



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Ísis Salviano Soares de Amorim

Avaliação do papel da metilação de DNA na repressão gênica, restrita à hipóxia, do supressor tumoral *SAVI* e seu potencial antitumoral

Rio de Janeiro

2020

Ísis Salviano Soares de Amorim

Avaliação do papel da metilação de DNA na repressão gênica, restrita à hipóxia, do supressor tumoral *SAVI* e seu potencial antitumoral

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Andre Luiz Mencalha

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A524 Amorim, Ísis Salviano Soares de.
Avaliação do papel da metilação de DNA na repressão gênica, restrita à hipóxia do supressor tumoral SAV1 e seu potencial antitumoral / Ísis Salviano Soares de Amorim. - 2020.
133f.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Mencialha

Doutorado (Tese) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Expressão gênica – Teses. 2. Agentes antineoplásicos– Teses. 3. Metilação de DNA. 4. Hipóxia Tumoral. I. Mencialha, André Luiz. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 615.277.3

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Ísis Salviano Soares de Amorim

Avaliação do papel da metilação de DNA na repressão gênica, restrita à hipóxia, do supressor tumoral *SAVI* e seu potencial antitumoral

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 9 de outubro de 2020.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha (Orientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Tatiana de Almeida Simão

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Sandra König

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Carolina Panis

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, a Deus por mais uma oportunidade na minha vida e por tanto ter me ajudado, durante a pós-graduação.

À minha família, meu bem mais precioso, à minha mãe, meu pai, minha vó, meus tios(as), primos(as) e cachorros, por todo apoio, incentivo e amor incondicional, de sempre.

Aos meus amigos e ao pessoal do Lab., em especial, Isabelle, Daphne, Priscyanne, Juliana, Mariana, Norma, Matheus, Keila, Luiz, Andrezza, Diego e Professor Adenilson, pelo companheirismo e ajuda nos momentos em que precisei.

Ao Professor Doutor Andre Luiz Mencialha por todo suporte, por toda compreensão e, por toda oportunidade de crescimento na carreira científica e acadêmica, por sempre se esforçar em oferecer o melhor para a formação de seus alunos.

A ciência é luz
A filosofia é trabalho
A religião é amor
A luz exalta a inteligência
O trabalho enriquece a razão
O amor diviniza o sentimento

Emmanuel

RESUMO

AMORIM, Ísis Salviano Soares de. **Avaliação do papel da metilação de DNA na repressão gênica, restrita à hipóxia, do supressor tumoral SAVI e seu potencial antitumoral.** 2020. 133 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020

A hipóxia tumoral tem sido associada ao pior prognóstico, sobretudo em câncer de mama. Ela induz hipometilação genômica global e hipermetilação de *loci* específicos no DNA. A metilação de DNA é um mecanismo epigenético, contexto-dependente, reversível que ocorre em ilhas CpGs localizadas no promotor e/ou primeiro éxon gênicos, promovendo o silenciamento gênico. Entretanto, pouco se sabe sobre quais genes são regulados por metilação em hipóxia. Preliminarmente, este trabalho identificou por microarranjo de DNA, que o gene do supressor tumoral *SAVI*, pertencente à via de sinalização Hippo, é um candidato à regulação por metilação de DNA, em hipóxia. Além disso, *SAVI* possui Ilha CpG em sua região promotora e tem sua expressão gênica aumentada diante do tratamento com agente demetilante de DNA. A ativação da via Hippo culmina com a inibição da proliferação celular e promoção de apoptose, atuando como supressora de tumor. Entretanto, a importância de *SAVI* em câncer de mama, principalmente em hipóxia, é pouco conhecida. Portanto, este trabalho analisou, *in vitro* e *in silico*, o perfil de expressão e metilação do gene *SAVI*, em normóxia e hipóxia, e o potencial prognóstico de *SAVI* para o câncer de mama, e ainda as alterações no transcriptoma em resposta ao agente demetilante (5-Aza-dC), em normóxia e hipóxia, por microarranjo de DNA. As linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 foram usadas como modelo experimental. As análises de expressão/localização subcelular proteica foram feitas por ICQ e expressão gênica por RT-qPCR. A metilação do promotor de *SAVI* foi avaliada por conversão com bissulfito e sequenciamento de DNA. As análises *in silico* foram realizadas através de diversas ferramentas de bioinformática. A análise de metilação revelou uma citosina metilada, em hipóxia, sítio de ligação para os fatores de transcrição, THAP1 e NRF1, indicando que esta metilação pode regular a expressão gênica de *SAVI*. A relação inversa das expressões de *SAVI* e *CYR61/CTGF*, genes alvo da via de Hippo, na MDA-MB-231, sugere que esta via pode estar mais direcionada para a face pró-tumoral, nesta linhagem, do que na MCF-7, o que pode estar associado à sua maior agressividade. *SAVI* é menos expresso em tecidos tumorais de mama do que em normais e a metilação pode contribuir para regulação da expressão gênica de *SAVI*, nos subtipos claudin-low e luminal A em normóxia. A menor expressão gênica de *SAVI* em amostras do grupo hipóxia sugere uma menor ação supressora tumoral em hipóxia do que em normóxia, e pode estar associada com o pior prognóstico relacionado à hipóxia. Os níveis de expressão de *SAVI* diminuíram de forma estágio-dependente e tiveram impacto na curva de sobrevivência. Os dados sugeriram *SAVI* como um supressor tumoral, com potencial prognóstico para o câncer de mama, no qual baixa expressão de *SAVI* está associada a um pior prognóstico. Além disso, vias pró-inflamatórias foram superexpressas após 5-Aza-dC. No entanto, 5-Aza-dC em normóxia mostrou uma quantidade maior de vias pró-inflamatórias superexpressas do que em hipóxia e aumento na expressão de NF-κB, sugerindo que a 5-Aza-dC induz uma maior alteração inflamatória, a níveis moleculares, em normóxia do que hipóxia.

Palavras-chave: Metilação de DNA. 5-Aza-dC. Expressão gênica. Hipóxia. *SAVI*.

ABSTRACT

AMORIM, Ísis Salviano Soares de. **Evaluation of DNA methylation role in the hypoxia-restricted gene repression of tumor suppressor *SAVI* and its antitumor potential.**

2020. 133 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020

Tumor hypoxia has been associated with a worse prognosis, especially in breast cancer. It induces global genomic hypomethylation and hypermethylation of specific loci in DNA. DNA methylation is an epigenetic, context-dependent, reversible mechanism that occurs in CpGs islands located in the promoter and/or first gene exon, promoting gene silencing. However, little is known about which genes are regulated by methylation in hypoxia. Preliminarily, this work identified by DNA microarray, that the tumor suppressor gene *SAVI*, belonging to the Hippo signaling pathway, is a candidate for regulation by DNA methylation, in hypoxia. In addition, *SAVI* has CpG Island in its promoter region and its gene expression is increased due to treatment with DNA demethylating agent. Activation of the Hippo pathway culminates with the inhibition of cell proliferation and the promotion of apoptosis, acting as a tumor suppressor. However, the importance of *SAVI* in breast cancer, especially in hypoxia, is little known. Therefore, this work analyzed, *in vitro* and *in silico*, the expression and methylation profile of the *SAVI* gene, in normoxia and hypoxia, and the prognostic potential of *SAVI* for breast cancer, as well as changes in the transcriptome in response to the demethylating agent. (5-Aza-dC), in normoxia and hypoxia, by DNA microarray. The MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines were used as an experimental model. The analysis of protein subcellular expression/location was performed by ICQ and gene expression by RT-qPCR. *SAVI* promoter methylation was evaluated by bisulfite conversion and DNA sequencing. *In silico* analyzes were performed using various bioinformatics tools. Methylation analysis revealed a methylated cytosine, in hypoxia, a binding site for the transcription factors, THAP1 and NRF1, indicating that this methylation can regulate the *SAVI* gene expression. The inverse relationship between *SAVI* and *CYR61/CTGF* expressions, Hippo pathway targets, in the MDA-MB-231, suggests that this pathway may be more directed towards the pro-tumor face, in this cell line, than in the MCF-7, which may be associated with its greater aggressiveness. *SAVI* is less expressed in breast tumor tissues than in normal ones and methylation may contribute to the regulation of *SAVI* gene expression, in the claudin-low and luminal A subtypes in normoxia. The lower *SAVI* gene expression in samples from the hypoxia group suggests lesser tumor suppressive action in hypoxia than in normoxia, and may be associated with the worse prognosis related to hypoxia. The *SAVI* levels expression decreased in a stage-dependent manner and had an impact on the survival curve. The data suggested *SAVI* as a tumor suppressor, with a potential prognosis for breast cancer, in which low expression of *SAVI* is associated with a worse prognosis. In addition, pro-inflammatory pathways were overexpressed after 5-Aza-dC. However, 5-Aza-dC in normoxia showed a greater amount of overexpressed pro-inflammatory pathways than in hypoxia and increased expression of NF- κ B, suggesting that 5-Aza-dC induces a greater inflammatory change, at molecular levels, in normoxia than hypoxia.

Keywords: DNA Methylation. 5-Aza-dC. Gene expression. Hypoxia. *SAVI*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação esquemática da via de HIF.....	23
Figura 2 –	Representação ilustrativa do silenciamento gênico promovido pela metilação do DNA.....	26
Figura 3 –	Representação ilustrativa da via de Hippo.....	33
Figura 4 –	Níveis relativos de mRNA de <i>IL1A</i> e <i>IL1B</i> após tratamento com agente demetilante 5-Aza-dC em normóxia.....	55
Figura 5 –	Níveis relativos de mRNA de <i>DUSP6</i> e <i>DUSP10</i> após tratamento com agente demetilante 5-Aza-dC em hipóxia.....	56
Figura 6 –	Agrupamento dos GDEs em vias de sinalização após tratamento com 5-Aza-dC em normóxia.....	58
Figura 7 –	Agrupamento dos GDEs em vias de sinalização após tratamento com 5-Aza-dC em hipóxia.....	59
Figura 8 –	Agrupamento dos GDEs em processos biológicos após tratamento com 5-Aza-dC em normóxia.....	61
Figura 9 –	Agrupamento dos GDEs em processos biológicos após tratamento com 5-Aza-dC em hipóxia.....	62
Figura 10–	Expressão proteica de NF- κ B após tratamento com agente demetilante 5-Aza-dC em normóxia e hipóxia.....	64
Figura 11–	Níveis relativos de mRNA de <i>SAV1</i> após tratamento com agente demetilante 5-Aza-dC em normóxia e hipóxia.....	65
Figura 12–	Análise <i>in silico</i> de sítio de metilação na região promotora e primeiro éxon de <i>SAV1</i>	66
Figura 13–	Representação esquemática do trecho da ilha CpG de <i>SAV1</i> analisado por sequenciamento, em hipóxia.....	68
Tabela 1 –	Predição de fatores de transcrição na região metilada de <i>SAV1</i>	69
Figura 14–	Comparação dos níveis relativos de mRNA de <i>SAV1</i> entre as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231.....	70
Figura 15–	Comparação dos níveis relativos de mRNA de <i>CYR61</i> e <i>CTGF</i> entre as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231.....	72

Figura 16–	Análise dos níveis relativos de mRNA de <i>SAVI</i> , <i>CYR61</i> e <i>CTGF</i> na linhagem MDA-MB-231 em normóxia e hipóxia.....	74
Figura 17–	Análise dos níveis relativos de mRNA de <i>SAVI</i> , <i>CYR61</i> e <i>CTGF</i> na linhagem MCF-7 em normóxia e hipóxia.....	76
Figura 18–	Comparação da expressão proteica e distribuição de <i>SAVI</i> entre as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 em normóxia e hipóxia.....	78
Figura 19–	Comparação da expressão gênica de <i>SAVI</i> entre amostras normal adjacente e de câncer de mama.....	79
Figura 20–	Comparação da metilação de DNA de <i>SAVI</i> entre amostras normal adjacente e de câncer de mama.....	80
Figura 21–	Correlação entre a expressão gênica e metilação de DNA de <i>SAVI</i> em amostras normal adjacente e de câncer de mama.....	82
Figura 22–	Análise da expressão gênica e metilação de DNA de <i>SAVI</i> em subtipos de câncer de mama.....	83
Figura 23–	Correlação entre a expressão gênica e metilação de DNA de <i>SAVI</i> em subtipos de câncer de mama.....	85
Figura 24–	Análise da expressão gênica de <i>CYR61</i> e <i>CTGF</i> em subtipos de câncer de mama.....	87
Figura 25–	Análise da expressão gênica e metilação de DNA de <i>SAVI</i> em amostras de câncer de mama em normóxia e hipóxia.....	88
Figura 26–	Correlação entre a expressão gênica e metilação de DNA de <i>SAVI</i> em amostras de câncer de mama em normóxia e hipóxia.....	90
Figura 27–	Análise da expressão gênica de <i>CYR61</i> e <i>CTGF</i> em amostras de câncer de mama em normóxia e hipóxia.....	92
Figura 28–	Análise da expressão gênica de <i>SAVI</i> em subtipos de câncer de mama em normóxia e hipóxia.....	93
Figura 29–	Análise da metilação de DNA de <i>SAVI</i> em subtipos de câncer de mama em normóxia e hipóxia.....	94
Figura 30–	Análise da correlação da expressão gênica e metilação de DNA de <i>SAVI</i> em subtipos de câncer de mama em normóxia.....	95
Figura 31–	Análise da correlação da expressão gênica e metilação de DNA de <i>SAVI</i> em subtipos de câncer de mama em hipóxia.....	97

Figura 32–	Análise da expressão gênica de <i>CYR61</i> em subtipos de câncer de mama em normóxia e hipóxia.....	98
Figura 33–	Análise da expressão gênica de <i>CTGF</i> em subtipos de câncer de mama em normóxia e hipóxia.....	100
Figura 34–	Análise da expressão proteica de SAV1 em subtipos de câncer de mama	101
Figura 35–	Análise da expressão proteica de SAV1 em amostras de câncer de mama e no subtipo claudin-low em normóxia e hipóxia.....	102
Figura 36–	Análise da correlação da expressão gênica e proteica de SAV1 em câncer de mama.....	104
Figura 37–	Análise da expressão gênica e proteica de SAV1 de acordo com estágio tumoral em amostras de câncer de mama.....	105
Figura 38–	Análise da expressão gênica e proteica de SAV1 de acordo com status livre de doença em amostras de câncer de mama.....	106
Figura 39–	Curva de sobrevida relacionada à expressão de SAV1 em pacientes de câncer de mama.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5'-CpG-3'	<i>5'-Cytosine-phosphate-Guanine-3'</i>
5-Aza-dC	<i>5-Aza-2'-deoxycytidine</i>
ACTB	<i>Beta-actin</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
DEPC	<i>Diethylpirocarbonato</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>
DNMTs	<i>DNA Methyltransferases</i>
dNTPs	<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EPAS1	<i>Endothelial PAS domain-containing protein 1</i>
ESR	<i>Estrogen Receptor</i>
FIH	<i>Factor Inhibiting HIF</i>
HDACs	<i>Histone Deacetylases</i>
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor</i>
HIF-1 α	<i>Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha</i>
LOI	<i>Loss of Imprinting</i>
MBP	<i>Methyl Binding Protein</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PHD	<i>Proxyl Hydroxylase Domain</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RT-qPCR	<i>quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SFB	<i>Soro Fetal Bovino</i>
TAE	<i>Tris-Acetato EDTA</i>
TM	<i>Temperatura de Melt</i>
VHL	<i>Von Hippel-Lindau</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	micrômetro
nm	nanômetro
mmHg	milímetro de mercúrio
α	alfa
β	beta
Kb	quilobase
<	menor que
>	maior que
CO ₂	gás carbônico
O ₂	oxigênio
mg/mL	miligrama por mililitro
%	por cento
U/mL	unidade por mililitro
h	hora
\pm	mais ou menos
°C	graus Celsius
cm ²	centímetro ao quadrado
bp	base pair
min	minuto
μM	micromolar
mM	milimolar
μg	micrograma
mA	miliAmpère
rpm	rotação por minuto
μL	microlitro
mL	mililitro
ΔG	delta G (variação de energia livre de Gibbs)

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1	Câncer de mama	18
1.1.1	<u>Incidência e taxa de mortalidade do câncer de mama</u>	18
1.1.2	<u>Subtipos moleculares de câncer de mama</u>	18
1.2	Microambiente nos tumores sólidos: hipóxia	20
1.2.1	<u>Hipóxia e câncer</u>	20
1.2.2	<u>Via de sinalização de HIF</u>	21
1.3	Metilação do DNA	24
1.3.1	<u>Mecanismo epigenético de silenciamento gênico</u>	24
1.3.2	<u>Status de metilação da célula normal x célula tumoral</u>	26
1.3.3	<u>Uso de agentes demetilantes na terapia antitumoral</u>	29
1.4	A via de Hippo	31
1.4.1	<u>O duplo papel da via de Hippo</u>	31
1.4.2	<u>A Via de Hippo e câncer</u>	34
1.4.3	<u>SAV1 e câncer</u>	35
2	OBJETIVOS	39
2.1	Objetivos gerais	39
2.2	Objetivos específicos	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	Cultura de células	41
3.2	Tratamento com agente demetilante e câmara de hipóxia	42
3.3	Microarranjo de DNA	42
3.4	Predição de sítios de metilação no promotor e no primeiro exon do gene de SAV1	43
3.5	Extração de DNA	44
3.6	Quantificação e avaliação da qualidade de DNA	44
3.7	Conversão por bissulfito do DNA	45
3.8	Amplificação de DNA por PCR convencional	45
3.9	Eletroforese em gel de agarose	45
3.10	Sequenciamento	46

3.11	Predição de sítios de ligação de fator de transcrição no promotor de <i>SAVI</i>..	47
3.12	Elaboração de <i>primers</i>	47
3.13	RT-qPCR	48
3.13.1	<u>Extração de RNA</u>	48
3.13.2	<u>Tratamento com DNase</u>	49
3.13.3	<u>Síntese de cDNA</u>	49
3.13.4	<u>Reação da PCR</u>	49
3.14	Análise imunocitoquímica (ICQ)	50
3.15	Análise imunohistoquímica (IHQ)	51
3.16	Análises <i>in silico</i> da expressão gênica e proteica de <i>SAVI</i> em pacientes com câncer de mama	52
3.17	Análise estatística	53
4	RESULTADOS	54
4.1	Validação do microarranjo de DNA	54
4.2	Análise de vias de sinalização a partir de genes diferencialmente expressos (GDEs) após tratamento com 5-Aza-2-dC em condições de normóxia e hipóxia	56
4.3	Análise de processos biológicos a partir de genes regulados diferencialmente (GDEs) após tratamento com 5-Aza-dC em condições de normoxia e hipóxia	60
4.4	Análise da expressão e localização subcelular de NF-κB/p65 após tratamento com agente demetilante em normóxia e hipóxia	63
4.5	Análise da expressão de <i>SAVI</i> após tratamento com 5-Aza-dC em normóxia e hipóxia	65
4.6	Predição de sítios de metilação no promotor e no primeiro exon de <i>SAVI</i>	66
4.7	Análise do sequenciamento da ilha CpG de <i>SAVI</i> e predição de sítios de ligação de fator de transcrição no promotor de <i>SAVI</i>	67
4.8	Comparação dos níveis de mRNA de <i>SAVI</i> entre as linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7	68
4.9	Comparação da expressão gênica de <i>CYR61</i> e <i>CTGF</i>, genes alvo da via de Hippo, entre as linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7	69

4.10	Análise da expressão gênica de <i>SAVI</i>, <i>CYR61</i> e <i>CTGF</i>, na linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231, em normóxia e hipóxia.....	71
4.11	Análise da expressão gênica de <i>SAVI</i>, <i>CYR61</i> e <i>CTGF</i>, na linhagem celular de câncer de mama MCF-7, em normóxia e hipóxia.....	73
4.12	Comparação da expressão proteica e distribuição celular de <i>SAV1</i> entre as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 em normóxia e hipóxia.....	75
4.13	Comparação da expressão gênica de <i>SAVI</i> entre amostras normal adjacente e de câncer de mama.....	77
4.14	Comparação <i>in silico</i> da metilação de DNA de <i>SAVI</i> em amostras normal adjacente e de câncer de mama.....	78
4.15	Correlação entre a expressão gênica e metilação de DNA de <i>SAVI</i> em amostras normal adjacente e de câncer de mama <i>in silico</i>.....	79
4.16	Análise <i>in silico</i> da expressão gênica, metilação de DNA e correlação expressão-metilação de <i>SAVI</i> em subtipos de câncer de mama.....	81
4.17	Análise <i>in silico</i> da expressão gênica de <i>CYR61</i> e <i>CTGF</i>, genes alvo da via de Hippo, em subtipos de câncer de mama.....	84
4.18	Análise <i>in silico</i> da expressão gênica, metilação de DNA e correlação expressão-metilação de <i>SAVI</i> em amostras de câncer de mama em normóxia e hipóxia.....	86
4.19	Análise da expressão gênica de <i>CYR61</i> e <i>CTGF</i>, genes alvo da via de Hippo, em amostras de câncer de mama <i>in silico</i>, estratificadas em normóxia e hipóxia.....	89
4.20	Análise <i>in silico</i> da expressão gênica, metilação de DNA e correlação expressão-metilação de <i>SAVI</i> em subtipos de câncer de mama, estratificados em normóxia e hipóxia.....	91
4.21	Análise <i>in silico</i> da expressão gênica de <i>CYR61</i> e <i>CTGF</i> em subtipos de câncer de mama, estratificados em normóxia e hipóxia.....	96
4.22	Análise da expressão proteica de <i>SAV1</i> em câncer de mama, subtipos de câncer de mama e em normóxia e hipóxia.....	99
4.23	Correlação entre os níveis de mRNA e proteína de <i>SAV1</i> em câncer de mama.....	102

4.24	Avaliação <i>in silico</i> dos níveis de mRNA e proteico de SAV1 e potencial prognóstico para o câncer de mama.....	103
5	DISCUSSÃO.....	107
	CONCLUSÃO.....	117
	REFERÊNCIAS.....	118
	APÊNDICE A – Comparação entre linhagem e subtipo tumoral análogo.....	131
	APÊNDICE B – Dados produzidos e não exibidos.....	132
	APÊNDICE C – Trabalhos científicos em diferentes fases de elaboração.....	133

INTRODUÇÃO

O microambiente tumoral de hipóxia ou baixos níveis de oxigênio é uma característica comum a tumores sólidos e está associado ao mau prognóstico. O fator de transcrição *Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha* (HIF-1 α , em português, Fator Induzido por Hipóxia 1 alfa), o qual é ativado em hipóxia, coordena a expressão de genes relacionados a proliferação, resistência à apoptose, invasão e metástase, tornando as células tumorais, residentes nesse ambiente, com fenótipo mais agressivo e resistente a terapia antitumoral. No entanto, outros mecanismos associados à hipóxia podem estar envolvidos no controle da expressão gênica, como mecanismos epigenéticos. Dentre os mecanismos epigenéticos, a metilação de DNA tem sido foco de alguns estudos, especialmente em células tumorais em hipóxia.

A hipóxia induz hipometilação genômica global e hipermetilação de *loci* específicos no DNA, que ainda estão sendo elucidados. A metilação de DNA é um mecanismo epigenético reversível que ocorre em ilhas CpGs localizadas na região promotora e/ou primeiro éxon, de 60% dos genes, promovendo a repressão da transcrição gênica. Entretanto, pouco se sabe sobre quais genes são especificamente regulados por metilação em hipóxia.

Preliminarmente, este trabalho identificou por microarranjo de DNA, que o gene do supressor tumoral *SAVI*, codificador da Protein salvador homolog 1, atuante na via de sinalização Hippo, é um candidato à regulação por metilação de DNA, em microambiente de hipóxia. Além disso, *SAVI* possui ilha CpG em sua região promotora e tem sua expressão gênica aumentada em resposta ao tratamento com agente demetilante de DNA. A ativação da via Hippo, culmina com a inibição da proliferação celular e promoção de apoptose, indicando uma atuação como supressora de tumor. Entretanto, a importância de *SAVI* para o câncer de mama, principalmente em hipóxia, é pouco conhecida.

Portanto, este trabalho analisou, *in vitro* e *in silico*, o perfil de expressão e metilação do gene *SAVI*, em normóxia e hipóxia, e o potencial prognóstico de *SAVI* para o câncer de mama, e ainda as alterações no transcriptoma em resposta ao agente demetilante (5-Aza-dC), em normóxia e hipóxia, a fim de identificar genes e vias potencialmente reprimidas por metilação de DNA.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Câncer de mama

1.1.1 Incidência e taxa de mortalidade do câncer de mama

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Segundo estimativas para o sexo feminino, 66.280 casos novos de câncer de mama são esperados para cada ano do triênio 2020-2022, no Brasil, sendo o tipo de câncer mais incidente, perfazendo um total de 29,7%, excetuando-se o câncer de pele não melanoma. (INCA, 2020).

