



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À
SAÚDE

NARA BARBOSA ARAÚJO

ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

RECIFE

2015

NARA BARBOSA ARAÚJO

**ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito exigido para obtenção de título de Mestre.

Orientação: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho – Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, LIKA/UFPE.

Co-orientação: Prof(a). Dr(a). Danyelly Bruneska Gondim Martins – Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, LIKA/UFPE.

RECIFE

2015

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Araújo, Nara Barbosa

Análise do perfil de metilação do DNA em pacientes com câncer de mama
/ Nara Barbosa Araújo. – Recife: O Autor, 2015.

67 f.: il.

Orientadores: José Luiz de Lima Filho, Danyelly Bruneska
Gondim Martins

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia
Aplicada à Saúde, 2015.

Inclui referências

1. Mamas – Câncer 2. Genética médica I. Lima Filho, José Luiz de (orient.) II. Martins, Danyelly Bruneska Gondim (coorient.) III. Título.

NARA BARBOSA ARAÚJO

**ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito exigido para obtenção de título de Mestre.

Aprovado em 31 de Março de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Orientador

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão Membro
Membro interno

Dr(a). Carla Limeira Barreto
Membro externo

RECIFE

2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço sobretudo a Deus, por sempre me dar forças nos momentos mais difíceis e por me fazer acreditar que tudo o que me reserva é o melhor para mim;

Aos meus pais por todo o apoio que sempre recebi, por sempre caminharem ao meu lado nas situações mais prazerosas e também nas mais difíceis, por vibrarem comigo em cada conquista alcançada e sofrerem junto por cada lágrima derramada. A vocês, o meu amor incondicional!

À minha irmã, por todo o amor e cuidado de irmã mais velha e por ser minha amiga “de sempre”, mesmo sendo o oposto de mim;

Ao meu namorado, Jean, pelo amor que tem por mim, por ser meu exemplo de dedicação, pela compreensão nos momentos em que não pude dar atenção, principalmente na fase final deste trabalho, e por me ensinar a ser um pouco mais racional nos momentos necessários;

Ao meu orientador, Prof. José Luiz, por ter me acolhido de volta ao LIKA, por ter aceitado me orientar e por ter me confiado a realização deste trabalho. Para mim é uma honra tê-lo como orientador!

À minha co-orientadora, Prof.(a) Danyelly Bruneska, pela orientação do dia-a-dia a qual possibilitou o desenvolvimento deste trabalho;

À Prof.(a) Maria da Paz, minha querida orientadora de IC e minha “mãe” no LIKA, por todo o carinho ao longo desses anos e por sempre rezar por mim;

À Roberta, por todos os momentos compartilhados ao longo desses dois anos, desde as risadas (que foram muitas), até os aperreios (que também foram muitos). Você foi para mim não apenas uma amiga, mas uma irmã, pois ninguém é capaz de entender melhor o que o outro passa do que um irmão;

A toda a equipe de mastologia do Hospital Barão de Lucena, especialmente ao Dr. Darley Ferreira, pela parceria firmada com o LIKA, por ter nos acolhido da melhor forma e por nos possibilitar a rica experiência da rotina no serviço e da vivência com as pacientes;

A todos os residentes da mastologia, especialmente Eduardo, pelo acolhimento, pelo interesse demonstrado pela pesquisa e pela incomensurável ajuda na obtenção das amostras e dos laudos;

A todas as pacientes que aceitaram participar dessa pesquisa, doando não só suas amostras, mas também parte do seu tempo durante aquele momento tão difícil e sofrido que estavam vivendo. Especialmente a Sílvia, que como tantas outras, nos deram uma lição de vida, mostrando que é possível sorrir, mesmo diante das dificuldades;

À Elisa e Lígia pela disponibilidade e pela valiosa colaboração para o desenvolvimento experimental desse trabalho;

À Sandra, pela imensa disponibilidade em sempre nos ajudar, pela amizade, pela torcida para que tudo desse certo e pelos momentos leves e alegres vividos no laboratório;

A todos os colegas e amigos que fazem parte do grupo Prospecmol, especialmente Fabrício, Monique e Taciana, pelas experiências compartilhadas e pela disponibilidade em ajudar;

À Eliete pela amizade, pelos avisos em relação aos prazos, pelas informações e por ser para sempre PPGBAS;

Aos meus queridos amigos do mestrado, especialmente Matheus e Thiago, pelo companheirismo e pelos prazerosos momentos vividos ao longo desses dois anos;

Às queridas amigas e colegas de profissão, Aleide, Fernanda e Rosário, pela certeza de que posso sempre contar com vocês;

A todos os meus amigos, em especial Ylissa e Abdiel que, mesmo sem entender o que eu faço, valorizam, acreditam, torcem e vibram por mim;

A todos vocês, os meus sinceros agradecimentos.

**“Por mais inteligente que alguém possa ser,
se não for humilde, o seu melhor se perde na
arrogância. A humildade ainda é a parte
mais bela da sabedoria.”**

Autor Desconhecido

RESUMO

O câncer de mama é o câncer mais comum e a principal causa de morte por câncer entre as mulheres, em todo o mundo. Diferentes mutações têm sido relacionadas ao câncer, mas apenas as mutações não conseguem esclarecer a heterogeneidade do câncer de mama. Desta forma, eventos epigenéticos têm sido estudados em tecido mamário cancerígeno. A metilação do DNA é a regulação epigenética mais estudada e bem compreendida, sendo catalisado pelas enzimas da família das DNA Metiltransferases; principalmente DNMT1, DNMT3A, e DNMT3B. Além disso, DNMT2 (TRDMT1), inicialmente considerada como um membro desta família foi mais tarde descrita como uma tRNA metiltransferase e, até o momento, pouco se sabe sobre a sua função. O objetivo deste estudo foi determinar o perfil de metilação do DNA em 31 pacientes com câncer de mama ductal invasivo e 04 tecidos saudáveis obtidos a partir da mama oposta. Os níveis globais de metilação foram observados por meio de um ensaio de ELISA, enquanto que os níveis de expressão das DNMTs (DNMT1, DNMT2 e DNMT3B) foram determinados por PCR em tempo real. Os níveis de expressão gênica também foram analisados para BRCA1, BRCA2, ERBB2 e ERBB4. Todos estes parâmetros foram correlacionados com os dados dos pacientes e as características intrínsecas dos tumores. Nossos resultados mostram que a metilação global em tumores de mama é significativamente menor em comparação com os tecidos saudáveis da mama ($p = 0,0034$). DNMT1 e DNMT3B foram mais expressos no tecido de carcinoma mamário ($p = 0,0034$; $p = 0,0031$, respectivamente), sendo o nível de DNMT3B significativamente maior ($p = 0,0391$) do que o nível de DNMT1. Apenas DNMT1 exibiu uma correlação com a metilação global, apesar de ser inversa. Além disso, a expressão das DNMTs apresentou uma forte correlação positiva com BRCA1 e apenas a DNMT2 mostrou estar relacionada com BRCA2. Pacientes submetidos a terapias adjuvantes apresentaram uma diminuição significativa na expressão de DNMT2 ($p = 0,0013$), indicando uma redução dos níveis de metilação em moléculas de tRNA. História familiar de câncer de mama foi a única variável independente que se correlacionou com os níveis de DNMT1 ($p = 0,0043$), sendo maior em pacientes com risco hereditário. Nossos resultados apontam para um importante papel das DNMTs no câncer de mama e mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos subjacentes envolvidos no processo de metilação que contribuem para o desenvolvimento e progressão do câncer de mama.

Palavras-chave: *câncer de mama; DNA metiltransferases; metilação do DNA; metilação global*

ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer and the leading cause of cancer deaths among women worldwide. Different mutations were related to breast cancer, but only their presence cannot explain the heterogeneity of this cancer. Then, epigenetic events have been studied in breast cancer tissues. DNA methylation is the most studied and well-understood epigenetic regulation, being catalysed by DNA methyltransferases family; mainly DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B. Besides, DNMT2 (DNMT1), initially thought to be a member of this family, was later described as a RNA methyltransferase and so far, little is known about its function. The aim of this study was to determine the DNA methylation profile in 31 patients with Invasive Ductal Breast Cancer and 04 healthy tissues obtained from the opposite breast. Tests were performed for global methylation levels through an ELISA assay and for the expression levels of DNMTs (DNMT1, DNMT2 and DNMT3B) by real-time PCR. Gene expression was also analysed for BRCA1, BRCA2, ERBB2 and ERBB4. All these parameters were correlated with patient's data and intrinsic characteristics of the tumours. Our results show that global methylation in breast tumours is significantly lower compared to breast healthy tissues ($p=0.0034$). DNMT1 and DNMT3B ($p=0.0034$; $p=0.0031$, respectively) showed high expression in breast cancer tissue, being DNMT3B level significantly higher ($p=0.0391$) than DNMT1 level. Only DNMT1 exhibit a correlation with the global methylation, despite inversely related. In addition, DNMTs presented a tightly positive correlation with BRCA1 and only DNMT2 seems to be related with BRCA2. Patients submitted to adjuvant therapies showed a significant decrease in DNMT2 expression ($p=0.0013$), indicating reduced methylation levels in tRNA molecules. Family history of breast cancer was the only independent variable that correlated to DNMT1 level ($p=0.0043$), being higher in patients with hereditary risk. Our results point to an important role of DNMTs in breast cancer and further studies are necessary to elucidate the underlying mechanisms involved in methylation process, contributing to breast cancer development and progression.

Keywords: *breast cancer; DNA methylation, DNA methyltransferases; global methylation*

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Incidência dos principais tipos de câncer em todo mundo..... Erro! Indicador não definido.

Quadro 2: Mortalidade dos principais tipos de câncer em ambos os sexos Erro! Indicador não definido.

Quadro 3: Mortalidade dos principais tipos de câncer, em todo o mundo, em mulheres. . Erro! Indicador não definido.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 em mulheres, exceto câncer de pele não melanoma. **19**
- Tabela 2:** Parâmetros utilizados para a classificação patológica pelo sistema TNM **25**
- Tabela 3:** Tabela com lista de genes descritos como hipermetilados no câncer de mama. **35**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Arquitetura da mama normal..	20
Figura 2: Eventos patológicos envolvidos no processo de neoplasia mamária ductal.	21
Figura 3: Cortes Histológicos de alguns dos tipos de câncer de mama.....	21
Figura 4: Marcação de ER, PR e HER2 por IHC.	22
Figura 5: Esquema resumindo os conceitos de biomarcador, marcador genético, e determinantes gênicos no câncer.	26
Figura 6: Espectro clínico do câncer de mama e potenciais usos dos marcadores tumorais). .	27
Figura 7: Esquema representando Via clássica de sinalização do ER α e as diferentes terapias alvo que atuam nesta via.....	28
Figura 8: Vias de sinalização do HER2 e sítios de atuação do Pertuzumab e Trastuzumab....	30
Figura 9: Estrutura química da citosina e esquema do processo de metilação catalizado por DNMT	33
Figura 10: Esquema representando o perfil de metilação de uma célula normal e o perfil aberrante de metilação em uma célula tumoral.	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5mC	5 Metil Citosina
AI	Inibidor da Aromatase
AJCC	American Joint Committee
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CLI	Carcinoma Lobular Invasivo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNMT	DNA Metil-Transferase
ER	Receptor de Estrógeno
ERE	Elemento de Resposta ao Estrógeno
FDA	Federal Drug Administration
HDAC	Histone deacetylase
HER2	Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano 2
HR	Via de Reparo por Recombinação Homóloga
IHC	Imuno-Histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MBD	Methyl-Binding Domain Proteins
NHEJ	Via de Reparo Não-Homóloga
NIH	National Institutes of Health
NISS	Nuclear-Initiated Steroid Signaling

NPI	Nottingham Prognostic Index
P13K- AKT	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PR	Receptor de Progesterona
RT-PCR	Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction
SAM	S-Adenosil Metionina
UICC	Union International Contre le Cancer

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA	17
2.2. ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA	19
2.3. ASPECTOS CLÍNICOS – PATOLÓGICOS	23
2.4. ASPECTOS MOLECULARES.....	25
2.4.1. Receptores Hormonais.....	27
2.4.2. Fator de Crescimento Epidermal Humano – ERBB2 / HER2.....	29
2.4.3. Genes BRCA	30
2.5. ASSINATURAS GENÉTICAS	31
2.6. EPIGENÉTICA	32
2.7. EPIGENÉTICA & CÂNCER.....	34
3. REFERÊNCIAS	37
4. OBJETIVOS	43
4.1. OBJETIVO GERAL.....	43
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
5. ARTIGO	44
INTRODUCTION	45
MATERIAL AND METHODS.....	46
RESULTS.....	48
DISCUSSION.....	50
CONCLUSIONS	52
6. CONCLUSÃO.....	67

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres em todo o mundo e também o que mais mata. Compreende uma doença heterogênea, com diferentes características moleculares e celulares; comportamento clínico variável; diferentes taxas de sobrevivência, incidência e resposta à terapêutica. A genética clássica sozinha não é capaz de explicar essa tamanha diversidade de fenótipos. O câncer de mama, assim como outros tipos de câncer, tem sido considerado como uma doença epigenética ao mesmo nível em que é considerado uma doença genética (ABDEL-HAFIZ & HORWITZ, 2015; BERTOS & PARK, 2011; ESTELLER & HERMAN, 2002).

Epigenética é definido como alterações hereditárias na expressão de genes sem que, no entanto, ocorra uma mudança na sequência de DNA (CHUANG & JONES, 2007). A metilação do DNA é o mecanismo de regulação epigenética mais estudado e bem compreendido, exercendo importante função na regulação de genes, no desenvolvimento e na carcinogênese. Este consiste na adição covalente de um grupamento metil ao carbono 5 do anel de citosina, o que resulta na 5-metilcitosina (ESTELLER, 2008). Duas mudanças paradoxais nos padrões de metilação do DNA coexistem nos cânceres humanos: uma hipometilação global e uma hipermetilação nas regiões promotoras dos genes (SHUKLA *et al.*, 2010). Apesar de a hipometilação global do DNA ter sido a primeira alteração epigenética a ser identificada em células cancerosas quando comparada com células normais, a hipermetilação na região promotora de genes específicos tem sido mais extensivamente estudada (FEINBERG & TYCKO, 2004).

DNA metiltransferases (DNMTs) são as enzimas que catalisam a adição de grupos metilo de resíduos de citosina no DNA. Cinco isoformas de DNMTs fazem parte desta família de enzimas - DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B, e DNMT3L - mas apenas DNMT1, 3A, 3B metilam DNA (FOULKES *et al.*, 2012). DNMT1 é responsável pela manutenção dos padrões de metilação do DNA durante a divisão celular e tem sido implicada no processo de metilação global. DNMT3A e 3B parecem mediar a metilação *de novo* do DNA e têm sido correlacionadas com a hipermetilação das regiões promotoras dos genes (SIEDLECKI & ZIELENKIEWICZ, 2006). Vários estudos têm mostrado perfil diferente de expressão das DNMTs em uma variedade de tipos de câncer, principalmente nos níveis DNMT1 e DNMT3B (GIRAULT *et al.*, 2003). Apesar de apresentar homologia de sequência com as

enzimas da família DNMT, DNMT2 não metila DNA, mas em vez disso metila uma citosina específico em tRNA-Asp e tem sido chamada alternativamente tRNA aspártico metiltransferase 1 (TRDMT1) (FOULKES *et al.*, 2012; GOLL *et al.*, 2006). DNMT2 é altamente conservada entre espécies, sugerindo um importante papel na manutenção da homeostase celular. Embora pouco ainda se conheça sobre a função exata desta enzima, a expressão de DNMT2 também mostrou ser alterada em tecido cancerígeno (ELHARDT *et al.*, 2015;. SCHAEFER *et al.*, 2009).

Uma lista cada vez maior de genes supressores tumorais tem sido descritos como silenciados no câncer de mama por metilação das ilhas CpG localizadas na região promotora, propiciando o crescimento e a sobrevivência de células, resultando em iniciação e progressão tumoral (XIANG *et al.*, 2011; ESTELLER, 2007). Entre eles, o BRCA1, gene envolvido no reparo do DNA, tem sido amplamente descrito como silenciados por metilação do promotor no câncer de mama (STEFANSSON *et al.*, 2011; TAPIA *et al.*, 2008; ESTELLER 2007; ESTELLER *et al.*, 2000). Além disso, o ERBB4/HER4, um receptor de tirosina-quinase pertencente à família dos receptores do fator de crescimento epidermal humano, foi descrito como tendo função de supressor tumoral e como estando epigeneticamente silenciado em tumores da mama por meio da hipermetilação do promotor (FUJIWARA *et al.*, 2014; DAS *et al.*, 2010).

