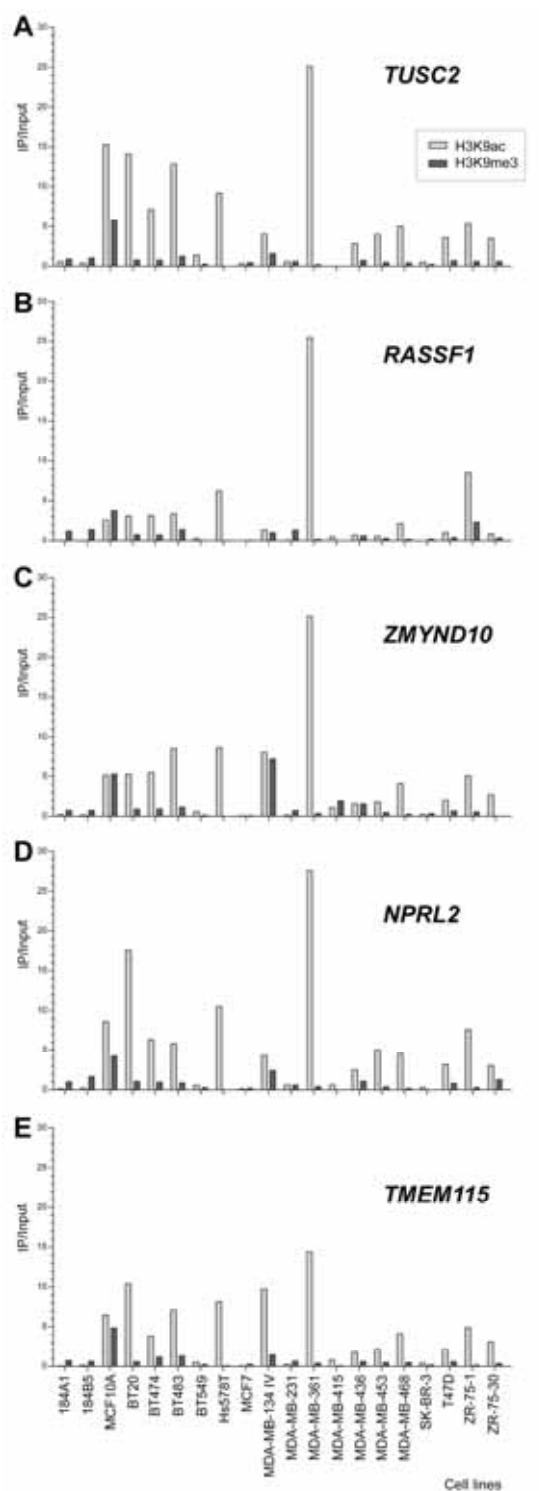


Figure 5. Analysis of Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) of genes close to *RASSF1* in breast cancer and epithelial mammary breast cell lines. The amount of immunoprecipitated target (using antibodies against H3K9 acetylation and H3K9 trimethylation) was quantified by real time PCR and plotted as the ratio of immunoprecipitated DNA to input.

## Supplementary Material

**Table S1.** Primers sequences used for High Resolution Melting (HRM), Immunoprecipitation of chromatin (ChIP) and Copy Number Analysis.

GENES	FORWARD (5'-3')	REVERSE (5'-3')
<b>High Resolution Melting (HRM) Analysis</b>		
<i>RASSF1</i> *	GGGTTTTATAGTTTTTGTATTTAGGTT	AACTCAATAAACTCAAACCTCCCC
<i>TMEM115</i>	TGGTTTTTTGGGATTTGTAGTT	AATCAAACCTAATCAACTCC
<i>TUSC2</i>	TTTGTTGGGATTTGGGATTT	ACTACCATAACCTACCCCAAC
<i>NPRL2</i>	TATGTTTGAATTGGTATTAAT	CCCTCCCAACTAACTCTACT
<b>Immunoprecipitation of chromatin (ChIP) and Copy Number Analysis</b>		
<i>RASSF1</i> **	TGGGGTGTGAGGAGGGGACGA	AGAGCCGCGCAATGGA
<i>TMEM115</i>	CCAGACCACGGAGGTTCTGT	CTCTAGCCCCCACACTTGCT
<i>TUSC2</i>	TAGGCCCTGAAGTGCAGGTT	CTCCCGGTCTTTTGGGTGTA
<i>NPRL2</i>	GGCGCAAAGCCATGTAAGAC	CCGCAGCAGGGAACACTACAAT
<i>ZMYND10</i>	GGGACGCGAGAAATAGAGGAA	TCTGTCCTCAGACGCCAAGTC
<i>GAPDH</i> **	TACTAGCGGTTTTACGGGCG	TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA

\* Di Gioia S, Bianchi P, Destro A, et al. Quantitative evaluation of RASSF1A methylation in the non-lesional, regenerative and neoplastic liver. *BMC Cancer*. 2006; 6:89-101.

\*\* Kawamoto K, Okino ST, Place RF, et al. Epigenetic modifications of RASSF1A gene through chromatin remodeling in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13:2541-8.

## CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- O agrupamento de candidatos a genes supressores tumorais mapeados em 3p21.3, constituído pelos genes *SEMA3B*, *HYAL3*, *HYAL1*, *HYAL2*, *TUSC2*, *ZMYND10*, *NPRL2*, *TMEM115* e *CACNA2D2*, que flanqueiam o já estabelecido gene supressor tumoral *RASSF1*, encontra-se sob repressão epigenética em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários, conforme evidenciado pela modulação positiva da expressão desses genes após os tratamentos das mesmas com drogas de ação epigenética.
- A isoforma *RASSF1A* está silenciada epigeneticamente na maioria das linhagens celulares derivadas de cânceres mamários e foi re-expressa após os tratamentos com 5Aza-dC, isolado ou combinado com TSA. Contrariamente, a isoforma *RASSF1C* foi detectada em todas as linhagens celulares não tratadas, com um subgrupo expressando maiores níveis comparado com as linhagens não-tumorigênicas.
- O efeito dos tratamentos com 5Aza-dC, isolado ou combinado com TSA, foi mais pronunciado nos genes *HYAL1* e *CACNA2D2*, que apresentaram os menores níveis de expressão no painel de linhagens celulares não tratadas.
- Apesar dos genes *TUSC2* (*upstream* ao *RASSF1*) e *ZMYND10*, *NPRL2* e *TMEM115* (*localizados downstream* ao *RASSF1*) serem co-regulados positivamente com *RASSF1* após os tratamentos com as drogas de ação epigenética, a metilação do DNA foi encontrada somente na ilha CpG da região promotora que regula a expressão da isoforma *RASSF1A*, correlacionando com sua ausência de expressão.
- A análise por imunoprecipitação da cromatina revelou que os níveis de acetilação foram mais altos do que os de trimetilação da lisina 9 da histona H3, e visto que, não foi observada correlação entre a modulação positiva da expressão gênica após os tratamentos com a metilação do DNA e com a

trimetilação da lisina 9 da histona H3, provavelmente outras marcas repressivas nas histonas, como a dimetilação na lisina 9 ou a metilação da lisina 27 da histona H3, possam ser responsáveis pelos baixos níveis de expressão observados neste agrupamento gênico contendo prováveis supressores tumorais mapeados em 3p21.3.

## ANEXO

## Aprovação do Comitê Interno de Biossegurança



 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
 "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
 Campus de Botucatu

30

Comissão Interna de Biossegurança – IB – UNESP - Botucatu

Of. Nº 01/08-CIBio/IBB  
EB/smf

Novembro, 14 de 2008

Prezada Senhora:

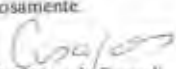
Em análise ao projeto de pesquisa "Controle epigenético da expressão gênica na carcinogênese mamária: investigação de genes candidatos a supressores tumorais mapeados em 3p21.3" de autoria de Vossa Senhoria e de sua equipe, temos a informar que em reunião de 14/11/2008, a Comissão Interna de Biossegurança, legalmente constituída (CQB nº 0164/02), **decidiu aprovar** o recebimento da importação e/ou doação de linhagens celulares fornecidas pela colaboração com a Dra Luciane R Cavalli da Washington University (Cell Line Collection Lombardi Comprehensive Cancer Center).

Informamos, outrossim, que atrelada à nossa posição favorável, solicitamos, em contrapartida uma declaração de responsabilidade e de ciência da Resolução Normativa nº 2, de 27 de novembro de 1996, da CTNBio, a qual dispõe sobre a classificação de riscos de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) e os níveis de biossegurança a serem aplicados nas atividades e projetos, bem como da Instrução Normativa nº 4, de 09 de dezembro de 1996, que se refere às normas para o transporte de organismos geneticamente modificados (OGMs). As mencionadas Resolução e Instrução Normativa podem ser acessadas pelos sites abaixo.