A taxa de mortalidade por câncer de mama ajustada pela população mundial apresenta uma curva ascendente. No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama são bastante elevadas, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados, representando a primeira causa de morte por câncer na população feminina brasileira, com 16,16 óbitos/100.000 mulheres em 2017 (INCA, 2017). Portanto, o câncer de mama é considerado um problema de saúde pública e, ainda que existam políticas públicas incentivando o diagnóstico precoce, a descoberta tardia minimiza as chances de cura.

1.1.2 Subtipos moleculares de câncer de mama

O câncer de mama é uma doença heterogênea e é classificado em 6 subtipos moleculares, de acordo, principalmente, com o perfil de expressão gênica e expressão de determinados marcadores hormonais e outros específicos de cada subtipo: luminal A (LumA), luminal B (LumB), Her2, basal, normal-like e claudin-low.

Luminal A é o subtipo mais frequente (30-40%), com bom prognóstico, expressa marcadores hormonais, *Estrogen Receptor* (ER, em português, Receptor de Estrogênio)-positivo e *Progesterone Receptor* (PR, em português, Receptor de Progesterona)-positivo (alta expressão), é *Human Epidermal growth factor Receptor 2* (HER2, em português, Receptor do fator de crescimento Epidérmico Humano 2)-negativo e expressa baixo nível do marcador de proliferação, Ki-67.

Luminal B apresenta frequência de 20-30%, com prognóstico intermediário, ER-positivo, PR-positivo (baixa expressão), HER2-negativo e expressa mais alto nível do marcador de proliferação, Ki-67, em comparação com a luminal A. Há também tumores luminais B HER2-positivos.

Her2 apresenta frequência de 12-20%, com mau prognóstico, ER-negativo, PR-negativo e HER2-positivo.

Basal representa 15-20% de todos os cânceres de mama, com mau prognóstico, ausência de marcação para ER, PR e HER2, ou seja, triplo negativo e alta expressão de marcadores basais, como queratinas 5, 6, 14, 17 e Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR, em português, Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico).

Há controvérsias sobre o subtipo normal-like. Ele apresenta similaridades de expressão gênica, em comparação às células normais e normalmente não apresenta marcadores tumorais usuais. Tem sido pouco usado em estudos, pois provavelmente representa uma contaminação com amostras de mama normais, durante a realização das análises para sua caracterização (YERSAL e BARUTCA, 2014; DAI et al., 2015; FRAGOMENI; SCIALLI; JERUSS, 2018).

A prevalência de tumores claudin-low varia de 1,5% to 14%. Esse subtipo não expressa ER, PR e HER2, isto é, também triplo negativo, e é associado com mau prognóstico. Ele se caracteriza por apresentar baixa expressão de genes de adesão célula-célula, como as claudinas 3, 4 e 7, ocludinas e E-caderina, alta expressão de genes associados à transição epitélio-mesênquima e expressão gênica associada à célula menos diferenciada e apresenta considerável infiltrado de células do estroma e imune (DIAS et al., 2017).

1.2 Microambiente nos tumores sólidos: hipóxia

1.2.1 Hipóxia e câncer

A medida que o conhecimento sobre a biologia dos tumores evolui, novas descobertas vêm desvendando a complexidade dos fatores que influenciam as células cancerosas. Dentre estes, vários trabalhos vêm elucidando a importância do microambiente tumoral para a manutenção e desenvolvimento do câncer. Diante de várias possibilidades, a exposição das células tumorais a diferentes gradientes de oxigenação tem sido discutida como um dos fatores envolvidos com a malignidade, resistência a quimioterapia e radioterapia.

As concentrações de oxigênio variam significativamente em um tumor sólido, devido à rápida e descontrolada proliferação das células tumorais, angiogênese tumoral caracterizada por vasos sanguíneos com anormalidades funcionais, estruturais e organizados de forma irregular e caótica e variações do fluxo sanguíneo (VAUPEL e HARRISON, 2004). Dessa forma, há três diferentes zonas componentes de um tumor sólido: a camada mais externa, com alta disponibilidade de oxigênio e glicose, também conhecida como área de crescimento máximo; a zona intermediária, na qual há baixos níveis de oxigênio (hipóxia) e glicose; e por fim, a camada mais interna, a zona necrótica, que caracteriza-se por completa ausência de oxigênio e glicose (DENEKAMP e DASU, 1999).

Com isso, por causa do padrão irregular de organização da vasculatura tumoral, células que se localizam a uma distância maior do que 100 μm (limite de difusão para o oxigênio) dos vasos sanguíneos são consideradas células em hipóxia (DENEKAMP e DASU, 1999).

Considera-se que o microambiente de hipóxia tem um papel significativo na promoção de muitos eventos oncogênicos, como a reconfiguração metabólica das células tumorais, neovascularização, transição epitélio-mesenquimal, renovação e promoção do nicho de células tronco tumorais, sendo estas apontadas como as principais responsáveis por recidiva pós-tratamento e metástase (HUNG et al., 2009).

É conhecido que o ambiente com baixos níveis de oxigênio torna as células menos sensíveis a radiação, além disso, células nas condições citadas também são mais

quimioresistentes. Com isso, o ambiente de hipóxia promove um impacto clínico negativo. Um estudo apresentado por Evans e Koch (2003), mostrou que pacientes que apresentavam baixa tensão de oxigênio tumoral, < 10 mmHg, tiveram as taxas de sobrevivência e tempo livre de doença reduzidos em 50% quando comparados a pacientes que apresentaram taxa de oxigenação tumoral maiores do que 10 mmHg.

A resposta à hipóxia em humanos é principalmente regulada por HIFs, uma família de fatores de transcrição que orquestram eventos de sinalização que levam à tumorigênese e progressão tumoral (LAND e TEE, 2007).

Os HIFs são fatores de transcrição heterodiméricos, constituídos por uma das três subunidades α reguladas por oxigênio (HIF-1 α , HIF-2 α e HIF-3 α) e uma subunidade β (ARNT), que é constitutiva (BERRA et al., 2003). Enquanto a subunidade HIF-1 α é amplamente expressa em tecidos e a que primeiramente participa da resposta à hipóxia, HIF-2 α exibe uma expressão mais restrita à determinados tecidos (GORDAN et al., 2007). Embora estas duas subunidades compartilhem funções redundantes, elas também exibem atividades únicas e até mesmo opostas (KEITH; JOHNSON; SIMON, 2012). Não se compreende totalmente a função de HIF-3 α , no entanto, sua variante de splicing é conhecida por inibir a atividade transcricional de HIF-1 α (HEIKKILA et al., 2011).

1.2.2 Via de sinalização de HIF

Em condições de normóxia, a via de HIF é inativada por modificações pós-traducionais. Em hipóxia, há a remoção destas modificações em HIF-1 α , o que aumenta sua estabilidade e capacidade de trans-ativação. Em presença de níveis normais de oxigênio, os resíduos do aminoácido prolina de HIF-1 α são hidroxilados pelas enzimas *Prolyl Hydroxylase Domain* (PHD, em português, Domínio Prolil Hidroxilase). As modificações nas prolinas de HIF-1 α induzem o reconhecimento e formação de complexos proteicos com as proteínas Von Hippel-Lindau (VHL). As VHLs são substratos de reconhecimento do complexo de ubiquitinação E3. Dessa forma, HIF-1 α é rapidamente degradado pela via proteolítica (APPELHOFF et al., 2004).

Além disso, em concentrações normais de oxigênio, o inibidor de HIF-1 α , conhecido como *Factor Inhibiting HIF* (FIH, em português, Fator inibidor de HIF), é capaz de catalisar a hidroxilação de um resíduo de asparagina, localizado no domínio de transativação c-terminal de HIF-1 α , evitando a sua interação com o coativador p300, o que, conseqüentemente, impede a atividade transcricional de HIF-1 α (TAN et al., 2007).

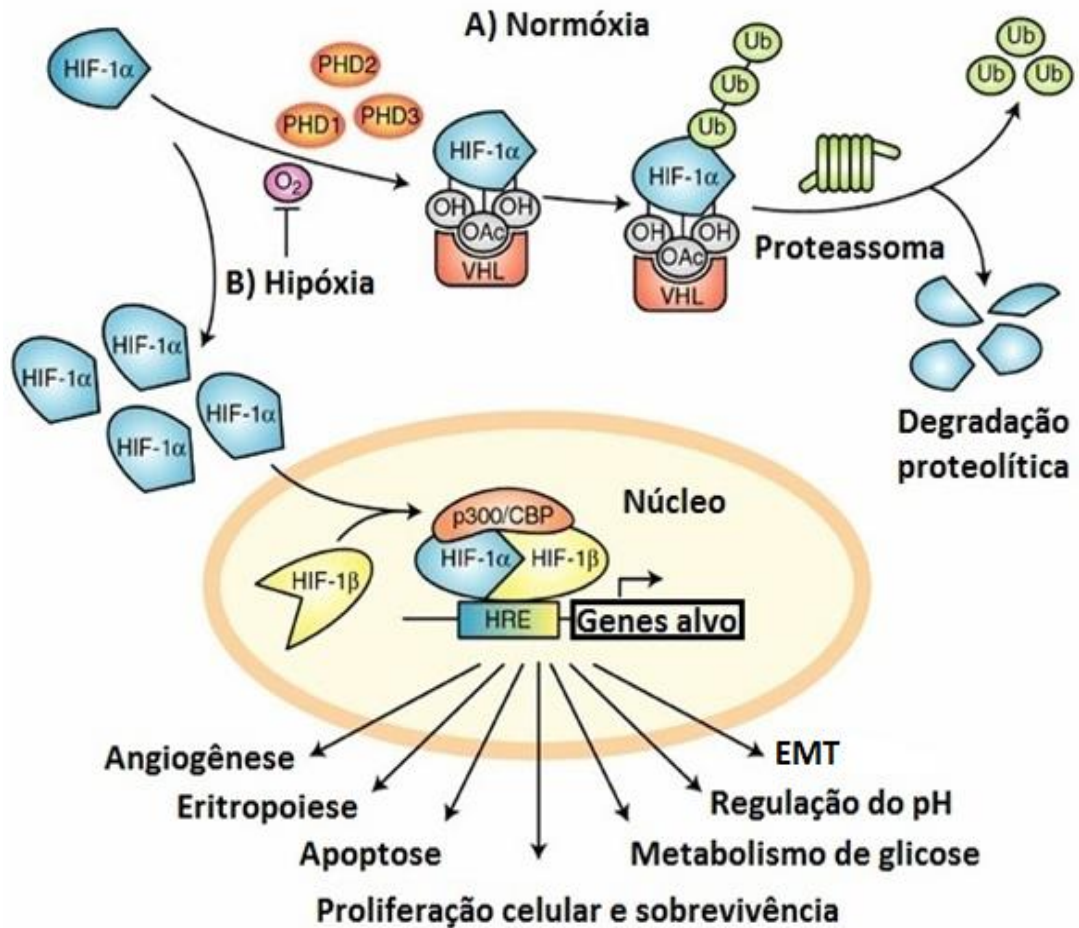
Em baixa concentração de oxigênio, as PHDs não promovem a hidroxilação de HIF-1 α , que conseqüentemente, não é reconhecida pela VHL e nem degradada. Diante disso, HIF-1 α se acumula no citoplasma e se transloca para o núcleo, onde forma heterocomplexo transcionalmente ativo com HIF-1 β . Com isso, o heterodímero HIF-1 α /HIF-1 β é capaz de reconhecer sequências consenso no *Deoxyribonucleic Acid* (DNA, em português, Ácido Desoxirribonucleico), A/GCGTG, e promover a transcrição de vários genes alvos de HIF (figura 1) (WENGER; STIEHL; CAMENISCH, 2005).

Existem mais de 60 genes sendo regulados nas condições de hipóxia por HIF-1 α /HIF-1 β . Genes esses que conferem às células mecanismos de sobrevivência quando há carência de oxigênio ou sob elevado estresse oxidativo, incluindo genes que contribuem para a neovascularização, como *Vascular Endothelial Growth Factor A* (*VEGFA*, em português, Fator de Crescimento Vascular Endotelial A) (CARMELIET, 1998).

A via de HIF-1 α atua coordenando a expressão de genes relacionados à diversas funções importantes no contexto do câncer e da progressão tumoral, estimulando a expressão de genes relacionados à proliferação celular, à invasão/metástase, sobrevivência celular e resistência à apoptose, angiogênese e metabolismo de glicose, sendo fortemente associada ao mau prognóstico (AEBERSOLD, 2001; PENNACCHIETTI et al., 2003).

No microambiente de hipóxia, a expressão gênica pode ser regulada por vários mecanismos moleculares, um deles envolve HIF, já discutido anteriormente, e também, mais recentemente mecanismos epigenéticos. Dentre os mecanismos epigenéticos, a metilação de DNA tem sido foco de alguns estudos, especialmente em células tumorais em hipóxia.

Figura 1 - Representação esquemática da via de HIF



Legenda: A via de HIF é inativada por modificações pós-traducionais em condições de normóxia que promovem degradação proteolítica de HIF-1 α . Em hipóxia, não há estas modificações em HIF-1 α , o que aumenta sua estabilidade e translocação para o núcleo onde forma heterodímeros e atua como fator de transcrição de uma série de genes envolvidos em diferentes processos celulares. *Epithelial Mesenchymal Transition* (EMT, em português, Transição Epitélio Mensenquimal); *HIF Responsive Element* (HRE, em português, Elemento Responsivo a HIF); *Ubiquitin* (Ub, em português, Ubiquitina); VHL (Von Hippel-Lindau); *CREB-binding protein* (CBP, em português, proteína ligadora a CREB); PHD (Prolyl Hydroxylase); OH (hidroxila).

Fonte: modificado de Cambridge University Press, 2005.

1.3 Metilação do DNA

1.3.1 Mecanismo epigenético de silenciamento gênico

Mecanismos epigenéticos são herdáveis e eles promovem alteração da expressão gênica sem alterar a sequência de bases do DNA. Como mecanismos de regulação epigenética pode-se citar a metilação do DNA, modificação de histonas, posicionamento de nucleossomos e microRNAs. Eles funcionam juntos, de forma coordenada, e interagem na regulação da expressão gênica, mantendo padrões de expressão gênica tecido-específico e são importantes para um desenvolvimento normal dos mamíferos (BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007; KOUZARIDES, 2007; JIANG e PUGH, 2009).

A metilação do DNA é um dos mecanismos mais estudados, no qual enzimas, conhecidas como *DNA methyltransferases* (DNMTs, em português, DNA metiltransferases), catalisam a transferência do grupamento metil para citosinas em dinucleotídeos CpGs (ROBERTSON, 2002). Esses dinucleotídeos não são amplamente espalhados pelo genoma, eles se concentram em pequenos trechos do DNA (0,5kb – 5kb) compostos por 60-70% de dinucleotídeos CpGs, denominados de ilhas CpGs e também em regiões de sequências repetitivas grandes do genoma, como por exemplo repetições centroméricas e elementos de retrotransposon (BIRD, 2002; TAKAI e JONES, 2002). As ilhas CpGs preferencialmente se localizam em promotores e/ou no primeiro exon em cerca de 60% dos genes (WANG e LEUNG, 2004; BRENET et al., 2011).

Há três DNMTs: DNMT1, DNMT3a e DNMT3b. DNMT1 é responsável por manter os padrões de metilação do DNA a cada replicação, enquanto DNMT3a e DNMT3b são envolvidas na geração de novos padrões de metilação e na manutenção dos padrões herdados (OKANO et al., 1999; KIM et al., 2002).

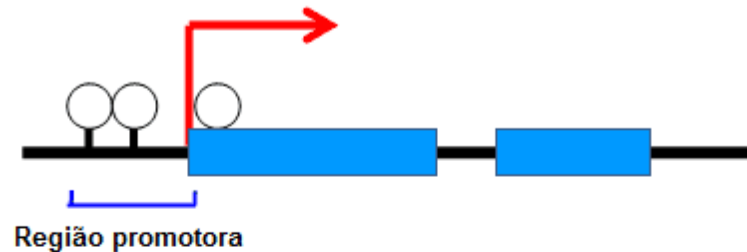
A metilação do DNA, geralmente, está relacionada ao silenciamento gênico, bloqueando a transcrição do gene que estiver sob sua regulação (figura 2) (BIRD, 2002). Esse silenciamento ocorre por bloquear o acesso de fatores de transcrição a suas respectivas sequências consenso de ligação ao DNA (WATT e MOLLOY, 1988; PRENDERGAST e ZIFF, 1991). E também pelo recrutamento de enzimas *Histone Deacetylases* (HDACs, em

português, Histona Deacetilases), mediado por *Methyl Binding Protein* (MBP, em português, Proteína Ligadora de Metil), culminando com uma maior compactação do DNA, o que impede o acesso da maquinaria de transcrição (JONES et al., 1998; NAN et al., 1998).

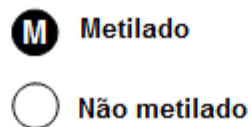
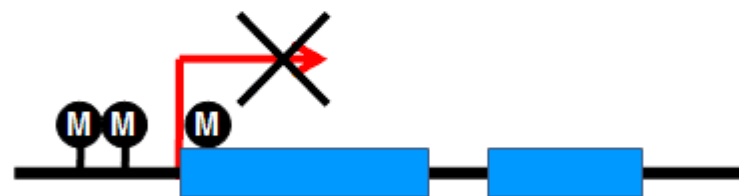
Estudos indicam que os efeitos do tratamento com agente demetilante, na expressão gênica, são devidos, além da demetilação do promotor associada ao aumento da expressão gênica (KIM et al., 2015; RAWLUSZKO et al., 2015), à demetilação do corpo gênico, normalmente relacionada à diminuição da expressão gênica (JONES, 1999), e aos efeitos indiretos, como ativação de fator de transcrição (EVANS et al., 2016) e modificações de histona (HONG et al., 2012). Além disso, as alterações induzidas pelo agente demetilante são dependentes do contexto celular, podendo ser influenciadas pelo microambiente celular, e podem promover a ativação da via de sinalização do interferon, com funções pró-inflamatórias (CHIAPPINELLI et al., 2015; ROULOIS et al., 2015).

Figura 2 - Representação ilustrativa do silenciamento gênico promovido pela metilação do DNA

A) Genes expressos



B) Genes silenciados por metilação de DNA



Legenda: Figura 2A representa os genes cujo promotor está demetilando, o que resulta em incentivo à expressão gênica. Figura 2B mostra os genes cujo promotor está metilado, acarretando silenciamento gênico. M - CpG metilada.

Fonte: National Cancer Center Research Institute, Japan.

1.3.2 Status de metilação da célula normal x célula tumoral

Os padrões de metilação são diferentes entre uma célula normal e uma tumoral (FEINBERG e VOGELSTEIN, 1983; RIGGS e JONES, 1983). Em uma célula normal, a maioria dos sítios CpGs localizados em sequências genômicas repetitivas, ao longo do DNA genômico, em regiões não expressas e não codificantes, estão fortemente metilados,

mantendo silenciados transcricionalmente, por exemplo, a heterocromatina pericentromérica e retrotransposons, o que evita a instabilidade genômica (BIRD, 2002; SUZUKI e BIRD, 2008; TAKAI e JONES, 2002). Em contraste, a maioria das ilhas CpGs estão demetiladas, durante o desenvolvimento e em tecidos diferenciados, para permitir a expressão gênica (SUZUKI e BIRD, 2008). No entanto, algumas ilhas CpGs são metiladas durante o desenvolvimento e assim permanecem, como no caso da inativação do cromossomo X de fêmeas e de genes que sofrem imprinting (BIRD, 2002), além do silenciamento tecido-específico de genes relacionados ao desenvolvimento, em tecidos somáticos (ECKHARDT et al., 2006; ILLINGWORTH et al., 2008).

A célula tumoral normalmente tem seu panorama epigenético modificado, caracterizado em parte por hipometilação global do genoma e hipermetilação de genes supressores tumorais (BENDER; ZINGG; JONES, 1998; SANTINI; KANTARJIAN; ISSA, 2001). A hipometilação global, por ativar áreas do genoma compostas por elementos repetitivos e retrotransposons, pode aumentar a instabilidade genômica, o que potencialmente, contribuirá para o processo de carcinogênese (EDEN et al., 2003; RODRIGUEZ et al., 2006; HOWARD et al., 2008). Além disso, proto-oncogenes, ao serem demetilados, podem ter sua expressão restabelecida, sendo convertidos a oncogenes que, por conseguinte contribuirão para a carcinogênese (WILSON; POWER; MOLLOY, 2007). A *Loss of Imprinting* (LOI, em português, perda de imprinting) também tem sido verificada em tumores e associada a um maior risco de desenvolvimento de determinados tumores (RAINIER et al., 1993; OGAWA et al., 1993; CUI et al., 2003).

Por sua vez, a hipermetilação de genes supressores de tumor, ao promover o silenciamento da expressão dos mesmos, pode ser considerado como um dos dois eventos requeridos para perda de função do gene e consequente transformação oncogênica, de acordo com o modelo de dois eventos proposto por Knudson (JONES e LAIRD, 1999). Além disso, genes de reparo de DNA e de fatores de transcrição também podem sofrer demetilação e ser silenciados, levando ao acúmulo de lesões genéticas e progressão do câncer, e silenciamento de outras classes de genes, respectivamente (BAYLIN, 2005; LONG et al., 2007).

Dessa forma, as alterações nos padrões de metilação do DNA que ocorrem na célula tumoral possuem um papel importante, auxiliando tanto na carcinogênese quanto na progressão do câncer (FEINBERG e VOGELSTEIN, 1983; RIGGS e JONES, 1983).

Da mesma forma, sabe-se que o microambiente tumoral de hipóxia também induz hipometilação global do genoma (SHAHRZAD et al., 2007; SKOWRONSKI et al., 2010; LIU et al., 2011; MARIANI et al., 2014) e hipermetilação de loci específicos que estão sendo determinados, tais como o fator pró-apoptótico, BNIP-3 (OKAMI; SIMEONE; LOGSDON, 2004; MURAI et al., 2005; HUANG et al., 2010; RAWLUSZKO et al., 2013).

Além disso, estudos vem sugerindo que, uma vez que a metilação está envolvida na regulação da expressão gênica e, por conseguinte na identidade celular, é de se esperar que cada tipo de tumor e cada subtipo tumoral exiba uma assinatura de metilação própria e característica (RAZIN e SZYF, 1984) e isto poderia ser avaliado, seja na forma de padrão de metilação de um painel de genes candidatos ou do genoma inteiro (SZYF, 2012).

E essa assinatura de metilação pode funcionar como um biomarcador, além de auxiliar na classificação tumoral, ajudar na avaliação de prognóstico e estratificação terapêutica, se tornando uma ferramenta em potencial na tentativa de melhorar a eficiência terapêutica (MOULTON et al., 1994; SHINOZAKI et al., 2005; DEDEURWAERDER; DESMEDT; CALONNE, 2011) além de, potencialmente, funcionar de maneira preventiva ao indicar o risco de desenvolvimento de um determinado tipo de câncer (BRENNAN et al., 2012).

Nesse sentido, de acordo com o subtipo tumoral de mama, genes são expressos ou não, devido à metilação do DNA. Por exemplo, os genes de receptores hormonais, *ER* e *PR*, estão silenciados por metilação de DNA em tumores ER-/PR-, enquanto não estão metilados e são expressos em tumores ER+/PR+ (LAPIDUS et al., 1996).

Além disso, Rawluszko et al. (2014), encontraram associação entre metilação do promotor de *Endothelial PAS domain-containing protein 1* (*EPASI*, em português, domínio PAS da proteína endotelial 1) e nível de mRNA e potencial prognóstico para câncer colorretal, na qual pacientes com o promotor de *EPASI* hipermetilado e baixos níveis de expressão de *EPASI* estão associados a um pior prognóstico.

1.3.3 Uso de agentes demetilantes na terapia antitumoral

Desde que a metilação do DNA é um processo reversível, utiliza-se agentes demetilante como tentativa para induzir a expressão de supressores tumorais, o que é considerado o principal mecanismo dos seus efeitos antitumorais, sugerindo seu uso contra o câncer (YOO e JONES, 2006).

Normalmente, os agentes demetilantes são análogos do nucleosídeo citidina, portanto, capazes de ser incorporados ao DNA a cada ciclo de replicação do DNA. Como exemplo de análogos de citidina, a azacitidina e a *5-aza-2'-deoxycytidine* (5-Aza-dC, em português, 5-aza-2'-desoxicitidina) são adicionadas ao DNA em replicação e, no momento do estabelecimento da metilação do DNA nas fitas filhas, as DNMTs se tornam aprisionadas aos análogos de citidina e posteriormente são degradadas. Com isso, o grau de metilação vai decaindo a cada replicação do DNA (JÜTTERMANN; LI; JAENISCH, 1994; EGGER et al., 2004).

A 5-Aza-dC, pela sua composição química, é incluída somente ao DNA, enquanto que a azacitidina pode ser incorporada também ao *Ribonucleic Acid* (RNA, em português, Ácido Ribonucleico), bloqueando a transcrição, o que explicaria parte de seus efeitos tóxicos (CREUSOT; ACS; CHRISTMAN, 1982; GOFFIN e EISENHAUER, 2002).