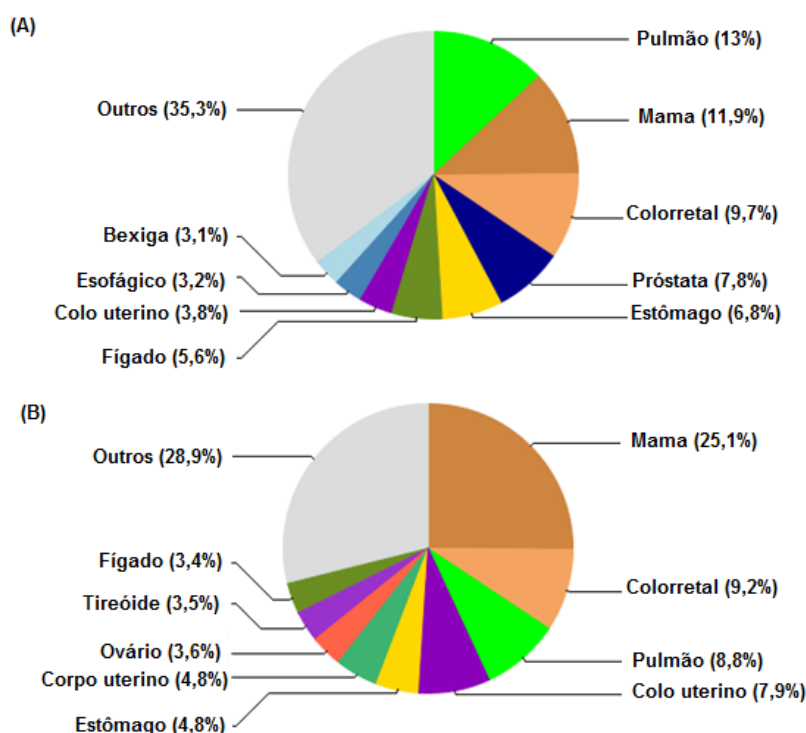
Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os níveis de expressão de DNMT1, DNMT2 e DNMT3B em tumores de mama, a sua associação com os processos de metilação globais; o efeito destas moléculas sobre os genes BRCA1, BRCA2, ERBB2 e ERBB4 e sua influência nas características intrínsecas das pacientes e dos tumores.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

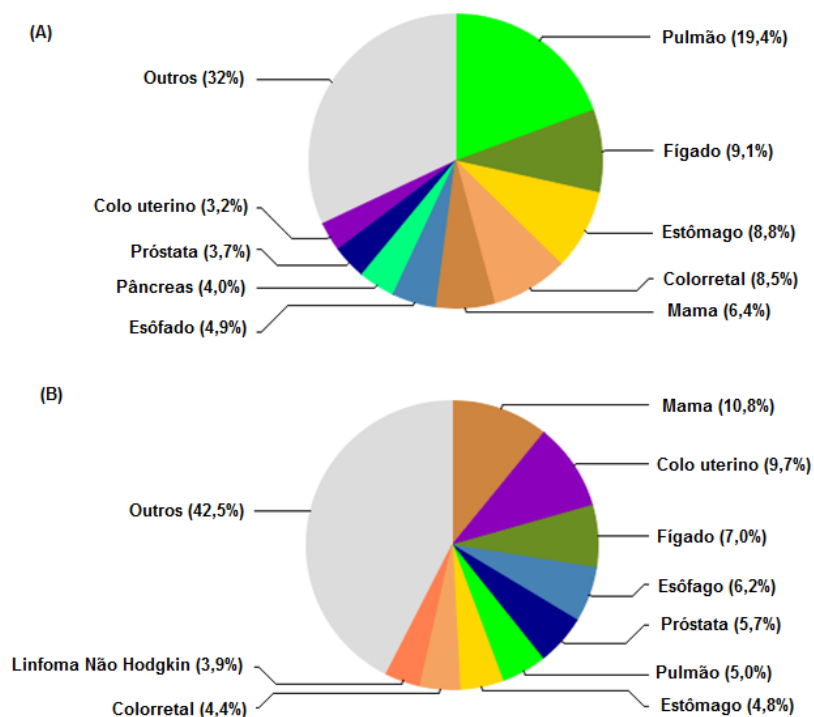
O câncer de mama é, a nível global, o segundo tipo de câncer mais comum, estando atrás apenas do câncer de pulmão, (Gráfico 1A) sendo o tipo de câncer mais frequente entre as mulheres (Gráfico 1B). De acordo com estimativas do projeto GLOBOCAN 2012, são esperados para o ano de 2015 o surgimento de aproximadamente 1,79 milhões de casos novos de câncer de mama em todo o mundo (FERLAY *et al.*, 2013).

Quadro 1: Incidência dos principais tipos de câncer em todo mundo: (A) em ambos os sexos; (B) em mulheres (GLOBOCAN, 2012).

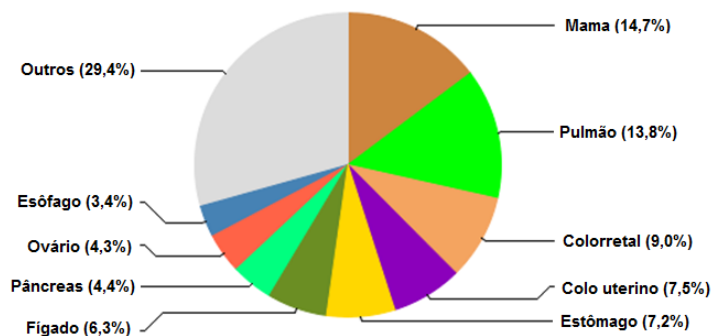


Quanto à mortalidade, é classificado em todo o mundo como a quinta causa de morte por câncer em geral (Gráfico 2A) e a maior causa de morte por câncer nos países em desenvolvimento, em ambos os sexos (Gráfico 2B). Em relação às mulheres, é a maior causa de morte por câncer em todo o mundo, com cerca de 520 mil mortes estimadas para o ano de 2012 (FERLAY *et al.*, 2013) (Gráfico 3).

Quadro 2: Mortalidade dos principais tipos de câncer em ambos os sexos: (A) em todo o mundo; (B) nos países em desenvolvimento (GLOBOCAN, 2012).



Quadro 3: Mortalidade dos principais tipos de câncer, em todo o mundo, em mulheres (GLOBOCAN, 2012).



No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, que é válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 57.120 casos novos de câncer de mama, o que corresponde a uma incidência de 20,8% em relação aos 10 tipos de câncer mais incidentes em mulheres (Tabela 1), com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres. Em relação aos estados brasileiros, estima-se para Pernambuco a incidência de 2.450 casos novos de câncer de mama para 2014, o que corresponde ao estado com a 7ª maior incidência, ficando atrás apenas de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná e

Bahia. Em Recife, a incidência de câncer mama por 100 mil habitante, estimada para o ano de 2014, é comparável àquela estimada para a capital paulista, sendo de 90,25 e 91,21, respectivamente. Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico se for 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 estágios avançados (INCA, 2014).

Tabela 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 em mulheres, exceto câncer de pele não melanoma (INCA 2014).

	Localização primária	casos	%
Mulheres 	Mama Feminina	57.120	20,8%
	Cólon e Reto	17.530	6,4%
	Colo do Útero	15.590	5,7%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
	Glândula Tireoide	8.050	2,9%
	Estômago	7.520	2,7%
	Corpo do Útero	5.900	2,2%
	Ovário	5.680	2,1%
	Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
	Leucemias	4.320	1,6%

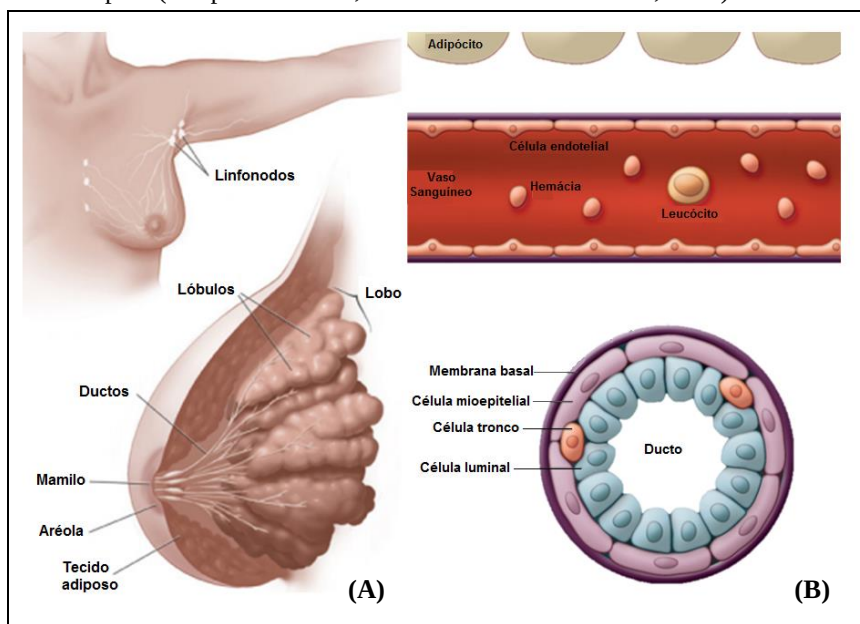
2.2. ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA

Embora o câncer de mama seja muitas vezes considerado como uma única doença, este corresponde na verdade a um grupo de tumores bastante heterogêneos e complexos, com diferentes características clínicas, cursos de doença, respostas a tratamentos específicos, distintos graus de agressividade e diferentes prognósticos, que, no entanto, afetam o mesmo órgão anatômico e podem ter origem na mesma estrutura anatômica. Características tumorais intrínsecas, incluindo as classificações histológicas e imunopatológicas clássicas, bem como subtipos moleculares mais recentemente descritos, separam os tumores de mama em distintos e variados grupos (BERTOS & PARK, 2011).

Para entender como tal variação decorre, é necessário conhecer a arquitetura mamária normal. A mama é composta de lóbulos e ductos, cada mama tem 15 a 20 lobos, cada lobo, por sua vez, é formado por um conjunto de lóbulos, os quais possuem glândulas responsáveis pela fabricação do leite. Os lobos, lóbulos e glândulas mamárias, se conectam com o mamilo através de finos ductos (NIH, 2012) (Figura 1A).

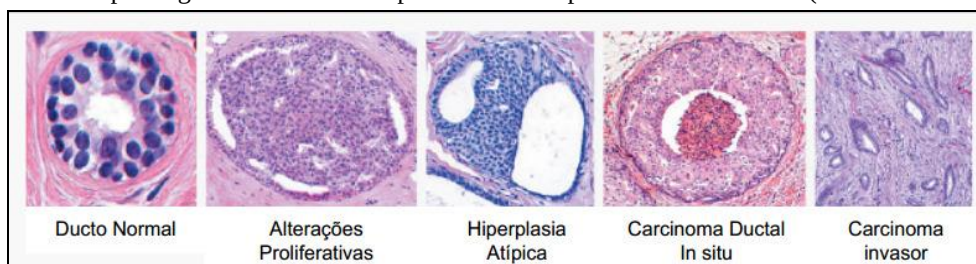
Histologicamente, lóbulos e ductos são revestidos por uma única camada de células epiteliais luminais, cercados transversalmente por células mioepiteliais. Estas estruturas são separadas do tecido circundante, ou estroma, por uma membrana basal (PINDER & ELLIS, 2003) (Figura 1B).

Figura 1: Arquitetura da mama normal. (A) Nível Macroscópico (B) Nível Microscópico (Adaptada de NIH, 2012 e BERTOS & PARK, 2011).



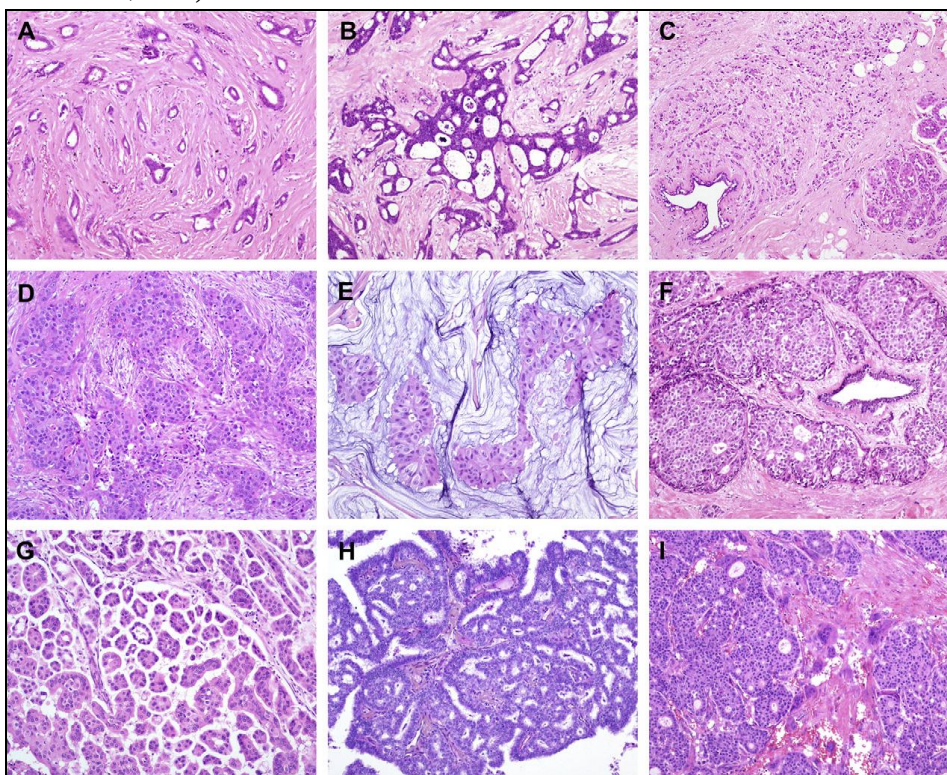
As primeiras lesões aparentes no tumor constituem as hiperplasias, onde células epiteliais apresentam alterações estruturais, mas não atipia citológica. À medida que a doença progride, a atipia citológica torna-se proeminente, com aumento significativo no índice mitótico. As células tumorais podem, então, se estabelecer na área de origem, caracterizando o carcinoma *in situ* ou podem romper a membrana basal, caracterizando o carcinoma invasivo (BATEMAN, 2007) (Figura 2).

Figura 2: Eventos patológicos envolvidos no processo de neoplasia mamária ductal (BURSTEIN *et al.*, 2004).



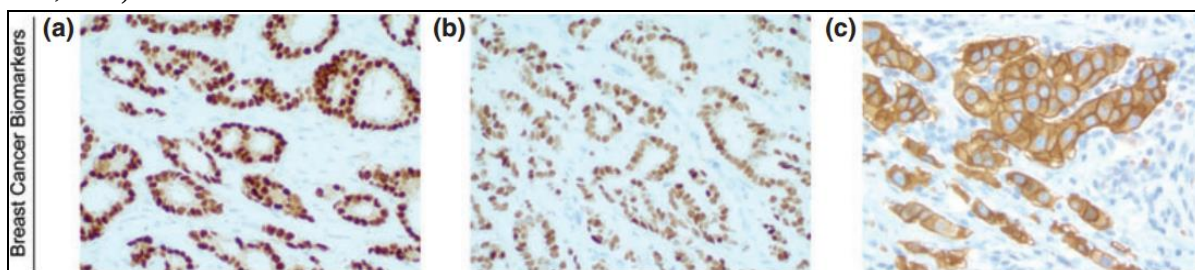
A patologia clássica separa os tumores de mama em diferentes tipos histológicos, com base na sua morfologia geral. O tipo mais comum é o carcinoma ductal invasivo (CDI), que corresponde a cerca de 75% dos casos, seguido do carcinoma lobular invasivo (CLI) (LI, *et al.*, 2005). Juntos, esses dois tipos totalizam cerca de 90% dos casos de câncer de mama, enquanto o restante são categorizados como medular, neuroendócrino, tubular, cribiforme, apócrino, metaplastico, mucinoso, inflamatório, adenóide cístico, micropapilar e papilar (WEIGELT *et al.* 2010) (Figura 3).

Figura 3: Cortes Histológicos de alguns dos tipos de câncer de mama. (A) Carcinoma Tubular, (B) Carcinoma Cribiforme, (C) Carcinoma Lobular Invasivo, (D) Carcinoma Apócrino, (E) Carcinoma Mucinoso, (F) Carcinoma Neuroendócrino, (G) Carcinoma Micropapilar, (H) Carcinoma Papilar, (I) Carcinoma Ductal Invasivo (Adaptado de WEIGELT, 2010).



Já a imunopatologia, se baseia na presença de marcadores específicos e não só classifica os tumores de mama em diferentes grupos, como direciona a decisão terapêutica. Os principais marcadores avaliados são o receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) e o receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2). As combinações destes marcadores separam os tumores em: ER + (ER + / HER2-), HER2 + (ER- / HER2 +), triplo negativo (ER- / PR- / HER2-) e triplo positivo (ER + / PR + / HER2 +). O método utilizado para a avaliação da expressão dos marcadores é a imuno-histoquímica (IHC), que se baseia nos níveis de marcação das proteínas correspondentes (WOLFF, 2007) (Figura 4).