Res. Normativa nº 2 (<http://www.ctnbio.gov.br/legislacao/normas/normativa02/1996-11-27-02.pdf>).Inst. Normativa nº 4 (<http://www.ctnbio.gov.br/legislacao/normas/normativa04/1996-12-09-04.pdf>).

Colocamo-nos a disposição para outros esclarecimentos adicionais.

Atenciosamente,

  
 Prof. Dr. Eduardo Bagagli  
 Presidente da Comissão Interna de Biossegurança  
 IBB – UNESP, Botucatu, SP, Brasil  
 CQB nº 0164/02

 À Sua Senhoria  
 A Senhora Claudia Aparecida Rainho  
 Professora do Departamento de Genética  
 IB-UNESP-Botucatu  
 Coordenadora do Projeto

## APÊNDICE I

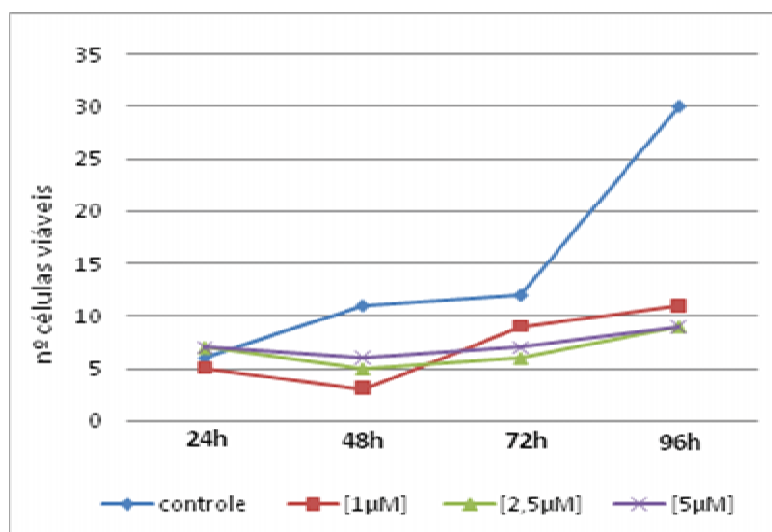
### Efeito das drogas de ação epigenética na proliferação celular

Após os testes preliminares para avaliação do efeito dos tratamentos na proliferação celular nas linhagens MCF7 e MDA-MB-231, verificou-se que o tratamento com 1.0 $\mu$ M de Aza durante 96 horas foi o que menos inibiu a proliferação celular (Figura I.1)

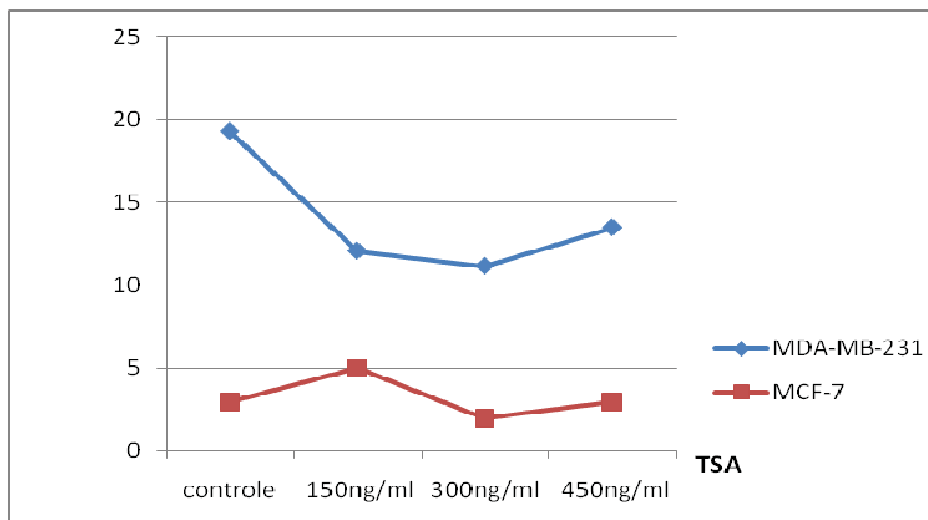
O tratamento das linhagens MCF7 e MDA-MB-231 com TSA não mostrou um efeito dependente da dose utilizada (Figura I.2). O efeito do tratamento contínuo com 1.0 $\mu$ M de Aza durante 96 horas, seguido pelo tratamento com diferentes concentrações de TSA (150, 300 ou 450ng/ml) por mais 24 horas, na proliferação celular das linhagens MCF-7 e da MDA-MB-231 está apresentado na figura I.3.

Baseado nos resultados destes testes preliminares definiu-se a seguinte estratégia para o tratamento das linhagens celulares com o agente desmetilante e o inibidor de desacetilases de histonas visando a re-expressão dos genes alvos:

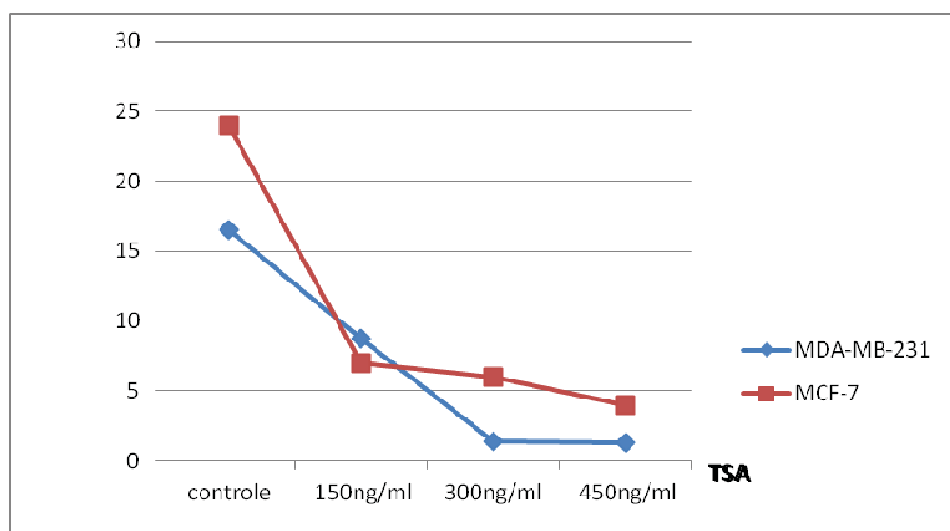
- 1) tratamento isolado com 1 $\mu$ M de Aza durante 4 dias,
- 2) tratamento isolado com 150ng/ml de TSA durante 24 horas ou
- 3) tratamento combinado com 1 $\mu$ M Aza por 4 dias seguido de 24 horas com 150ng/ml TSA.



**Figura I.1.** Efeito do tratamento com 5-aza-2'-desoxicitidina na proliferação celular da linhagem MCF-7.



**Figura I.2.** Efeito da concentração de TSA na proliferação das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 após 24 horas de tratamento.