Atualmente tais análogos são aprovados para o uso no tratamento de malignidades hematológicas (PLIMACK; KANTARJIAN; ISSA, 2007; AZAD et al., 2013). Em tumores sólidos, testes com estas drogas tem encontrado menos sucesso (POHLMANN et al., 2002; APPLETON et al., 2007; FU et al., 2011; BAUMAN et al., 2012)

Além disso, tratamento com estes agentes apresenta alguns obstáculos, tais como a baixa estabilidade da molécula em pH neutro, a baixa especificidade para células tumorais, a rápida desativação por meio da ação da citidina deaminase, além da toxicidade e ativação de proto-oncogenes e genes relacionados a progressão do câncer (POULIOT et al., 2015). Dessa forma, outros agentes demetilantes que sejam mais resistentes a inativação pela citidina deaminase, mais seletivos contra células tumorais e com mecanismos de ação diferentes e com potencial tóxico menor sobre células normais, por não se incorporarem a molécula de DNA, vem sendo desenvolvidos, mas ainda estão em fase de teste (CHENG et al., 2004; CORTEZ e JONES, 2008; DATTA et al., 2009; POULIOT, M.-C. et al., 2015).

Diante da interação e integração entre os vários mecanismos epigenéticos, a associação de agentes demetilantes com outros agentes que agem no epigenoma (inibidores de HDACs, microRNAs, entre outros) tem mostrado resultados mais eficazes, sendo vistos como estratégia em potencial para o tratamento do câncer (CAMERON et al., 1999; BELINSKY et al., 2003; SAITO et al., 2006; SHARMA; KELLY; JONES, 2009).

Cabe ressaltar que a literatura carece de testes clínicos que validem a eficácia dos agentes demetilantes sobre a fração tumoral em hipóxia, a mais resistente aos tratamentos contra o câncer. Com isso, é necessário se conhecer os efeitos do uso desses agentes, em áreas de hipóxia (RAMACHANDRAN et al., 2015).

Tem sido mostrado que a hipóxia induz hipometilação genômica global (LIU et al., 2011) e hipermetilação de *loci* específicos em células tumorais, que ainda estão sendo elucidados, tais como o fator pró-apoptótico, BNIP-3 (OKAMI; SIMEONE; LOGSDON, 2004).

Thienpont et al. (2016) demonstraram que a hipóxia tumoral induziu hipermetilação do promotor por reduzir a atividade da enzima TET, que participa na remoção da metilação. Na clínica, foi verificado que uma intensa metilação ocorre em tumores em hipóxia. Além disso, a hipóxia oriunda de um menor suprimento sanguíneo, devido ao rompimento de vasos sanguíneos realizado em tumores de mama murinos aumentou a hipermetilação de DNA, que foi revertida pela normalização do vaso e da oxigenação. Esses dados reforçam a hipóxia como um dos reguladores do mecanismo de metilação de DNA em tumores.

Diante disso, o presente trabalho utilizou uma ferramenta de estudo em larga escala, o microarranjo de DNA, para auxiliar na seleção de um gene, pertencente à via importante para a sobrevivência da célula, numa área de hipóxia, que estivesse possivelmente reprimido por metilação de DNA, nesse ambiente.

Com base na análise do microarranjo de DNA, os níveis de mRNA do supressor tumoral *SAVI* aumentaram após tratamento com o agente demetilante, 5-Aza-dC, em hipóxia. Esse dado indicou que *SAVI* poderia estar sendo silenciado por metilação de DNA, em hipóxia. Além disso, a presença de uma ilha CpG na região promotora e primeiro exon de *SAVI* reforça ainda mais a hipótese de que esse gene possa ser regulado por metilação de DNA. Com isso, o supressor tumoral *SAVI*, pertencente à via de Hippo, foi eleito como foco do presente trabalho.

1.4 A Via de Hippo

1.4.1 O duplo papel da via de Hippo

O controle da proliferação celular é essencial para desenvolvimento normal e manutenção da homeostase celular. Uma das vias responsáveis por esse controle é a via de Hippo. A via de Hippo modula proliferação celular, diferenciação, crescimento e morte e metástase, o que pode contribuir com diversas condições fisiológicas e patológicas, tais como desenvolvimento, controle do tamanho e forma dos órgãos, homeostase de tecido, tumorigênese e progressão tumoral (EHMER e SAGE, 2016; DONG et al., 2007; ZHAO et al., 2007; WANG; YU; YU, 2017). A via exerce um duplo papel, quando está ativa, funciona como pró-apoptótica e quando está inativa, colabora com a proliferação. Como exemplo, os principais efetores, YAP e TAZ, podem exercer papéis benéficos ao estimular reparo de tecido e regeneração após injúria (LIAN et al., 2010), em contrapartida, a desregulação funcional da via de Hippo pode contribuir com a tumorigênese e desenvolvimento de câncer (SUNG BAE; KIM; LEE, 2015).

O núcleo da via de Hippo consiste em uma cascata de quinases (figura 3). As quinases MST1/2 são ativadas por uma variedade de estímulos apoptóticos (URA et al., 2001; LUO et al., 2009) e quando a via está ativa, a interação das quinases MST1/2 com a proteína SAV1 aumenta suas atividades quinases. SAV1, atuando como uma proteína acopladora, é capaz de manter MST1/2 e LATS1/2 juntos em complexo e pode aumentar a atividade de LATS1/2 após fosforilação por MST1/2 (CALLUS; VERHAGEN; VAUX, 2006). MST1/2 fosforila diretamente LATS1/2, ativando-as (CHAN et al., 2005). MST1/2 também fosforila MOB1, que se liga ao motivo autoinibitório em LATS1/2, levando a autofosforilação da alça de ativação de LATS (Lats1 S909 and Lats2 S872), aumentando sua atividade quinase (CHAN et al., 2005; PRASKOVA; XIA; AVRUCH, 2008). LATS1/2 fosforilam os co-ativadores transcricionais YAP e TAZ (DONG et al., 2007; ZHAO et al., 2007; LEI et al., 2008). Os efetores YAP e TAZ fosforilados são retidos no citoplasma via interação com proteínas 14-3-3 (ZHAO et al. 2007) ou podem ser degradados (LIU et al., 2010; ZHAO et al. 2010), resultando em inibição da transcrição de seus genes alvo. Em contrapartida, quando as

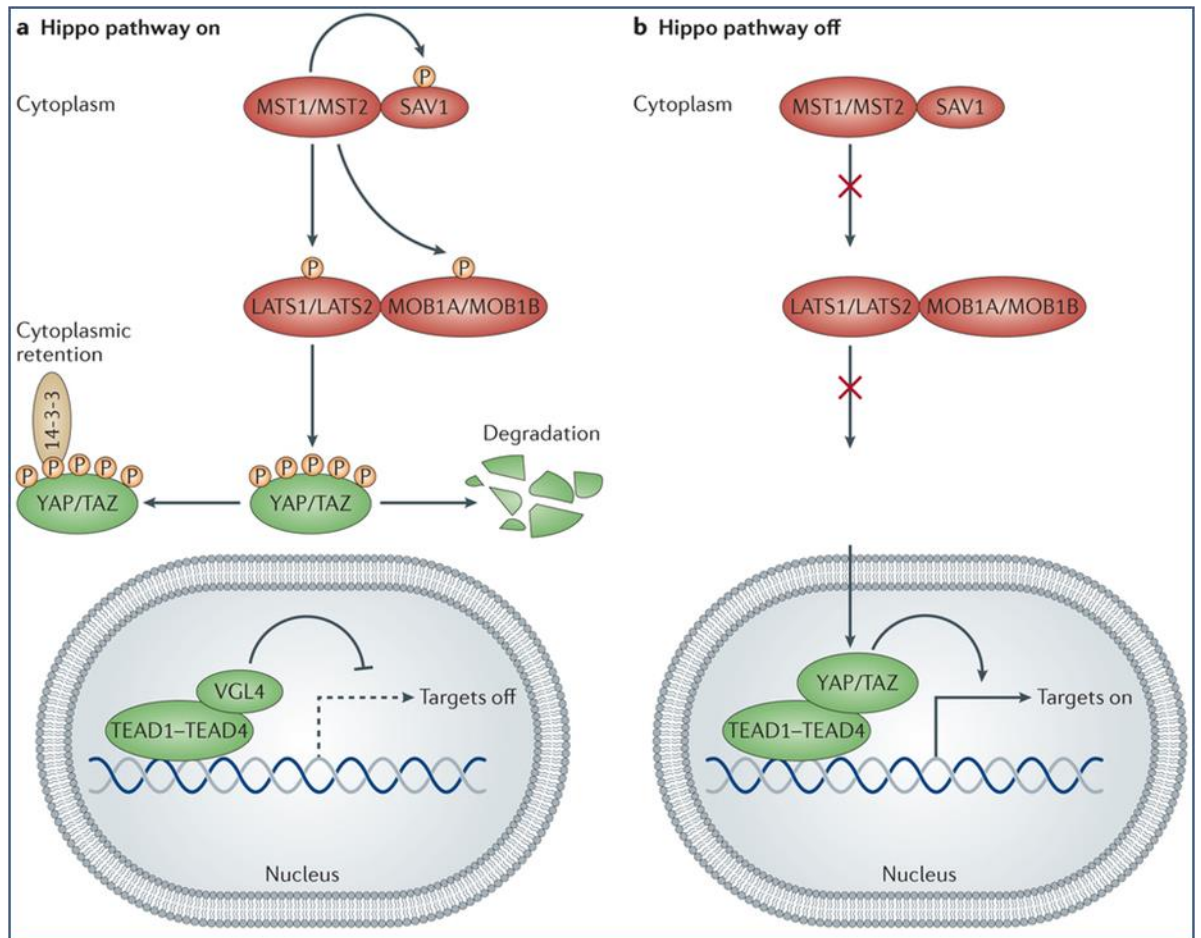
quinases a montante estão inativas, YAP e TAZ em estados hipofosforilados, se translocam para o núcleo e junto com fatores de transcrição controlam a expressão de genes envolvidos com estímulo à proliferação e migração celulares e inibição de morte celular (KANAI et al., 2000; DONG et al., 2007; ZHAO et al., 2007; LEI et al., 2008).

Como YAP e TAZ não contêm domínios de ligação ao DNA, eles controlam a expressão gênica ao interagir com fatores de transcrição, principalmente TEAD1-4, a fim de regular genes envolvidos com incentivo à proliferação e inibição da morte celular, tais como *CTGF*, *CYR61*, *AXL* e Survivin (VASSILEV et al., 2001; WU et al., 2008; ZHANG et al., 2008; ZHAO et al., 2008; SUNG BAE; KIM; LEE, 2015).

Eles também interagem com outros fatores, como Smad1 (ALARCÓN et al., 2009), Smad2/3 (VARELAS et al., 2008), Smad7 (FERRIGNO et al., 2002), RUNX1/2 (YAGI et al., 1999), e ErbB4 (KOMURO et al., 2003), ao mediar a transcrição de genes de proliferação, diferenciação e desenvolvimento, e o pró-apoptótico p63/p73 (STRANO et al., 2001).

Além da atuação das quinases do núcleo da via de Hippo, diversas vias de sinalização, assim como respostas ao ambiente externo, podem afetar as atividades co-transcricionais de YAP e TAZ. Muitos elementos biológicos, tais como tensão mecânica sobre a célula, moléculas de adesão/polaridade celular, outras vias de sinalização (receptor acoplado a proteína G, receptor do fator de crescimento epidérmico, Wnt, Notch e fator de crescimento transformador beta/proteína morfogênica óssea) e status metabólico celular (estresse energético, hipóxia) podem interagir com componentes da via de Hippo e regular a atividade dos efetores, YAP e TAZ (SUNG BAE; KIM; LEE, 2015).

Figura 3 - Representação ilustrativa da via de Hippo



Legenda: O núcleo da via de Hippo consiste em uma cascata de quinases. As quinases MST1/2 são ativadas por uma variedade de estímulos apoptóticos e quando a via está ativa, MST1/2 junto com SAV1 fosforilam LATS1/2 e MOB1A/1B, ativando-as. LATS1/2, por sua vez, fosforilam os co-ativadores transcricionais YAP e TAZ, que são retidos no citoplasma ou degradados, resultando em inibição da transcrição de seus genes alvo. Em contrapartida, quando as quinases a montante estão inativas, YAP e TAZ em estados hipofosforilados, se translocam para o núcleo e junto com fatores de transcrição controlam a expressão de genes envolvidos com estímulo à proliferação e migração celulares e inibição de morte celular. *Mammalian Ste20-like Kinases 1/2* (MST1/2); *Protein Salvador Homolog 1* (SAV1); *Large tumor suppressor homolog 1/2* (LATS1/2); *MOB kinase activator 1A/1B* (MOB1A/1B); *Transcriptional coactivator YAP1* ou *Yes-associated protein 1* (YAP); *Tafazzin* (TAZ); *TEA domain-containing sequence-specific transcription factors 1-4* (TEAD1-4); *Transcription cofactor vestigial-like protein 4* (VGL4); *phosphorylation* (P, em português, fosforilação).

Fonte: JOHNSON e HALDER, 2014.

1.4.2 A Via de Hippo e câncer

No contexto tumoral, normalmente quando a via de Hippo está ativa, ela funciona como supressora tumoral, em contrapartida, quando a via está inativa, tem função oncogênica (SUNG BAE; KIM; LEE, 2015).

Em muitos tipos de câncer, a via de Hippo está inativa, e com isso, são observadas altas atividades dos efetores, YAP e TAZ. A desregulação funcional dessa via propicia as atividades oncogênicas de YAP e TAZ, assim promovendo o desenvolvimento do câncer (EHMER e SAGE, 2016). Em alguns cânceres humanos, componentes do núcleo de Hippo estão inativados por silenciamento epigenético (TAKAHASHI et al., 2005; WIERZBICKI et al., 2013). Além disso, a interação com outras vias de sinalização pode também estar envolvida no desenvolvimento de câncer (ZYGULSK; KRZEMIENIECKI; PIERZCHALSKI, 2017).

A via de Hippo é um fator chave no desenvolvimento tanto da glândula mamária, quanto do câncer de mama (SHI; FENG; CHEN, 2015). É conhecido que YAP e TAZ contribuem com a tumorigênese do câncer de mama (MAUGERI-SACCÀ et al., 2015).

A alta expressão de TAZ foi associada com transformação e indução de migração celular de células de câncer de mama, assim como quimioresistência. Na clínica, a expressão de YAP e TAZ impactaram em menor sobrevivência livre de doença em pacientes com câncer de mama triplo negativo tratados com quimioterapia neoadjuvante (DÍAZ-MARTÍN et al., 2015; BARTUCCI et al., 2015).

Tufail et al. (2012) demonstraram que a expressão de YAP foi significativamente reduzida em células de câncer de mama invasivo e altos níveis de YAP foram observados no tecido de mama normal. A diminuição da expressão de YAP nas células de câncer de mama invasivas foi significativamente relacionada a ausência de receptores de estrogênio e progesterona, sugerindo que YAP pode atuar como um supressor tumoral no câncer de mama invasivo.

Além disso, tem sido observado na literatura que a hipóxia desativa a via de Hippo, inclusive em células de câncer de mama, culminando com a atividade de YAP, e conseguinte sobrevivência e crescimento tumoral, colaborando com a resposta à hipóxia (ZHANG et al., 2018; GREENHOUGH et al., 2018). E ainda demonstraram que YAP é fundamental para a

estabilidade e função de HIF-1a (MA et al., 2015). Também foi relatado que HIF-2a promoveu o crescimento de câncer de colon por potencializar a atividade de YAP (MA et al., 2017). Yan et al. (2014) mostraram que a hipóxia regulou YAP e TAZ de forma oposta em linhagens celulares de câncer ovariano epitelial, induzindo a redução da fosforilação de YAP e sua expressão total e aumento dos níveis de TAZ fosforilado.

Como pode ser verificado, alguns membros da via de Hippo são bem caracterizados em relação ao câncer, sobretudo câncer de mama, entretanto pouco é conhecido a respeito de SAV1, que participa da via, mas também pode atuar independentemente.

1.4.3 SAV1 e câncer

SAV1 é uma proteína acopladora, composta por domínios de interação proteína-proteína, tais como: dois domínios WW, um domínio SARAH (Sav/Rassf/Hpo) e uma região *coiled-coil*. Além de seu papel como proteína acopladora na via de Hippo, através da sua interação com MST1/MST2, que culmina com promoção de apoptose e inibição da proliferação celular, SAV1 também interage com outras proteínas.

Por exemplo, Mardin et al., 2010 encontraram um novo papel de alguns componentes da via de Hippo ao demonstrarem que SAV1 e MST1/2 são parceiros de associação direta com Nek2A e auxiliam na atividade de Nek2A e seu recrutamento para os centrossomos, cooperando com a separação dos centrossomos (MARDIN et al., 2010). Foi observado que SAV1 junto com MST2 ativam a atividade transcricional de ESR1 na linhagem MCF7 de câncer de mama, e sugeriram que essa regulação pode ter um papel na patogênese do câncer de mama (LEE et al., 2011).

Além disso, Jiang et al. (2019) encontraram, na linhagem não tumoral HEK293, que o domínio WW de SAV1 se liga ao domínio AKT-PH, funcionando como um inibidor de AKT, e assim podendo exercer um papel importante contra a tumorigênese, já que AKT tem papel pró-tumoral e está relacionada ao aumento da proliferação e sobrevivência celular (SONG et al., 2019). No contexto do câncer renal, identificaram mutações que dificultam a ligação de SAV1 a AKT, e permitem a atividade de AKT, promovendo um efeito pró-tumoral. Além disso, mostraram que a fosforilação realizada por MERTK em AKT, o liberou

da interação com SAV1 e que inibidores de MERTK poderiam restituir essa interação, de forma mais eficiente em tumores renais que expressam SAV1 (JIANG et al., 2019).

Min et al. (2012) demonstraram que SAV1 interage com o supressor tumoral RUNX3 (Runt-related transcription factor 3) e que essa interação é aumentada por MST2, enquanto que SAV1 facilita a associação de MST2 com RUNX3. Além disso, indicaram que o complexo ternário composto com RUNX3, MST2 e SAV1 promoveu morte celular nas linhagens celulares HEK293 e MCF7.

Won et al. (2019) identificaram a proteína anti-apoptótica, BCL-2, como outro possível parceiro de SAV1, eles mostraram que a superexpressão de BCL-2 diminuiu os níveis de expressão das proteínas MST2 e SAV1 em culturas celulares da linhagem HEK293. Observaram que SAV1 pode interagir fisicamente com BCL-2, o que promoveu a degradação proteolítica de SAV1 e MST2, justificando a correlação inversa entre essas proteínas. Compararam a expressão em diferentes linhagens de câncer, como a MCF-7, que apresentou altos níveis de MST2 e SAV1 e em contrapartida baixos níveis de BCL-2, ao contrário da linhagem de neuroblastoma, SH-SY5Y. Além disso, na linhagem SH-SY5Y, o silenciamento de BCL-2 resultou em aumento da expressão de MST2 e SAV1. Eles também encontraram que a inibição de BCL-2 aumentou a morte celular da linhagem HEK293. Logo, sugeriram que a degradação de MST2 e SAV1 por BCL-2 é uma maneira de impedir a morte celular em células cancerígenas.

Estudos tem apontado que SAV1 exerce papel como supressor tumoral em vários tipos de câncer. Jiang et al. (2017) mostraram que os níveis de mRNA e proteína de SAV1 estão diminuídos em tecidos de câncer colorretal humano comparado com tecidos não tumorais adjacentes e que SAV1 reprimiu o desenvolvimento do câncer colorretal por meio da inibição da sinalização Akt-mTOR, de uma maneira dependente de YAP.

De acordo com Wang et al. (2016), o nível de mRNA de SAV1 em adenocarcinoma ductal pancreático foi menor em comparação com tecidos paratumorais. Linhagens celulares pancreáticas exibiram menor nível proteico de SAV1 em comparação com linhagem celular pancreática normal. O mesmo estudo também indicou que baixo nível de proteína SAV1 tende a correlacionar com características clinicopatológicas desfavoráveis em pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático comparado com o perfil de alto nível proteico de SAV1, além de ser associado a menor taxa de sobrevivência global.

Wang et al. (2017) mostraram que SAV1 é silenciado por metilação de DNA e atua como supressor tumoral em adenocarcinoma ductal pancreático e Matsuura et al. (2011) encontraram que SAV1 está frequentemente com a expressão diminuída em carcinoma celular renal de células claras de alto grau e que os baixos níveis de SAV1 estão envolvidos na patogênese desse carcinoma.

A partir da análise do banco de dados de microarranjos (Oncomine), Luo et al. (2011) mostraram que os níveis de mRNA de SAV1 estão diminuídos em câncer de mama quando comparados ao tecido de mama normal e que SAV1 interage com HAX1 e atenua seus efeitos anti-apoptóticos em linhagem de câncer de mama, MCF-7.

Da mesma maneira, Li et al. (2016) relatou que o nível de SAV1 está diminuído em tecidos tumorais de pulmão comparados com não tumoral e também em linhagens de câncer de pulmão. O estudo evidenciou um papel supressor de tumor de SAV1, a partir da interação com a proteína Gli1, que é altamente expressa em câncer de pulmão, resultando na inibição da via de hedgehog/Gli1. No entanto, os dados sugeriram que a diminuição da expressão de SAV1 promoveu a carcinogênese e progressão tumoral por ativar a via de sinalização de Hedgehog/Gli1.

Além disso, RASSF1A, frequentemente inativado em células tumorais humanas, tem sido evidenciado como um ativador do supressor tumoral p73, ao mediar a ativação da via de Hippo (MATALANAS et al., 2007). Donniger et al. (2011), mostraram que SAV1 possibilita RASSF1A regular o pró-apoptótico p73 de uma maneira independente da via de Hippo, sugerindo funções supressoras tumorais independentes da via de Hippo para SAV1.

Dessa forma, vários trabalhos têm mostrado o papel de SAV1 como supressor tumoral e suas múltiplas possibilidades de interação com diversas proteínas, reforçando sua atuação independente da via Hippo. No entanto, há poucos trabalhos que avaliam sua importância para o câncer de mama, e até o momento, nenhum trabalho avaliou a importância de SAV1 em hipóxia, que é uma característica comum de tumores sólidos, associada a maior agressividade tumoral e pior prognóstico (AEBERSOLD, 2001; PENNACCHIETTI et al., 2003).

Portanto, o presente trabalho objetivou investigar *in vitro* e *in silico*, o perfil de expressão e metilação do gene SAV1, em normóxia e hipóxia, e o potencial prognóstico de SAV1 para o câncer de mama, e ainda as alterações no transcriptoma em resposta ao agente

demetilante (5-Aza-dC), em normóxia e hipóxia, a fim de identificar genes e vias potencialmente reprimidas por metilação de DNA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o papel da metilação do DNA na regulação da expressão do gene *SAVI* e de outras vias de sinalização, em normóxia e hipóxia, e avaliar a expressão gênica e proteica de *SAVI*, *in vitro* e *in silico*, e seu potencial prognóstico para o câncer de mama.

2.2 Objetivos específicos

- a) Analisar as vias de sinalização e processos biológicos alterados, em resposta ao tratamento com agente demetilante 5-Aza-dC, em hipóxia e normóxia;
- b) Avaliar o nível de mRNA e localização subcelular/expressão proteica de *SAVI* após tratamento com agente demetilante 5-Aza-dC, em hipóxia e normóxia;
- c) Identificar a presença ou ausência de metilação de DNA, na região promotora de *SAVI*, em hipóxia e normóxia;
- d) Avaliar o nível de mRNA e localização subcelular/expressão proteica de *SAVI*, níveis de mRNA de *CYR61* e *CTGF*, em relação ao fenótipo de agressividade (comparação entre linhagem celular de câncer de mama mais agressiva, MDA-MB-231, e menos agressiva, MCF7), em hipóxia e normóxia;
- e) Analisar *in silico* a expressão gênica/proteica de *SAVI*, gênica de *CYR61* e *CTGF*, e metilação de DNA de *SAVI* em amostras normais adjacentes e amostras de câncer de mama, e em subtipos tumorais, estratificados em normóxia e hipóxia;

- f) Avaliar o potencial prognóstico de *SAVI* para o câncer de mama, através das análises de expressão de *SAVI* de acordo com estágio tumoral, status livre de doença e curva de sobrevivência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

Para esse trabalho, foram utilizadas como modelos experimentais, as linhagens celulares de câncer de mama, MDA-MB-231 (HTB-26, ATCC) e MCF-7 (HTB22, ATCC). A linhagem MDA-MB-231 apresenta o perfil de um subtipo de câncer de mama que exibe ausência de marcadores moleculares, ER, PR e HER2, ou seja, triplo negativa, tem um elevado potencial de metástase e é pouco diferenciada, assemelhando-se a um dos subtipos de câncer de mama mais agressivo e de pior prognóstico, denominado como "claudin-low" (DIAS et al., 2015). Enquanto a MCF-7 é linhagem ER+ e PR+, com fenótipo bem diferenciado, melhor prognóstico e se assemelha ao subtipo de câncer de mama luminal A (SUBIK et al., 2010). As células foram cultivadas em atmosfera de 37°C e 5% de CO₂, em presença de meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Life Technologies, Thermo Fisher, USA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Invitrogen), 2 mM de Glutamina, 100 mg/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina (Invitrogen).