Figura 4: Marcação de ER, PR e HER2 por IHC: (a) marcação para ER positiva, de forte intensidade (b) marcação para PR positiva, de moderada intensidade (c) marcação para superexpressão do HER-2 (DE ABREU *et al.*, 2014).



A análise molecular do câncer de mama tem acrescentado conhecimentos importantes para o entendimento da biologia desta neoplasia. A primeira sub-classificação molecular com grande impacto sobre a pesquisa do câncer de mama foi proposta em 2000, por Perou e colaboradores, na qual os tumores foram subdivididos de acordo com o seu padrão de expressão gênica para uma lista de genes "intrínsecos". Esta classificação molecular se sobrepõe parcialmente à classificação imunopatológica clássica, porquanto adiciona um maior nível de detalhes (BERTOS & PARK, 2011).

Cinco grupos foram identificados e denominados baseados na similaridade com algumas células do epitélio mamário: 1º. Luminal A (ER+ e/ou PR+, HER2- e CK8/18+), 2º Luminal B (ER+ e/ou PR+, HER2+ e CK8/18+), 3º Basal-like [ER- e/ou PR-, HER2-, CK5/6+, CK14+, CK17+ e receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR)+], 4º Normal-like (ER- e/ou PR-, HER2-, CK5/6-, CK14-, CK17-, EGFR-) e 5º HER-2enriched (ER- e/ou PR- e HER2+). Mais de 70% dos cânceres de mama correspondem os subgrupos Luminais (PEROU *et al.*, 2000; SØRLIE *et al.*, 2001; SØRLIE *et al.*, 2003).

Mais recentemente os subgrupos moleculares foram ampliados para incluir também um sexto subgrupo: Claudin-low, caracterizado pela baixa expressão de genes de adesão celular, os genes Claudina (PRAT *et al.*, 2010). Além disso, uma sub-população do subtipo Luminal A com um índice de proliferação Ki-67 > 14% foi designado como subtipo Luminal B (CHEANG *et al.*, 2009). Estes subgrupos intrínsecos demonstram diferenças em termos de biologia, sobrevivência e taxa de recorrência (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011).

2.3. ASPECTOS CLÍNICOS – PATOLÓGICOS

Fator prognóstico é definido como qualquer característica do paciente ou do tumor que possa indicar a história natural do tumor, não associado à terapêutica sistêmica. Enquanto fator preditivo é definido como uma característica específica do paciente ou do tumor que esteja relacionada com resposta ou ausência de resposta a um tratamento específico. Existe uma sobreposição entre fatores prognósticos e preditivos e uma proporção deles apresentam as duas características, embora uma possa predominar (RAKHA & ELLIS, 2011).

No câncer de mama, os fatores prognósticos mais importantes, utilizados internacionalmente na rotina clínica, são o estágio de comprometimento dos linfonodos, tamanho do tumor primário, grau histológico do tumor, metástase à distância, a positividade para os receptores hormonais, para o HER2 e o escore para o KI67. Outras variáveis que são reportadas, mas não são necessariamente utilizados na tomada de decisão da terapêutica sistêmica, incluem o tipo histológico do tumor, invasão do canal linfovascular, multifocalidade do tumor, presença e características de componente *in situ* associado, comprometimento da margem cirúrgica, tipo da excisão, a idade dos pacientes, história familiar e status menopausal (RAKHA & ELLIS, 2011; FITZGIBBONS *et al.*, 1999).

O status de comprometimento de linfonodo é o fator prognóstico mais importante no câncer de mama em estágio inicial. Além disso, o número absoluto de linfonodos envolvidos também é de importância prognóstica; pacientes com 4 ou mais linfonodos comprometidos têm pior prognóstico do que aqueles com menos de 4 linfonodos envolvidos (FITZGIBBONS *et al.*, 1999). Já o grau histológico se refere à avaliação do grau de diferenciação de um tumor, e indica a sua agressividade (WEIGELT *et al.* 2010). Quanto aos tipos histológicos do câncer

de mama há relação entre tipo histológico e prognóstico: os tipos adenóide cístico, medular, papilífero, mucinoso e carcinomas tubulares apresentam prognóstico relativamente melhor do que os tipos CDI, CLI, apócrino e carcinoma medular (WEIGELT *et al.* 2010).

O antígeno Ki-67 está relacionado ao grau de proliferação de um tumor sendo considerado um fator prognóstico. O Ki-67 é uma proteína nuclear não-histona que está relacionada ao ciclo celular sendo expressa em células em proliferação, mas não em células em repouso ou quiescentes. O escore de Ki-67 é medido em cortes histológicos por IHC, definido como a porcentagem de células de carcinoma invasivo que foram coradas. De acordo com o St. Gallen Consensus de 2011, o índice de proliferação é considerado baixo ou negativo, quando há 14% ou menos de núcleos corados, sendo considerado positivo ou alto quando existem mais do que 14% dos núcleos corados. Contudo, a padronização das técnicas e dos métodos para o estabelecimento do escore é necessária para a integração deste biomarcador na prática cotidiana (HIRATA *et al.*, 2014).

Em relação aos receptores hormonais e HER2, estes têm não só valor prognóstico, mas também valor preditivo. A positividade para o ER identifica tumores de melhor prognóstico e que podem responder à terapia endócrina, já a positividade para PR, geralmente está relacionada com a positividade para ER e tem menos significado clínico. Os tumores HER2 + eram previamente considerados de mau prognóstico, mas atualmente estes se beneficiam da terapia alvo. Por outro lado, os tumores triplo negativos (ER-/ PR- /HER2 -), são considerados de mau prognóstico e ainda não conta com nenhuma terapia-alvo, embora esta seja uma área de investigação intensa (ZHANG *et al.*, 2014).

O sistema TNM para tumores malignos em geral, é o sistema de estadiamento mais utilizado, tanto pela Union International Contre le Cancer (UICC) como pela American Joint Committee (AJC). Este sistema utiliza o tamanho do tumor, comprometimento nodal e metástase à distância. Apesar de ainda ser clinicamente relevante, este sistema tem limitações porque não incorpora outras características biológicas importantes que possam influenciar o prognóstico geral do paciente como, por exemplo, o grau histológico (Tabela 2). Já o Nottingham Prognostic Index (NPI) é um índice prognóstico que utiliza o grau histológico, sendo reconhecido como o único índice devidamente validado. O NPI é calculado pela equação: $NPI = 0,2 \times \text{tamanho do tumor (cm)} + \text{grau histológico (1 a 3)} + \text{escore de linfonodo (1 a 3)}$. O prognóstico piora à medida que o índice aumenta, e usando pontos de corte de 3,4 e

5,4 os pacientes podem ser estratificados em bom, regular e mau prognóstico (EDGE *et al.*, 2010; RAKHA *et al.*, 2008; GALEA *et al.*, 1992; ELSTON & ELLIS, 1991).

Tabela 2: Parâmetros utilizados para a classificação patológica pelo sistema TNM (SOBIN & WITTEKIND, 2002).

T	Tamanho do tumor (cm)	Grupamento por Estádios (TNM)	
T1	< 2	I	
T2	2 A 5		T1N0M0
T3	> 5		T1N1M0
N	Comprometimento Nodal	II	T2N0M0
			T2N1M0
			T3N0M0
N0	0		
N1	1 A 3		T1N2M0
N2	4 A 9		T2N2M0
N3	≥ 10	III	T3N1M0
M	Métástase à distância		T3N2M0
			TxN3M0
M0	Ausência	IV	TxNxM1
M1	Presença		

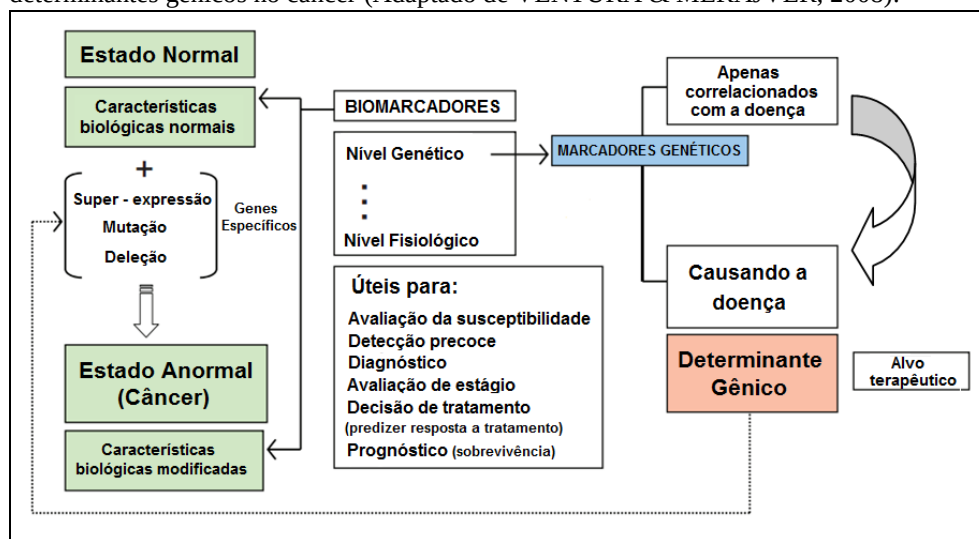
2.4. ASPECTOS MOLECULARES

De acordo com o "Working Group and Biomarkers Consortium", do National Institutes of Health (NIH), um biomarcador é uma característica que pode ser medida de forma objetiva para indicar processos biológicos normais ou patogênicos, monitoramento da doença, ou uma resposta farmacológica para determinada intervenção terapêutica (MISHRA & VERMA, 2010). Embora a maioria destes marcadores sejam glicoproteínas, mais recentemente, padrões de expressão gênica e alterações no DNA identificados em tumores também têm tido destaque como marcadores tumorais (VENTURA & MERAJVER, 2008).

O câncer é uma doença decorrente de alterações genéticas e epigenéticas. Embora fatores não genéticos desempenhem um papel em vários estágios da tumorigênese, o

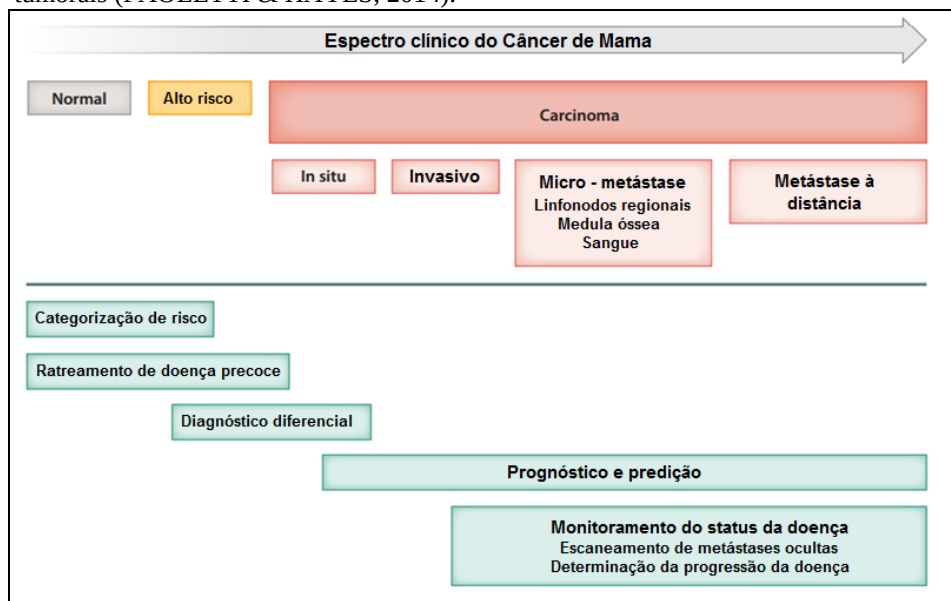
desenvolvimento e propagação do câncer de mama e de outros cânceres humanos são, em última análise, causados pela superexpressão, silenciamento, mutação e/ou deleção de genes específicos ou grupos de genes que dirigem estes eventos. Entre todos os tipos possíveis de marcadores tumorais, os biomarcadores genéticos e moleculares têm recebido especial atenção na pesquisa do câncer, uma vez que eles podem levar à descoberta dos determinantes gênicos no processo cancerígeno, desvendando as diferenças genéticas e moleculares entre as células cancerosas e saudáveis, bem como entre os diferentes subtipos de determinado câncer (VENTURA & MERAJVER, 2008). Genes expressos de maneira aberrante, identificados pelos perfis de expressão gênica podem ser divididos em duas categorias: os genes que são simplesmente correlacionados com determinado tipo de câncer, mas não funcionalmente relacionados a ele, e os genes que, na verdade, causam o desenvolvimento do câncer, os determinantes gênicos. Há um grande interesse em encontrar determinantes gênicos do câncer, não só para proporcionar uma melhor descrição da doença em termos moleculares (VARMUS, 2006), mas também para o desenvolvimento de terapias alvo (SAWYERS, 2004) (Figura 5).

Figura 5: Esquema resumindo os conceitos de biomarcador, marcador genético, e determinantes gênicos no câncer (Adaptado de VENTURA & MERAJVER, 2008).



Os marcadores tumorais no câncer de mama podem ser úteis para a categorização de risco, rastreio, diagnóstico diferencial, prognóstico, predição terapêutica ou monitorização do estado da doença (HENRY & HAYES, 2006) (Figura 6).

Figura 6: Espectro clínico do câncer de mama e potenciais usos dos marcadores tumorais (PAOLETTI & HAYES, 2014).



Alguns dos marcadores moleculares mais intensivamente estudados e com valores prognósticos e/ou preditivos mais bem estabelecidos para o câncer de mama são os receptores hormonais ER α e PR, o oncogene HER-2 e os genes supressores tumorais, BRCA1 e BRCA2 (HIRATA *et al.*, 2014).

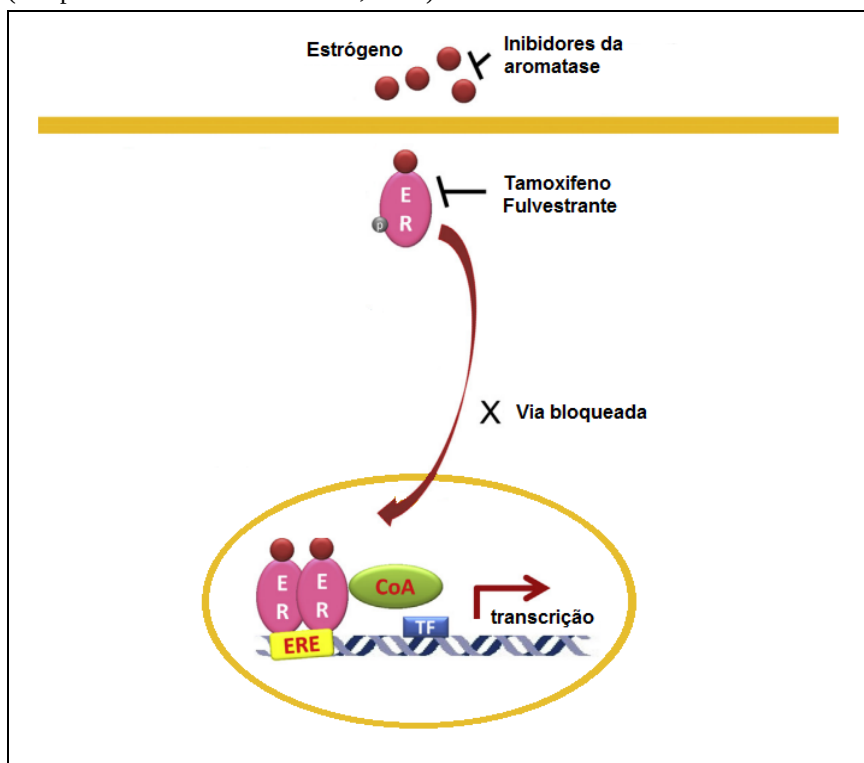
2.4.1. Receptores Hormonais

Os receptores de estrógeno (ER) são membros de uma grande família de reguladores nucleares de transcrição de genes alvo, que são ativados por hormônios esteróides, como o estrógeno. ERs existem em duas isoformas, α e β , que são codificadas por dois diferentes genes. Embora ambas as isoformas sejam expressas na glândula mamária normal, apenas a ER α parece ser fundamental para o desenvolvimento normal da glândula. No entanto, há cada vez mais evidências de que ER β pode antagonizar a função do ER α , e que altos níveis de ER β estejam associados com uma resposta mais favorável ao tratamento com tamoxifeno (SNOJ *et al.*, 2012).