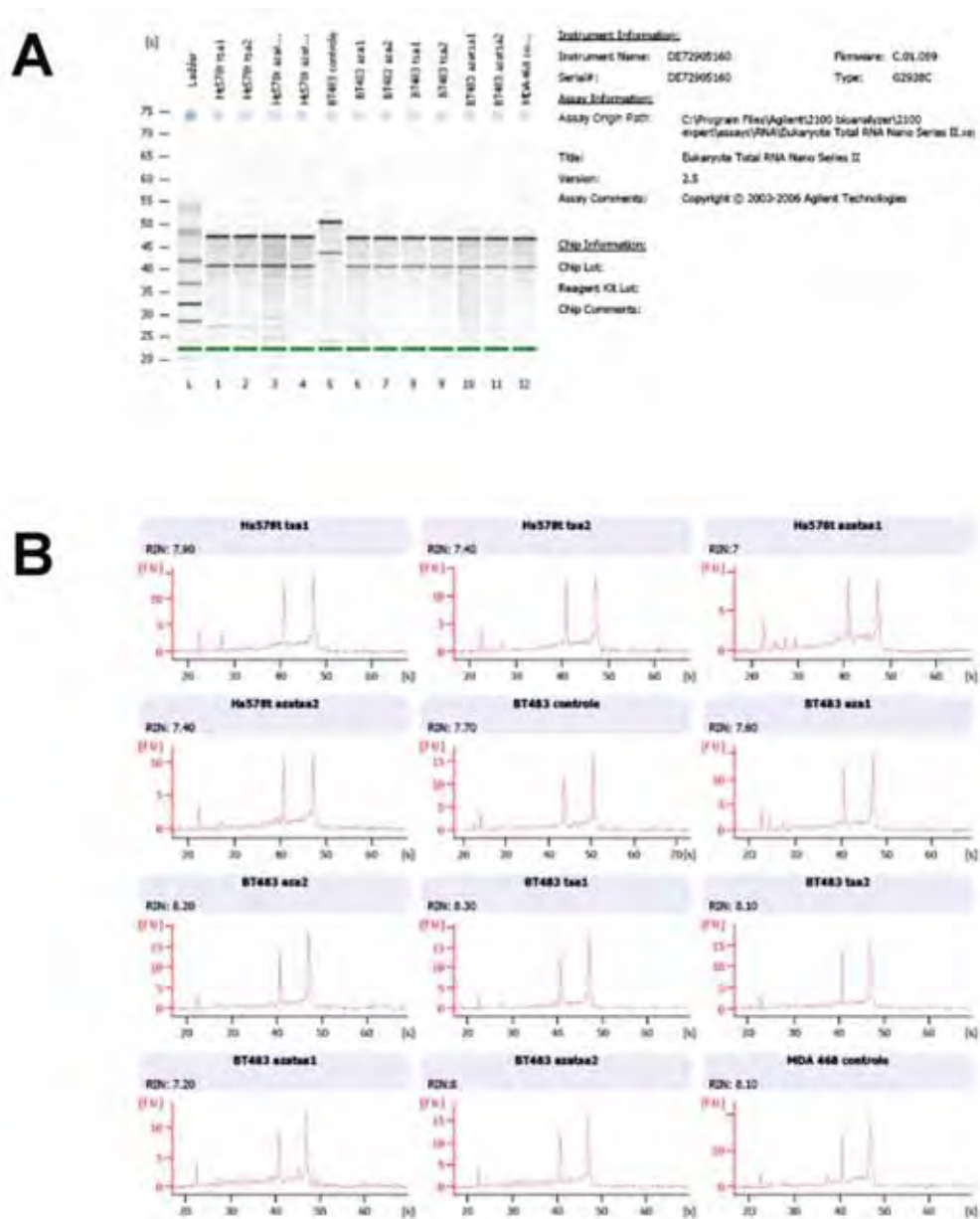


**Figura I.3.** Efeito da concentração de TSA (24 horas de tratamento) na proliferação das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 previamente expostas a  $1\mu\text{M}$  de Aza durante 96 horas.

## **APÊNDICE II**

### **Avaliação da integridade do RNA total após a extração**

Após a extração do RNA de cada linhagem submetida ou não aos tratamentos, a avaliação da integridade do RNA foi obtida no equipamento *Agilent Bioanalyzer 2000* que revelou valores de RIN (*RNA Integrity Number*) maiores do que sete na maioria das amostras, sendo estes valores considerados aceitáveis para o prosseguimento com a síntese do cDNA (Figura II.1).

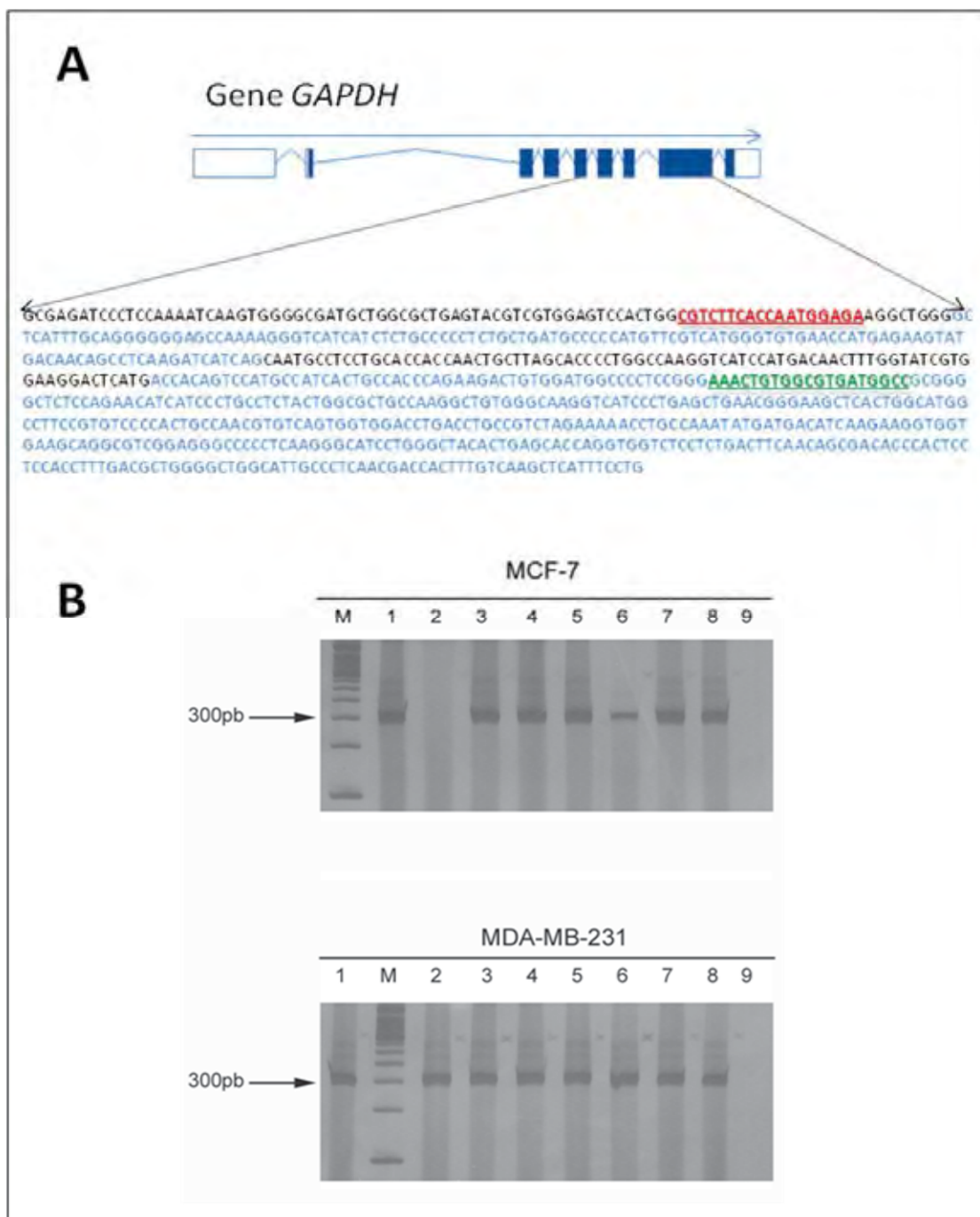


**Figura II.1.** Avaliação da integridade do RNA. Em **A** observa-se uma imagem semelhante a um gel de eletroforese convencional onde são observadas as bandas correspondentes às frações de RNA ribossômico 28S e 18S de cada amostra (canaletas de 1 a 12) e o marcador de tamanho molecular (*ladder* - L). Em **B** estão apresentados os eletroferogramas correspondentes com dois picos centrais representando quantitativamente cada fração do RNA ribossômico bem como os valores de RIN.

## **APÊNDICE III**

### **Avaliação da qualidade do cDNA sintetizado**

Após considerar adequados os valores de RIN obtidos dos RNAs extraídos de cada linhagem foi realizada a avaliação da qualidade do cDNA sintetizado antes de prosseguir com as quantificações da expressão de cada gene por RT-PCR quantitativa em tempo real. Para esta avaliação, foi selecionado uma região de 300pb do gene *GAPDH*, sendo a amplificação deste fragmento indicativa de um cDNA de qualidade e tamanho suficientes para fornecer sequências moldes para a amplificação dos genes alvos deste estudo (Figura III.1).



**Figura III.1.** Avaliação da qualidade do cDNA. Amplificação de um fragmento de 300pb do gene *GAPDH*. As seqüências dos exons consecutivos estão indicadas pelas cores preta e azul. Em vermelho está destacada a seqüência do oligonucleotídeo *forward* no éxon 5 e em verde, a região de pareamento do oligonucleotídeo *reverse* no éxon 8. M= marcador de tamanho molecular; 1 e 2 (cDNA controle sem tratamento); 3 e 4 (cDNA de células tratadas com Aza), 5 e 6 (cDNA de células tratadas com TSA) e 7 e 9 (cDNA de células tratadas com a combinação Aza+TSA), correspondentes aos protocolos de tratamento A, B e C apresentados na figura 2, respectivamente. 9=NTC (*non template control*).