Os repiques celulares foram realizados quando as culturas atingiram a confluência de aproximadamente 80%. Os repiques foram realizados na proporção de 1:4 com auxílio de tripsina EDTA 1X (Invitrogen) e semeadas em novas garrafas para manutenção das culturas. Para os experimentos, as células foram repicadas para uma densidade de 10.000 células/cm², onde após 24 h os ensaios experimentais foram iniciados. Para esse repique, antes de plaquear, o número de células foi estimado por contagem das células viáveis em câmara de Neubauer com auxílio do azul de tripan 0,4%. Este corante penetra e não é expelido pelas células não viáveis, deixando-as azuis, permitindo identificar e diferenciar das células viáveis que são proficientes na extrusão do corante. Para a realização dos experimentos, foram utilizadas garrafas de cultura e placas de 96 poços.

Para estocagem das células, foram realizados protocolos de congelamento para manutenção de estoques em 90% SFB/10% Dimetilsulfóxido (DMSO), onde foram resfriadas gradativamente, seguindo protocolo de 16 h a -20°C, em seguida para -70°C pelo

período mínimo de 24 h até o máximo de 1 mês, por fim os tubos de congelamento foram transferidos para o tambor de nitrogênio líquido. Para o descongelamento e reposição da cultura, os tubos de congelamento com as células foram retirados do freezer -70°C e incubados diretamente a 37°C. Após total descongelamento, as células foram lavadas com 5mL de *Phosphate-Buffered Saline* (PBS, em português, Tampão Fosfato-Salino) 1x e cultivadas em meio RPMI suplementado com 20% de SFB até o primeiro repique. Após esse período, as células foram mantidas em meio RPMI como descrito acima.

3.2 Tratamento com agente demetilante e câmara de hipóxia

Para os experimentos de microarranjo de DNA e RT-qPCR, as células MDA-MB-231 foram tratadas com 100 µM de agente demetilante 5-Aza-2'-deoxicitidina (5-Aza-2'-dC, Sigma-Aldrich), por 72 h, e nas últimas 24h de tratamento com 5-Aza-2'-dC, as células foram incubadas em normóxia ou hipóxia. DMSO foi usado como diluente da 5-Aza-2'-dC. Foram avaliados 4 grupos experimentais: DMSO em normóxia versus 5-Aza-2'-dC em normóxia; DMSO em hipóxia versus 5-Aza-2'-dC em hipóxia.

Para estabelecer um ambiente de hipóxia, as células MDA-MB-231 e MCF-7 foram mantidas por 24 h em 1% de oxigênio na câmara de hipóxia (Billups-Rothenberg inc.). A câmara foi submetida a um fluxo de nitrogênio de maneira a reduzir a proporção de oxigênio no ar nela contida de 20 % para 1 %. A aferição dos níveis de oxigênio no interior da câmara foi realizada com auxílio de um medidor de oxigênio (SP2nd, Senko). Após ser hermeticamente fechada, foi colocada em uma estufa à 37 °C por 24 h.

3.3 Microarranjo de DNA

Para síntese de cDNA foi utilizado o kit *WT Expression Kit* (Ambion), conforme recomendação da *Affymetrix (Gene Chip Expression Analysis Technical Manual - Affymetrix*

Inc). Cerca de 200 ng do *pool* de RNA total de 3 experimentos independentes foi convertido em cDNA dupla-fita utilizando o oligonucleotídeo iniciador T7-Oligo (dT). Seguindo para a síntese do cRNA (RNA complementar) biotilado, o volume total do cDNA sintetizado através reação para a transcrição *in vitro*, incubando a mistura por 16 h a 40 °C no termociclador *Veriti* (Applied Biosystems, California, USA). Após o final do processo, o cRNA foi purificado utilizando *beads* magnéticas (Nucleic Acid Binding Beads, Ambion®, Life Technologies™, USA). Após síntese do cRNA, estes foram hibridizados contra o chip de microarranjo Human Exon 1.0 ST (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA). Todo o processo de lavagem e coloração foi feito na estação fluídica GeneChip® Fluidics Station 450 de acordo com a recomendação do fabricante. Para a leitura óptica dos chips *Human Exon 1.0 ST*, os arranjos de sonda foram lidos em scanner GeneArray® Scanner 7G (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA), e a captura das imagens e análise inicial das hibridações foram feitas com o software Affymetrix® Expression Console™ e os arquivos gerados foram salvos em formato *.cel. Os dados obtidos na aquisição dos sinais de fluorescência presentes nos arquivos *.cel foram normalizados e sumarizados utilizando o software *Expression Console* (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA).

Foram comparadas células da linhagem MDA-MB-231, tratadas com 5-Aza-dC e não tratadas, em normóxia e hipóxia. Após a seleção dos genes diferencialmente expressos, usando como ponto de corte ± 2 vezes, eles foram agrupados em vias de sinalização, utilizando a ferramenta WebGestalt 2019 (WEB-based Gene Set Analysis Toolkit) (WANG et al., 2017; LIAO et al., 2019) e o método GSEA (Gene Set Enrichment Analysis). Os bancos de dados Biological Process (ASHBURNER et al., 2000; CARBON et al., 2009; CARBON et al., 2019) e KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (OGATA et al., 1999) foram usados na análise de agrupamento dos genes alterados em processos biológicos ou vias de sinalização.

3.4 Predição de sítios de metilação no promotor e no primeiro exon do gene de SAVI

Para avaliar se era possível uma regulação transcricional de *SAVI* pelo mecanismo epigenético de metilação de DNA, foi efetuada uma análise *in silico* de sítios de metilação.

A análise *in silico* consistiu na busca de ilhas CpGs, na região do DNA correspondente ao promotor e primeiro éxon do gene *SAVI*, de -1000 bp a + 458 bp. A ferramenta de bioinformática utilizada foi o software Methprimer (LI e DAHIYA, 2002).

3.5 Extração de DNA

DNAzol® foi usado para a extração de DNA de 3 experimentos de culturas de células MDA-MB-231 em normóxia e hipóxia. Após retirada do meio de cultura, 1mL do reagente DNAzol® foi adicionado à garrafa de 25 cm² de cultura contendo as células aderidas. Após adição de 500 µL de etanol absoluto, os microtubos foram agitados por inversão e incubados a temperatura ambiente por 3 minutos. Na etapa seguinte as amostras foram centrifugadas a 4.000 x g por 2 minutos para a precipitação do DNA. Os sobrenadantes foram descartados e procedeu-se com duas etapas de lavagem dos precipitados de DNA: adição de 1 mL de etanol 75%, agitação por inversão, incubação por 1 min a temperatura ambiente e remoção do sobrenadante por fluxo-refluxo com auxílio da pipeta. Os microtubos foram mantidos abertos até a secagem dos precipitados, os quais foram, depois de secos, reconstituídos em de solução de NaOH 8 mM. Os pHs das soluções foram ajustados para o valor de 7,5 através da adição de HEPES 0,1 M.

3.6 Quantificação e avaliação da qualidade de DNA

Os DNAs extraídos foram quantificados utilizando o equipamento NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare). A solução usada para a reconstituição ou eluição final do DNA foi usada na determinação do 0% de absorbância. A calibração foi realizada em duas etapas, nas quais 5 µL do eluente foi aplicado na janela de leitura para a determinação do 100% de transmitância. A quantificação (em ng/µL) se deu pela aplicação de 2 µL da amostra na janela de leitura.

3.7 Conversão por bissulfite do DNA

Os DNAs foram submetidos à conversão por bissulfite utilizando EpiTect Plus Bisulfite (Qiagen), composto por duas etapas: conversão com bissulfite em termociclador (2 ciclos de desnaturação por 5 minutos, seguido de incubação a 60°C por 20 minutos) e purificação em colunas spin de sílica.

3.8 Amplificação de DNA por PCR convencional

As reações de PCR foram realizadas utilizando GoTaq Green Master Mix (Promega), no equipamento Rotor-Gene Q 2plex HRM (Qiagen). Cada reação foi composta de 1 X de GoTaq Green Master Mix; 0,2 µM de primers; 10 ng de DNA convertido com bissulfite e água para um volume total de 25 µL. Foram utilizados primers com alvo em um trecho do promotor de *SAVI* com 253 bp (-173 a +80 bp). Os primers usados foram 5'-GTTGAGGATGAGTGAGGATAGT -3' e 5'-CGAACCAAAACCAAAACCATAATCC-3'. O programa usado para a amplificação foi composto de: desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos; seguida de 55 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. Após a ciclagem as reações foram mantidas a 72 °C por 10 minutos.

3.9 Eletroforese em gel de agarose

Para avaliar a especificidade do primer para o promotor de *SAVI* utilizado na PCR convencional, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com GelRed®, do produto da PCR (253 bp).

O gel de agarose 1,5 % foi preparado fundindo-se agarose em tampão TAE [Tris-Acetato 40 mM e EDTA 1 mM pH 8,0]. O gel foi vertido em placa horizontal, na cuba de eletroforese, e foi adicionado o mesmo tampão TAE. Após a gelificação, adicionou-se a cada

poço, 10 µL produto da PCR e 1 µL de GelRed® 10.000 X. A corrida foi realizada a 60 mA, por 30 minutos. Após a corrida, o gel foi observado após exposição aos raios ultra-violetas, no transiluminador AlphaImager® Mini System (Alpha Innotech).

3.10 Sequenciamento

Os produtos das ampliações por PCR dos DNAs convertidos foram purificados com PureLink® PCR Purification Kit (Life Technologies). As reações de sequenciamento foram montadas em placas de 96 poços utilizando reagente BigDye® Terminator v3.1 (Life Technologies) e foram compostas de: 1 µL de reagente BigDye®; 2 µL de 5X Sequencing Buffer; 3,2 pmol de primer; 10 ng de produto de PCR purificado e água ultrapura para volume total de 10 µL. O programa usado para a reação de sequenciamento foi constituído de um passo de desnaturação inicial a 96 °C por 1 minuto; 35 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 2 minutos e incubação a 4 °C.

Após a reação de sequenciamento, os produtos passaram por uma etapa de purificação. A cada reação foram adicionados 2,5 µL de solução de EDTA (125 mM, pH 8,0) e 30 µL de etanol absoluto. A placa foi agitada por inversão e mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foi centrifugada a 4.000 x g por 45 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado por inversão e a placa foi centrifugada invertida por 5 segundos. A cada reação foram adicionados 30 µL de etanol 70% m/v e a placa foi centrifugada a 4.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido por inversão e a placa foi, novamente, centrifugada invertida por 5 segundos e mantida a 60 °C por 10 minutos sem cobertura. Os precipitados foram reconstituídos em 10 µL de formamida Hi-Di™ (Life Technologies). A eletroforese capilar foi realizada no equipamento 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies), utilizando conjunto de capilares de 50 cm e polímero POP-7™ (Life Technologies).

As sequências obtidas foram analisadas nos programas Bioedit 7.2.5 (IbisBioscience) e ClustalOmega (MADEIRA et al., 2019).

3.11 Predição de sítios de ligação de fator de transcrição no promotor de *SAVI*

Para avaliar se a região metilada, identificada por sequenciamento, poderia compor sítio de ligação para fatores de transcrição, foi efetuada uma análise de predição *in silico* de sítios de ligação para fatores de transcrição em um determinado trecho do promotor de *SAVI* com 253 bp (-173 a +80 bp). As ferramentas de bioinformática utilizadas foram os softwares TFBIND (TSUNODA e TAKAGI, 1999), PROMO (MESSEGUER et al., 2002) e JASPAR (FORNES et al., 2020).

3.12 Elaboração de *primers*

As sequências dos genes alvos avaliados foram obtidas por meio da *database gene* do *NCBI* e do *Ensembl*. Todas as variantes de transcrito do mesmo gene foram alinhadas a fim de se encontrar regiões comuns entre elas, a partir das quais foram selecionadas as sequências dos primers, cuidando para que a região escolhida, quando possível, se localizasse em dois éxons adjacentes diferentes. As sequências selecionadas foram verificadas quanto a determinados parâmetros através da ferramenta *OligoAnalyzer 3.1*, da seção *SciTools*, pertencente à *IDT DNA*, tais como: tamanho do primer (18-24 bp), produto da PCR de 70-150 bp, temperatura do primer ou *T_M* (Temperatura de Melt) entre 55°C-60°C, temperatura para formação de hairpin menor do que 35°C e o $\Delta G > -10$ para a formação de homodímero e heterodímero (BUSTIN, 2000).

Os primers também foram analisados quanto à especificidade de ligação à sequência de interesse, por meio do algoritmo *BLAST*, disponível online através do endereço eletrônico <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Os seguintes primers foram usados: *ACTB* 5'-GAGCGCGGCTACAGCTT-3' e 5'-TCCTTAATGTCACGCACGATTT-3'; *SAVI* 5'-CACGAGCCCCTGTGAAATAT-3' e 5'-TTAGCATTCCCTGGTATGTATCCA-3'; *CTGF* 5'-ACCTGGAAGAGAACATTAAGAAGG-3' e 5'-GTCGGTACATACTCCACAGAAT-3'; *CYR61* 5'-GCCAGTGTACAGCAGCCT-3 e 5'-GCAGGAACCGCAGTACTTG-3; *IL1A* 5'-ATTGTATGTGACTGCCCAAG-3' e 5'-TAGTGCCGTGAGTTTCCCAG-3'; *IL1B*

5'-CTGAAAGCTCTCCACCTCCAG-3' e 5'-CACGCAGGACAGGTACAGAT-3'; *DUSP6*
5'- CAGCGACTGGAACGAGAATAC-3' e 5'- CCTCGTCCTTGAGCTTCTTG-3';
DUSP10 5'- GTTCAACTACAAGCGGTCGC-3' e 5'-CAGCCTGGCAGTGGATGAG-3'.

3.13 RT-qPCR

3.13.1 Extração de RNA

A RT-qPCR foi utilizada para avaliar alterações nos níveis de transcritos de *SAVI* em resposta ao agente demetilante, 5-Aza-dC, sob condições de normóxia e hipóxia e validar os resultados do microarranjo de DNA, através das mudanças nos níveis de mRNA de *IL1A*, *IL1B*, *DUSP6* e *DUSP10*. Os níveis de mRNA de *CTGF* e *CYR61*, genes alvo da via de Hippo, também foram avaliados para mensurar indiretamente alteração da atividade transcricional da via, em normóxia e hipóxia. Após os tratamentos e condições, foi realizada a extração de RNA total com auxílio do reagente TRIzol (Invitrogen). Para extração de RNA, as células foram submetidas a centrifugação de 1500 rpm, por 5 min, a 25°C. O precipitado foi homogeneizado em 1mL de TRIzol, seguindo com adição de 200µL de Clorofórmio. Os lisados celulares foram centrifugados a 12000 rpm por 15 min a 4°C. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo de 1,5 mL e os RNAs foram precipitados adicionando 500 µL de Isopropanol 100%. Após 15 min a 25°C, as amostras foram submetidas a centrifugação de 12000 rpm, por 10 min, a 4°C. Descartando o sobrenadante, os precipitados foram reconstituídos em água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC). As quantificações de RNAs obtidos da extração foram realizadas através de espectrofotometria com auxílio do equipamento Nanodrop 1000 (NanoDrop). Os RNAs foram armazenados a -70°C até o uso.

3.13.2 Tratamento com DNase

Depois da extração de RNA, as amostras foram incubadas com DNase para remoção de resquícios de moléculas de DNA indevidamente obtidas da extração de RNA. Para tal, foi utilizada a DNase amplification grade I (Invitrogen). Para tal, cerca de 2 µg de RNA total foi incubado com 1 U de DNase e 1X de Tampão DNase 10X em um volume total de 9 µL, durante 15 min a 25°C. A reação foi inativada adicionando 1 µL de EDTA 25 mM e incubado a 65°C por 10 min.

3.13.3 Síntese de cDNA

Para avaliação dos níveis de mRNA, os RNAs foram convertidos em *Complementary DNA* (cDNA, em português, DNA complementar) com auxílio do SCRIPT cDNA synthesis kit (Promega). Brevemente, à reação do RNA tratado com DNase foram adicionados 4µL de Tampão 5X First-Strand, 1 µL de OligodT (500 µg/mL), 1 µL *Deoxynucleotide Triphosphates* (dNTP, em português, Desoxirribonucleotídeos Trifosfato) Mix (10 mM), 1 µL de Script Enzima RT. A síntese de cDNA procedeu incubando as reações durante 50 min a 42°C com posterior inativação da enzima a 70°C por 15 min. As incubações foram realizadas em termociclador.

3.13.4 Reação da PCR

A RT-qPCR foi realizada a fim de avaliar quantitativamente as variações nos níveis de mRNA dos genes citados. Para isso, as reações de síntese de cDNA foram diluídas cerca de 5 vezes e utilizadas para amplificação por PCR utilizando Rotor Gene PCR Master Mix (Qiagen). As reações das PCRs foram realizadas em volumes finais de 10 µL contendo 0,5 µM de cada primer. As RT-qPCRs foram realizadas no termociclador Rotor-Gene 6000

(Qiagen). O programa usado para a amplificação foi composto de: desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos; seguida de 45 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60 °C por 45 segundos, e por último, a etapa de melt, que consistiu em uma rampa de 70°C a 95°C, variando de 1°C em 1°C. As análises foram realizadas com auxílio do programa Rotor-Gene 6000 Series Software (Qiagen). Os níveis de expressão dos genes avaliados foram normalizados pelos níveis de *ACTB*. As reações foram feitas em triplicata e as quantificações foram determinadas através do cálculo de DDCT (LIVAK e SCHITTIGEN, 2001). Para avaliação da especificidade dos primers e/ou formação de dímeros de primers, foi analisada através da curva de dissociação, a formação de um pico único ao derivar os dados brutos de dissociação da fluorescência/temperatura *versus* ciclos.

3.14 Análise imunocitoquímica (ICQ)

Para a realização da técnica de ICQ, foram confeccionadas lâminas contendo células aderentes representativas de cada experimento, fixadas com fixador comercial Citofix. Ao início do experimento, todas as lamínulas foram delimitadas com caneta hidrofóbica Dako Pen. As lâminas foram incubadas por 15 minutos em solução de Triton 0,1%, lavadas em PBS e em seguida incubadas em soro fetal 10% por 30 minutos. O anticorpo primário anti-NF-kB/p65 (1:200, sc-372, Santa Cruz Biotechnology) foi usado. Na sequência, foi aplicado o anticorpo primário sobre cada lamínula (após padronização de acordo com o material analisado), seguido de incubação em câmara úmida por 16 horas a 4°. Após a incubação, as lamínulas foram submetidas a 2 banhos (2 minutos) em wash buffer e em seguida, foi aplicado sobre cada amostra o anticorpo secundário biotilado, fornecido pelo kit (LSAB Dako), por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. Após este tempo, as lamínulas foram lavadas em wash buffer por 5 minutos, seguido da aplicação de conjugado streptavidina-peroxidase por 15 minutos, em câmara úmida e em temperatura ambiente. As lamínulas foram em seguida lavadas em wash buffer por 5 minutos e submetidas à revelação com o substrato-cromógeno (DAB, LSAB kit, Dako) por 5 minutos, contracoradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto, posteriormente lavadas em água corrente por 5 minutos e desidratados em graduações de álcool (70%, 85% e 100%), clarificadas em xilol e montadas

e cobertas com lamínula utilizando meio de montagem não aquoso. As lâminas montadas foram analisadas para obtenção de score quantitativo de imunomarcção, no programa Image J (NIH, USA). No caso da marcação de SAV1, as lamínulas foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos, seguido de lavagem com PBS 1X. Para imunomarcção, foram usados o anticorpo anti-SAV1 (1:500, ab105105, ABCAM) e o DAB (ImmPACT DAB, SK-4105, Vector Laboratories), e seguidas as instruções do kit VECTASTAIN® Universal Quick HRP (Peroxidase), R.T.U. (Ready-to-Use) (PK-7800, Vector Laboratories). Na análise das lâminas, os pixels foram convertidos em densidade óptica (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/>), foi feita a subtração do background e o resultado foi expresso como razão da densidade óptica do teste/controle.

3.15 Análise imunohistoquímica (IHQ)

Uma porção das amostras tumorais de 15 pacientes brasileiros (subtipos Triplo negativo, Luminal A e Her2) foi fixada em solução de formalina tamponada (10%) por 48h. Após esse tempo, os tecidos foram acondicionados em cassetes histológicos após registro, lavados em água corrente por 20 minutos e submetidos a desidratação em banhos de álcool em concentração crescente (70%, 90% e 100%). Após incubação em dois banhos de xilol, as amostras foram colocadas em dois banhos de parafina e emblocadas. Após microtomia, os cortes foram pescados em lâminas adesivadas com silano. Para a realização da imunohistoquímica, as lâminas foram deixadas na estufa a 60° C por 30 minutos e depois foram desparafinizadas com 3 banhos de xilol e hidratadas em banhos de concentração decrescente de álcool (100%, 90% e 70%). Após banho com água destilada, os cortes foram incubados por 15 minutos com solução de peróxido de hidrogênio a 2% para bloqueio de peroxidase endógena. Para recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas em Tampão Citrato pH=6,0 por 20 minutos a 60°C. Para bloqueio e imunodeteção foi utilizado o kit VECTASTAIN® Universal Quick HRP (Peroxidase), R.T.U. (Ready-to-Use) (PK-7800, Vector Laboratories). A solução de bloqueio foi incubada por 10 minutos, o excesso foi retirado e em seguida os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-SAV1 (ab105105, ABCAM) diluído em PBS/BSA 1% na proporção de 1:250 por 24 h. As lâminas

foram lavadas com PBS três vezes por 5 minutos antes da incubação com o anticorpo secundário biotilado do kit por 10 minutos. Após lavagem com PBS, os cortes foram incubados com solução estreptavidina/peroxidase por 5 minutos, lavados com PBS e incubados com solução de DAB (ImmPACT DAB, SK-4105, Vector Laboratories) por 10 minutos. Lâminas foram lavadas em água destilada, contracoradas com hematoxilina, desidratadas com banhos de álcool em concentrações crescentes e incubadas com 3 banhos de xilol. As lâminas foram montadas com meio de montagem Entellan e lamínulas. As lâminas foram fotografadas em microscópio de luz Olympus com câmera acoplada. Foram fotografadas em média 5 glândulas e 5 estromas por grupo no aumento de 400x. As lâminas montadas foram analisadas para obtenção de score quantitativo de imunomarcação, no programa Image J (NIH, USA).

3.16 Análises *in silico* da expressão gênica e proteica de SAV1 em pacientes com câncer de mama

Para as análises *in silico* da expressão gênica e proteica, foram usados dados públicos de pacientes com câncer de mama, obtidos do TCGA (The Cancer Genome Atlas Program), gerados pelo TCGA Research Network (<https://www.cancer.gov/tcga>). As análises de expressão gênica e metilação de DNA de SAV1, entre amostras normais adjacentes e amostras de câncer de mama, foram realizadas na ferramenta online Wanderer (DÍEZ-VILLANUEVA; MALLONA; PEINADO, 2015). Enquanto que, as avaliações de expressão gênica e metilação de DNA de SAV1 em subtipos de câncer de mama e a curva de sobrevivência foram realizadas, de forma online, no UCSC Xena (GOLDMAN et al., 2020). Os subtipos Basal, Her2, LumA, LumB e claudin-low foram usados nessa análise. Para agrupar as amostras em normóxia e hipóxia, foi usada a assinatura clínica de hipóxia (*ALDOA + MIF + TUBB6 + P4HA1 + SLC2A1 + PGAM1 + ENO1 + LDHA + CDKN3 + TPI1 + NDRG1 + VEGFA + ACOT7 + ADM*) (BUFFA et al., 2010), no UCSC Xena. Os pacientes com maiores valores de expressão gênica dessa assinatura foram classificados como tumores em hipóxia, e os com menores valores foram agrupados em normóxia. Similar estratégia foi usada para agrupar os tumores no subtipo claudin-low. Para isso, foi usada a assinatura composta por

genes regulados positivamente (+) e negativamente (-): + *ADAMDEC1* + *ANXA1* + *BTN3A3* + *CASP1* + *CD36* + *CD3D* + *CFLAR* + *COLEC12* + *CTSK* + *CTSS* + *CXCL9* + *DPT* + *EPAS1* + *FHL1* + *FUCA1* + *GPX3* + *LAPTM5* + *LGALS2* + *LTB* + *LXN* + *MAF* + *PLAC8* + *PSMB10* - *AKAP1* - *ANK3* - *BSPRY* - *CDH1* - *CLDN3* - *CLDN4* - *CTTN* - *EFNA4* - *ELF3* - *EPN3* - *FLNB* - *FXRD3* - *GAS2L1* - *GCAT* - *GPR56* - *H1FO* - *HIST1H2BD* - *HIST2H2BE* - *KRT18* - *KRT19* - *KRT8* - *LASS2* - *MB* - *MTA1* - *MYO6* - *NEBL* - *PBX1* - *PIK3R3* - *PPM1H* - *PTPRF* - *SLC19A2* - *TOB1* - *TOM1L1* - *TPD52* - *TPD52L1* - *TRAF4* (DIAS et al., 2017). Por fim, a expressão proteica de SAV1 de acordo com estágio tumoral e status livre de doença foi obtida no cBioPortal (CERAMI et al., 2012; GAO et al., 2013).