Na via clássica de ação genômica do ER, a ligação de estrógeno ao ER transloca o ER citoplasmático para o núcleo, onde o ER ligado ao estrógeno forma dímero que funciona

como um fator de transcrição por meio da ligação ao Elemento de Resposta ao Estrógeno (ERE) dos genes-alvo e a interação com co-reguladores e outros fatores de transcrição ativam a expressão do gene alvo, desencadeando, no câncer de mama, processos como proliferação celular, inibição de apoptose, invasão e angiogênese (Figura 7). Cada etapa da via do ER pode servir como alvo terapêutico direcionado para tratar pacientes ER+. Algumas terapias hormonais já aprovadas são o tamoxifeno, os inibidores da aromatase (IAs) e o fulvestrante. O tamoxifeno é um modulador seletivo do ER que impede competitivamente a ligação do estrógeno interrompendo a via. Já os IAs bloqueiam a biossíntese de estrógeno a partir de andrógenos através da inibição da enzima aromatase, resultando na redução dos níveis de estrógeno circulante, enquanto que o fulvestrante age diminuindo a expressão do ER (DE ABREU *et al.*, 2014; MOHAMED *et al.*, 2013) (Figura 7).

Figura 7: Esquema representando Via clássica de sinalização do ER α e as diferentes terapias alvo que atuam nesta via. CoA: co-enzima A; TF: fator de transcrição; ERE: elemento de resposta ao estrógeno; ER: receptor de estrógeno (Adaptado de MOHAMED *et al.*, 2013).



O receptor de progesterona (PR) é codificado pelo gene PGR que é regulado pelo estrógeno e seu receptor. Em 75% dos cânceres de mama que expressam ER, mais da metade desses tumores também expressam PR e, uma vez que, a expressão de PR é regulada por ER,

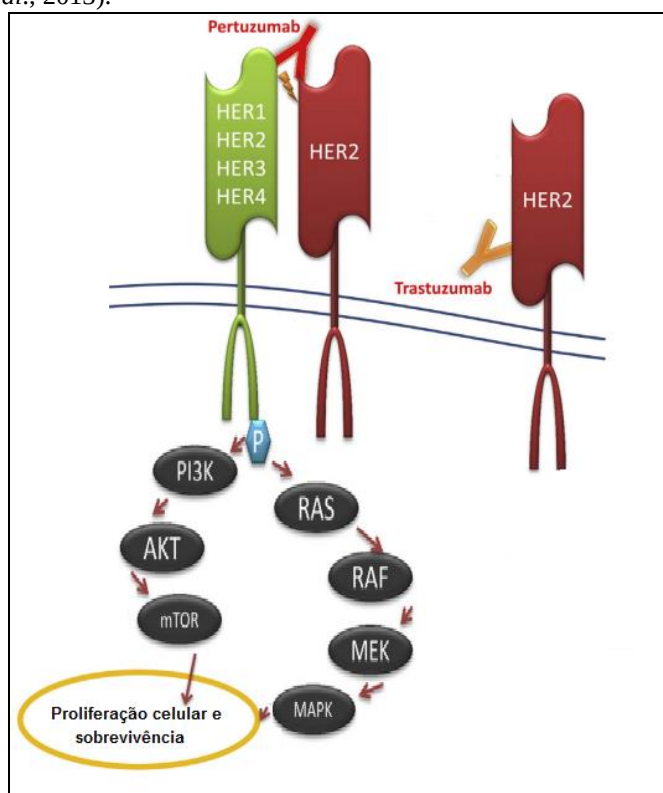
flutuações na expressão de PR são comumente associadas com anomalias funcionais em ER. Embora o valor prognóstico e preditivo da expressão de PR seja controverso, alguns autores sugerem que esta esteja associada com resposta à terapia endócrina em pacientes ER+ e que pacientes ER+ / PR- apresentam pior prognóstico do que aqueles ER+ / PR+. Além do papel do PR como marcador da função do ER, a função deste como mediador do efeito da progesterona no desenvolvimento da glândula mamária e do câncer de mama ainda precisa ser explorada em mais detalhes (ABDEL-HAFIZ & HORWITZ, 2015; PICCART-GEBHART, 2010).

2.4.2. Fator de Crescimento Epidermal Humano – ERBB2 / HER2

HER2 é um receptor transmembrana de tirosina quinase pertencente à família dos receptores do fator de crescimento epidermal humano. Quatro membros da família ErbB já foram identificados: EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) e ErbB4 (HER4). A ativação dos genes desta família afeta processos essenciais na tumorigênese e desempenha um papel crucial na patogênese do câncer de mama. ErbB2 tem sido considerado um oncogene chave na carcinogênese mamária. O aumento da quantidade de moléculas de ErbB2 expressas na superfície de células tumorais facilita a formação de heterodímeros de ErbB2, uma vez que este é o receptor preferido de dimerização para os outros três membros da família, e a formação espontânea de homodímeros de ErbB2. A hetero ou homodimerização dos membros da família de ErbB leva a autofosforilação do domínio citoplasmático de tirosina quinase do receptor. Isto conduz à ativação de várias vias de sinalização, tais como a MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) e a PI3K- AKT (Phosphatidylinositol 3-Kinase), envolvidas na proliferação celular e sobrevivência (Figura 8). A super-expressão de HER2 como resultado de amplificação do gene ocorre em 18% a 20% dos cânceres de mama e está associada com um fenótipo mais agressivo. No entanto, o tratamento específico com o Trastuzumab conduziu a uma melhoria significativa no prognóstico desta doença. Em adição ao Trastuzumab, vários agentes que utilizam o HER2 como alvo, incluindo o Pertuzumab foram aprovados para o tratamento do câncer de mama HER2+ (MOHAMED *et al.*, 2013; SNOJ *et al.*, 2012; MOASSER, 2007).

O Trastuzumab (Herceptin®; Genentech), é um anticorpo monoclonal completamente humanizado contra o domínio extracelular do HER2. Os mecanismos de ação do Trastuzumab não são completamente compreendidos, mas estudos têm mostrado que ocorre citotoxicidade anticorpo-dependente e consequente inibição da sinalização mediada por HER2 através das cascatas PI3K e MAPK. Já o Pertuzumab é um anticorpo monoclonal humanizado anti-HER2 que inibe a dimerização de HER2 com outros membros da sua família (MOHAMED *et al.*, 2013) (Figura 8).

Figura 8: Vias de sinalização do HER2 e sítios de atuação do Pertuzumab e Trastuzumab (Adaptado de MOHAMED *et al.*, 2013).



2.4.3. Genes BRCA

Os genes BRCA1 e BRCA2 estão entre os genes de susceptibilidade ao câncer mais conhecidos, uma vez que mutações germinativas nestes genes estão associadas com riscos marcadamente elevados de desenvolver câncer de mama familiar. Os genes BRCA são considerados supressores tumorais, pois codificam proteínas responsáveis pelo reparo dos danos ao DNA ocasionados por quebra da dupla-fita durante a replicação, a qual é

particularmente prejudicial para a integridade do genoma e tem sido apontada como uma das principais causas de tumorigênese. As duas principais vias de reparo do DNA, são a via de reparo por recombinação homóloga (HR) e a via de reparo não-homóloga (NHEJ). A HR parece ser o principal mecanismo para proteger a integridade do genoma de células em proliferação, pois esta é menos passível de erros, uma vez que o reparo da quebra na dupla fita ocorre durante as fases S e G2 do ciclo celular, quando uma cromátide irmã intacta pode servir como um modelo para o reparo. Mecanismos de respostas a danos causados ao DNA também incluem a ativação de pontos de checagem (“check-points”) que atrasam o ciclo celular, antes ou durante a replicação (G1 / S ou intra-S), ou antes da divisão celular (G2/M), para assegurar que erros genéticos não serão transmitidos para gerações subsequentes, possibilitando tempo suficiente para o reparo do DNA. O BRCA1 também tem ação como ativador dos pontos de checagem. Tanto o BRCA1 como o BRCA2 agem na via HR, e a expressão destes genes em células normais está, portanto, aumentada durante replicação celular e a perda da função de BRCA1 ou BRCA2 em células normais resulta em aumento da taxa de mutações aleatórias o que leva, gradualmente, ao crescimento clonal de células com mutações adquiridas favorecendo o desenvolvimento de tumores (ROY *et al.*, 2012; MURPHY & MOYNAHAN, 2010).

2.5. ASSINATURAS GENÉTICAS

Em contraste com a abordagem de um único marcador, testes moleculares baseados em painéis genéticos têm sido usados mais recentemente para prever prognóstico e resposta terapêutica. As duas assinaturas moleculares mais utilizadas e conhecidas, já aprovadas pela Federal Drug Administration (FDA) para uso clínico em pacientes com câncer de mama são: MammaPrint® (Agendia, Irvine, CA, USA), que utiliza a tecnologia de microarranjo para analisar 70 genes em material de tumor fresco ou congelado (VAN 'T VEER *et al.*, 2002); e OncotypeDX® (Genomic Health, Inc., Redwood City, CA, EUA), que analisa um painel de 21 genes em material de tumor embebido em parafina, através de RT-PCR (KIM *et al.*, 2004). Ambas as plataformas são ferramentas clinicamente úteis para caracterizar o câncer de mama ao diagnóstico, discernir quais pacientes com carcinoma da mama irão se beneficiar da terapia hormonal ou citotóxica e ainda para calcular o risco de recidiva da doença (VOLLAN & CALDAS, 2011; EROLES *et al.*, 2012). Também existem painéis comercialmente

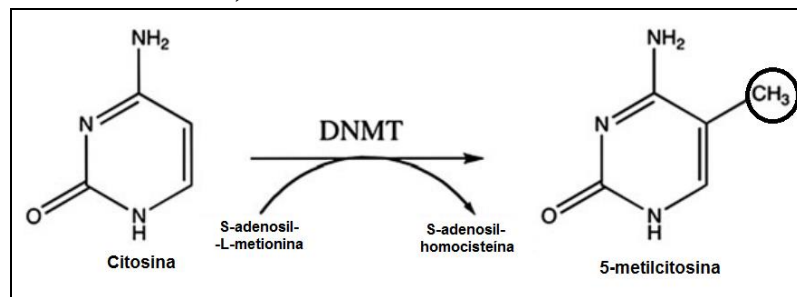
disponíveis para classificar os casos clínicos em subtipos. O PAM-50 Breast Cancer Intrinsic Classifier assay (NanoString, ARUP Laboratories, Salt Lake City, UT) analisa um painel de 50 genes, que acredita-se serem inerentes aos subtipos moleculares, em material de tumor embebido em parafina, através de RT-PCR e classifica o tumor individualmente no subtipo molecular que é mais similar (ALLISON, 2012). Muitas assinaturas genéticas têm sido publicadas, mas a validação inadequada torna-as inaplicáveis à clínica (KOSCIELNY, 2010).

2.6. EPIGENÉTICA

A genética clássica por si só não pode explicar a diversidade de fenótipos dentro de uma população, nem, como apesar de sequências idênticas de DNA, gêmeos monozigóticos ou animais clonados podem ter fenótipos distintos e diferente sensibilidade à determinada doença. O conceito de epigenética oferece uma explicação parcial desses fenômenos (ESTELLER, 2008) e se refere a alterações na expressão de genes que não alteram a sequência de DNA. Estas alterações são herdáveis durante as divisões celulares e fornecem uma espécie de memória do padrão de expressão gênica que é crucial para manutenção da identidade celular. As modificações epigenéticas desempenham papel fundamental em diversos aspectos do desenvolvimento natural, entre eles, na embriogênese, na qual o "código epigenético" é apagado nos primeiros momentos após a concepção, sendo então reprogramado; na diferenciação celular, na qual múltiplos tipos celulares divergem fisiologicamente de um mesmo código genético; no *imprinting* genômico; na inativação do cromossomo X; no silenciamento de *transposons* e na variação fenotípica entre indivíduos geneticamente idênticos. Além disso, as alterações epigenéticas também estão implicadas no desenvolvimento de doenças, entre elas o câncer. Vários mecanismos fazem parte da maquinaria epigenética: a metilação do DNA, as modificações das histonas e os microRNAs. No entanto, a metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais intensivamente estudado (TABY & ISSA, 2010).

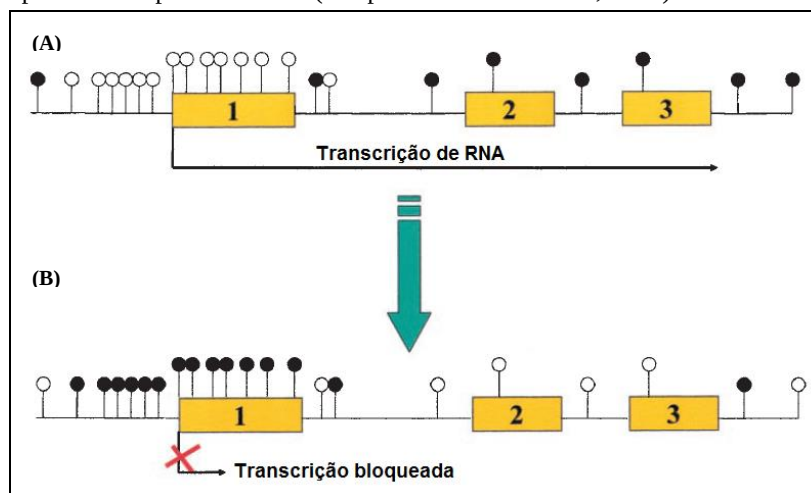
A metilação do DNA consiste na adição covalente de um grupamento metil, proveniente de uma S-adenosil metionina (SAM), ao carbono na posição 5 do anel de citosina. Esta transferência do grupamento metil é catalisada por enzimas DNA metil-transferases (DNMTs) (LEWANDOWSKA & BARTOSZEK, 2011) (Figura 9).

Figura 9: Estrutura química da citosina e esquema do processo de metilação catalizado por DNMT (Adaptado de LEWANDOWSKA & BARTOSZEK, 2011).



O processo de adição de um grupamento metil à citosina, ocorre quase que exclusivamente em citosinas localizadas à extremidade 5' de uma guanina, formando um dinucleotídeo (CpG), os quais estão espalhados no genoma de forma relativamente escassa. No entanto, em determinadas áreas do genoma, ocorre uma concentração elevada de dinucleotídeos CpG, formando as "ilhas CpG" (CGIs), as quais são geralmente encontradas na região promotora de diversos genes (cerca de 60% dos genes humanos). Em uma célula diferenciada normal, os dinucleotídeos CpG espalhados ao longo de todo o genoma são altamente metilados, enquanto que a grande maioria das CGIs, localizadas na região promotora dos genes, estão protegidas da metilação, permanecendo em seu estado não-metilado (ESTELLER, 2002) (Figura 10).

Figura 10: Esquema representando em (A) o perfil de metilação de uma célula normal, com a CGI, localizada na região promotora do gene, não metilada e o corpo do gene metilado, com o gene sendo normalmente transcrito. Em (B) está representado o perfil aberrante de metilação em uma célula tumoral, na qual a CGI encontra-se metilada e o corpo do gene não-metilado. Pontos brancos representam CpGs não-metiladas; pontos pretos representam CpGs metiladas (Adaptado de ESTELLER, 2002).



A metilação dos CGIs na região promotora leva ao silenciamento da expressão do gene correspondente, através da inibição direta da ligação dos fatores de transcrição aos seus sítios e por meio do recrutamento de proteínas MBD (methyl-binding domain proteins). Estas MBDs estão presentes em complexos co-repressores da transcrição, os quais envolvem outros membros da maquinaria epigenética, como as desacetilases de histona (HDAC), resultando na reconfiguração da cromatina para um estado fechado e no subsequente silenciamento do gene (ILLINGWORTH & BIRD, 2009).

A família das DNMTs é composta por 4 membros: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L. Outro membro identificado por homologia de sequência foi chamado DNMT2, no entanto, posteriormente, foi identificada sua função na metilação de RNA ao invés de DNA e é atualmente descrito como TRDMT1. A DNMT1 é amplamente expressa e age durante a replicação. Tem a função de manutenção do padrão de metilação do DNA durante as divisões celulares, através da adição de grupamentos metil às fitas de DNA recém-sintetizadas nos sítios CpG hemimetilados. A DNMT3 é responsável por estabelecer a metilação *de novo* durante o desenvolvimento, ou seja, metilar regiões do DNA previamente não-metiladas, e consiste em duas proteínas relacionadas codificadas por genes distintos: DNMT3A e DNMT3B, as quais são altamente expressas em células embrionárias precoces (a fase em que ocorre a maioria dos eventos programados de metilação *de novo*) e estão reguladas negativamente após a diferenciação em tecidos somáticos adultos. A DNMT3B parece desempenhar um papel crucial na hipermetilação *de novo* das ilhas de CpG localizadas na região promotora dos genes, um possível mecanismo para a inativação de genes supressores tumorais. Já a DNMT3L, devido à falta de um aminoácido essencial para a atividade catalítica, esta não possui capacidade de metilação, mas atua como co-fator para as enzimas DNMT3 e estimula suas atividades (GUIBERT & WEBER, 2013; GOLL *et al.*, 2006; SUETAKE *et al.*, 2004).

2.7. EPIGENÉTICA & CÂNCER

Embora o padrão de metilação em células adultas seja relativamente estável, diminuição da metilação global e hipermetilação específica na região promotora têm sido descritas durante o processo de envelhecimento celular. Ainda não está bem estabelecido se

essas mudanças no padrão de metilação no DNA decorrentes do tempo são aleatórias ou fazem parte de um processo programado. No entanto, acredita-se que essas mudanças tenham papel importante no desenvolvimento de desordens relacionadas à idade, entre elas, o câncer (TABY & ISSA, 2010; ISSA *et al.* 1994; AHUJA *et al.*, 1998).