## APÊNDICE IV

### **Seleção do gene normalizador (referência) para a análise de expressão gênica por RT-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)**

Os cDNAs das linhagens MCF7 e MDA-MB-231, controles e após os três tratamentos, foram utilizados na amplificação de 11 genes comumente utilizados como normalizadores (referência ou controle endógeno) em ensaios quantitativos dos níveis de expressão gênica em diferentes tecidos humanos utilizando-se a *TaqMan® Human Endogenous Control Plate* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em duplicadas segundo as recomendações do fornecedor. Após a obtenção dos valores de Ct e desvio-padrão (SD), os dados foram subsequentemente analisados por dois diferentes algoritmos, *GeNorm* e *NormFinder* (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>; <http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>, respectivamente), para a identificação do controle endógeno mais estável sob as condições experimentais deste estudo.

Foi detectado um bom grau de concordância entre os dois algoritmos na listagem dos genes mais estáveis. Segundo o *GeNorm*, apresentaram o menor valor M (maior estabilidade) os genes *PO* e *CYC* para a linhagem MCF7 e os genes *GAPDH* e *CYC* para a linhagem MDA-MB-231 (Tabelas IV.1 e IV.2), sendo indicados como os melhores pares de endógenos para as condições experimentais testadas (Figuras IV.1 e IV.2).

**Tabela IV.1.** Valores de estabilidade da expressão dos genes controles endógenos na linhagem MCF7 calculadas pelos algoritmos *GeNorm* e *NormFinder*.

<b>GeNorm</b>		<b>NormFinder</b>		
	<b>Gene</b>	<b>Estabilidade<sup>a</sup> (M)</b>	<b>Gene</b>	<b>Estabilidade<sup>a</sup> (SD)</b>
1	<i>PO</i>	0,0447	<i>CYC</i>	0,0224
2	<i>CYC</i>	0,0447	<i>GAPDH</i>	0,0351
3	<i>GAPDH</i>	0,0718	<i>PO</i>	0,0695
4	<i>BA</i>	0,1078	<i>TBP</i>	0,1624
5	<i>GUS</i>	0,1580	<i>BA</i>	0,1822
6	<i>PGK</i>	0,1902	<i>HPRT</i>	0,2373
7	<i>TBP</i>	0,2301	<i>18S</i>	0,2874
8	<i>HPRT</i>	0,2607	<i>GUS</i>	0,3485
9	<i>18S</i>	0,2842	<i>PGK</i>	0,3839
10	<i>B2m</i>	0,3285	<i>B2m</i>	0,4937
11	<i>TfR</i>	0,4031	<i>TfR</i>	0,7647

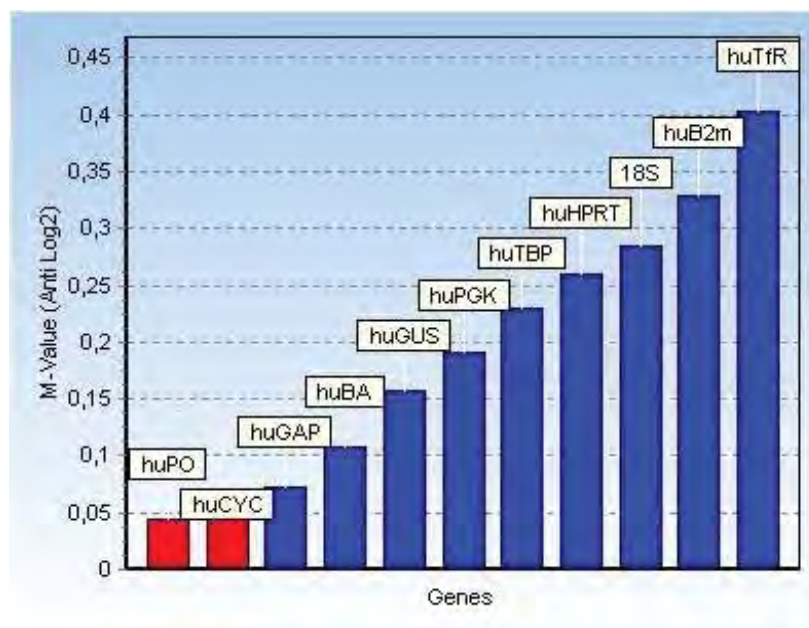
<sup>a</sup> A estabilidade é baseada na determinação da variação intra e inter-grupo combinada.

**Tabela IV.2** Valores de estabilidade da expressão dos genes controles endógenos na linhagem MDA-MB-231 calculadas pelos algoritmos *GeNorm* e *NormFinder*.

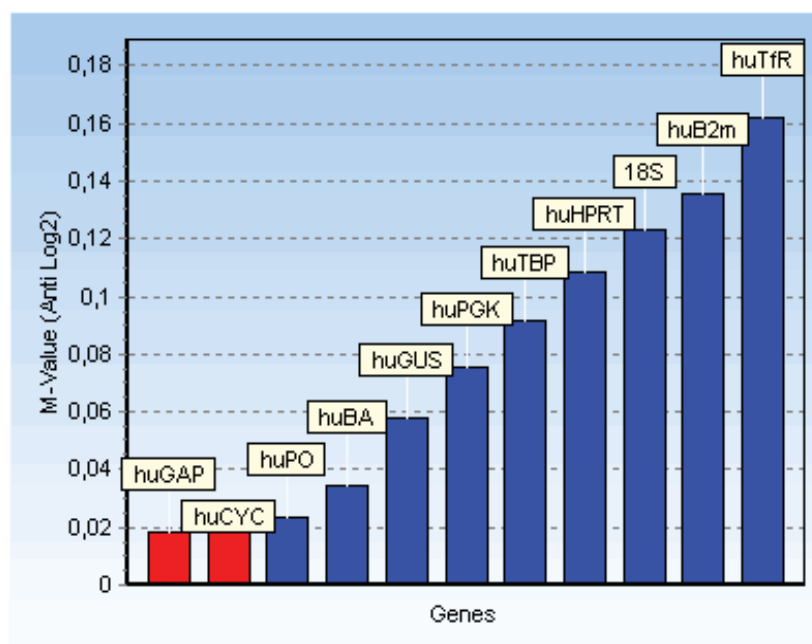
<b>GeNorm</b>		<b>NormFinder</b>		
	<b>Gene</b>	<b>Estabilidade<sup>a</sup> (M)</b>	<b>Gene</b>	<b>Estabilidade<sup>a</sup> (SD)</b>
1	<i>GAPDH</i>	0,0186	<i>CYC</i>	0,0093
2	<i>CYC</i>	0,0186	<i>GAPDH</i>	0,0159
3	<i>PO</i>	0,0231	<i>PO</i>	0,0246
4	<i>BA</i>	0,0345	<i>BA</i>	0,0491
5	<i>GUS</i>	0,0579	<i>TBP</i>	0,0867
6	<i>PGK</i>	0,0751	<i>GUS</i>	0,1341
7	<i>TBP</i>	0,0914	<i>HPRT</i>	0,1352
8	<i>HPRT</i>	0,1081	<i>PGK</i>	0,1402
9	<i>18S</i>	0,1230	<i>18S</i>	0,1524
10	<i>B2m</i>	0,1357	<i>B2m</i>	0,1755
11	<i>TfR</i>	0,1619	<i>TfR</i>	0,2851

<sup>a</sup> A estabilidade é baseada na determinação da variação intra e inter-grupo combinada.