3.17 Análise estatística

O teste t de Student ou Mann Whitney foi realizado para verificar diferenças estatísticas. O valor de $p < 0,05$ foi considerado o nível menos significativo. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão de pelo menos três experiências individuais. O software Graphpad Prism foi usado para realizar a análise estatística (GraphPad Prism Software versão 5.0 para Windows 8).

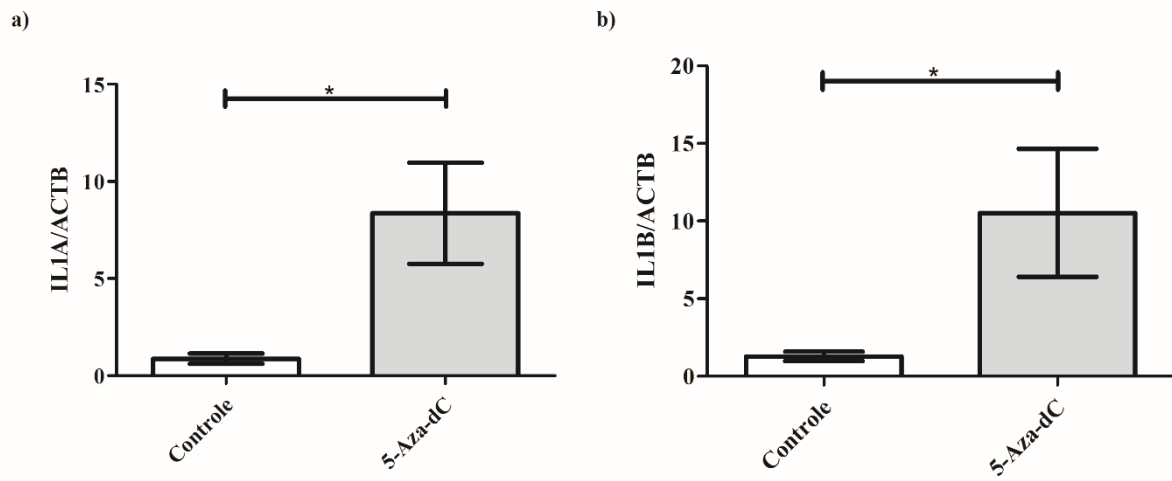
4 RESULTADOS

Os resultados da tese se iniciaram com a validação de dados, obtidos no mestrado, de experimentos de microarranjo de DNA, usando a linhagem MDA-MB-231, tratada com 5-Aza-dC ou não, em normóxia e hipóxia, e uma avaliação aprofundada dos genes com suas expressões alteradas, utilizando ferramentas online de agrupamento gênico e identificação de vias de sinalização e processos biológicos alterados.

4.1 Validação do microarranjo de DNA

Os genes *IL1A* (+13,36 vezes), *IL1B* (+10,47 vezes), tiveram seus níveis de mRNA aumentados na análise de microarranjo de DNA, após tratamento com agente demetilante em normóxia. Enquanto que os genes *DUSP6* (+2,1 vezes) e *DUSP10* (+2 vezes) apresentaram seus níveis de transcritos elevados após tratamento com agente demetilante em hipóxia. Esses quatro genes foram usados para validação do microarranjo de DNA. Na RT-qPCR, os níveis de mRNA de *IL1A* (figura 4A) aumentaram 8,4 ($\pm 2,6$) vezes ($p < 0,05$), enquanto que os níveis de *IL1B* (figura 4B) aumentaram 10,5 ($\pm 4,1$) vezes ($p < 0,05$), após o tratamento com 5-Aza-dC em normóxia, de acordo com os dados de microarranjo anteriormente citados. Além disso, *DUSP6* (figura 5A) e *DUSP10* (figura 5B) aumentaram 1,9 ($\pm 0,1$) vezes ($p < 0,05$) e 3,3 ($\pm 0,5$) vezes ($p < 0,01$), respectivamente, depois do tratamento com 5-Aza-dC em microambiente de hipóxia, igualmente em conformidade com os resultados do microarranjo. Os dados acima foram congruentes nos microarranjos e validações por PCR, sugerindo que os demais genes não analisados por PCR podem seguir esse padrão e podem ser considerados para futuras avaliações.

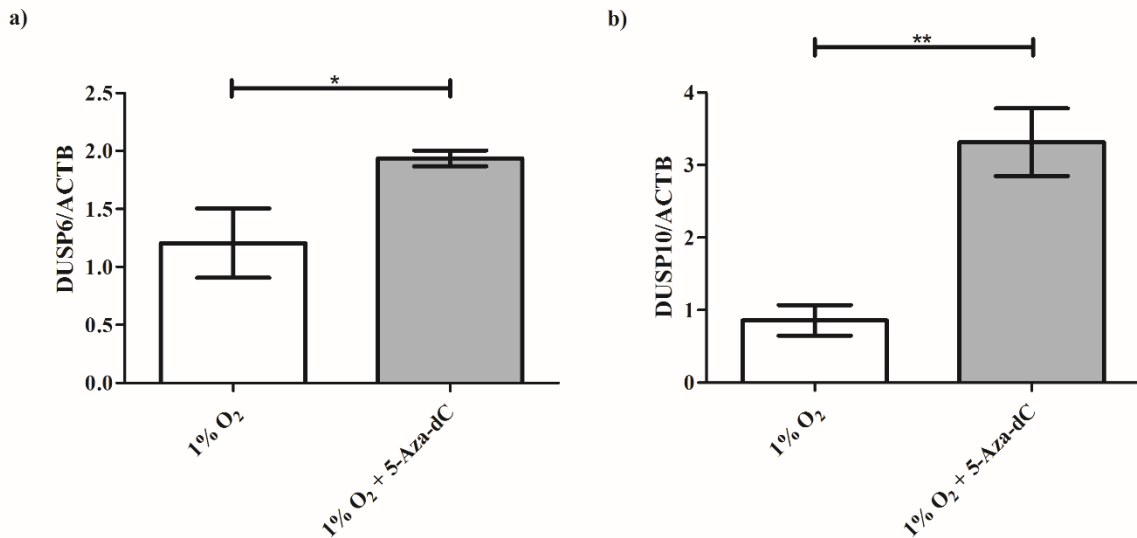
Figura 4 – Níveis relativos de mRNA de *IL1A* e *IL1B* após tratamento com agente demetilante 5-Aza-dC em normóxia



Legenda: As barras representam as médias de pelo menos três experimentos individuais (\pm erro padrão) dos níveis relativos de mRNA de *IL1A* (4A) e *IL1B* (4B). Controle – células tratadas com diluente dimetilsulfóxido em normóxia. 5-Aza-dC – células tratadas com agente demetilante 5-Aza-dC em normóxia. *ACTB* foi usada como gene de referência. (*) $p < 0,05$.

Fonte: A autoria, 2020.

Figura 5 - Níveis relativos de mRNA de *DUSP6* e *DUSP10* após tratamento com agente demetilante 5-Aza-dC em hipóxia



Legenda: As barras representam as médias de pelo menos três experimentos individuais (\pm erro padrão) dos níveis relativos de mRNA de *DUSP6* (5A) e *DUSP10* (5B). 1% O₂ – células tratadas com diluente dimetilsulfóxido em hipóxia. 1% O₂ + 5-Aza-dC – células tratadas com agente demetilante 5-Aza-dC em hipóxia. *ACTB* foi usada como gene de referência. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

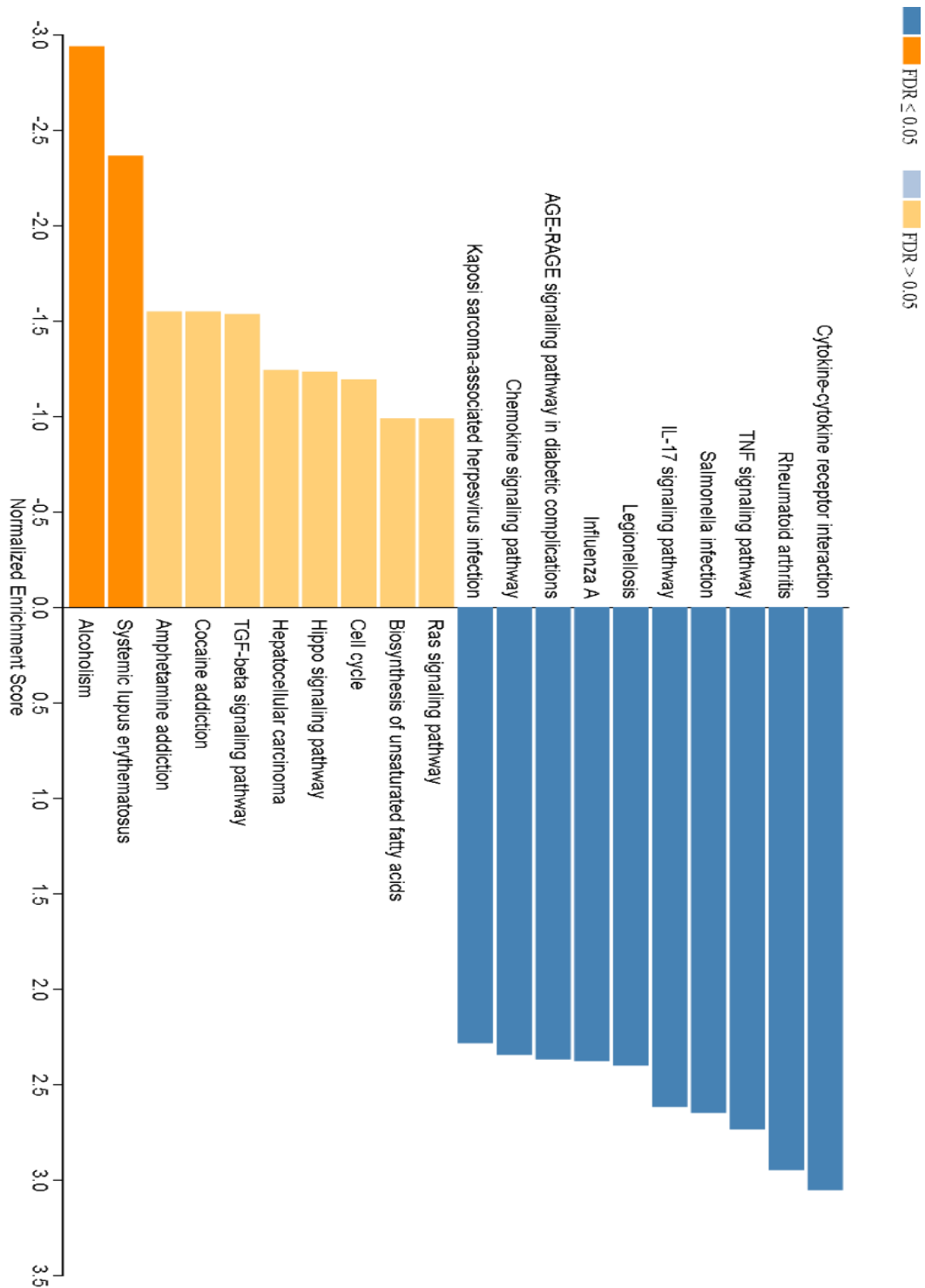
Fonte: A autoria, 2020.

4.2 Análise de vias de sinalização a partir de genes diferencialmente expressos (GDEs) após tratamento com 5-Aza-2-dC em condições de normóxia e hipóxia

Para agrupar GDEs em vias de sinalização, foi utilizado o banco de dados KEGG, na ferramenta online WebGestalt. A análise do transcriptoma após o tratamento com 5-Aza-2-dC, em condição de normóxia, exibiu 484 genes aumentados e 121 genes diminuídos em relação ao grupo não tratado. Os genes superexpressos foram agrupados em interação receptor citocina-citocina, artrite reumatóide, via de sinalização de TNF, infecção por salmonella, via de sinalização de IL-17, legionelose, influenza A, via de sinalização ARE-RAGE em complicações diabéticas, via de sinalização de quimiocina e infecção pelo vírus herpes associada ao sarcoma de Kaposi. Enquanto, os genes diminuídos foram agrupados em lúpus eritematoso sistêmico e alcoolismo (figura 6). Por outro lado, A análise do tratamento com 5-Aza-2-dC, em condições de hipóxia, mostrou 936 genes superexpressos e 159 genes

diminuídos em relação ao grupo não tratado em hipóxia. Os genes superexpressos foram agrupados em artrite reumatóide, via de sinalização de IL-17 e secreção salivar. Enquanto, os genes diminuídos foram agrupados em alcoolismo, lúpus eritematoso sistêmico e transdução olfativa (figura 7). Os dados sugerem que os genes/vias alterados podem ser regulados por metilação de DNA.

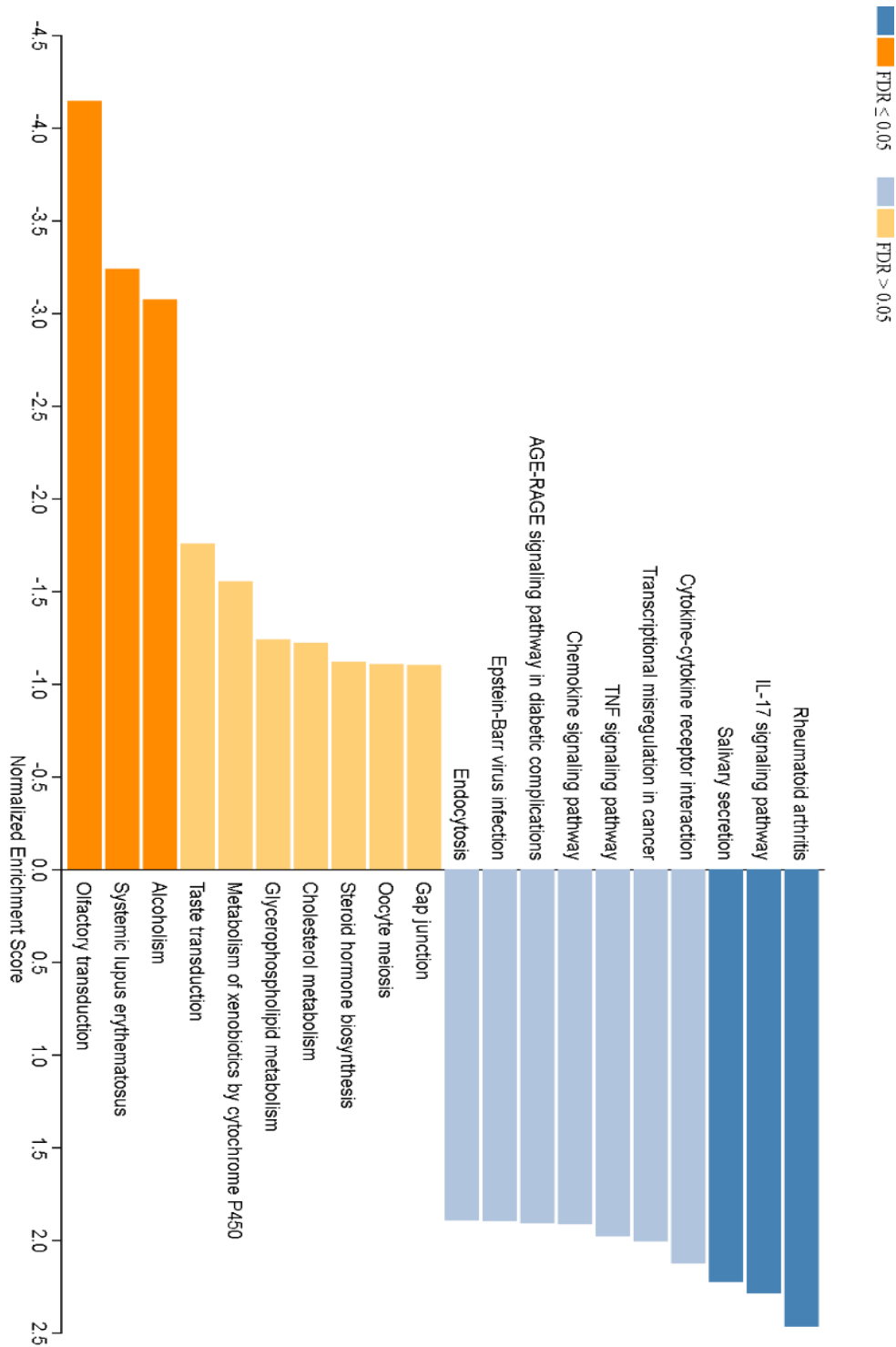
Figura 6 - Agrupamento dos GDEs em vias de sinalização após tratamento com 5-Aza-dC em normóxia



Legenda: As barras em azul representam as vias de sinalização, cujos genes tiveram sua expressão elevada, enquanto as barras em laranja correspondem as vias de sinalização, que tiveram seus genes com expressão diminuída. As barras em tom mais escuro correspondem ao $FDR \leq 0,05$.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 7 - Agrupamento dos GDEs em vias de sinalização após tratamento com 5-Aza-dC em hipóxia



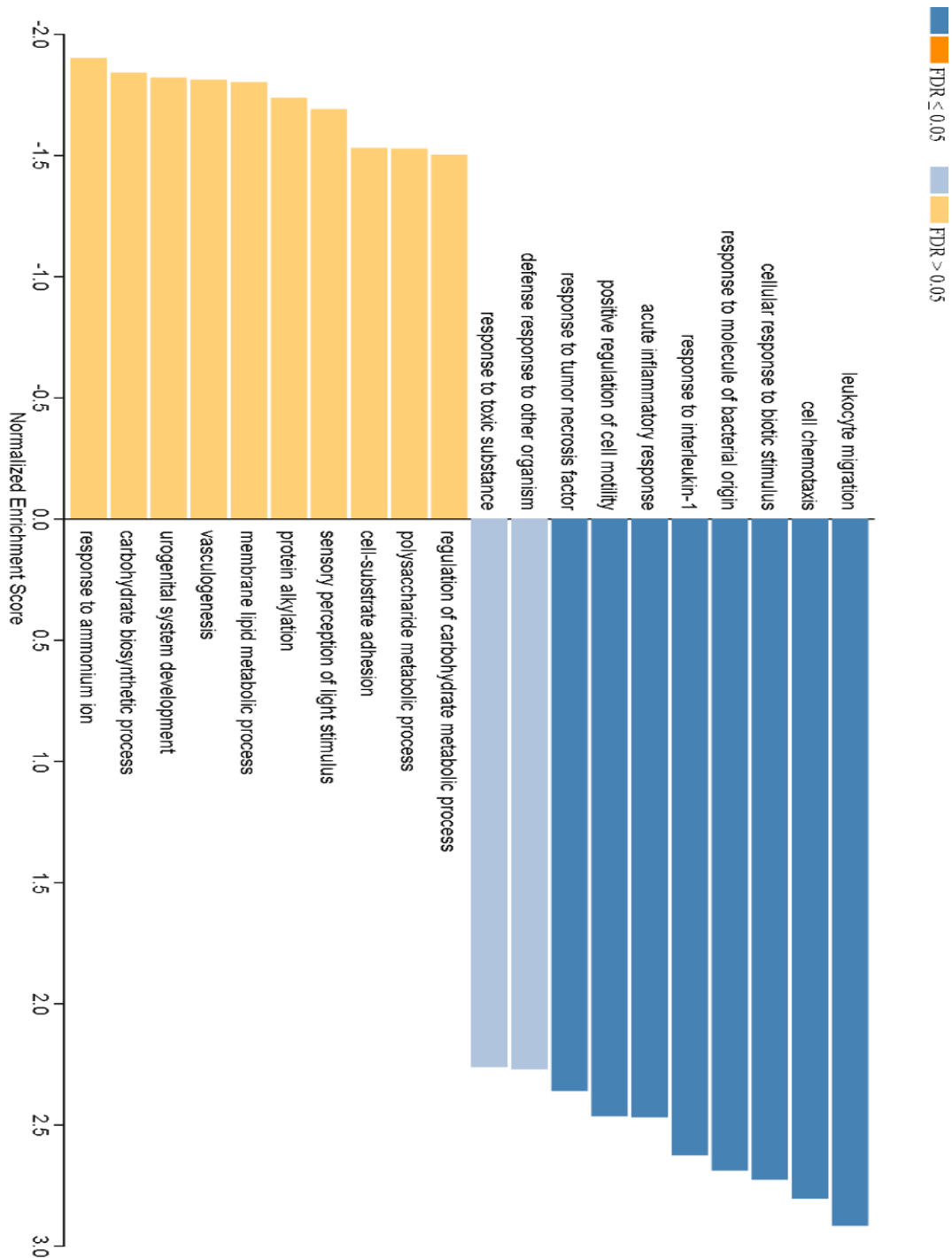
Legenda: As barras em azul representam as vias de sinalização, cujos genes tiveram sua expressão elevada, enquanto as barras em laranja correspondem as vias de sinalização, que tiveram seus genes com expressão diminuída. As barras em tom mais escuro correspondem ao $FDR \leq 0,05$.

Fonte: A autora, 2020.

4.3 Análise de processos biológicos a partir de genes diferencialmente expressos (GDEs) após tratamento com 5-Aza-dC em condições de normóxia e hipóxia

Para agrupar GDEs em processos biológicos, foi utilizado o banco de dados do Gene Ontology, na ferramenta online WebGestalt. Os genes superexpressos, após tratamento com 5-Aza-dC, em condição de normóxia, foram agrupados em migração de leucócitos, quimiotaxia celular, resposta celular a estímulos bióticos, resposta a molécula de origem bacteriana, resposta a interleucina-1, resposta inflamatória aguda, regulação positiva de motilidade celular, resposta ao fator de necrose tumoral, resposta de defesa a outro organismo e resposta a substância tóxica. Enquanto, os genes diminuídos não foram agrupados fortemente em nenhuma via de sinalização (figura 8). Por outro lado, os genes superexpressos após o tratamento com 5-Aza-dC, em condição de hipóxia, foram agrupados em regulação negativa da proteólise, regulação da atividade de peptidase, regulação negativa da atividade de hidrolase. Enquanto, os genes diminuídos não foram agrupados fortemente em nenhuma categoria (figura 9). Os dados do microarranjo de DNA sugerem que genes/vias alterados podem ser regulados por metilação de DNA, e indicam um efeito pró-inflamatório, a nível molecular, mais pronunciado após tratamento com 5-Aza-dC em normóxia, do que em hipóxia.