No câncer observa-se tanto hipermetilação nas CGIs, como uma hipometilação a nível global. A hipometilação global do DNA é a primeira alteração epigenética observada nas células cancerígenas. Uma potencial consequência da hipometilação é a instabilidade genômica, predispondo o indivíduo a mutações, deleções, amplificações, inversões e translocações. Outra potencial consequência da hipometilação do DNA é a reativação de genes que deveriam estar normalmente silenciados, podendo levar à ativação de vias que promovem o crescimento celular e os mecanismos anti-apoptóticos. A hipermetilação na região promotora de genes específicos também é um evento precoce na tumorigênese e está relacionada ao silenciamento de genes supressores tumorais, criando um ambiente propício ao acúmulo simultâneo de aberrações tanto genéticas como epigenéticas (ISSA, 2008; EHRLICH, 2002).

Uma lista cada vez maior de genes supressores tumorais tem sido descritos como silenciados em vários tipos de câncer, entre eles o câncer de mama, por metilação das ilhas CpG localizadas na região promotora, propiciando o crescimento e a sobrevivência de células, resultando em iniciação e progressão tumoral (XIANG *et al.*, 2011; ESTELLER 2007) (Tabela 3).

Tabela 3: Tabela com lista de genes descritos como hipermetilados no câncer de mama (Extraído a partir do banco de dados do MetaCore™).

GENES HIPERMETILADOS RELACIONADOS AO CÂNCER DE MAMA				
CDKN2A	SFN	FBXW7	DAPK1	ZNF432
TWIST1	SLIT2	ERBB4	PROX1	EMILIN2
SFRP1	ESR2	BRCA1	EVL	CCND2
COL7A1	IGFBP7	SYNM	ATM	DFNA5
MMP2	SYNE1	DKK3	LZTS1	MLH1
CST6	LATS1	CXCL12	ID4	SLC19A3
ITIH5	ADAM33	APC	PITX2	IGFBPL1
PYCARD	SFRP5	CDH1	PTPRD	GSTP1
NOP9	FHIT	EFEMP1	PTPN12	PGR
RARB	RASSF1	VIM	ESR1	SCGB3A1
TFAP2A				

Nos últimos tempos, as pesquisas a respeito dos mecanismos epigenéticos envolvidos na carcinogênese têm recebido especial atenção, pois, além de serem mecanismos precoces que podem ser utilizados como marcadores moleculares no câncer, estes não alteram a sequência dos nucleotídeos no DNA, portanto, ao contrário das mudanças genéticas, podem ser reversíveis por intervenção terapêutica. Além disso, a detecção de hipermetilação na região promotora dos genes oferece vantagens quando comparadas a alterações no DNA, como as mutações. Estas últimas podem ocorrer em diferentes sítios, enquanto a hipermetilação ocorre na região promotora do gene, tornando a detecção mais simples. Comparando também com outras frequentes alterações cromossômicas no câncer, como a perda de um alelo, a hipermetilação consiste em um sinal positivo, o qual é mais fácil de ser detectado contra um padrão de DNA normal. Ainda, de acordo com o perfil do gene cuja inativação associada à hipermetilação foi detectada, é possível obter informações importantes a respeito do comportamento do tumor. Desta forma, o estudo dos mecanismos epigenéticos relacionados ao câncer, em especial, a metilação do DNA, pode proporcionar a descoberta de marcadores moleculares com potencial de melhorar radicalmente a detecção precoce e o tratamento do câncer (ESTELLER *et al.*, 2001).

3. REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAFIZ, H. A., & HORWITZ, K. B. (2015). Role of epigenetic modifications in luminal breast cancer. *Epigenomics*, 10(2217).
- AHUJA N., LI Q., MOHAN A.L., BAYLIN S.B., ISSA JP. (1998) Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Research.*, 58, 5489-5494.
- ALLISON, K. H. (2012). Molecular pathology of breast cancer: what a pathologist needs to know. *American journal of clinical pathology*, 138(6), 770–80.
- BERTOS, N. R., & PARK, M. (2011). Review series Breast cancer — one term , many entities?. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(10), 3789–3796
- BURSTEIN, H.J., POLYAK, K., WONG, J.S., LESTER, S.C., KAELEN, C. (2004). Ductal Carcinoma in Situ of the Breast. *New England Journal of Medicine*, 350, 1430–1441.
- CHEANG, M. C. U., CHIA, S. K., VODUC, D., GAO, D., LEUNG, S., SNIDER, J., WATSON, M., ET AL. (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(10), 736–50.
- CHUANG, J. C., & JONES, P. A. (2007). Epigenetics and microRNAs. *Pediatric research*, 61(5), 24–29.
- DAS, P. M., THOR, A D., EDGERTON, S. M., BARRY, S. K., CHEN, D. F., & JONES, F. E. (2010). Reactivation of epigenetically silenced HER4/ERBB4 results in apoptosis of breast tumor cells. *Oncogene*, 29(37), 5214–9.
- DE ABREU, F. B., SCHWARTZ, G. N., WELLS, W. A, & TSONGALIS, G. J. (2014). Personalized therapy for breast cancer. *Clinical genetics*, 86(1), 62–7.
- EDGE SB, BYRD DR, COMPTON CC, ET AL. AJCC Cancer Staging Manual. (2010) 7th ed. New York: Springer.
- EHRLICH, M. (2002). DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, 21(35), 5400–13.
- ELHARDT, W., SHANMUGAM, R., JURKOWSKI, T. P., & JELTSCH, A. (2015). Somatic cancer mutations in the DNMT2 tRNA methyltransferase alter its catalytic properties. *Biochimie*, 112, 66–72.
- ELSTON, C. W., & ELLIS, O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer . I . The value of histological grade in breast cancer : experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19, 403–410.

EROLE, P., BOSCH, A., PÉREZ-FIDALGO, J. A., & LLUCH, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, 38(6), 698–707.

ESTELLER, M. (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*, 21(35), 5427–40.

ESTELLER, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature reviews. Genetics*, 8(4), 286–98.

ESTELLER, M. (2008). Epigenetics in Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 358, 1148–59.

ESTELLER, M., & HERMAN, J. G. (2002). Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *Journal of Pathology*, 196, 1–7.

ESTELLER, M., CORN, P. G., BAYLIN, S. B., CORN, P. G., BAYLIN, S. B., & HERMAN, J. G. (2001). A Gene Hypermethylation Profile of Human Cancer. *Cancer Research*, 61, 3225–3229.

ESTELLER, M., SILVA, J. M., DOMINGUEZ, G., BONILLA, F., MATIAS-GUIU, X., LERMA, E., BUSSAGLIA, E., et al. (2000). Promoter Hypermethylation and BRCA1 Inactivation in Sporadic Breast and Ovarian Tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(7), 564–569.

FEINBERG, A. P., & TYCKO, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer*, 4(February), 143–153.

FERLAY, J. et al. GLOBOCAN 2012 v1 .0, cancer incidence and mortality worldwide. Lyon, France: IARC, 2013. (IARC CancerBase, 11). Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 22 jan. 2015.

FITZGIBBONS, P. L., PAGE, D. L., WEAVER, D., THOR, A. D., ALLRED, D. C., CLARK, G. M., RUBY, S. G., ET AL. (1999). Prognostic Factors in Breast Cancer College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*, 124.

FOULKES, J. M., PARNELL, K. M., NIX, R. N., CHAU, S., SWIERCZEK, K., SAUNDERS, M., WRIGHT, K., et al. (2012). Epigenetic drug discovery: targeting DNA methyltransferases. *Journal of biomolecular screening*, 17(1), 2–17.

FUJIWARA, S., IBUSUKI, M., YAMAMOTO, S., YAMAMOTO, Y., & IWASE, H. (2014). Association of ErbB1–4 expression in invasive breast cancer with clinicopathological characteristics and prognosis. *Breast Cancer*, 21(4), 472–481.

GALEA, M. H., BLARNEY, R. W., ELSTON, C. E., & ELLIS, I. O. (1992). The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 22, 207–219.

GIRAULT, I., LIDEREAU, R., & BIE, I. (2003). Expression Analysis of DNA Methyltransferases 1, 3A, and 3B in Sporadic Breast Carcinomas. **Clinical Cancer Research**, 9, 4415–4422.

GOLDHIRSCH, A., WOOD, W. C., COATES, A. S., GELBER, R. D., THÜRLIMANN, B., & SENN, H.-J. (2011). Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, 22(8), 1736–47.

GOLL, M. G., KIRPEKAR, F., MAGGERT, K. A., YODER, J. A., HSIEH, C., ZHANG, X., GOLIC, K. G., ET AL. (2006). Methylation of tRNA Asp by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2. **Science**, 311, 395–397.

GUIBERT, S. & WEBER, M. (2013). Functions of DNA Methylation and Hydroxymethylation in Mammalian Development. **Current Topics in Developmental Biology**, 104, 47-83.

HENRY, N. L., & HAYES, D. F. (2006). Uses and Abuses of Tumor Markers in the Diagnosis, Monitoring, and Treatment of Primary and Metastatic Breast Cancer. **The Oncologist**, 541–552.

HIRATA, B. K.B., ODA, J. M. M., Guembarovski, R.L, Ariza, C. B., De Oliveira, C. E. C., & Watanabe, M. A. E. (2014). Molecular markers for breast cancer: prediction on tumor behavior. **Disease markers**, 2014, 513158.

ILLINGWORTH, R. S., & BIRD, A. P. (2009). CpG islands--'a rough guide'. **FEBS letters**, 583(11), 1713–20.

INCA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124p. : il. col., mapas. ISBN 978-85-7318-237-8 (versão eletrônica)

ISSA J.P, OTTAVIANO Y.L., CELANO P., HAMILTON S.R., DAVIDSON N.E., BAYLIN S.B. (1994) Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. **Nature Genetics**, 7, 536-540.

ISSA, J.-P. (2008). Cancer prevention: epigenetics steps up to the plate. **Cancer prevention research**, 1(4), 219–22.

KIM, C., BAKER, J., PH, D., CRONIN, M., BAEHNER, F. L., WALKER, M. G., WATSON, D., ET AL. (2004). A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. **New England of Journal Medicine**, 351, 2817–2826.

KOSCIELNY, S. (2010). Why Most Gene Expression Signatures of Tumors Have Not Been Useful in the Clinic. **Sci Transl Med**, 2(14), 1–3.

LEWANDOWSKA, J., & BARTOSZEK, A. (2011). DNA methylation in cancer development, diagnosis and therapy - multiple opportunities for genotoxic agents to act as methylome disruptors or remediators. **Mutagenesis**, 26(4), 475–87.

- LI, C. I., URIBE, D. J., & DALING, J. R. (2005). Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *British journal of cancer*, 93(9), 1046–52.
- MISHRA, A., & VERMA, M. (2010). Cancer biomarkers: are we ready for the prime time? *Cancers*, 2(1), 190–208.
- MOASSER, M. M. (2007). The oncogene HER2: it's signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, 26(45), 6469–87.
- MOHAMED, A., KRAJEWSKI, K., CAKAR, B., & MA, C. X. (2013). Targeted therapy for breast cancer. *The American journal of pathology*, 183(4), 1096–112.
- MURPHY, C. G. & MOYNAHAN M. E. (2010). BRCA Gene Structure and Function in Tumor Suppression. *The Cancer Journal*, 16(1).
- NIH. What You Need To Know About™ Breast Cancer / National Cancer Institute Services, U.S. Department of Health and Human Services: NIH Publication No. 12-1556, Revised April 2012, Printed August 2012
- PAOLETTI, C., & HAYES, D. F. (2014). Molecular testing in breast cancer. *Annual review of medicine*, 65, 95–110.
- PEROU, C. M., SØRLIE, T., EISEN, M. B., VAN DE RIJN, M., JEFFREY, S. S., REES, C. A, POLLACK, J. R., ET AL. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–52.
- PICCART-GEBHART, M. J. (2010). New developments in hormone receptor-positive disease. *The oncologist*, 15 Suppl 5(suppl 5), 18–28.
- PINDER, S. E., & ELLIS, I. O. (2003). The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: ductal carcinoma in situ (DCIS) and atypical ductal hyperplasia (ADH)—current definitions and classification. *Breast Cancer Research*, 5(5), 254–7.
- PRAT A, PARKER JS, KARGINOVA O, FAN C, LIVASY C, HERSCHKOWITZ JI, HE X, PEROU CM. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 12:R68.
- RAKHA, E. A, EL-SAYED, M. E., LEE, A. H. S., ELSTON, C. W., GRAINGE, M. J., HODI, Z., BLAMEY, R. W., ET AL. (2008). Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(19), 3153–8.
- RAKHA, E. A., & ELLIS, I. O. (2011). Modern Classification of Breast Cancer : Should we Stick With Morphology or Convert to Molecular Profile Characteristics. *Adv Anat Pathol*, 18(4), 255–267.
- ROY, R., CHUN, J., & POWELL, S. N. (2012). BRCA1 and BRCA2 : different roles in a common pathway of genome protection. *Nature Reviews Cancer*, 12.
- SAWYERS, C. (2004). Targeted cancer therapy. *Nature*, 432(7015), 294–297.

SCHAEFER, M., HAGEMANN, S., HANNA, K., & LYKO, F. (2009). Azacytidine inhibits RNA methylation at DNMT2 target sites in human cancer cell lines. **Cancer research**, 69(20), 8127–32.

SHUKLA, V., COUMOUL, X., LAHUSEN, T., WANG, R.-H., XU, X., VASSILOPOULOS, A., XIAO, C., et al. (2010). BRCA1 affects global DNA methylation through regulation of DNMT1. **Cell research**, 20(11), 1201–15.

SIEDLECKI, P., & ZIELENKIEWICZ, P. (2006). Mammalian DNA methyltransferases. **Acta Biochimica Polonica**, 53(2), 245–256.

SNOJ N, DINH P, BEDARD P, S. C. (2012). In: Coleman WB, Tsongalis GJ, eds. *Molecular biology of breast cancer*. (pp. 341–349). Elsevier Press.

SOBIN, L.H. & WITTEKIND, C.H (2002) TNM Classification of Malignant Tumors . John Wiley & Sons, INC. ISBN 0-471-22288-7

SØRLIE T, PEROU CM, TIBSHIRANI R, AAS T, GEISLER S, JOHNSEN H, HASTIE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY SS, THORSEN T, QUIST H, MATESE JC, BROWN PO, BOTSTEIN D, EYSTEIN LØNNING P, BØRRESEN-DALE A-L (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci**, 98, 10869-10874.

SØRLIE T, TIBSHIRANI R, PARKER J, HASTIE T, MARRON JS, NOBEL A, DENG S, JOHNSEN H, PESICH R, GEISLER S, DEMETER J, PEROU CM, LONNING PE, BROWN PO, BØRRESEN-DALE A-L, BOTSTEIN D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci**, 100:8418-8423.

STEFANSSON, O. A., JONASSON, J. G., OLAFSDOTTIR, K., HILMARSDOTTIR, H., OLAFSDOTTIR, G., ESTELLER, M., JOHANSSON, O. T., et al. (2011). CpG island hypermethylation of BRCA1 and loss of pRb as co-occurring events in basal/triple-negative breast cancer. **Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society**, 6(5), 638–49.

SUBRAMANIAM, D., THOMBRE, R., DHAR, A., & ANANT, S. (2014). DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. **Frontiers in oncology**, 4(May), 80.

SUETAKE, I. ET AL. (2004) DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. **J. Biol. Chem.** 279, 27816–27823

SZYF, M., PAKNESHAN, P., & RABBANI, S. A. (2004). DNA methylation and breast cancer. **Biochemical pharmacology**, 68(6), 1187–97.

TABY, R., & ISSA, J.P. J. (2010). Cancer Epigenetics. CA: **A Cancer Journal for Clinicians**, 60(6).

TAPIA, T., SMALLEY, S. V., KOHEN, P., MUÑOZ, A., SOLIS, L. M., CORVALAN, A., FAUNDEZ, P., et al. (2008). Promoter hypermethylation of BRCA1 correlates with absence of expression in hereditary breast cancer tumors. **Epigenetics**, 3(3), 157–163.

VAN 'T VEER LJ, DAI H, VAN DE VIJVER MJ, HE YD, HART AAM, M. M., PETERSE HL, VAN DER KOOY K, MARTON MJ, WITTEVEEN AT, S. G., & KERKHOVEN RM, ROBERTS C, LINSLEY PS, BERNARDS R, F. S. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415(345), 2817–2826.

VARMUS, H. (2006). The New Era in Cancer Research. *Science*, 312(5777), 1162–65.

VENTURA, A. C., & MERAJVER, S. D. (2008). Genetic determinants of aggressive breast cancer. *Annual review of medicine*, 59, 199–212.