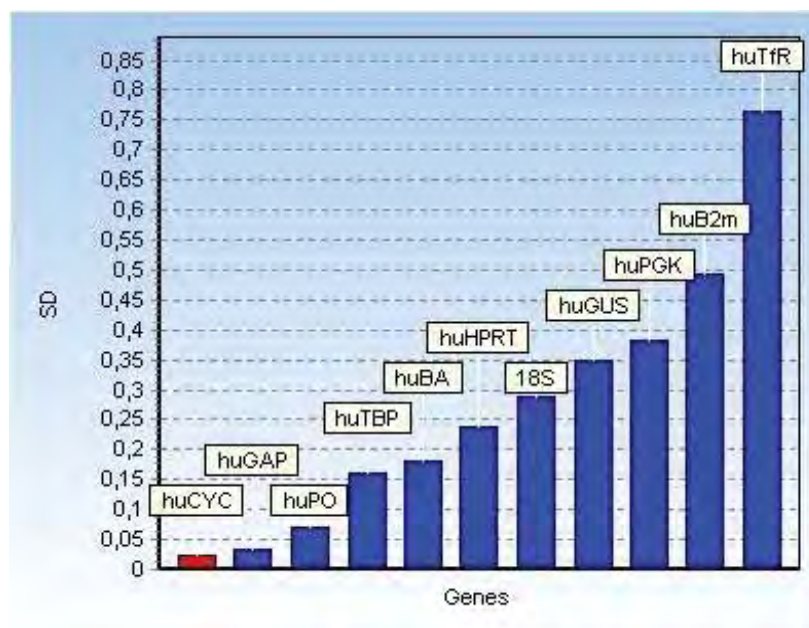
De acordo com o *NormFinder*, o gene *CYC* foi considerado o gene com expressão mais estável tanto para a linhagem MCF7 quanto para a MDA-MB-231 sendo o *GAPDH* o segundo mais estável (Figura IV.3 e IV.4). Também de acordo com os dois algoritmos, o emprego de dois genes normalizadores foi indicado como a condição ideal para o experimento (Figuras IV.5 e IV.6). Diante dessas análises, foi escolhido como melhor normalizador para o nosso design experimental e grupo amostral o gene *GAPDH*.



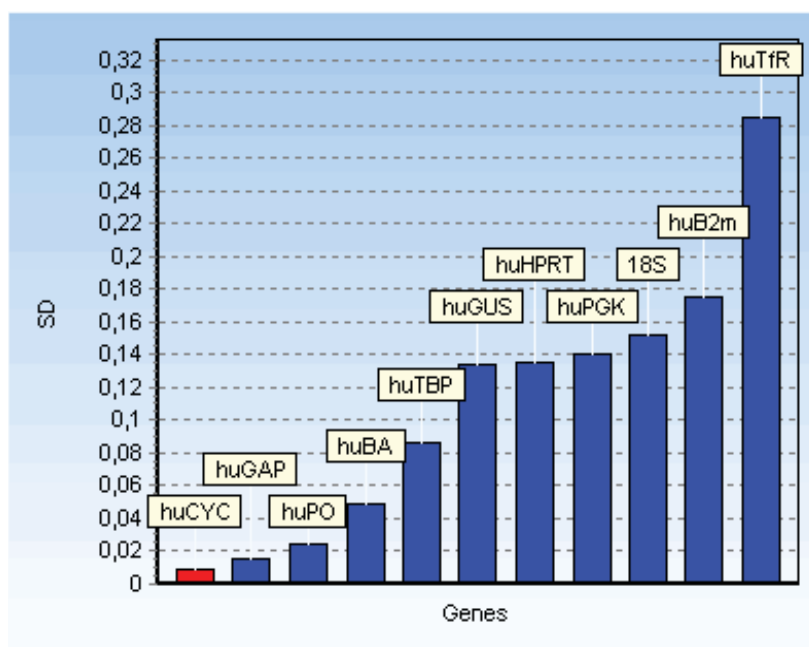
**Figura IV.1.** *Genorm*. Genes analisados na linhagem MCF7 ranqueados de acordo com o valor de M, sendo o par de melhores genes mostrado em vermelho.



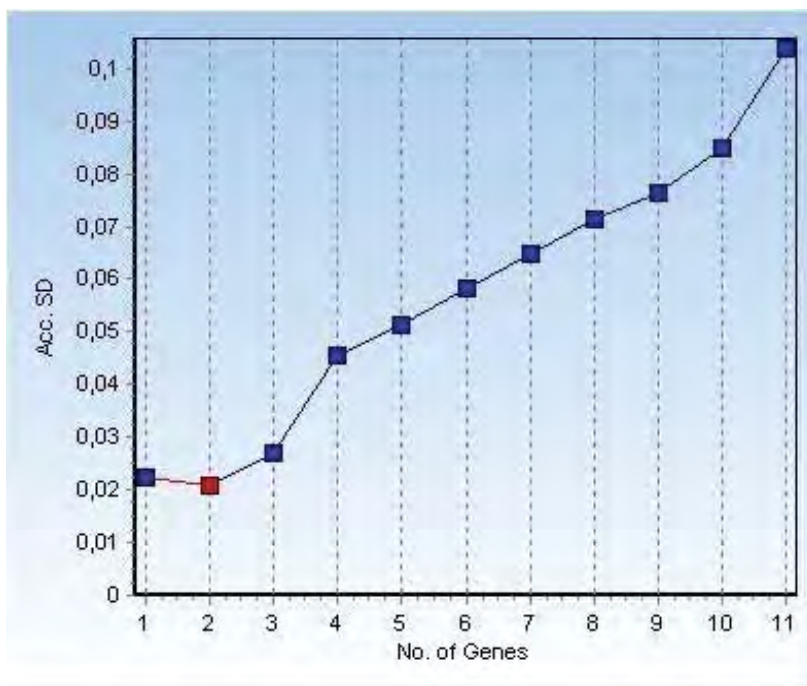
**Figura IV.2.** *Genorm*. Genes analisados na linhagem MDA-MB-231 ranqueados de acordo com o valor de M, sendo o par de melhores genes mostrado em vermelho.



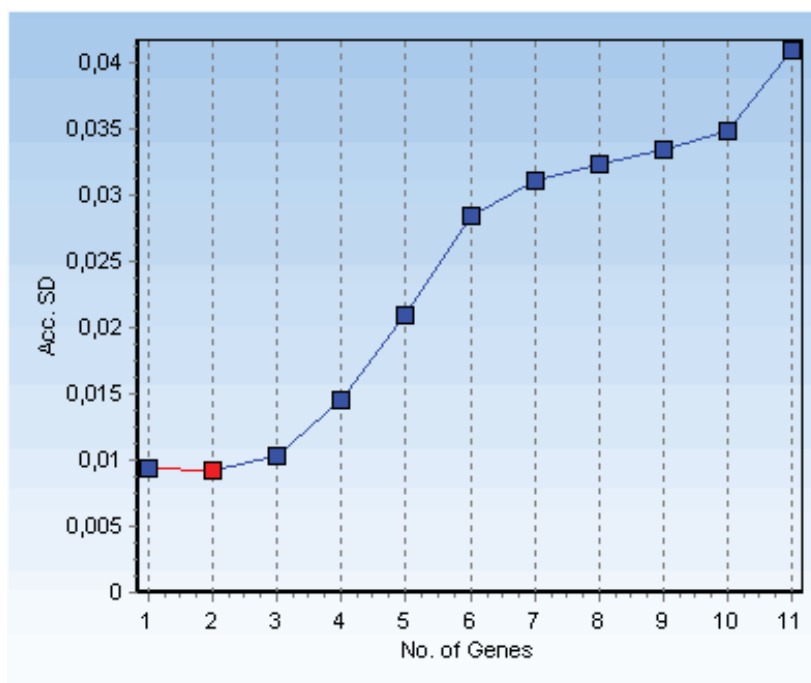
**Figura IV.3.** *NormFinder*. Genes analisados na linhagem MCF7 ranqueados de acordo com a maior estabilidade na expressão, sendo o gene mais estável mostrado em vermelho.



**Figura IV.4.** *NormFinder*. Genes analisados na linhagem MDA-MB-231 ranqueados de acordo com a maior estabilidade na expressão, sendo o gene mais estável mostrado em vermelho.