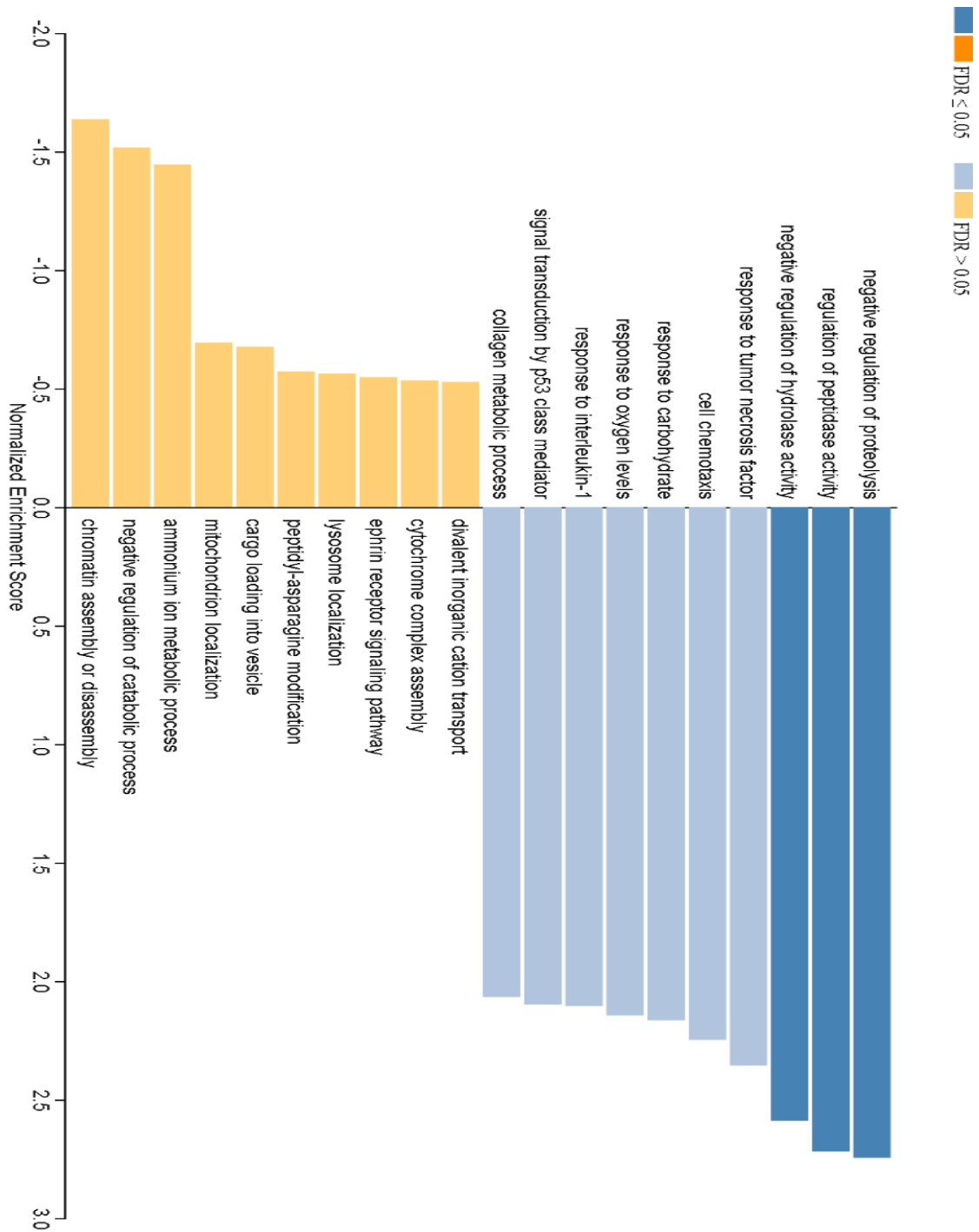
Figura 8 - Agrupamento dos GDEs em processos biológicos após tratamento com 5-Aza-dC em normóxia



Legenda: As barras em azul representam as vias de sinalização, cujos genes tiveram sua expressão elevada, enquanto as barras em laranja correspondem as vias de sinalização, que tiveram seus genes com expressão diminuída. As barras em tom mais escuro correspondem ao $FDR \leq 0,05$.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 9 - Agrupamento dos GDEs em processos biológicos após tratamento com 5-Aza-dC em hipóxia



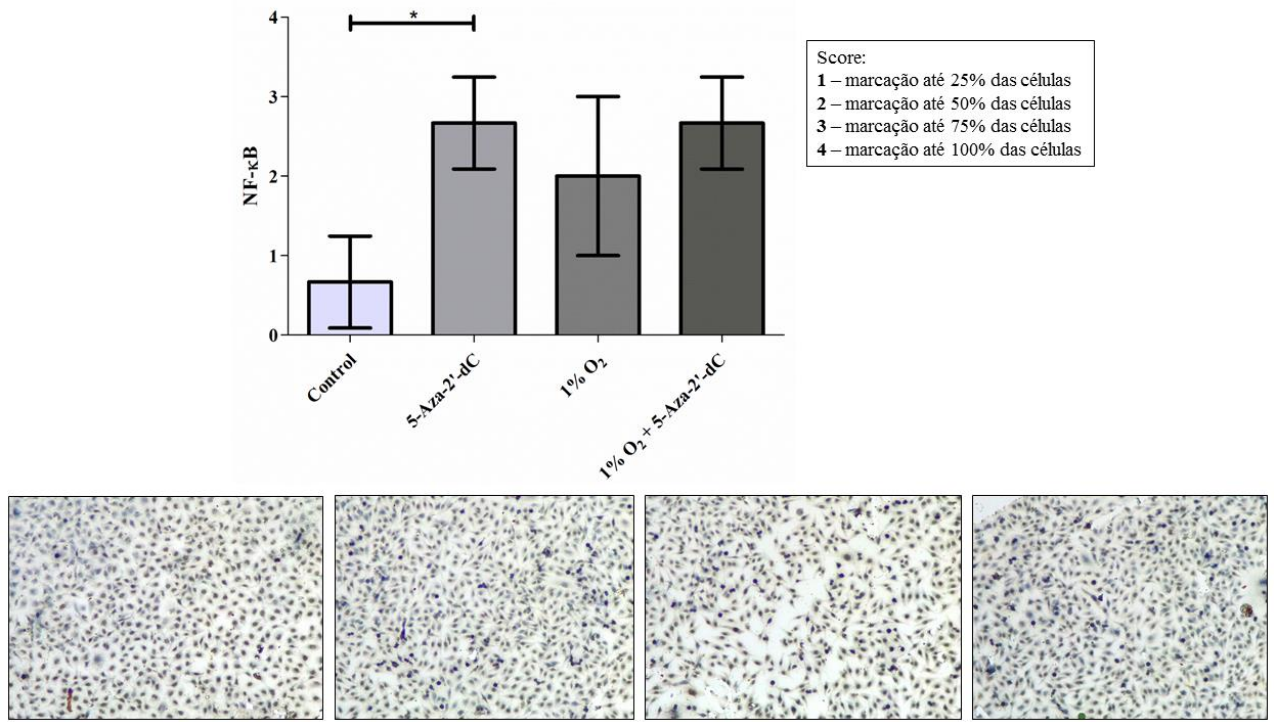
Legenda: As barras em azul representam as vias de sinalização, cujos genes tiveram sua expressão elevada, enquanto as barras em laranja correspondem as vias de sinalização, que tiveram seus genes com expressão diminuída. As barras em tom mais escuro correspondem ao $FDR \leq 0,05$.

Fonte: A autora, 2020.

4.4 Análise da expressão e localização subcelular de NF- κ B/p65 após tratamento com agente demetilante em normóxia e hipóxia

Tendo em vista o efeito pró-inflamatório indicado pelo microarranjo de DNA, a técnica de ICQ foi realizada para avaliar o efeito do agente demetilante na expressão proteica e localização subcelular de um dos principais reguladores da inflamação, NF- κ B/p65 (LIU et al., 2017), na linhagem MDA-MB-231. Os níveis de NF- κ B/p65 aumentaram de 0,7 (\pm 0,3) em células não tratadas para 2,7 (\pm 0,3) em células tratadas com 5-Aza-dC em condição de normóxia, representando um aumento de 285%, destaca-se que as marcações para NF- κ B/p65 foram nucleares, indicando que o mesmo está ativo (figura 10). NF- κ B/p65 não foi alterado significativamente nas células tratadas com 5-Aza-dC, em condições de hipóxia. Esse dado reforçou a sugestão de um efeito pró-inflamatório mais pronunciado após tratamento com 5-Aza-dC em normóxia, do que em hipóxia.

Figura 10 – Expressão proteica de NF- κ B após tratamento com agente demetilante 5-Aza-dC em normóxia e hipóxia



Legenda: As barras representam as médias de pelo menos três experimentos individuais (\pm erro padrão) dos scores de expressão proteica de NF- κ B. Controle – células tratadas com diluente dimetilsulfóxido em normóxia. 5-Aza-dC – células tratadas com agente demetilante 5-Aza-dC em normóxia. 1% O₂ – células tratadas com diluente dimetilsulfóxido em hipóxia. 1% O₂ + 5-Aza-dC – células tratadas com agente demetilante 5-Aza-dC em hipóxia. (*) p<0,05. Abaixo, são exibidas as fotos de cada grupo, respectivamente dispostas.

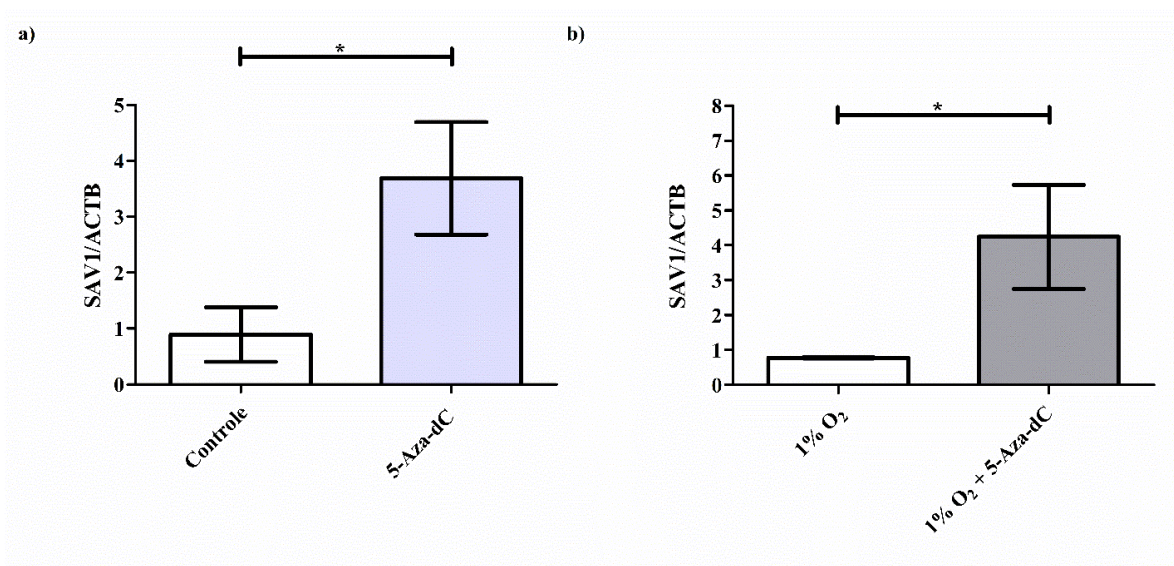
Fonte: A autora, 2020.

Após validação do microarranjo de DNA e análise global de vias de sinalização e processos biológicos majoritariamente alterados, em resposta ao tratamento com 5-Aza-dC em normóxia e hipóxia, foi selecionado para análises mais aprofundadas, o gene do supressor tumoral SAV1, por ter importante função no contexto tumoral, por ser potencialmente regulado por metilação de DNA e pouco reportado na literatura. A partir dos próximos subtítulos, serão abordadas análises de metilação de DNA de *SAV1* em linhagem celular de câncer de mama, MDA-MB-231, em normóxia e hipóxia.

4.5 Análise da expressão de *SAVI* após tratamento com 5-Aza-dC em normóxia e hipóxia

A partir da análise dos microarranjos, o gene do supressor tumoral *SAVI* foi selecionado como potencialmente silenciado por metilação de DNA em hipóxia, pois seus níveis de mRNA aumentaram após tratamento com agente demetilante 5-Aza-dC em hipóxia (+2,16 vezes). A validação por RT-qPCR mostrou que os níveis de mRNA de *SAVI* aumentaram 4,2 ($\pm 1,5$) vezes ($p < 0,05$), após tratamento com 5-Aza-dC em hipóxia (figura 11B). Os níveis de transcritos de *SAVI* também aumentaram 3,7 ($\pm 1,0$) vezes ($p < 0,05$), após tratamento com 5-Aza-dC em normóxia (figura 11A). Os dados sugeriram que *SAVI* pode ser regulado por metilação de DNA em ambas condições.

Figura 11 - Níveis relativos de mRNA de *SAVI* após tratamento com agente demetilante 5-Aza-dC em normóxia e hipóxia



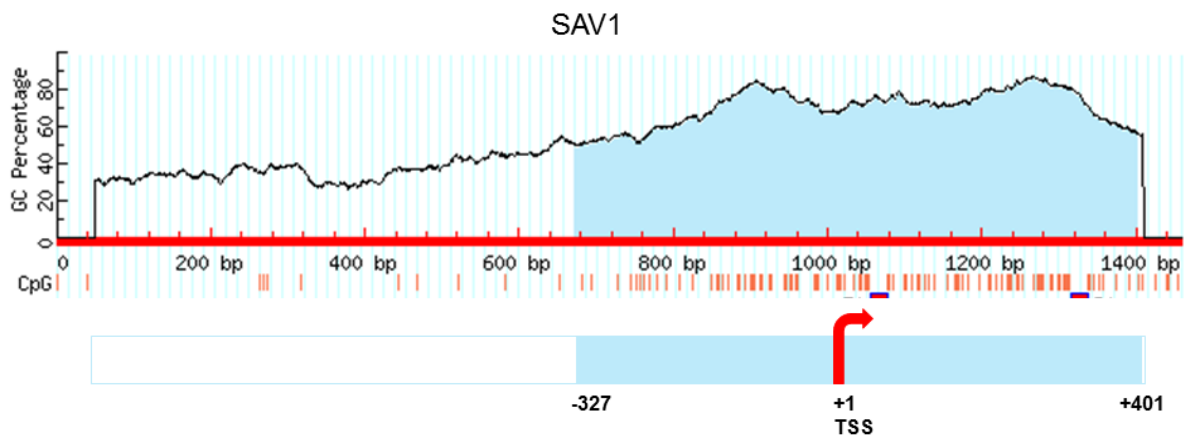
Legenda: As barras representam as médias de pelo menos três experimentos individuais (\pm erro padrão) dos níveis relativos de mRNA de *SAVI* após tratamento com 5-Aza-dC em normóxia (11A) e em hipóxia (11B). Controle – células tratadas com diluente dimetilsulfóxido em normóxia. 5-Aza-dC – células tratadas com agente demetilante 5-Aza-dC em normóxia. 1% O₂ – células tratadas com diluente dimetilsulfóxido em hipóxia. 1% O₂ + 5-Aza-dC – células tratadas com agente demetilante 5-Aza-dC em hipóxia. *ACTB* foi usada como gene de referência. (*) $p < 0,05$.

Fonte: A autora, 2020.

4.6 Predição de sítios de metilação no promotor e no primeiro exon de *SAVI*

Para verificar a possibilidade de atuação do mecanismo epigenético de metilação do DNA na regulação transcricional de *SAVI*, foi realizada a predição de sítios de metilação *in silico*, caracterizados por ilhas CpGs, no promotor e no primeiro éxon do gene de *SAVI*, utilizando o software *Methprimer*. Na figura 12, está representado o sítio, identificado através da predição *in silico*. Por meio desta análise foi identificada 1 ilha CpG, localizada entre as posições -327bp a +401bp, somando 729 bp. A identificação da ilha CpG reforça a ideia de que a metilação do DNA pode ser um mecanismo atuante na regulação gênica de *SAVI*.

Figura 12 - Análise *in silico* de sítio de metilação na região promotora e primeiro éxon de *SAVI*



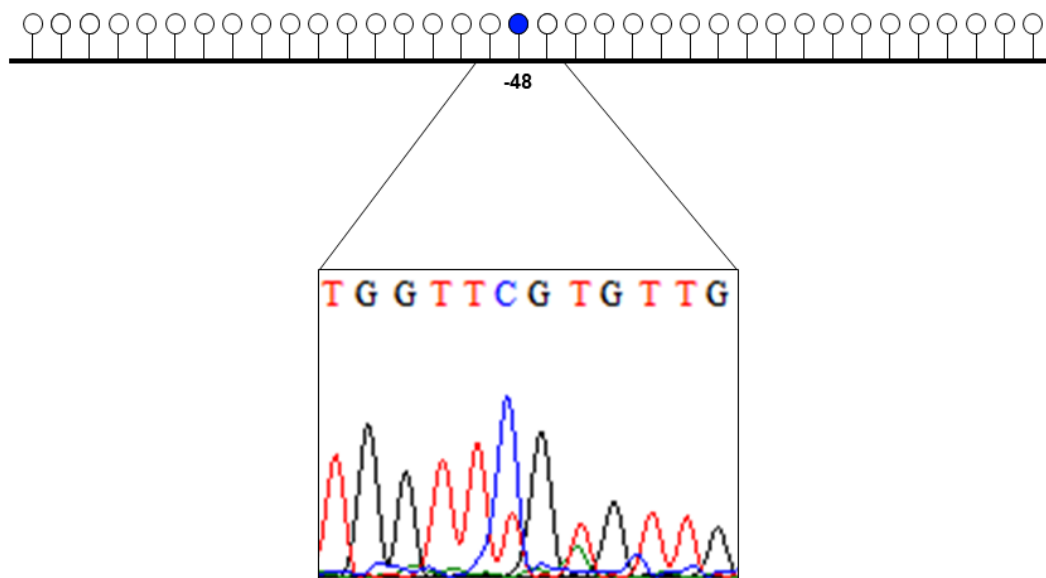
Legenda: A lacuna destacada em azul representa a ilha CpG, situada na posição -327 a +401 do sítio iniciador da transcrição (seta vermelha, +1 TSS - *Transcription Start Site*). Pares de bases (bp - *base pair*). Imagem adaptada do software *Methprimer*.

Fonte: A autora, 2020.

4.7 Análise do sequenciamento da ilha CpG de *SAVI* e predição de sítios de ligação de fator de transcrição no promotor de *SAVI*

A análise de metilação de DNA revelou uma citosina metilada precedida de guanina, apenas em hipóxia, na posição - 48 pb do trecho sequenciado, que contém 36 dinucleotídeos CpGs (figura 13), sugerindo que há metilação de DNA no promotor de *SAVI*, indicando que este pode ser mecanismo de regulação da expressão em hipóxia. Para avaliar se a citosina encontrada metilada por sequenciamento poderia compor sítio de ligação para fator de transcrição, foi efetuada uma análise *in silico* de sítios de ligação de fatores de transcrição. Foram preditos 6 fatores de transcrição (tabela 1) que poderiam atuar na região metilada, sugerindo que a região pode ser local de controle da expressão gênica de *SAVI* pelos fatores de transcrição encontrados.

Figura 13 – Representação esquemática do trecho da ilha CpG de *SAVI* analisado por sequenciamento, em hipóxia



Legenda: As placas representam os 36 dinucleotídeos CpGs. A placa com o círculo destacado em azul representa a citosina metilada, ressaltando seu eletroferograma abaixo.

Fonte: A autora, 2020.

Tabela 1 – Predição de fatores de transcrição na região metilada de SAVI

Software	Fator de transcrição (Score)
TFBIND	NFKAPPAB50 (76%)
PROMO	E2F-1 (86%; 89%)
	GCF (100%; 94.1%)
JASPAR	EGR2 (80%)
	THAP1 (83%)
	NRF1 (88%)

Legenda – NFKB: Fator nuclear kappa B 50; E2F-1: fator de transcrição E2F 1; GCF: fator de ligação a sequência de DNA rica em CG; EGR2: resposta de crescimento inicial 2; THAP1: proteína contendo domínio THAP 1; NRF1: fator respiratório nuclear 1

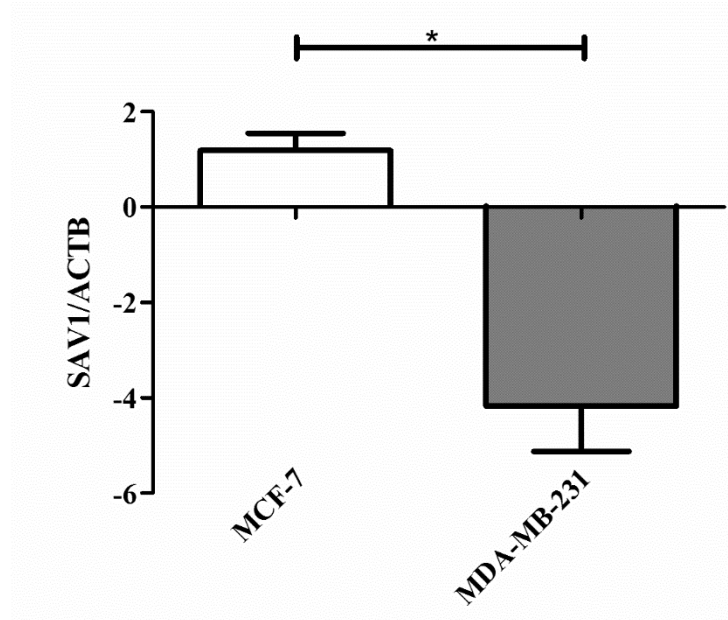
Fonte: A autora, 2020.

Nas próximas sessões, serão exibidas as análises de comparação da expressão de SAVI entre linhagem menos agressiva de câncer de mama, MCF-7, e mais agressiva, MDA-MB-231, em condições de normóxia e hipóxia, assim como análises de expressão de genes alvo da via de Hippo, *CYR61* e *CTGF*.

4.8 Comparação dos níveis de mRNA de SAVI entre as linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7

Os níveis relativos do mRNA SAVI das linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7 foram comparados, por RT-qPCR, a fim de identificar uma possível associação da expressão do gene SAVI com a agressividade. Conforme exibido pela figura 14, a expressão gênica de SAVI diminuiu 4,2 ($\pm 0,9$) vezes, $p < 0,05$, na linhagem MDA-MB-231, em comparação com linhagem MCF-7. O dado sugere um maior nível de expressão gênica de SAVI em uma linhagem menos agressiva, MCF-7, do que mais agressiva, MDA-MB-231.

Figura 14 – Comparação dos níveis relativos de mRNA de *SAVI* entre as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231



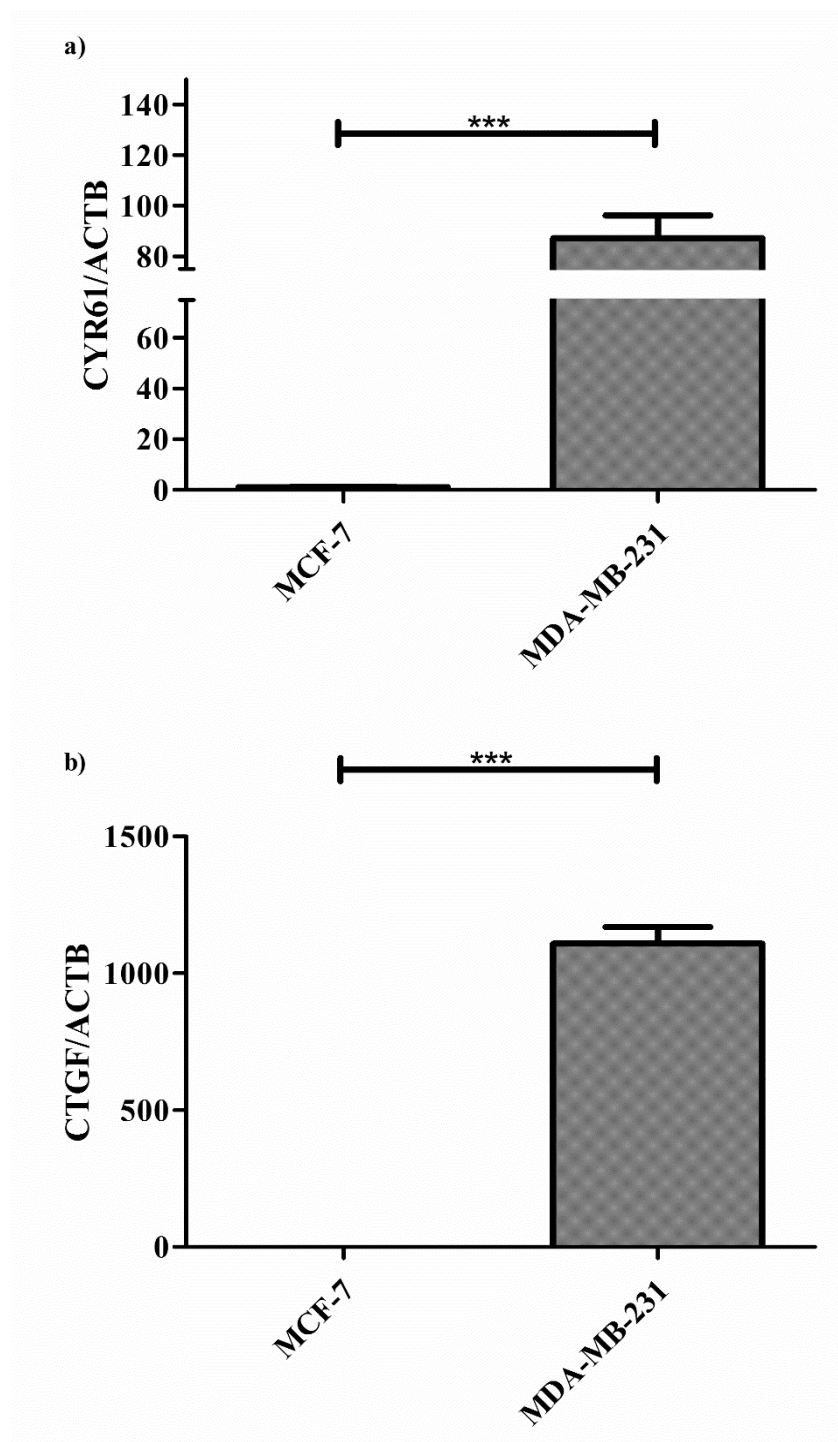
Legenda: As barras representam as médias de pelo menos três experimentos individuais (\pm erro padrão) dos níveis relativos de mRNA de *SAVI* nas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231. *ACTB* foi usada como gene de referência. (*) $p < 0,05$.

Fonte: A autora, 2020.

4.9 Comparação da expressão gênica de *CYR61* e *CTGF*, genes alvo da via de Hippo, entre as linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7

Com o propósito de se obter um indicativo do funcionamento da via de Hippo, foram comparados os níveis dos transcritos de *CYR61* e *CTGF*, genes alvo da via de Hippo, entre as linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7, por RT-qPCR. A expressão gênica de *CYR61* e *CTGF* aumentaram, respectivamente, 87,25 ($\pm 8,98$) vezes (figura 15A) e 1108 ($\pm 61,24$) vezes (figura 15B), $p < 0,0001$, na linhagem MDA-MB-231, em comparação com linhagem MCF-7. Esse resultado junto com o anterior, sugerem que na MDA-MB-231, a via de Hippo pode estar mais direcionada para a face pró-tumoral, do que na MCF-7, visto que os níveis de mRNA de *SAVI* diminuíram e os níveis dos genes alvo da via de Hippo aumentaram, o que pode estar associado com a maior agressividade daquela linhagem.