VOGELSTEIN B, KINZLER KW. 1998. The Genetic Basis of Human Cancer. McGraw-Hill

VOLLAN, H. K. M., & CALDAS, C. (2011). The breast cancer genome--a key for better oncology. *BMC cancer*, 11(1), 501.

WEIGELT, B., GEYER, F. C., & REIS-FILHO, J. S. (2010). Histological types of breast cancer: how special are they? *Molecular oncology*, 4(3), 192–208.

WOLFF, A. C., HAMMOND, M. E. H., SCHWARTZ, J. N., HAGERTY, K. L., ALLRED, D. C., COTE, R. J., DOWSETT, M., ET AL. (2007). American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer, 131(January).

XIANG, T. X., YUAN, Y., LI, L. L., WANG, Z. H., DAN, L. Y., CHEN, Y., REN, G. S., et al. (2011). Aberrant Promoter Methylation Silences Critical TSGs in Breast Carcinoma Clinical Implications of Promoter Methylation in Breast Cancer early detection and prognosis in breast cancer. *Chinese Journal of Cancer*, 30, 1–9.

ZHANG, M. H., MAN, H. T., ZHAO, X. D., DONG, N., & MA, S. L. (2014). Estrogen receptor-positive breast cancer molecular signatures and therapeutic potentials (Review). *Biomedical reports*, 2(1), 41–52.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Determinar o perfil de metilação de DNA em pacientes com câncer de mama através da análise dos níveis de metilação global; dos níveis de expressão das DNMTs e sua correlação com a expressão de genes implicados na tumorigênese; bem como a relação de todos estes com características intrínsecas das pacientes e dos tumores.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os níveis globais de metilação do DNA em fragmentos de tumores mamários e em fragmentos de tecido de mamas opostas saudáveis;
- Determinar os níveis de expressão gênica das DNMT1, DNMT2 e DNMT3B em fragmentos de tumores mamários e em fragmentos de tecido de mamas opostas saudáveis;
- Avaliar a correlação entre a expressão das DNMT1, DNMT2 e DNMT3B e os níveis de metilação global do DNA;
- Determinar os níveis de expressão gênica de BRCA1, BRCA2, ERBB2 e ERBB4 em fragmentos de tumores mamários e em fragmentos de tecido de mamas opostas saudáveis;
- Avaliar a correlação entre a expressão das DNMTs e dos genes BRCA1, BRCA2, ERBB2 e ERBB4;
- Avaliar a correlação entre a expressão das BRCA1, BRCA2, ERBB2, ERBB4 e os níveis de metilação global do DNA;
- Analisar os níveis de expressão dos genes DNMT1, DNMT2, DNMT3B, BRCA1, BRCA2, ERBB2 e ERBB4 em relação a características intrínsecas das pacientes e dos tumores;
- Analisar os níveis globais de metilação do DNA em relação a características intrínsecas das pacientes e dos tumores;

5. ARTIGO

Analysis of global methylation and expression levels of DNMT1, DNMT2 and DNMT3B: an overview about the methylation process involved in Invasive Ductal Breast Cancer

Nara Barbosa Araújo¹, Roberta Luciana do Nascimento Godone¹, Carlos Eduardo de Matos Alves¹, Darley de Lima Ferreira Filho², Nancy Cristina Ferraz de Lucena Ferreira², Elisa de Almeida Neves Azevedo³, Anna Ligia de Castro Figueiredo³, Danyelly Bruneska Gondim Martins¹, José Luiz de Lima Filho¹.

1. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, UFPE, Recife, PE – Brazil

2. Hospital Barão de Lucena, Recife, PE – Brazil

3. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz, Recife, PE – Brazil

Correspondence to: naraujo@prospecmol.org

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is the most common cancer and the second leading cause of cancer deaths among women worldwide. Different mutations were related to breast cancer, but only their presence cannot explain the heterogeneity of this cancer. Then, epigenetic events have been studied in breast cancer tissues. DNA methylation is the most studied and well-understood epigenetic regulation, being catalysed by DNA methyltransferases family; mainly DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B. Besides, DNMT2 (TRDMT1), initially thought to be a member of this family, was later described as a RNA methyltransferase and so far, little is known about its function. **Objectives:** The aim of this study was to determine the DNA methylation profile in 31 patients with Invasive Ductal Breast Cancer and 04 healthy tissues obtained from the opposite breast. Tests were performed for global methylation levels through an ELISA assay and for the expression levels of DNMTs (DNMT1, DNMT2 and DNMT3B) by real-time PCR. Gene expression was also analysed for BRCA1, BRCA2, ERBB2 and ERBB4. All these parameters were correlated with patient's data and intrinsic characteristics of the tumours. **Results:** Our results show the global methylation in breast tumours is significantly lower compared to breast healthy tissues ($p=0.0034$). DNMT1 and DNMT3B ($p=0.0034$; $p=0.0031$, respectively) showed high expression in breast cancer tissue, being DNMT3B level significantly higher ($p=0.0391$) than DNMT1 level. Only DNMT1 exhibit a correlation with the global methylation, despite inversely related. In addition, DNMTs presented a tightly positive correlation with BRCA1 and only DNMT2 seems to be related with BRCA2. Patients submitted to adjuvant therapies showed a significant decrease in DNMT2 expression ($p=0.0013$), indicating reduced methylation levels in tRNA molecules. Family history of breast cancer was the only independent variable that correlated to DNMT1 level ($p=0.0043$), being higher in patients with hereditary risk. **Conclusions:** Our results points to an important role of DNMTs in breast cancer and further studies are necessary to elucidate the underlying mechanisms involved in methylation process, contributing to breast cancer development and progression

Keywords: breast cancer; DNA methylation, DNA methyltransferases; global methylation

INTRODUCTION

Breast cancer is the most common cancer and the leading cause of cancer deaths among women worldwide. It comprises a heterogeneous disease with different molecular and cellular characteristics; variable clinical behaviours; different survival rates, incidence and response to therapeutic. Nowadays, classical genetics alone cannot explain this diversity of phenotypes, so breast cancer, as other types of cancers, has been considered as an epigenetic disease at the same level that it is considered a genetic disease. (Abdel-Hafiz & Horwitz, 2015; Bertos & Park, 2011; Esteller & Herman, 2002)

Epigenetics is defined as heritable changes in gene expression without a change in the DNA sequence itself. (Chuang & Jones, 2007) DNA methylation is the most studied and well-understood mechanism of epigenetic regulation and has profound roles in gene regulation, development, and carcinogenesis. It consists in a covalent addition of a methyl group at the 5' carbon of the cytosine ring, resulting in 5-methylcytosine. (Esteller, 2008) Two paradoxical changes in DNA methylation patterns coexist in human cancers: a global hypomethylation and a hypermethylation in the promoter regions. (Shukla *et al.*, 2010) Although, global DNA hypomethylation was the first epigenetic abnormality to be identified in cancer cells compared to normal cells, hypermethylation of promoter specific genes has been studied more extensively. (Feinberg & Tycko, 2004)

DNA methyltransferases (DNMTs) are the enzymes that catalyse the addition of methyl groups to cytosine residues in DNA. DNMT enzyme family consist of five DNMT isoforms—DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B, and DNMT3L—but only DNMT1, 3A, and 3B methylate DNA. (Foulks *et al.*, 2012) DNMT1 is responsible for maintaining patterns of DNA methylation during cell division and has been implicated in the global methylation process. DNMT3A and 3B seems to mediate *de novo* DNA methylation and has been correlated with the hypermethylation of the promotor regions in cancer. (Siedlecki & Zielenkiewicz, 2006) Several studies have shown different profile of DNMT expression in a variety of cancers, mainly DNMT1 and DNMT3B levels. (Girault *et al.*, 2003) Despite sequence similarity to the DNMT family, DNMT2 does not methylate DNA, but instead methylates a specific cytosine in tRNA^{Asp} and has been alternatively named tRNA aspartic methyltransferase 1 (TRDMT1). (Foulks *et al.*, 2012; Goll *et al.*, 2006) DNMT2 is highly conserved between species suggesting its important role in maintaining cellular homeostasis.

Although little is known about the exact function of this enzyme, DNMT2 expression is also altered in cancer tissue. (Elhardt *et al.*, 2015; Schaefer *et al.*, 2009)

A growing list of tumours suppressor genes has been described as silenced in breast cancer by promoter CpG methylation which facilitates cells growth and survival, resulting in tumour initiation and progression, directly contributing to tumorigenesis (Xiang *et al.*, 2011; Esteller, 2007). Among them, BRCA1, a tumour suppressor gene involved in DNA repair, has been widely described as silenced by promoter methylation in breast cancer. (Stefansson *et al.*, 2011; Tapia *et al.*, 2008; Esteller 2007; Esteller *et al.*, 2000) Besides, HER4/ERBB4, a tyrosine kinase receptor that belongs to the epidermal growth factor receptor-family, was postulated to have a tumour suppressor function and to be epigenetically suppressed in breast cancer through promoter hypermethylation. (Fujiwara *et al.*, 2014; Das *et al.*, 2010)

In this context, this study aimed to evaluate the expression levels of DNMT1, DNMT2 and DNMT3B in breast tumours, its association with the global methylation processes; the effect of these molecules over BRCA1, BRCA2, ERBB2 and ERBB4 genes and its influence in the intrinsic characteristics of patients and tumours.

MATERIAL AND METHODS

Patients and samples

A total of 42 patients were enrolled in this study, from December 2013 to May 2014. Fragments of fresh tumours were collected at the time of surgical procedure at Barão de Lucena Hospital, Recife, Brazil. According to histological analysis, 31 patients were diagnosed with Invasive Ductal Carcinoma (IDC) Breast Cancer, being 07 Triple Negative Breast Cancer (TNBC) and 24 ER+ patients. Tumours histologically classified as HER2+ subtype (n=2), Lobular (n=2), Micropapilar (n=1), Mucinous (n=2) and Papilar (n=1), as well tumours not classified (n=1) were excluded. Two samples showed low quality during the analysis, so were excluded from further studies. Tissues from the healthy opposite breast were obtained from four patients during an oncoplastic surgery (procedure realized immediately after the excision of the tumour from other breast). All patients signed the informed consent

for research and attended to a short questionnaire to provide personal data. Clinical details were retrieved from their medical records. All fragment tissues were conserved in TRIzol® Reagent (Life Technologies) and stored in freezer at -20°C until extraction procedure.

DNA/RNA Extraction, cDNA Conversion and Storage

DNA and RNA were obtained using respectively QIAasympphony® DSP DNA Kit (QIAGEN) and QIAasympphony® RNA Kit (QIAGEN), dedicated to QIAasympphony system, according to the instructions. All sample eluates were quantified using NanoDrop™ Spectrophotometer (Thermo Scientific), then DNA samples were stored at -20°C and RNA samples were stored at -80°C. cDNA was synthesized and amplified by using QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN), quantified using NanoDrop™ Spectrophotometer (Thermo Scientific) and stored at -20°C.

qPCR analysis for mRNA expression

All primers (Table 1) were obtained from IDT® (Integrated DNA Technologies), diluted and stored according to manufacturer's instructions. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed in Rotor-Gene Q (QIAGEN), using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), according the instruction of the manufacturer. All samples, as well NTCs (non-template control), were tested twice and melting curve analysis was performed to check the specificity of all reactions. Only duplicates with standard deviation (SD) lower than 1.00 in quantification cycle (Ct) were accepted. Relative quantification of target gene expression was performed according to the comparative Ct method using β -actin as an endogenous control.

Global DNA Methylation

The global DNA methylation status was determined by ELISA assay using the 5-mC DNA ELISA kit (Zymo Research). This kit is based on the recognition and quantification of the methylated DNA fraction using a 5-methylcytosine antibody and a standard curve generated by methylated/demethylated *E. coli* DNA. The absorbance was measured by the Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific). All samples were tested

twice and only duplicates with a deviation of absorbance lower than 0.1 were considered. The output values were multiplied by the human CpG density/genome factor provided by the manufacturer [*E. coli* CpG density/genome length is 0.075 and human CpG density/genome length is 0.009 (28,700,086/3,137,161,264), and the fold difference between *E. coli* and human CpG density is 8.3].

Statistical analysis

GraphPad Prism version 5.0 for WindowsTM was used in all calculations. Mann-Whitney test was used to compare gene expressions between two groups and Kruskal-Wallis test was used to compare gene expression between more than two groups. Correlation analysis was performed by Pearson test to parametric variables and by Spearman test to nonparametric variables. All p-values are two-sided and considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

The median age of the patients was 53 years (range 32-100 years), being 61% older than 50 years. Of the 31 patients, 9 (29%) declared family history of breast cancer, 19 (61%) declared no breast cancer family background and 3 (10%) could not answer this question. Only 9 (29%) patients were submitted to adjuvant therapies. Most patients 24 (77%) were ER+/PR±/HER2- in tissue immunohistochemistry analysis, against 7 (23%) that were triple negative (ER-/PR-/HER2-). Ki-67 levels were unclear in 7 (23%) patients, so sub-classification of Luminal Breast Cancer (LBC) was not considered. Tumour size greater than 2 cm was observed in 22 (71%) patients, being smaller than 2 cm in only 8 (26%) patients. Lymph node status was positive in 16 (52%) patients. None of them was classified as well differentiated according to histological grade (Tables 2 and 3).

Global DNA Methylation

Global methylation in breast tumour tissues was significant low ($p = 0.0034$) compared to the levels in healthy tissues (Figure 1) but no difference was found between LBC and

TNBC (Table 2). In order to analyse the influence of each DNMT in the global methylation process, the expression levels of DNMT1 and DNMT3B were correlated with the global methylation profile. Only DNMT1 showed correlation ($p=0.0160$) with DNA methylation. Although it was expected as positive correlation, we found the opposite behaviour (Figure 2). None of the risk or prognostic factors was related with the global methylation levels (Table 2).

DNA Methyltransferases (DNMTs) Expression

The expression levels of DNMT1, DNMT2 and DNMT3B were higher in breast cancers tissues than in healthy opposite breasts tissues (Table 4). However, only DNMT1 and DNMT3B showed significant increase ($p=0.0034$; $p=0.0031$, respectively) in breast cancer, being DNMT3B level significantly higher ($p=0.0391$) than DNMT1 level (Figure 3). Moreover, DNMT1 expression was related to family history of breast cancer ($p=0.0043$) compared with those without hereditary risk. In addition, patients submitted to adjuvant therapies showed a significant decrease ($p=0.0013$) in DNMT2 expression level (Table 2). The expression of DNMT1 and DNMT3B shows a tendency to enhance with the advances in clinical stage, but it was not significantly relevant (Table 2).

DNMTs versus BRCA genes

BRCA1 and BRCA2 expressions levels were slightly enhanced in healthy tissues from the opposite breast compared to breast cancer tissues, although without statistically significance (Table 4). Concerning of the relationship between BRCA genes with the methylation machinery, it was found that BRCA1 gene is tightly linked with DNMTs, with positive correlation in all of them (Figure 4). Otherwise, BRCA2 showed to be correlated only with DNMT2 expression (Figure 5). It was also verified the relevance of these two genes on the risk and prognostic factors, showing significant lower level ($p=0.0349$) of BRCA1 and BRCA2 expression in patients in their fifties or young (Table 3).

DNMTs versus ERBB genes

Regarding to ERBB expression levels, only ERBB2 showed a significant increase ($p=0.0065$) in breast tumors compared to the opposite healthy breast (Table 4), but there is no association between the expression levels of DNMTs and ERBB genes. Analyzing the prognostic factors, both ERBB2 and ERBB4 presented a lower expression levels ($p=0.0043$; $p=0.0002$, respectively) in the TNBC subtype when compared to the LBC subtype (Table 3). Besides, it was observed a lower level ($p<0.05$) of ERBB2 expression in tumors poorly differentiated compared to those moderately differentiated (Table 3). However, this observation could be biased, once 5 of 9 poorly differentiated tumors are TNBC which have lower ERBB2 expression levels compared to LBC.

DISCUSSION

Alterations of DNA methylation, which influence in gene expression and genome integrity, are an important component of cancer development including in breast cancer (ESTELLER, 2008). Global DNA hypomethylation was the first epigenetic abnormality identified in cancer cells compared to normal cells (FEINBERG & TYCKO, 2004) and is a classical hallmark of breast cancer (BERNARDINO *et al.*, 1997; SOARES *et al.*, 1999; JACKSON *et al.*, 2004). More recently, genome-scale methods including MeDIP Sequencing (RUIKE *et al.* 2010) and Bissulfite Sequencing (HON *et al.*, 2012) have confirmed global hypomethylation as a hallmark of breast cancer. Although, nowadays, localized hypermethylation of promoter specific genes has been studied more extensively, global hypomethylation could potentially be important in diagnosis since it can be easily measured by assays with antibodies against 5-methylcytosine (BJANESY *et al.*, 2014; TELLEZ-PLAZA *et al.*, 2014). It also does not require the knowledge of specific hypermethylated sequences and appears to be an early event for breast cancer (WILSON *et al.*, 2007) Besides, in contrast with ours findings, a previous study carried out in 117 primary invasive carcinomas described association between the global DNA hypomethylation and the disease stage ($p=0.0009$), tumor size ($p=0.0026$), histologic grade ($p=0.0097$) and a tendency for DNA hypomethylation in patients with positive axillary lymph nodes (N1) ($p=0.055$).