**Figura IV.5.** Número ideal de controles endógenos necessários para o grupo amostral testado (linhagem MCF7).



**Figura IV.6.** Número ideal de controles endógenos necessários para o grupo amostral testado (linhagem MDA-MB-231).

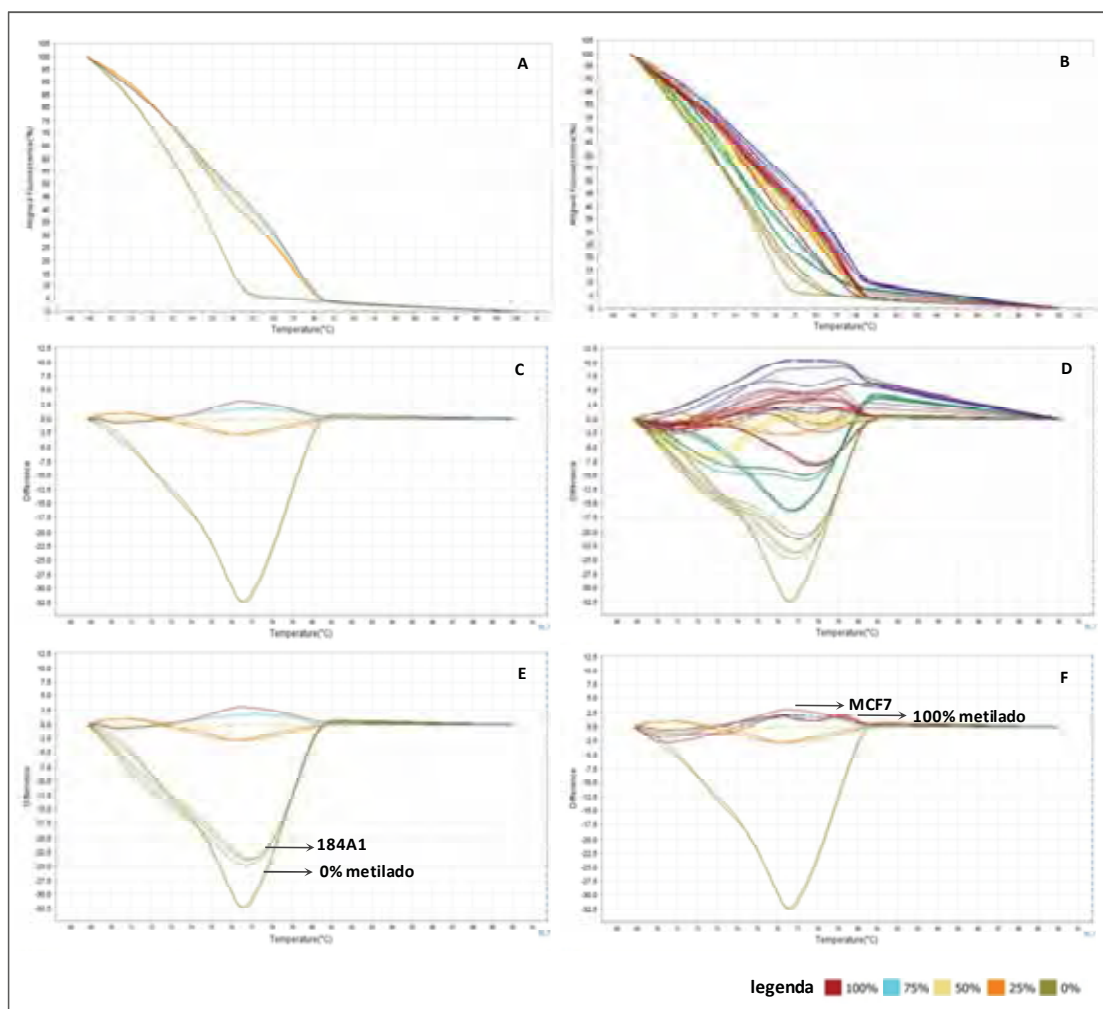
## APÊNDICE V

### **Análise semiquantitativa da metilação do DNA pela metodologia de High Resolution Melting (HRM)**

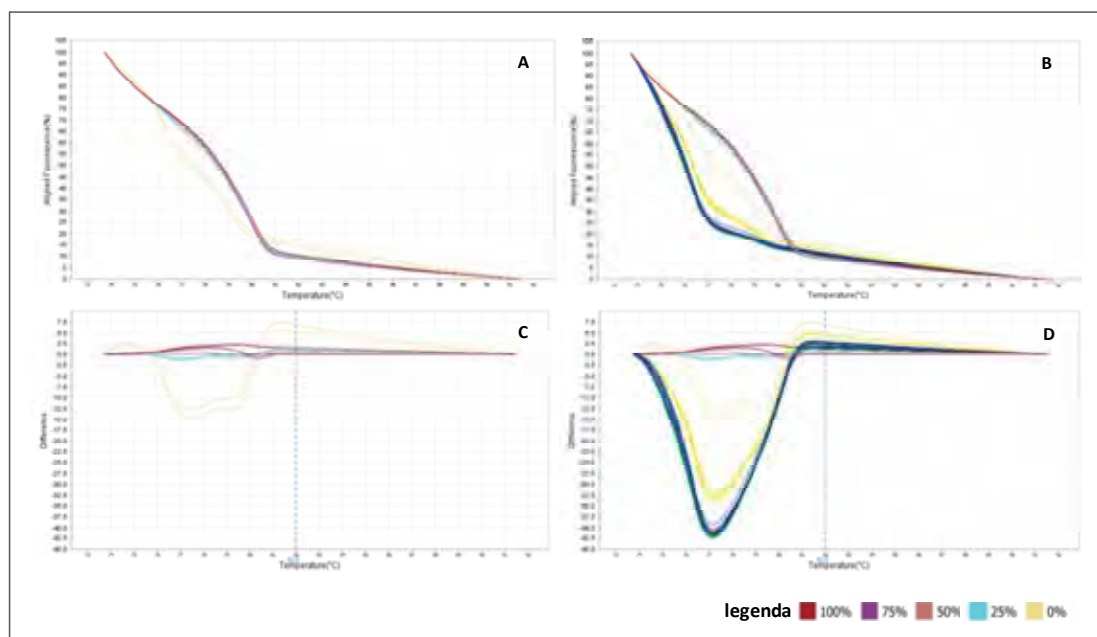
A modificação do DNA pelo bissulfito de sódio foi realizada com o EpiTect® Bisulphite Kit (Qiagen). Em seguida, 10ng de DNA modificado foram utilizados na amplificação pela PCR e na análise da curva de melting (*High Resolution Melting* - HRM) no equipamento *StepOne Real Time PCR System* (Applied Biosystems), segundo as recomendações do fabricante.

As reações de amplificação do DNA foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo 1X *MeltDoctor HRM Master Mix* (Applied Biosystems), 200nM de cada oligonucleotídeo iniciador e 10 ng do DNA modificado por bissulfito de sódio como molde. Foi construída uma curva padrão com porcentagens conhecidas de metilação (100, 75, 50, 25 e zero por cento) utilizando diluições de DNA hipermetilado padrão (*CpG Methylated HeLa Genomic DNA* - New England BioLabs) e de DNA não-metilado padrão (*Epiect Unmethylated Human Control DNA* - Qiagen), esta curva foi incluída em cada experimento para estimar a porcentagem de metilação das amostras. As reações de PCR da curva padrão de metilação foram realizadas em duplicata e as reações contendo as amostras em triplicatas. A amplificação foi conduzida sob as seguintes condições: 1 ciclo a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60° por 1 minuto seguidos pela curva de melting de alta resolução com 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, 95°C por 15 segundos e aquisição contínua de dados de 60 a 95°C à 0.3%. Os dados foram analisados utilizando o *High Resolution Melting Software* (Applied Biosystems). Os dados foram visualizados como curvas de *melting* normalizadas e plots da diferença de metilação (*difference plots*).

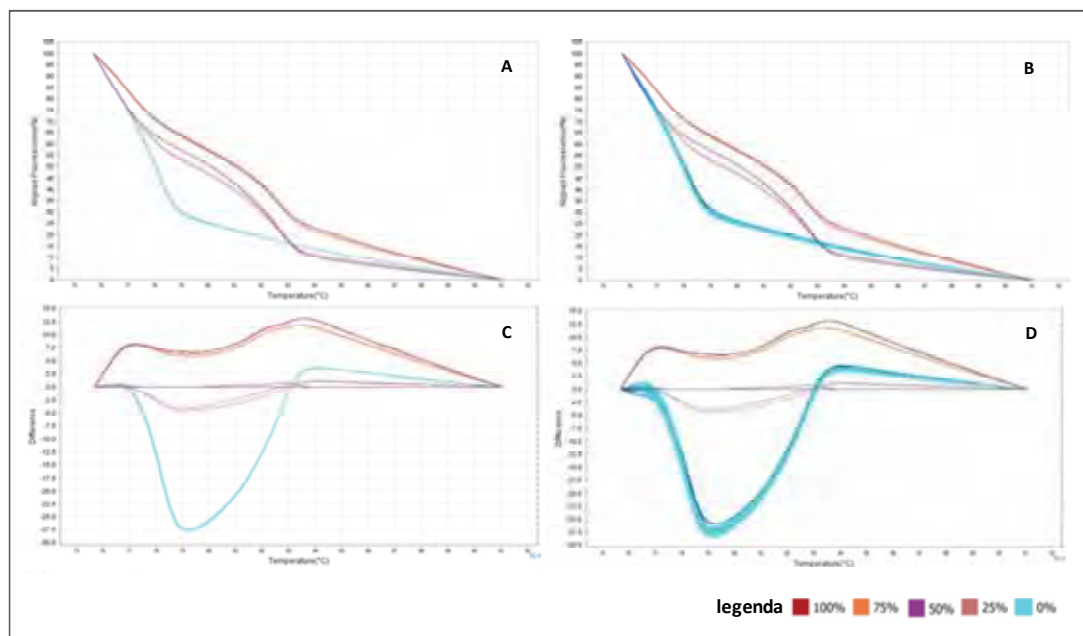
As figuras V.1-4 apresentam os gráficos com as curvas de amplificação normalizadas e com os *difference plots* referentes à análise da metilação do DNA dos genes *RASSF1*, *TMEM115*, *TUSC2* e *NPRL2* pela metodologia de HRM, realizada nas 20 linhagens celulares analisadas no presente trabalho.