Figura 15 – Comparação dos níveis relativos de mRNA de *CYR61* e *CTGF* entre as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231



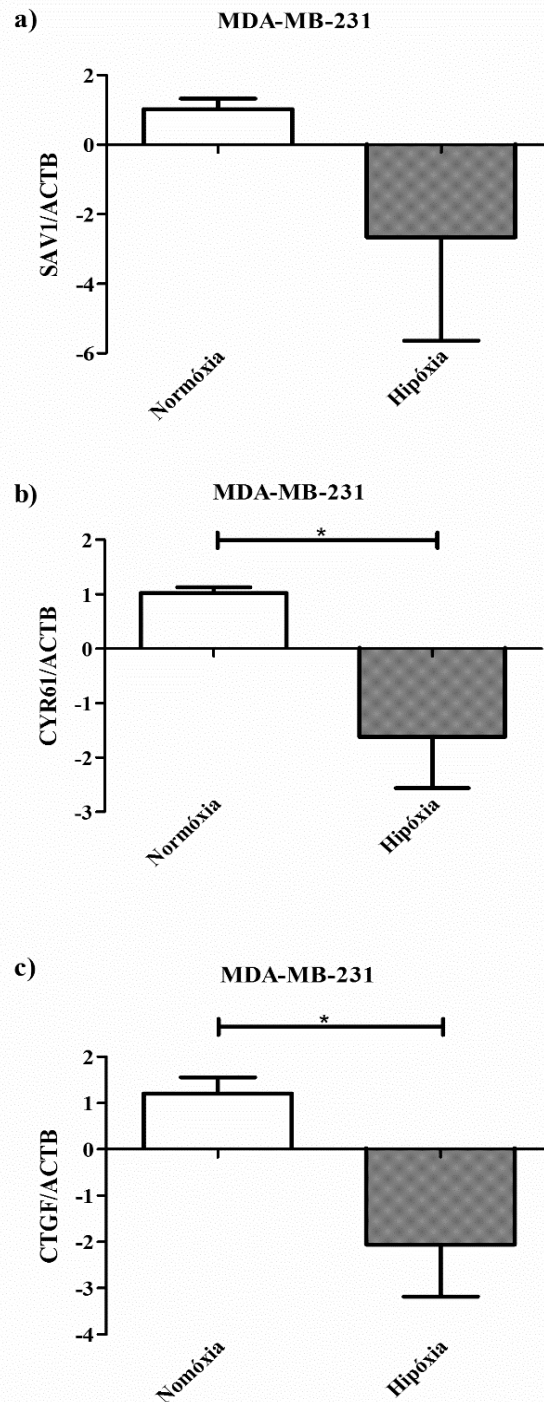
Legenda: As barras representam as médias de pelo menos três experimentos individuais (\pm erro padrão) dos níveis relativos de mRNA de *CYR61* (15A) e *CTGF* (15B), nas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231. *ACTB* foi usada como gene de referência. (***) $p < 0,0001$.

Fonte: A autora, 2020.

4.10 Análise da expressão gênica de *SAVI*, *CYR61* e *CTGF*, na linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231, em normóxia e hipóxia

Os níveis de transcritos de *SAVI*, *CYR61* e *CTGF*, foram avaliados por RT-qPCR na linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231, em normóxia e hipóxia, a fim de avaliar se o microambiente tumoral de hipóxia poderia afetar a expressão destes componentes da via de Hippo. A expressão gênica de *SAVI* não alterou (figura 16A), *CYR61* (figura 16B) e *CTGF* (figura 16C) diminuíram 1,6 ($\pm 0,9$) vezes e 2,1 ($\pm 1,1$) vezes, $p < 0,05$, respectivamente, em hipóxia, quando comparado com normóxia, o que indicou um direcionamento da via de Hippo mais para o lado antitumoral.

Figura 16 – Análise dos níveis relativos de mRNA de *SAVI*, *CYR61* e *CTGF* na linhagem MDA-MB-231 em normóxia e hipóxia



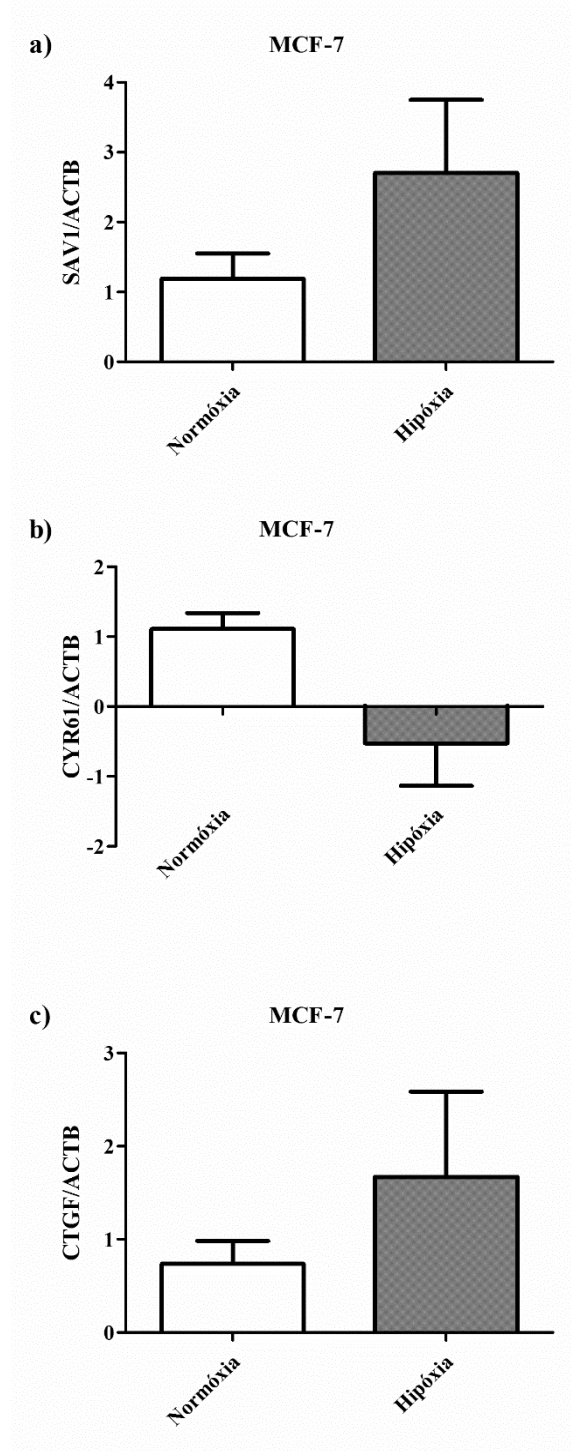
Legenda: As barras representam as médias de pelo menos três experimentos individuais (\pm erro padrão) dos níveis relativos de mRNA de *SAVI* (16A), *CYR61* (16B) e *CTGF* (16C), na linhagem celular MDA-MB-231 em normóxia e hipóxia. *ACTB* foi usada como gene de referência. (*) $p < 0,05$.

Fonte: A autora, 2020.

4.11 Análise da expressão gênica de *SAVI*, *CYR61* e *CTGF*, na linhagem celular de câncer de mama MCF-7, em normóxia e hipóxia

Os níveis de transcritos de *SAVI*, *CYR61* e *CTGF*, foram avaliados por RT-qPCR na linhagem celular de câncer de mama MCF-7, em normóxia e hipóxia, a fim de avaliar se o microambiente tumoral de hipóxia poderia afetar a expressão destes componentes da via do Hippo. Os níveis de mRNA de *SAVI* (figura 17A), *CYR61* (figura 17B) e *CTGF* (figura 17C) não foram alterados em hipóxia, quando comparado à normóxia.

Figura 17 – Análise dos níveis relativos de mRNA de *SAVI*, *CYR61* e *CTGF* na linhagem MCF-7 em normóxia e hipóxia



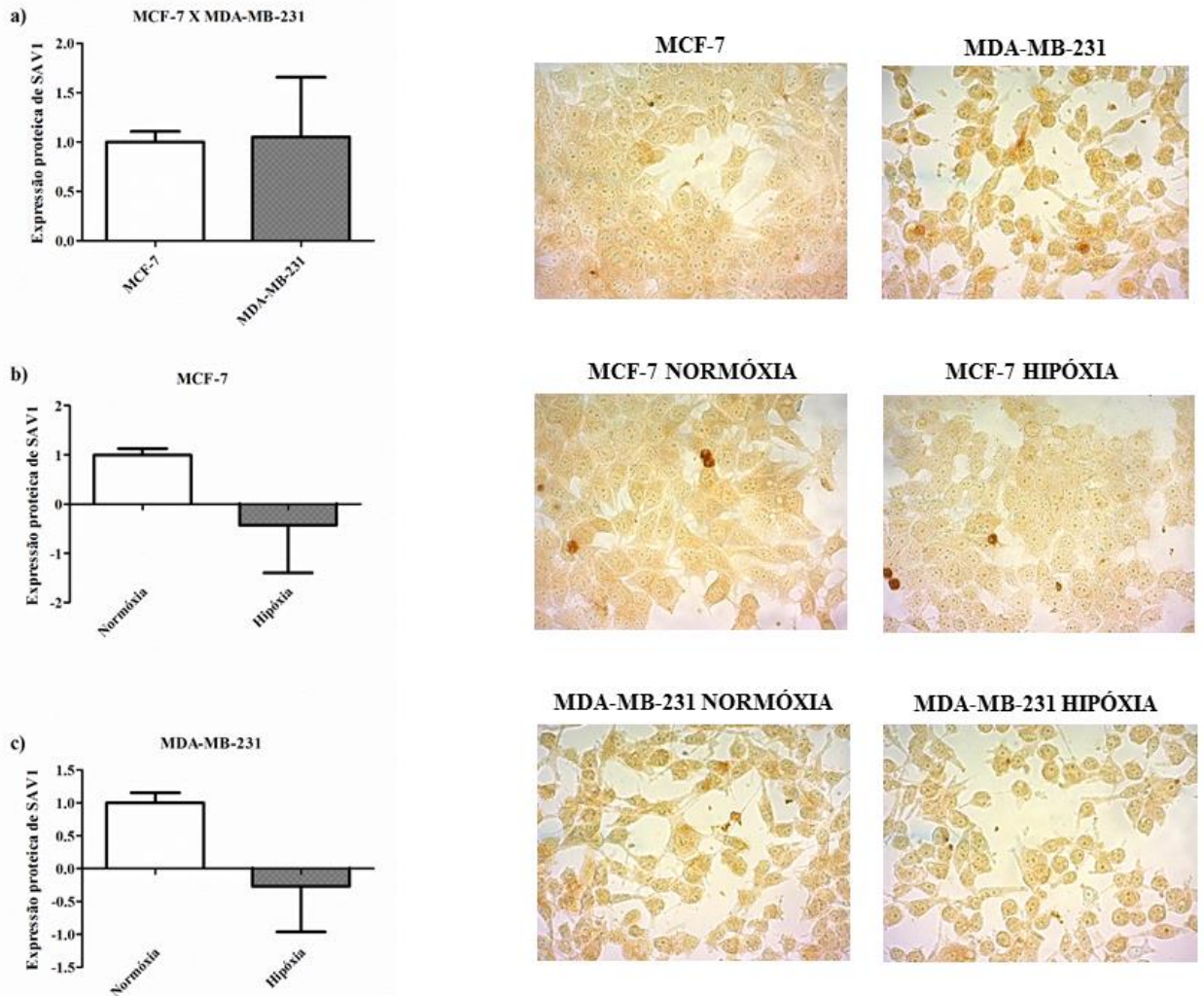
Legenda: As barras representam as médias de pelo menos três experimentos individuais (\pm erro padrão) dos níveis relativos de mRNA de *SAVI* (17A), *CYR61* (17B) e *CTGF* (17C), na linhagem celular MCF-7 em normóxia e hipóxia. *ACTB* foi usada como gene de referência.

Fonte: A autora, 2020.

4.12 Comparação da expressão proteica e distribuição celular de SAV1 entre as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 em normóxia e hipóxia

A fim de comparar a expressão proteica e distribuição celular de SAV1, entre as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, em normóxia e hipóxia, foi realizada imunocitoquímica. Não houve diferença de expressão proteica e distribuição da SAV1, entre MDA-MB-231 e MCF-7 (figura 18A), e nem nas comparações normóxia versus hipóxia (figuras 18B e 18C). Em todas as condições avaliadas, SAV1 foi expresso em todas as células e de modo uniforme, presente tanto no citoplasma quanto no núcleo.

Figura 18 – Comparação da expressão proteica e distribuição de SAV1 entre as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 em normóxia e hipóxia



Legenda: As barras representam as médias de pelo menos três experimentos individuais (\pm erro padrão) da expressão proteica de SAV1 (14A), *CYR61* (14B) e *CTGF* (14C), nas comparações MCF-7 vs MDA-MB-231 (18A), MCF-7 normóxia vs hipóxia (18B), MDA-MB-231 normóxia vs hipóxia (18C). À direita, as fotos representativas dos grupos avaliados.

Fonte: A autora, 2020.

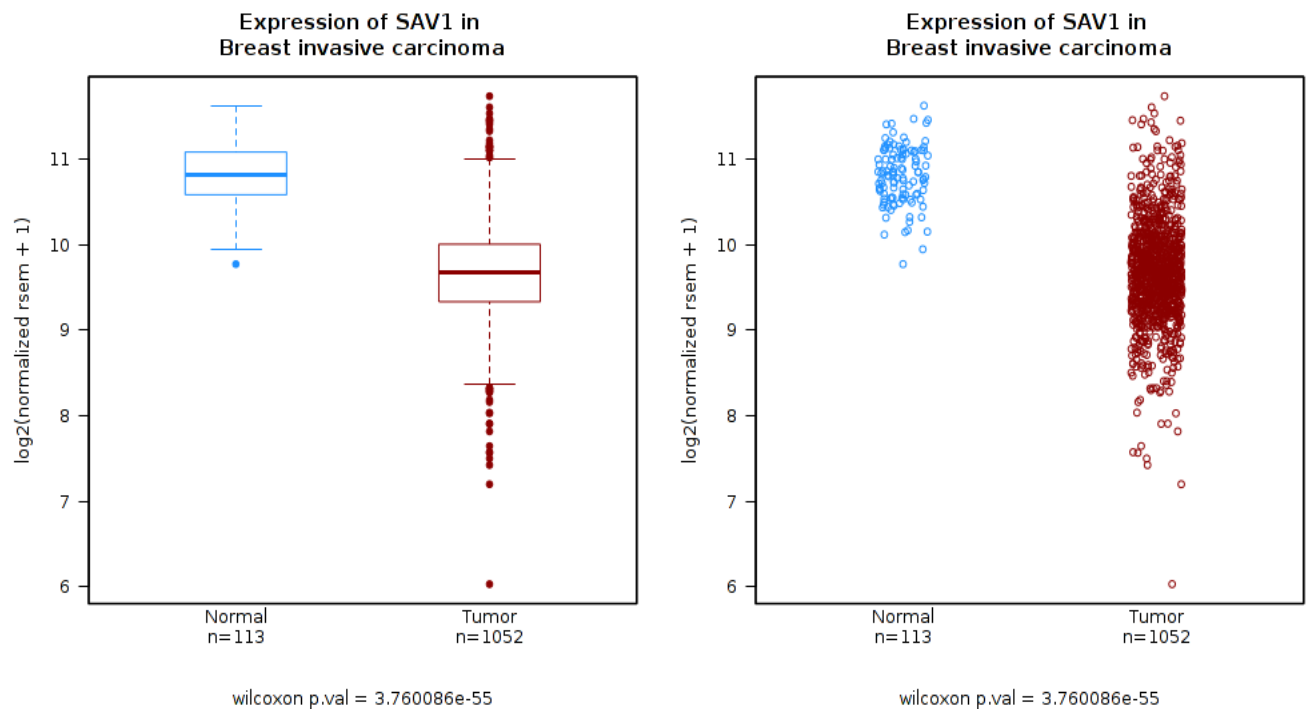
A partir desse ponto, um estudo de avaliação da expressão gênica, proteica e metilação de DNA de SAV1 foi realizado, utilizando dados públicos de pacientes com câncer de mama, de acordo com critérios clínicos, como subtipo tumoral, estágio tumoral, status livre de doença e sobrevida global, e também com base em uma assinatura gênica de hipóxia clínica. Além disso, também foi avaliada expressão proteica de SAV1 e sua localização em

uma coorte de pacientes brasileiros de câncer de mama, de acordo com subtipo tumoral. Para facilitar a comparação entre alguns dados obtidos *in vitro* e *in silico*, há uma tabela no APÊNDICE A.

4.13 Comparação da expressão gênica de *SAV1* entre amostras normal adjacente e de câncer de mama

Uma vez que *SAV1* é considerado um supressor tumoral, as expressões do gene *SAV1* foram comparadas entre amostras normais adjacentes e de câncer de mama, por meio da ferramenta online Wanderer. Como mostrado na figura 19, a expressão de *SAV1* foi maior nas amostras normais do que nas de câncer de mama ($p < 0,001$). O dado encontrado reforçou o papel supressor tumoral de *SAV1*, também em câncer de mama.

Figura 19 – Comparação da expressão gênica de SAV1 entre amostras normal adjacente e de câncer de mama



Legenda: Os box plots representam as medianas da expressão gênica de SAV1 em amostras normal adjacente (n=113) e de câncer de mama (n=1052).

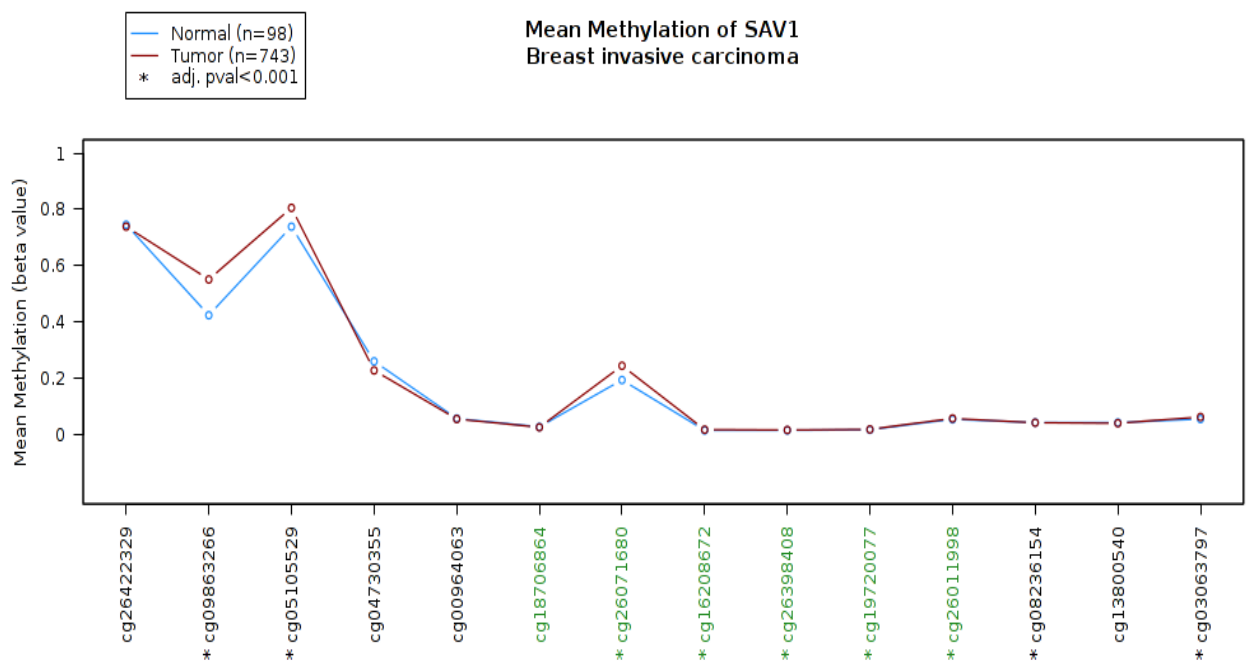
Fonte: A autora, 2020.

4.14 Comparação *in silico* da metilação de DNA de SAV1 em amostras normal adjacente e de câncer de mama

Desde que os níveis de mRNA de SAV1 são maiores em amostras normais do que tumorais, com a finalidade de avaliar se o mecanismo de metilação de DNA poderia estar contribuindo com a regulação dessa expressão gênica, foi realizada a comparação da metilação de DNA de SAV1, entre amostras normais e de câncer de mama, através de análise *in silico*, na ferramenta online Wanderer. Como resultado da figura 20, destaca-se a região localizada no éxon 1 e referente à ilha CpG, representada pela sonda cg26071680, que se mostrou mais metilada em amostras tumorais do que normais, $p < 0,001$, um indicativo de que

a metilação de DNA poderia contribuir para a menor expressão gênica de *SAVI* em amostras tumorais comparadas às normais, observada no subtítulo anterior.

Figura 20 – Comparação da metilação de DNA de *SAVI* entre amostras normal adjacente e de câncer de mama



Legenda: O gráfico exibe o valor de beta de metilação de DNA para cada sonda analisada. As sondas destacadas em verde correspondem à ilhas CpGs.

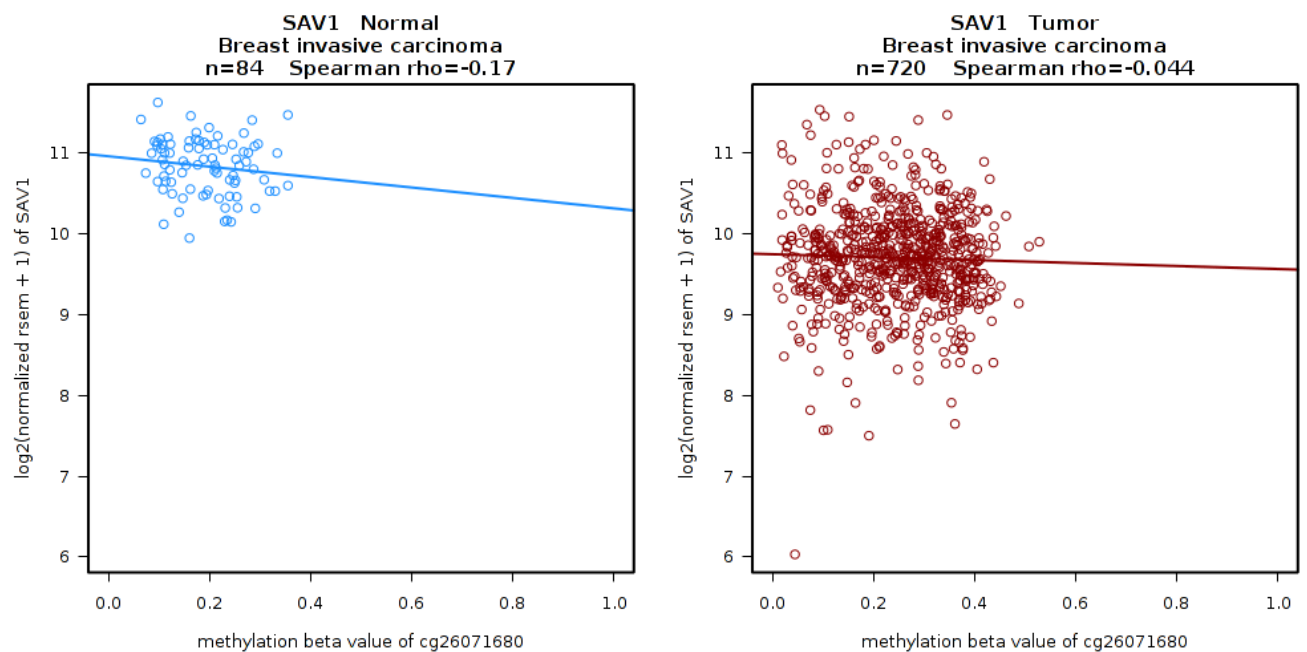
Fonte: A autora, 2020.

4.15 Correlação entre a expressão gênica e metilação de DNA de *SAVI* em amostras normal adjacente e de câncer de mama *in silico*

A análise de correlação entre a expressão gênica e metilação de DNA de *SAVI* em amostras normal adjacente e de câncer de mama foi executada pela ferramenta Wanderer, para avaliar se a alteração na metilação de DNA poderia realmente se refletir em mudança

na expressão gênica. A figura 21 mostrou correlações negativas muito fracas entre as variáveis analisadas, para amostras normais, $-0,17$, e para amostras tumorais, $-0,044$, sugerindo que não há relação inversamente proporcional, entre a metilação de DNA da região analisada e expressão gênica de *SAVI*, em ambos tipos de amostras. Portanto, o maior nível de metilação do DNA encontrado na região avaliada do *SAVI* não parece contribuir para o silenciamento gênico observado em amostras de câncer de mama, quando comparadas às normais.