However, they could not find significant association between DNA methylation and the breast cancer subtype (SOARES *et al.*, 1999), in agreement with our results.

There is yet no consensus about the underlying mechanisms evolved in the paradoxical coexistence of a global decrease in methylation with regional hypermethylation found in cancers, including breast cancer (SHUKLA *et al.*, 2010). It has been postulated that mammals have two classes of DNMTs (maintenance and *de novo* DNMTs). DNMT1 is the enzyme implicated in the maintenance of methylation during DNA replication and its deficiency may lead to global hypomethylation. Otherwise, DNMT3A and DNMT3B are implicated in the generation of *de novo* methylation patterns, and could be related to the promoter hypermethylation (ABDEL-HAFIZ & HORWITZ, 2015). Several studies have shown DNMT overexpression (mainly DNMT1 and DNMT3B) in a variety of cancers, compared to normal tissues. Besides, DNMT3B is described as having the highest expression level (GIRAULT *et al.*, 2003; ROBERTSON *et al.*, 1999). In accordance with these findings, our results showed DNMT1 and DNMT3B expression levels increased in breast tumors with respect to healthy tissues, and DNMT3B level higher than DNMT1. Girault *et al* (2003) also described DNMT3B overexpression significantly related to grade III, ER negativity and strong Ki-67 expression. Although our results failed to confirm these findings, we found the expression for DNMT1 and DNMT3B shows an increasing tendency with the advances in clinical stage, but it was not significantly relevant. Nevertheless, we found DNMT1 levels significantly higher in cases of familial than sporadic breast cancer and DNMT2 level significantly suppressed in patients under adjuvant therapies.

Our findings also have shown DNMT1 as the single DNMT related to global methylation, however, it was found a negative correlation: the global hypomethylation accentuates according as the level of DNMT1 expression increases. Jones & Liang (2009) proposed that the genome couldn't be kept methylated by the DNMT1 enzyme alone, once all replicating systems, such as DNA synthesis, need a proofreading mechanism to ensure that the fidelity of patterns is maintained. They proposed that in addition to DNMT1 action at the replication fork, it could perform error correction. Maybe, this last mechanism could also be not efficient in cancer, with increased levels of DNMT1 simultaneously to global hypomethylation in cancer as a failed compensatory mechanism. It could be an explanation to DNMT1 tendency to enhance when global methylation is decreased, according our results.

A previous study about the correlation between DNMT1 and BRCA1 expression described a positive correlation between these two genes and postulated that DNMT1 is a transcriptional target of BRCA1 which binds to the promoter of the DNMT1 and this binding is required for maintaining a transcriptional active configuration of the promoter in both mouse and human cells (SHUKLA *et al.*, 2010). It could explain the occurrence of DNMT1 levels increment to the extent that BRCA1 also increase.

Although we did not find correlations between ERBB2 and ERBB4 with any DNMT, Das *et al.* (2010) identified a CpG island within the HER4 promoter and showed an inverse correlation between HER4 expression and the extent of promoter methylation. Besides, when they treated HER4-negative BT20 cell line (representing the triple negative subtype) with the DNA demethylating agent 5-aza-20-deoxycytidine (DAC), it was observed an enhanced HER4 expression. They also found that DAC treatment to reactive HER4 expression in combination with the HER4 ligand heregulin-b1 (HRG) resulted in apoptosis of BT20 cells, supporting a tumor suppressor function to this gene and providing a novel therapeutic strategy for TNBC. In addition, the group also verified HER4 promoter methylation in a cohort of 25 primary breast carcinomas and detected a significant increase of HER4 promoter methylation in HER4-negative breast tumors. We do not found a relationship between HER4 and DNMT3B, but we observed lower levels of HER4 in TNBC compared to the LBC tissues. Fujiwara *et al.* (2014) achieved the same result, with ERBB4 mRNA overexpression associated with positive hormone receptor status.

CONCLUSIONS

Our results showed that global methylation in breast tumors is significantly low in comparison to normal breast tissues, presenting an important potential in diagnosis, since it appears to be an early event in this neoplasia and can be easily measured. Although our results points to an important role of DNMTs in breast cancer, further studies are needed to elucidate the underlying mechanisms involved that contribute to the development and progression of breast cancer.

REFERENCES

- Abdel-Hafiz, H. A., & Horwitz, K. B. (2015). Role of epigenetic modifications in luminal breast cancer. *Epigenomics*, 10(2217).
- Bernardino, J. et al. (1997) DNA hypomethylation in breast cancer: an independent parameter of tumor progression? *Cancer Genet. Cytogenet.*, 97, 83–89.
- Bertos, N. R., & Park, M. (2011). Review series Breast cancer — one term , many entities?. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(10), 3789–3796
- Bjanesoy, T. E., Andreassen, B. K., Bratland, E., Reiner, A., Islam, S., Husebye, E. S., & Bakke, M. (2014). Altered DNA methylation profile in Norwegian patients with Autoimmune Addison's Disease. *Molecular immunology*, 59(2), 208–16.
- Chuang, J. C., & Jones, P. a. (2007). Epigenetics and microRNAs. *Pediatric research*, 61(5), 24–29.
- Das, P. M., Thor, a D., Edgerton, S. M., Barry, S. K., Chen, D. F., & Jones, F. E. (2010). Reactivation of epigenetically silenced HER4/ERBB4 results in apoptosis of breast tumor cells. *Oncogene*, 29(37), 5214–9.
- Elhardt, W., Shanmugam, R., Jurkowski, T. P., & Jeltsch, A. (2015). Somatic cancer mutations in the DNMT2 tRNA methyltransferase alter its catalytic properties. *Biochimie*, 112, 66–72.
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature reviews. Genetics*, 8(4), 286–98.
- Esteller, M. (2008). Epigenetics in Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 358, 1148–59.
- Esteller, M., & Herman, J. G. (2002). Cancer as an epigenetic disease : DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *Journal of Pathology*, 196, 1–7.
- Esteller, M., Silva, J. M., Dominguez, G., Bonilla, F., Matias-guiu, X., Lerma, E., Bussaglia, E., et al. (2000). Promoter Hypermethylation and BRCA1 Inactivation in Sporadic Breast and Ovarian Tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(7), 564–569.
- Feinberg, A. P., & Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer*, 4(February), 143–153.
- Foulks, J. M., Parnell, K. M., Nix, R. N., Chau, S., Swierczek, K., Saunders, M., Wright, K., et al. (2012). Epigenetic drug discovery: targeting DNA methyltransferases. *Journal of biomolecular screening*, 17(1), 2–17.

- Fujiwara, S., Ibusuki, M., Yamamoto, S., Yamamoto, Y., & Iwase, H. (2014). Association of ErbB1–4 expression in invasive breast cancer with clinicopathological characteristics and prognosis. *Breast Cancer*, 21(4), 472–481.
- Girault, I., Lidereau, R., & Bie, I. (2003). Expression Analysis of DNA Methyltransferases 1, 3A , and 3B in Sporadic Breast Carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 9, 4415–4422.
- Goll, M. G., Kirpekar, F., Maggert, K. A., Yoder, J. A., Hsieh, C., Zhang, X., Golic, K. G., et al. (2006). Methylation of tRNA Asp by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2. *Science*, 311(10), 2–6.
- Hon, G. C., Hawkins, R. D., Caballero, O. L., Lo, C., Lister, R., Pelizzola, M., Valsesia, A., et al. (2012). Global DNA hypomethylation coupled to repressive chromatin domain formation and gene silencing in breast cancer. *Genome Research*, 22, 246–258.
- Jackson, K. et al. (2004) DNA hypomethylation is prevalent even in lowgrade breast cancers. *Cancer Biol. Ther.*, 3, 1225–1231.
- Jones, P. a, & Liang, G. (2009). Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nature reviews. Genetics*, 10(11), 805–11.
- Robertson, K. D., Uzvolgyi, E., Liang, G., Talmadge, C., Sumegi, J., Gonzales, F. A., & Jones, P. A. (1999). The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1 , 3a and 3b :coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Research*, 27(11), 2291–2298.
- Ruike, Y., Imanaka, Y., Sato, F., Shimizu, K., & Tsujimoto, G. (2010). Genome-wide analysis of aberrant methylation in human breast cancer cells using methyl-DNA immunoprecipitation combined with high-throughput sequencing. *BMC Genomics* 2010, 11(137).
- Schaefer, M., Hagemann, S., Hanna, K., & Lyko, F. (2009). Azacytidine inhibits RNA methylation at DNMT2 target sites in human cancer cell lines. *Cancer research*, 69(20), 8127–32.
- Shukla, V., Coumoul, X., Lahusen, T., Wang, R.-H., Xu, X., Vassilopoulos, A., Xiao, C., et al. (2010). BRCA1 affects global DNA methylation through regulation of DNMT1. *Cell research*, 20(11), 1201–15.
- Siedlecki, P., & Zielenkiewicz, P. (2006). Mammalian DNA methyltransferases. *Acta Biochimica Polonica*, 53(2), 245–256.
- Soares, J. et al. (1999) Global DNA hypomethylation in breast carcinoma: correlation with prognostic factors and tumor progression. *Cancer*, 85, 112–118.
- Stefansson, O. A., Jonasson, J. G., Olafsdottir, K., Hilmarsdottir, H., Olafsdottir, G., Esteller, M., Johannsson, O. T., et al. (2011). CpG island hypermethylation of BRCA1 and loss of pRb as co-occurring events in basal/triple-negative breast cancer. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*, 6(5), 638–49.

Szyf, M., Pakneshan, P., & Rabbani, S. a. (2004). DNA methylation and breast cancer. *Biochemical pharmacology*, 68(6), 1187–97.

Tapia, T., Smalley, S. V., Kohen, P., Muñoz, A., Solis, L. M., Corvalan, A., Faundez, P., et al. (2008). Promoter hypermethylation of BRCA1 correlates with absence of expression in hereditary breast cancer tumors. *Epigenetics*, 3(3), 157–163.

Tellez-plaza, M., Tang, W., Shang, Y., Umans, J. G., Francesconi, K. A., Goessler, W., Ledesma, M., et al. (2014). Association of Global DNA Methylation and Global DNA Hydroxymethylation with Metals and Other Exposures in Human Blood DNA Samples. *Environmental Health Perspectives*, 946(9), 946–954.

Wilson, A. S., Power, B. E., & Molloy, P. L. (2007). DNA hypomethylation and human diseases. *Biochimica et biophysica acta*, 1775(1), 138–62.

Xiang, T. X., Yuan, Y., Li, L. L., Wang, Z. H., Dan, L. Y., Chen, Y., Ren, G. S., et al. (2011). Aberrant Promoter Methylation Silences Critical TSGs in Breast Carcinoma Clinical Implications of Promoter Methylation in Breast Cancer early detection and prognosis in breast cancer. *Chinese Journal of Cancer*, 30, 1–9.

Figure 1: Levels of global methylation in breast cancer tissue (BCT) and opposite healthy breast tissue (OHBT).

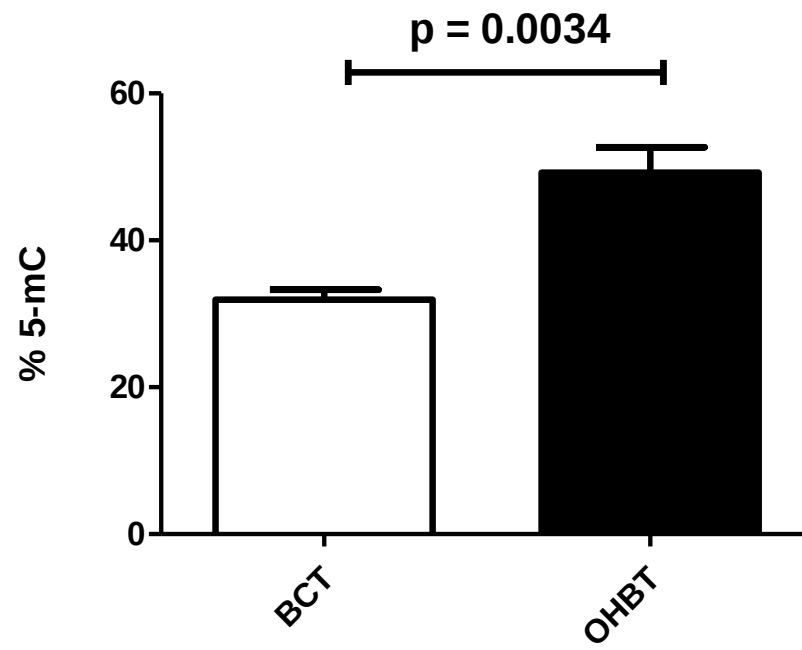


Figure 2: Correlation of DNMT1 expression levels with percentage of global DNA methylation.

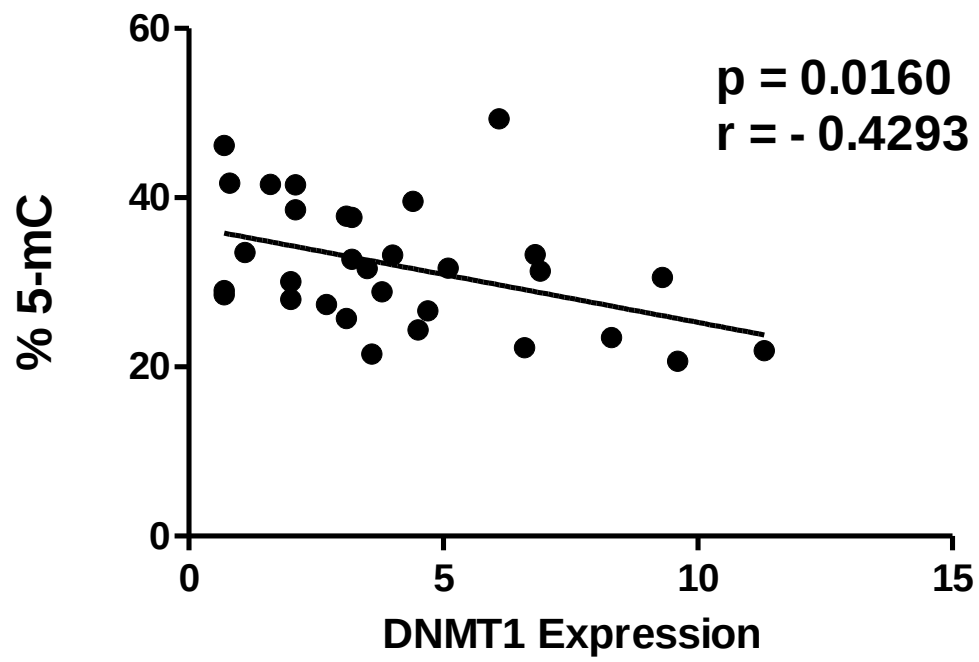


Figure 3: Comparative expression of DNMTs between breast cancer tissue (BCT) and opposite healthy breast tissue (OHBT).

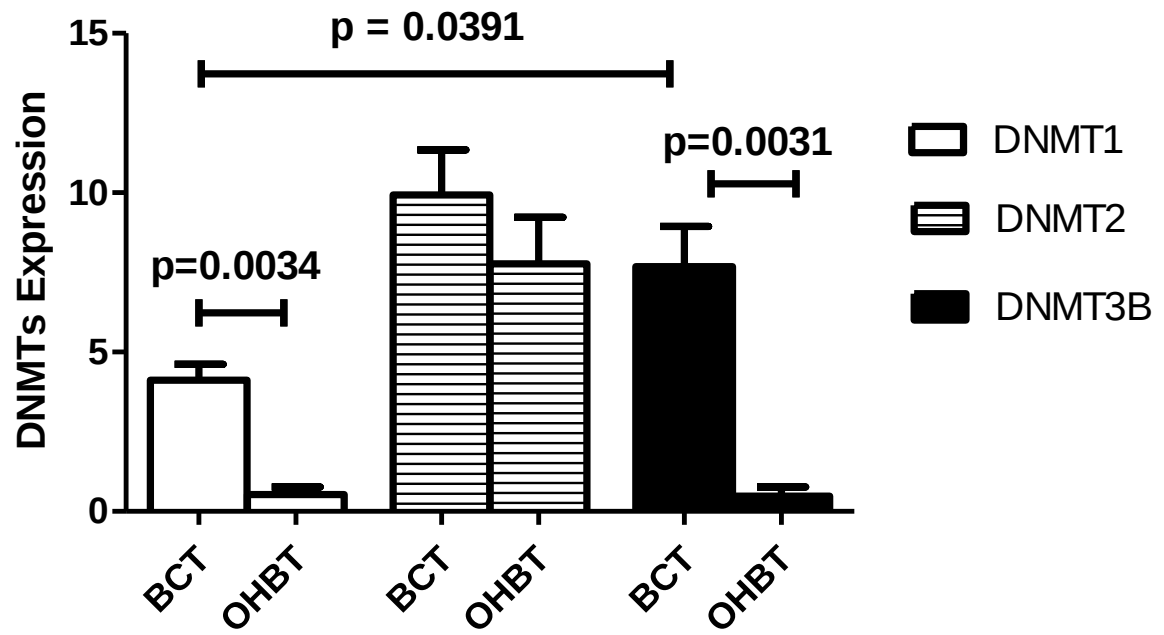


Figure 4: Correlation between BRCA1 with DNMT1 (A), DNMT2 (B) and DNMT3B (C).