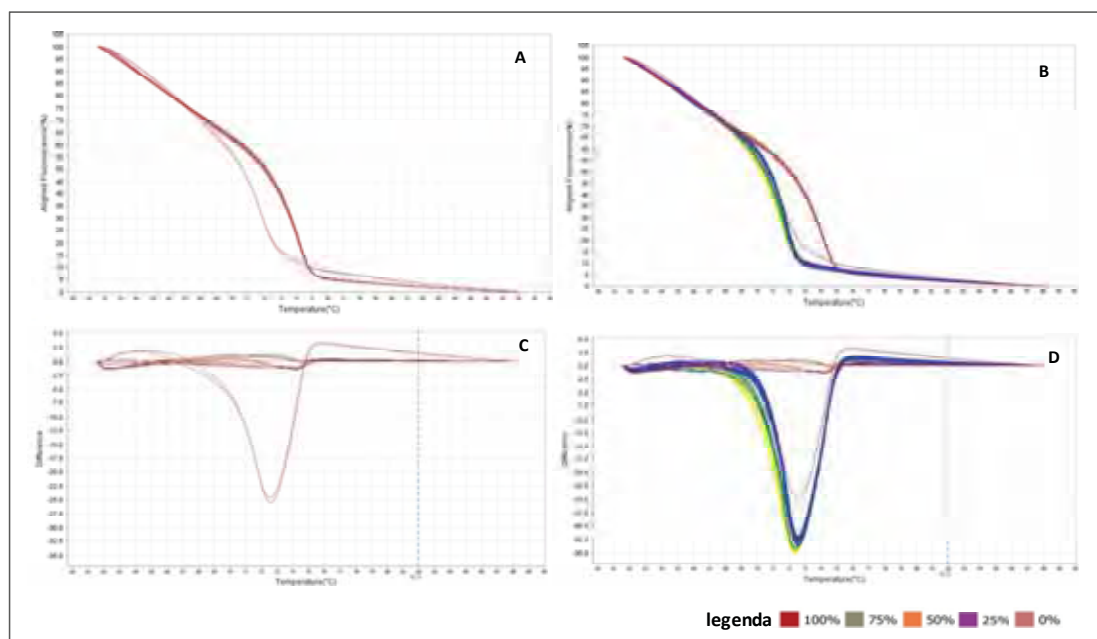
**Figura V.1.** Análise de HRM do gene *RASSF1*. Em **A** está apresentada a curva padrão com 100, 75, 50, 25 e 0% de metilação e em **B** também são mostradas as linhagens celulares; **C** e **D** apresentam os *difference plots* correspondentes; **E** apresenta o *difference plot* contendo a curva padrão e apenas a linhagem celular não-tumorigênica 184A1 com 0% de metilação (**E**) e apenas a linhagem celular tumorigênica MCF7 com 100% de metilação (**F**).



**Figura V.2.** Análise de HRM do gene *TMEM115*. Em **A** está apresentada a curva padrão com 100, 75, 50, 25 e 0% de metilação e em **B** também são mostradas as linhagens celulares; **C** e **D** apresentam os *difference plots* correspondentes. Todas as linhagens analisadas apresentaram 0% de metilação.



**Figura V.3.** Análise de HRM do gene *TUSC2*. Em **A** está apresentada a curva padrão com 100, 75, 50, 25 e 0% de metilação e em **B** também são mostradas as linhagens celulares; **C** e **D** apresentam os *difference plots* correspondentes. Todas as linhagens analisadas apresentaram 0% de metilação.



**Figura V.4.** Análise de HRM do gene *NPRL2*. Em **A** está apresentada a curva padrão com 100, 75, 50, 25 e 0% de metilação e em **B** também são mostradas as linhagens celulares; **C** e **D** apresentam os *difference plots* correspondentes. Todas as linhagens analisadas apresentaram 0% de metilação.

## APÊNDICE VI

### Análise do número de cópias do DNA por qPCR

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a análise do número de cópias dos genes *TUSC2*, *RASSF1*, *ZMYND10*, *NPRL2* e *TMEM115* foram os mesmos utilizados para as análises de imunoprecipitação da cromatina (ChIP). O número de cópias de cada gene alvo foi quantificado em relação a um *pool* de amostras de DNA obtidas de linfócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis (controles normais). Os dados de amplificação foram normalizados pelo gene *GAPDH*. Para a identificação de prováveis deleções nestes *loci*, foram considerados os valores abaixo do intervalo de confiança\* obtidos das amostras controles normais (média das réplicas  $\pm$  duas vezes o desvio-padrão).

**Tabela VI.1.** Determinação do número de cópias dos genes *TUSC2*, *RASSF1*, *ZMYND10*, *NPRL2* e *TMEM115* relativo ao número de cópias de um pool de DNA de voluntários saudáveis. Em cinza, estão evidenciadas as linhagens que apresentaram deleção.

Linhagens celulares	<i>TUSC2</i>	<i>RASSF1</i>	<i>ZMYND10</i>	<i>NPRL2</i>	<i>TMEM115</i>
184A1	0,91	0,56	1,10	0,62	0,87
184B5	0,43	0,29	0,41	0,54	0,50
BT-20	0,77	0,45	1,40	0,54	0,71
BT-474	0,59	0,28	0,81	0,45	0,75
BT-483	0,27	0,38	0,49	0,65	0,49
BT-549	0,63	1,02	1,35	1,61	1,63
Hs578t	0,68	0,86	1,27	1,57	1,30
MCF10A	0,77	0,56	1,24	0,74	0,97
MCF7	0,86	0,45	0,46	0,73	0,80
MDA-MB-134	0,71	1,00	1,27	1,69	1,50
MDA-MB-231	0,85	0,85	1,07	1,04	1,33
MDA-MB-361	0,42	0,25	0,88	0,42	0,41
MDA-MB-415	1,72	0,92	1,44	1,05	1,84
MDA-MB-436	0,48	0,36	0,72	0,43	0,57
MDA-MB-453	1,47	0,35	0,86	1,01	1,05
MDA-MB-468	0,78	0,88	1,17	1,21	0,96
SKBR3	0,52	0,45	0,70	0,96	0,73
T47	1,60	1,06	2,12	1,29	1,84
ZR-75-1	0,37	0,31	0,72	0,35	0,41
ZR-75-30	0,90	0,46	1,08	1,09	

Intervalo de confiança\*:  
*TUSC2* min: -0,06 max: 2,29  
*RASSF1* min: 0,45 max: 1,62  
*ZMYND10* min: 0,18 max: 1,94  
*NPRL2* min: 0,53 max: 1,52  
*TMEM115* min: 0,77 max: 1,24

## APÊNDICE VII

**Tabela VII. 1.** Quantificação relativa do nível de expressão dos dez genes nas 20 linhagens celulares após o tratamento isolado ou combinado com a agente desmetilante 5 azacitidina (Aza) e com inibidor das desacetilases de histonas (TSA).

	184A1	184B5	MCF10A	BT-20	BT-474	BT-483	BT-549	Hs578T	MCF7	MDA-MB-134	MDA-MB-231	MDA-MB-361	MDA-MB-415	MDA-MB-436	MDA-MB-453	MDA-MB-468	SKBR3	T47D	ZR-75-1	ZR-75-30
<b>SEMAB3</b>																				
controle	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
aza 1	2,21	0,92	0,83	0,98	3,63	2,62	1,20	1,44	15,64	1,65	0,34	3,50	2,14	1,22	6,06	2,02	5,07	1,35	10,39	0,43
aza 2	2,85	1,11	0,86	1,18	5,64	2,37	1,25	2,25	3,08	1,45	0,33	3,94	2,60	2,29	10,02	2,44	2,89	1,33	10,14	0,54
tsa 1	0,43	1,11	0,72	0,15	1,43	1,02	1,42	1,38	0,91	1,06	0,42	1,10	0,68	1,20	2,26	0,71	0,63	1,06	1,45	0,44
tsa 2	0,59	1,31	0,71	0,15	1,65	0,99	0,94	1,70	1,00	0,67	0,38	1,14	0,71	1,27	2,00	0,79	1,38	1,10	1,38	0,14
aza tsa1	1,18	1,25	0,81	1,65	3,22	2,28	1,53	2,17	3,35	0,84	0,62	4,81	1,83	2,35	6,62	2,81	10,27	1,79	5,13	0,90
aza tsa 2	1,16	1,12	0,79	1,23	3,13	2,28	1,79	1,70	3,21	1,11	0,78	5,66	2,11	1,74	5,93	2,52	2,38	1,74	5,46	0,65
<b>HYAL3</b>																				
controle	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
aza 1	1,00	2,79	2,05	1,15	1,25	1,18	2,42	1,87	1,13	0,85	3,77	2,04	1,65	1,70	1,90	5,44	2,03	1,36	4,38	0,72
aza 2	1,21	2,81	1,65	1,23	1,78	1,23	2,07	1,81	0,88	1,14	4,64	2,83	1,78	2,27	2,16	6,67	1,51	1,24	3,21	0,71
tsa 1	0,93	1,43	1,36	0,32	1,41	0,91	1,41	1,29	0,60	1,36	1,50	1,83	0,69	1,23	0,97	1,22	2,97	0,91	1,06	1,63
tsa 2	0,78	0,83	1,13	0,84	1,03	0,84	1,11	1,36	0,62	0,63	1,06	1,59	0,69	1,08	1,06	2,16	0,96	0,89	0,73	1,15
aza tsa1	1,15	2,65	3,19	1,04	5,04	0,85	2,95	2,64	0,73	0,84	3,45	2,85	1,41	1,83	3,28	4,69	2,07	1,11	1,98	1,07
aza tsa 2	0,82	2,61	2,46	1,20	3,67	0,64	2,87	2,53	0,86	0,86	3,29	3,32	1,37	1,99	1,19	5,14	1,20	1,01	1,12	1,27
<b>HYAL1</b>																				
controle	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
aza 1	126,60	63,46	93,12	7,01	5,44	26,09	62,32	6,07	27,81	11,85	8,13	21,24	2,37	17,27	76,51	6,81	14,70	8,47	32,07	3,59
aza 2	126,70	60,37	102,64	7,91	5,29	23,04	57,40	6,30	30,76	7,06	7,26	25,17	2,36	14,43	52,38	11,56	3,87	8,63	27,76	3,35
tsa 1	1,28	0,79	0,46	1,73	3,94	0,58	1,74	1,34	1,70	1,49	12,85	0,94	0,53	0,58	1,05	2,46	11,63	1,52	0,62	1,65
tsa 2	1,12	1,12	0,79	1,47	2,85	1,24	1,45	0,92	1,35	1,54	1,00	0,63	0,53	0,63	0,82	4,13	0,79	1,46	0,43	2,89
aza tsa1	136,91	59,88	120,70	8,10	58,57	46,31	52,17	9,16	33,15	8,86	6,63	23,19	1,32	26,94	116,22	7,75	17,91	9,01	20,37	4,22
aza tsa 2	81,80	41,80	119,11	8,28	29,82	36,12	50,10	8,25	31,66	13,48	7,26	34,65	1,96	25,75	34,74	15,38	3,05	7,02	15,81	3,72



<b>ZMYND10</b>																				
controle	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
aza 1	0,86	1,15	1,12	1,54	4,55	1,15	1,01	1,71	1,09	0,42	1,76	2,71	1,59	5,23	1,24	0,87	4,25	1,28	1,88	0,76
aza 2	0,99	1,80	1,04	1,61	7,64	1,23	0,98	1,76	0,89	0,16	1,42	2,44	1,77	7,66	1,64	1,16	3,63	1,27	2,12	0,80
tsa 1	0,62	0,23	1,19	1,46	12,36	0,81	1,12	1,57	0,63	0,55	2,22	1,59	0,92	0,72	1,32	1,28	5,88	1,20	1,57	4,73
tsa 2	0,44	0,27	0,85	1,63	24,73	0,70	1,06	1,74	0,52	0,87	1,74	1,64	0,91	1,26	1,25	1,23	1,16	1,22	1,43	5,29
aza tsa1	0,82	2,00	1,45	1,13	56,26	0,54	0,60	2,57	0,44	0,60	2,28	2,15	1,17	8,91	1,04	2,80	4,97	0,71	2,69	2,01
aza tsa 2	0,50	1,30	1,42	1,10	47,86	0,40	0,70	2,34	0,49	0,66	2,26	2,72	0,78	6,00	0,82	2,39	1,79	1,00	2,30	1,02
<b>TUSC4</b>																				
controle	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
aza 1	0,83	1,19	1,39	1,13	1,57	0,95	0,93	1,77	2,35	1,06	1,46	1,01	1,28	2,14	1,54	1,41	1,44	1,03	2,63	0,83
aza 2	0,89	1,12	1,90	1,06	1,91	0,86	1,00	1,40	1,48	0,94	1,42	1,18	1,41	2,62	1,74	1,89	1,75	1,16	2,70	1,26
tsa 1	0,97	1,28	1,21	1,29	1,18	0,69	1,28	1,38	0,98	1,11	0,92	0,95	0,83	1,14	1,15	1,17	3,89	0,96	2,52	2,89
tsa 2	0,50	0,90	1,00	1,06	1,10	0,65	0,97	1,02	0,70	0,84	1,00	0,87	0,82	1,34	1,27	1,12	1,09	1,16	2,25	2,45
aza tsa1	0,87	1,39	1,86	1,98	2,23	0,58	1,16	1,60	1,06	1,00	1,26	2,00	1,36	2,84	1,54	1,99	3,96	1,49	2,05	0,95
aza tsa 2	0,76	1,38	1,40	1,98	1,81	0,58	1,08	1,50	1,25	0,85	1,21	1,46	1,45	2,76	1,22	2,03	1,85	1,55	1,50	1,00
<b>TMEM115</b>																				
controle	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
aza 1	1,07	1,40	0,97	1,07	1,23	1,22	1,16	1,22	1,14	1,21	1,44	1,67	1,63	1,03	1,38	2,60	1,68	2,12	2,25	0,58
aza 2	1,16	1,29	1,13	1,08	1,46	1,16	1,13	1,25	0,95	1,12	4,06	1,81	1,42	1,65	2,58	3,10	1,22	1,82	2,08	0,46
tsa 1	1,05	1,45	0,78	0,80	1,92	0,91	1,26	1,13	1,22	1,06	1,09	1,26	0,94	0,84	1,04	1,16	2,27	1,62	2,13	0,77
tsa 2	0,88	1,17	1,18	0,85	1,66	0,90	1,10	0,93	0,71	1,11	1,12	1,05	0,93	0,99	1,09	1,10	0,69	1,63	1,84	0,57
aza tsa1	1,21	1,74	1,27	1,23	2,37	0,98	1,47	1,32	0,09	1,08	1,42	1,84	1,65	1,73	1,52	2,99	3,44	3,22	2,84	0,54
aza tsa 2	0,98	1,65	1,26	1,31	2,08	0,93	1,44	1,35	2,04	1,05	1,46	2,49	2,05	1,48	1,50	3,52	1,29	3,40	2,97	0,51
<b>CACNA2D2</b>																				
controle	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
aza 1	5,42	5,35	36,54	2,43	1,17	0,70	9,53	2,70	0,84	0,48	2,12	1,13	0,78	1,65	2,09	1,70	12,76	3,24	1,64	0,56
aza 2	10,60	8,31	20,28	2,34	1,67	0,52	9,23	3,55	1,25	0,87	2,73	1,24	0,68	3,28	3,58	2,34	4,70	3,67	1,80	0,54
tsa 1	0,85	1,70	1,26	0,46	1,72	0,86	2,70	1,93	0,70	0,79	3,17	0,94	0,55	1,16	1,09	1,28	11,75	1,44	1,95	0,79
tsa 2	0,58	0,96	0,83	0,69	1,82	0,88	1,38	1,76	0,56	0,53	3,32	1,11	0,49	1,11	0,93	1,10	1,21	1,88	2,47	0,73
aza tsa1	7,68	14,55	54,30	2,44	2,36	0,33	13,53	3,28	0,79	0,73	15,91	2,06	0,82	3,76	1,33	12,46	18,79	4,69	1,56	0,65
aza tsa 2	9,79	22,36	47,85	1,81	2,59	0,38	14,09	5,02	1,00	0,41	10,07	1,88	0,70	3,84	2,20	7,32	4,83	4,44	1,10	0,52