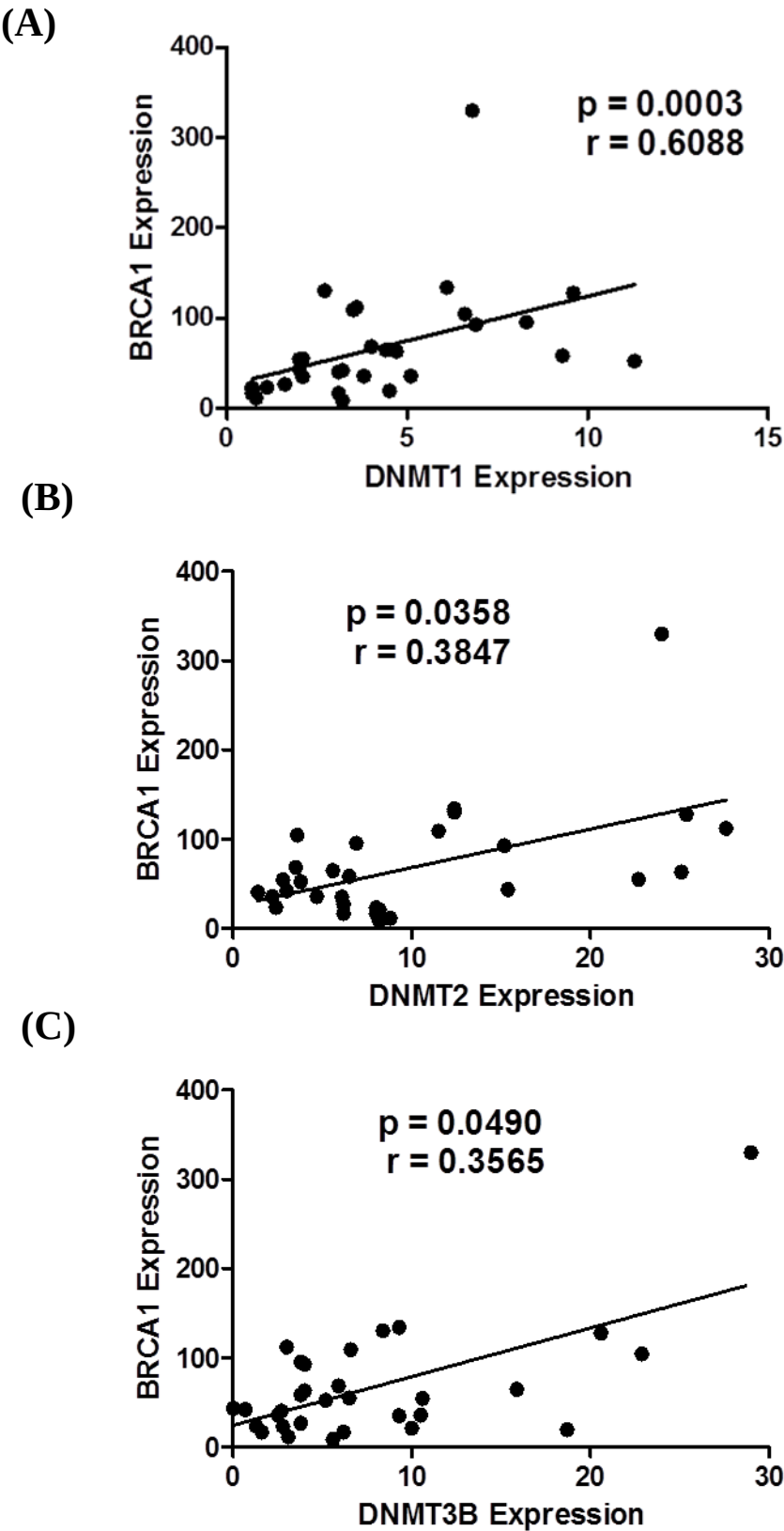


Figure 5: Correlation between BRCA2 with DNMT2

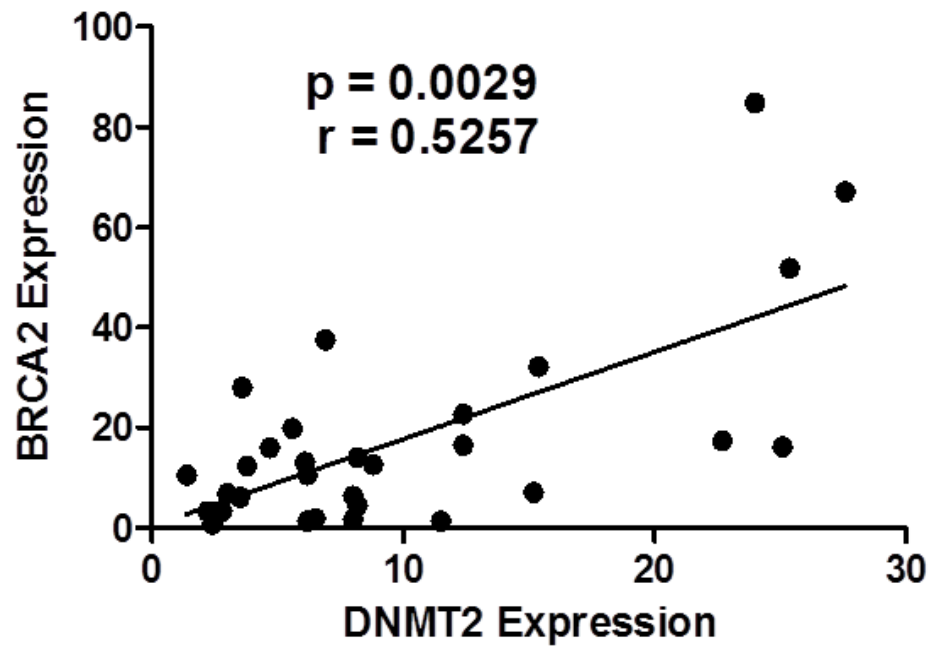


Table 1. Primers sequences

Gene	Primer Sequence
β -actin	5'-CCTACCCAGCACAAT-3'
	5'-GCCGATCCACAC GGAGTACT-3'
DNMT1	5'-GGTCTTGGAGTTCATGACTGT-3'
	5'-GAAAAAGAACCTGAAAAAGTAAATCCA-3'
DNMT2 (TRDMT1)	5'-ATTCTCAACCTGCACATCCTC-3'
	5'-G TTCAGCCCACTTG TAGAAGG-3'
DNMT3B	5'-TTCTCGGCTCTGATCTTCATC-3'
	5'-AAACCCAACAACACGCAAC-3'.
BRCA1	5'-ATACCTGCCTCAGAATTCCTC-3'
	5'-AATGGAAGGAGAGTGCTTGG-3'
BRCA2	5'-GGAATTAGAGTTACACTGAGGGT-3'
	5'-AGGATGAATATGAAGAGTGGT GT-3'
ERBB2	5'-CATGCGGGAGAATTCAGACA-3'
	5'-ATCTGCACCATTGATGTCTACA-3'
ERBB4	5'-CCAAATCCCGATGAACGAGT-3'
	5'-GATCACAACTGCTGCTTAACTG-3'

Table 2. Relationship between levels of DNMT genes expression tested and intrinsic characteristics of patients and tumors.

Variables	n (%)	% Met Mean ($\pm$ SD)	<i>p</i> value	DNMT1 Expression Median	<i>p</i> value	DNMT2 Expression Median	<i>p</i> value	DNMT3B Expression Median	<i>p</i> value
Total population	31 (100)	31.94 ($\pm$ 7.4)	-	3.50	-	7.45	-	5.6	-
Age									
≤ 50	12 (39)	32.11 ($\pm$ 7.2)	0.9838	3.15	0.4055	6.50	0.1432	3.80	0.2013
> 50	19 (61)	31.84 ($\pm$ 7.7)		4.00		8.80		6.50	
Family history of BC									
No	19 (61)	32.36 ($\pm$ 7.0)	0.5550	3.10	0.0043**	8.00	0.5770	5.60	0.7490
Yes	9 (29)	29.30 ($\pm$ 4.6)		6.60		5.60		4.00	
N/A	3 (10)								
Adjuvant therapy									
No	22 (71)	32.00 ($\pm$ 7.5)	0.9480	3.20	1	8.20	0.0013**	5.20	0.6025
Yes	9 (29)	31.81 ($\pm$ 7.5)		3.80		3.50		5.90	
Immunohistochemistry									
ER+ / PR $\pm$ / HER2 -	24 (77)	31.98 ($\pm$ 7.2)	0.9435	3.35	0.7052	8.00	0.4922	5.40	0.9247
Triple Negative	7 (23)	31.82 ($\pm$ 8.7)		5.10		6.20		6.20	
Ki - 67									
$< 14\%$	5 (16)	28.92 ($\pm$ 4.2)	0.3555	3.20	0.8588	8.20	0.9703	4.00	0.1884
$> 14\%$	19 (61)	32.84 ($\pm$ 8.0)		3.60		7.10		6.20	
N/A	7 (23)	-	-	-	-	-	-	-	-

(Continued on page 63)

Variables	n (%)	% Met Mean (±SD)	<i>p</i> value	DNMT1 Expression Median	<i>p</i> value	DNMT2 Expression Median	<i>p</i> value	DNMT3B Expression Median	<i>p</i> value
Tumor size									
< 2 cm	8 (26)	30.08 (± 8.1)	0.2317	3.90	0.9439	7.55	0.8072	6.20	0.9813
2 - 5 cm	19 (61)	32.56 (± 7.4) ¹		3.35 ¹		8.00 ¹		5.40 ¹	
> 5 cm	3 (10)								
N/A	1 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
Histological grade									
Well differentiated	0 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-
Moderately differentiated.	21 (68)	31.23 (± 6.9)	0.6838	3.55	0.7059	7.45	0.6205	4.60	0.5713
Poorly differentiated.	9 (29)	33.51 (± 9.0)		3.10		8.00		6.50	
N/A	1 (3)	-		-		-		-	
Node Involment									
No	15 (48)	31.73 (± 7.6)	0.7972	3.65	0.2385	11.95	0.183	5.25	0.8102
Yes	16 (52)	32.14 (± 7.5)		3.20		6.20		5.20	
1 - 3 nodes	6 (19)	32.65 (± 7.3)		2.75		6.05		4.50	
4 - 9 nodes	8 (26)	31.84 (± 8.0) ²	0.7128	2.70 ²	0.7675	6.20 ²	0.7234	5.60 ²	0.9061
> 10 nodes	2 (6)								
Clinical staging (TNM)									
Stage I	8 (26)	31.60 (± 6.5)	0.4519	2.55	0.1205	7.45	0.8285	3.80	0.3009
Stage II	13 (42)	33.99 (± 8.6)		3.60		6.50		6.20	
Stage III	10 (32)	29.55 (± 6.3)		4.25		8.80		7.15	
Prognosis (NPI)									
Good	15 (48)	31.32 (± 5.8)	0.6800	3.20	0.2886	8.80	0.4966	4.00	0.9133
Moderate	14 (45)	30.32 (± 7.8)		4.20		6.05		4.50	
Bad	2 (6)	33.34 (± 6.0)		1.95		7.20		5.90	

N/A Not Available

* statistical significance ($p < 0.05$)¹ tumors size bigger than 2cm² more than 3 nodes involved

Table 3. Relationship between levels of BRCA and ERBB genes expression tested and intrinsic characteristics of patients and tumors.

Variables	n (%)	BRCA1 Expression Median	p value	BRCA2 Expression Median	p value	ERBB2 Expression Median	p value	ERBB4 Expression Median	p value
Total population	31 (100)	52.6	-	12.40	-	571.10	-	80.3	-
Age									
≤ 50	12 (39)	31.30	0.0349*	5.70	0.0349*	533.60	0.7610	63.40	0.4531
> 50	19 (61)	63.00		16.00		612.10		106.70	
Family history of BC									
No	19 (61)	42.20	0.1923	10.60	0.8440	571.10	0.3500	80.30	1.0000
Yes	9 (29)	68.50		7.10		967.20		92.30	
N/A	3 (10)	-	-	-	-	-	-	-	-
Adjuvant therapy									
No	9 (29)	54.85	0.8277	12.85	0.1917	591.60	0.4208	84.40	0.4463
Yes	22 (71)	40.40		6.90		559.40		24.20	
Immunohistochemistry									
ER+ / PR ± / HER2 -	24 (77)	48.10	0.8316	12.50	0.2375	650.40	0.0043**	99.50	0.0002***
Triple Negative	7 (23)	54.50		3.40		165.20		2.20	
Ki - 67									
< 14%	5 (16)	43.60	0.8311	12.40	0.5696	743.30	0.3555	168.60	0.0646
> 14%	19 (61)	54.50		10.50		571.10		56.40	
N/A	7 (23)	-	-	-	-	-	-	-	-

(Continued on page 65)

Variables	n (%)	BRCA1 Expression Median	p value	BRCA2 Expression Median	p value	ERBB2 Expression Median	p value	ERBB4 Expression Median	p value
Tumor size									
< 2 cm	8 (26)	58.75		16.10		478.90		71.65	
2 - 5 cm	19 (61)	42.90 ¹	0.2807	8.85 ¹	0.2506	581.20 ¹	0.7605	77.60 ¹	0.542
> 5 cm	3 (10)								
N/A	1 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
Histological grade									
Well differentiated	0 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-
Moderately differentiated.	21 (68)	43.60		12.40		743.30		91.00	
Poorly differentiated.	9 (29)	58.40	0.3898	16.50	0.9099	387.40	0.0113* †	29.00	0.0668
N/A	1 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-
Node Involvement									
No	15 (48)	55.20		13.10		612.10		92.30	
Yes	16 (52)	44.15	0.2130	11.50	0.4526	434.40	0.1727	63.40	0.323
1 - 3 nodes	6 (19)	38.10		12.50		365.50		82.95	
4 - 9 nodes	8 (26)	45.10 ²	0.4923	8.50 ²	0.7128	641.90 ²	0.7128	55.45 ²	0.7925
> 10 nodes	2 (6)								
Clinical staging (TNM)									
Stage I	8 (26)	33.65		10.55		533.60		85.65	
Stage II	13 (42)	58.40	0.1998	16.00	0.9344	332.60	0.0787	29.00	0.2432
Stage III	10 (32)	60.55		9.75		1032.00		98.35	
Prognosis (NPI)									
Good	15 (48)	42.90		12.85		650.40		99.50	
Moderate	14 (45)	58.40	0.4374	12.40	0.7524	507.70	0.3693	54.50	0.1593
Bad	2 (6)	12.70	-	2.95	-	97.45	-	36.25	-

N/A Not Available * statistical significance (p<0.05) ¹ tumors size bigger than 2cm ² more than 3 nodes involved † probably a biased analysis once 5 of 9 Poorly Differentiated tumors are Triple Negative which have lower ERBB2 expression.

Table 4. Correlation between levels of gene expression in breast tumors and healthy breast.

BCT x OBHT	n	% Met Mean ($\pm$ SD)	<i>p</i> value	DNMT1 Expression Median	<i>p</i> value	DNMT2 Expression Median	<i>p</i> value	DNMT3B Expression Median	<i>p</i> value
Breast Cancer Tissue (BCT)	31	31.94 ($\pm$ 7.4)	0.0034**	3.50	0.0034**	7.45	0.9361	5.60	0.0031**
Oposite Healthy Breast Tissue (OHBT)	4	49.24 ($\pm$ 6.8)		0.45		7.10		0.35	
BCT x OBHT	n (%)	BRCA1 Expression Median	<i>p</i> value	BRCA2 Expression Median	<i>p</i> value	ERBB2 Expression Median	<i>p</i> value	ERBB4 Expression Median	<i>p</i> value
Breast Cancer Tissue (BCT)	31	52.60	0.5861	12.40	0.1694	571.10	0.0065**	80.30	0.3120
Oposite Healthy Breast Tissue (OHBT)	4	67.05		55.90		84.00		46.95	

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que a metilação global em tumores de mama é significativamente menor em comparação com tecidos mamários normais, apresentando importante potencial no diagnóstico, uma vez que parece ser um evento precoce nesta neoplasia e pode ser facilmente mensurada. Embora nossos resultados apontem para um papel importante das DNMTs no câncer de mama, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos subjacentes envolvidos que contribuem para o desenvolvimento e a progressão do câncer de mama.