Figura 21 – Correlação entre a expressão gênica e metilação de DNA de *SAVI* em amostras normal adjacente e de câncer de mama



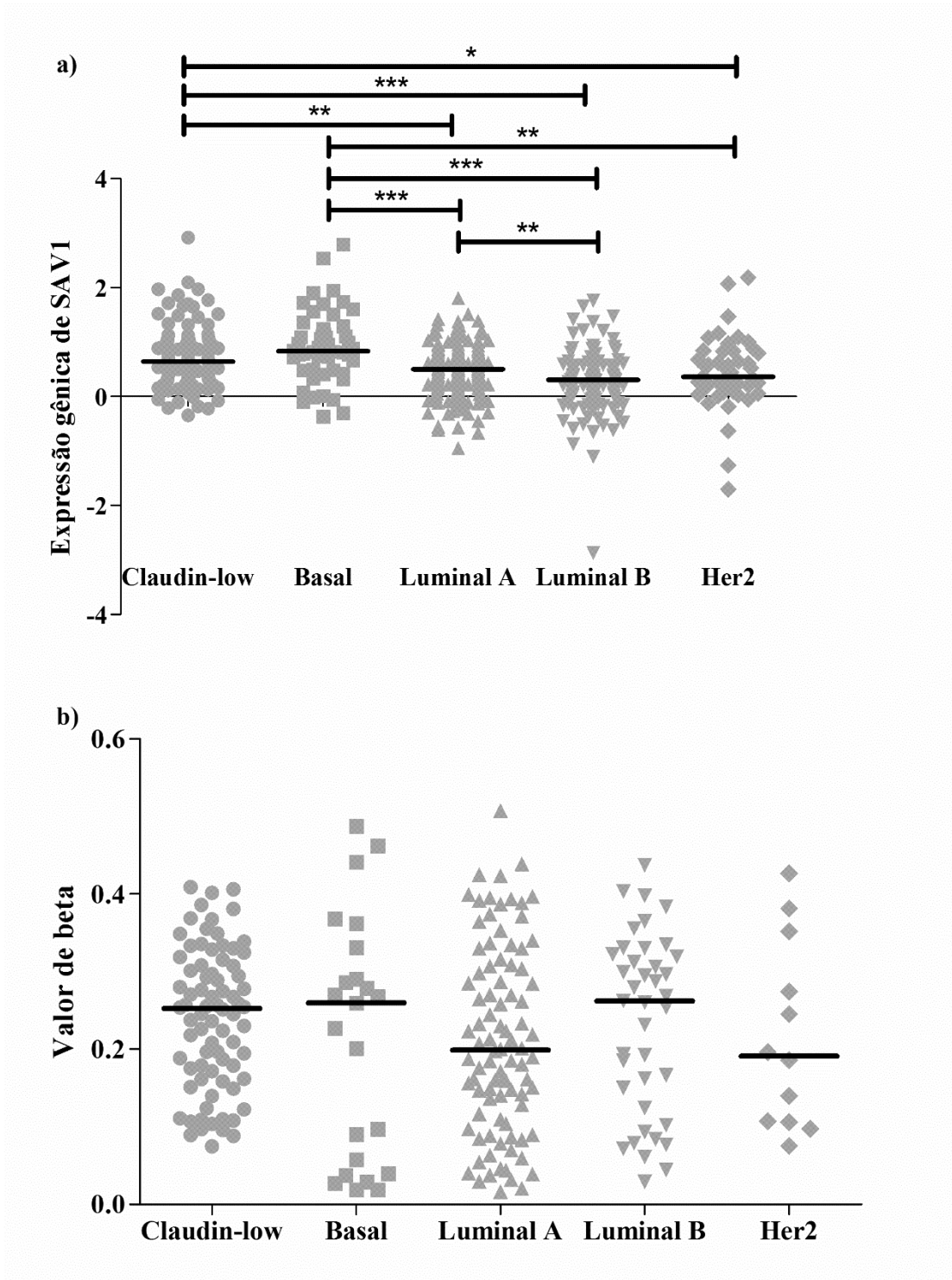
Legenda: Os gráficos exibem as correlações entre a expressão gênica e metilação de DNA de *SAVI* em amostras normal adjacente (esquerda) e de câncer de mama (direita).

Fonte: A autora, 2020.

4.16 Análise *in silico* da expressão gênica, metilação de DNA e correlação expressão-metilação de *SAVI* em subtipos de câncer de mama

Devido à diversidade tumoral entre os pacientes, foi realizada a análise da expressão gênica, metilação de DNA e correlação expressão-metilação de *SAVI*, entre os subtipos de câncer de mama, por meio de análises *in silico*, através da ferramenta online UCSC Xena. Os níveis de mRNA de *SAVI* diminuíram nas amostras LumA ($p < 0,01$), LumB ($p < 0,001$) e Her2 ($p < 0,05$), quando comparadas às claudin-low. Os níveis também reduziram nas seguintes comparações: Basal x LumA ($p < 0,001$), Basal x LumB ($p < 0,001$), Basal x Her2 ($p < 0,01$) e LumA x LumB ($p < 0,01$) (figura 22A), sugerindo que os subtipos triplo negativos expressam níveis maiores de *SAVI*. Em relação à metilação de DNA, não teve diferença de nível de metilação entre os subtipos de câncer de mama (figura 22B). Além disso, foi efetuada a correlação entre a metilação de DNA e a expressão gênica de *SAVI*, para avaliar se a alteração na metilação de DNA poderia se refletir em mudança na expressão gênica. De acordo com a figura 23, houve correlações muito fracas para os subtipos basal, 0,1 (figura 23B); Her2, -0,1 (figura 23C); e LumA, -0,05 (figura 23D). Enquanto que houve correlação negativa, fraca e não significativa estatisticamente para LumB, -0,27 (figura 23E), e correlação negativa, fraca e significativa para claudin-low, -0,34 (figura 23A), com $p < 0,01$, sugerindo uma contribuição da metilação de DNA da região analisada, na regulação da expressão gênica de *SAVI*, considerando o subtipo claudin-low.

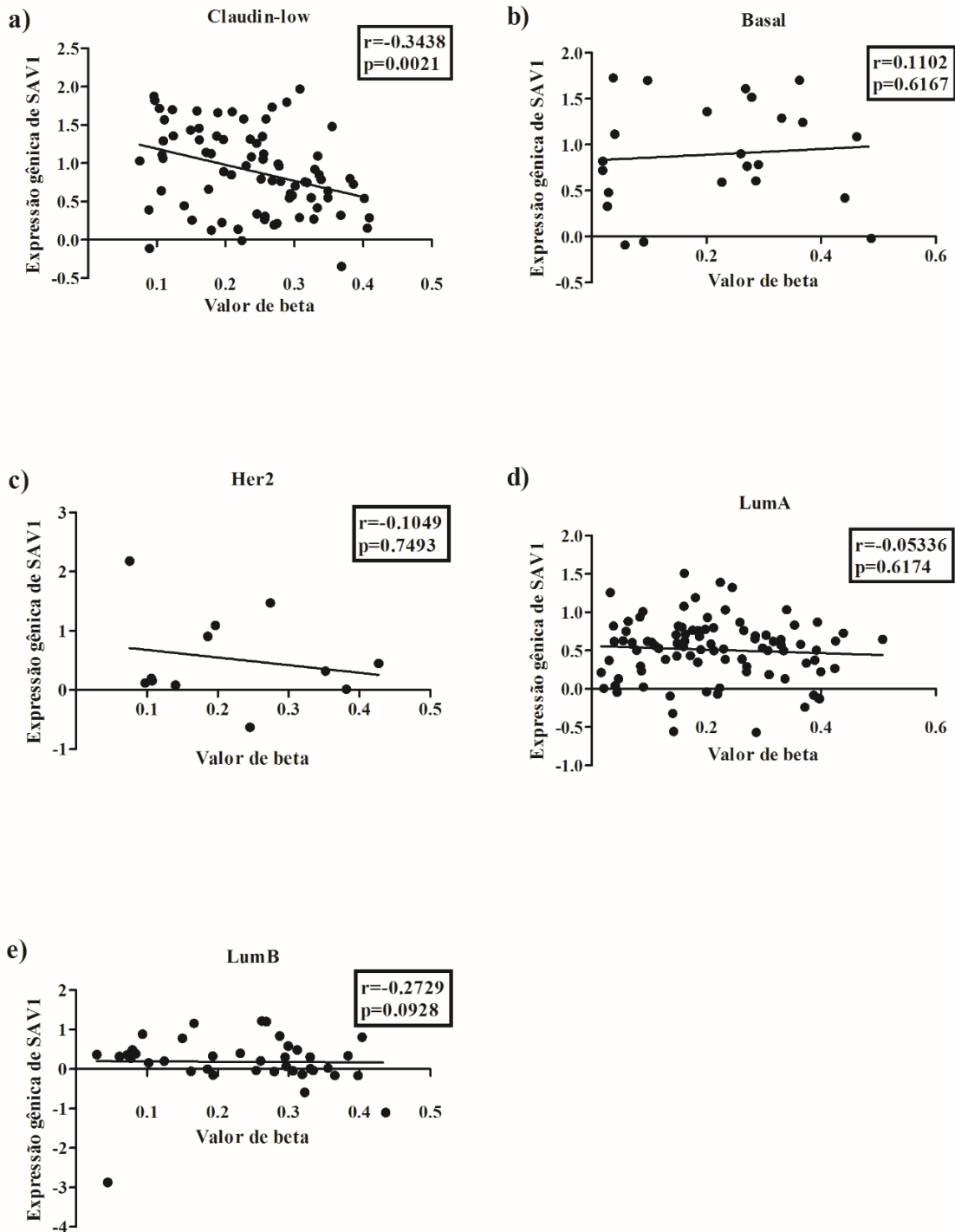
Figura 22 – Análise da expressão gênica e metilação de DNA de *SAVI* em subtipos de câncer de mama



Legenda: Os gráficos representam as medianas da expressão gênica (22A) e metilação de DNA (22B) de *SAVI* em subtipos de câncer de mama. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 23 – Correlação entre a expressão gênica e metilação de DNA de *SAVI* em subtipos de câncer de mama



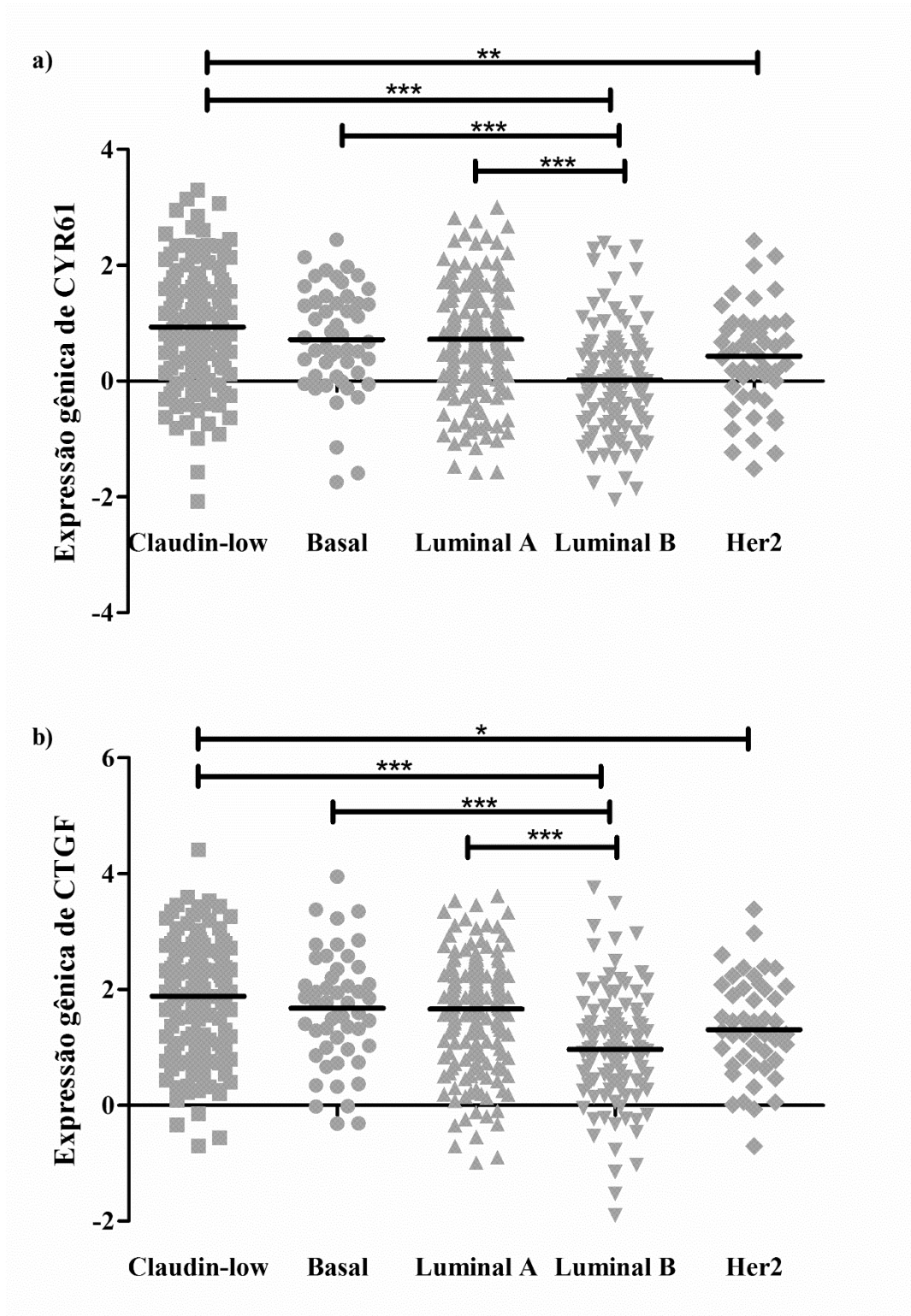
Legenda: Os gráficos mostram as correlações entre a expressão gênica e metilação de DNA de *SAVI* em subtipos de câncer de mama.

Fonte: A autora, 2020.

4.17 Análise *in silico* da expressão gênica de *CYR61* e *CTGF*, genes alvo da via de Hippo, em subtipos de câncer de mama

Para obter um indicativo de funcionamento da via de Hippo, foi feita a análise da expressão gênica de *CYR61* e *CTGF*, genes alvo da via de Hippo, em subtipos de câncer de mama *in silico*, utilizando o banco de dados UCSC Xena. Em relação à expressão gênica de *CYR61*, houve diminuição nas comparações claudin-low x LumB ($p < 0,001$), claudin-low x Her2 ($p < 0,01$), Basal x LumB ($p < 0,001$) e LumA x LumB ($p < 0,001$) (figura 24A). A análise de *CTGF* teve resultado semelhante à de *CYR61*, exceto pelo valor de p da comparação claudin-low x Her2 ($p < 0,05$) (figura 24B), o que evidenciou que ambos são regulados em conjunto. Esse dado junto com o resultado da figura 22A não mostraram uma relação negativa entre as expressões de *SAVI* e *CYR61* ou *CTGF*. No entanto, pode-se notar que o subtipo de câncer de mama triplo negativo, um dos mais agressivos e de pior prognóstico, claudin-low, apresentou maiores níveis de expressão de *CYR61* e *CTGF* do que os demais, sugerindo que outro mecanismo, independente da expressão gênica de *SAVI*, pode estar deslocando a via de Hippo mais para o modo oncogênico nesse subtipo.

Figura 24 – Análise da expressão gênica de *CYR61* e *CTGF* em subtipos de câncer de mama



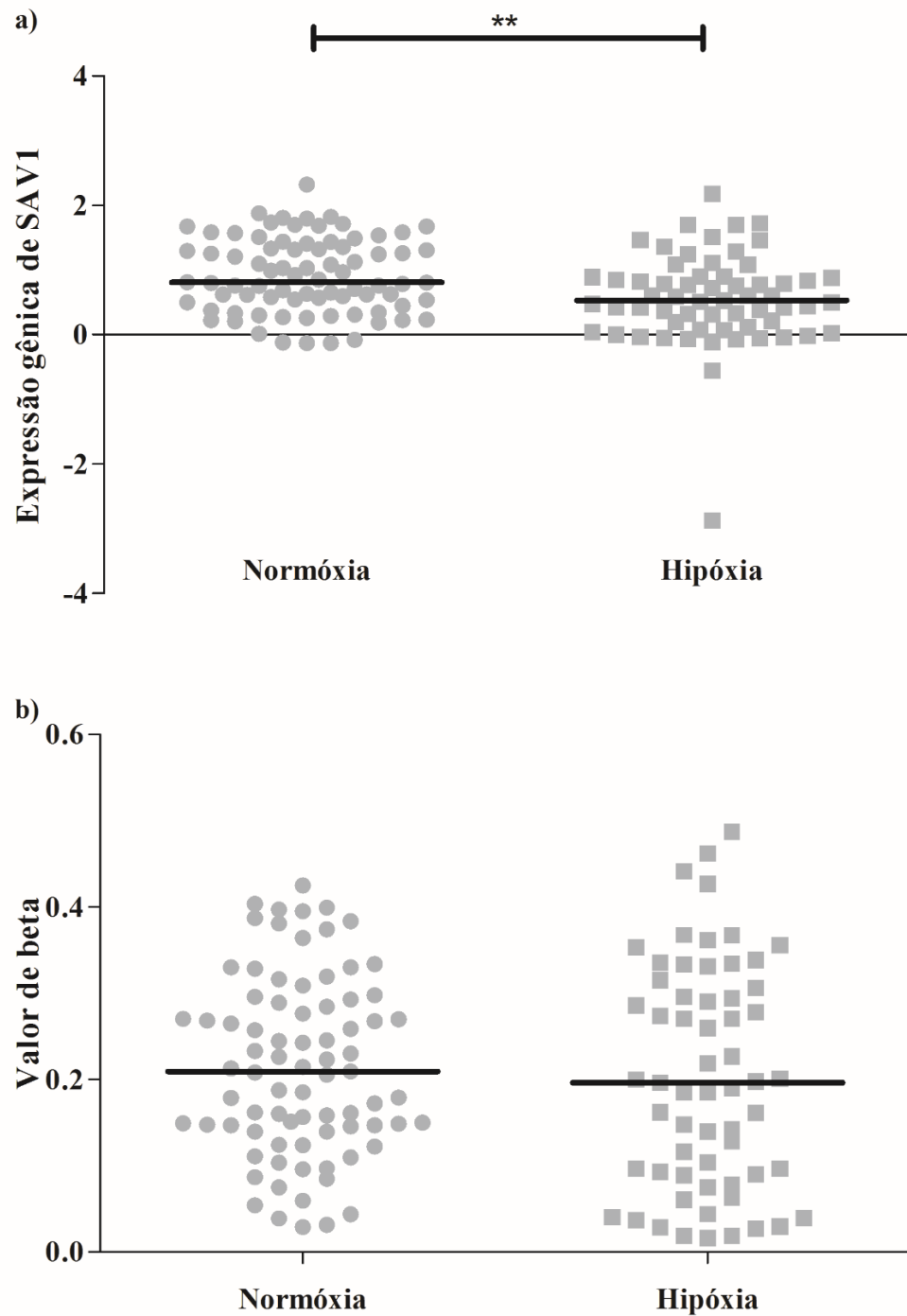
Legenda: Os gráficos representam as medianas da expressão gênica de *CYR61* (24A) e *CTGF* (24B) em subtipos de câncer de mama. (*) p<0,05, (**) p<0,01 e (***) p<0,001.

Fonte: A autora, 2020.

4.18 Análise *in silico* da expressão gênica, metilação de DNA e correlação expressão-metilação de *SAVI* em amostras de câncer de mama em normóxia e hipóxia

Foi efetuada a análise da expressão gênica, metilação de DNA e correlação expressão-metilação de *SAVI*, em amostras de câncer de mama *in silico*, estratificadas em normóxia e hipóxia, utilizando o banco de dados UCSC Xena. De acordo com a figura 25A, a expressão de *SAVI* diminuiu em hipóxia, quando comparado à normóxia, $p < 0,01$, sugerindo uma menor ação supressora tumoral em hipóxia do que em normóxia, o que está em conformidade com o pior prognóstico da hipóxia. Com a finalidade de comparar a metilação de DNA de *SAVI* entre amostras de câncer de mama em normóxia e hipóxia, foi realizada a análise da região de ilha CpG, representada pela sonda cg26071680. Como resultado da figura 25B, não houve diferença na metilação dessa região, ao comparar amostras de câncer de mama em normóxia e hipóxia. Foi realizada a correlação entre a metilação de DNA e a expressão gênica de *SAVI* em amostras de câncer de mama *in silico*, estratificadas em normóxia e hipóxia, para avaliar se a alteração na metilação de DNA poderia se refletir em mudança na expressão gênica. De acordo com a figura 26A, a correlação foi negativa e fraca, $-0,31$, e significativa estatisticamente, $p < 0,01$, para amostras em normóxia, sugerindo contribuição da metilação do DNA na regulação da expressão do gene *SAVI* nessas amostras. Em relação a amostras em hipóxia, a correlação foi muito fraca, $0,08$ (figura 26B).

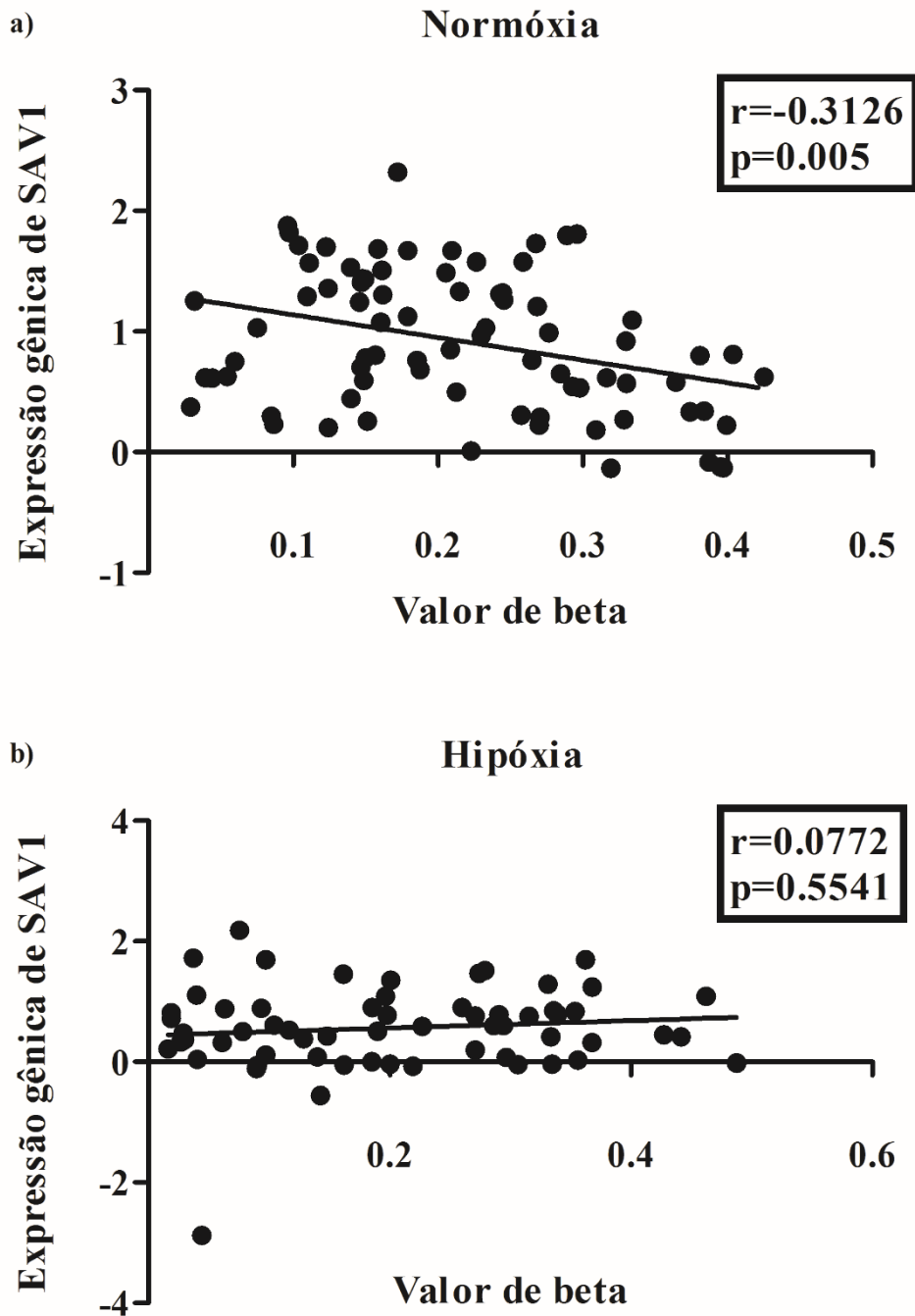
Figura 25 – Análise da expressão gênica e metilação de DNA de *SAVI* em amostras de câncer de mama em normóxia e hipóxia



Legenda: Os gráficos representam as medianas da expressão gênica (25A) e metilação de DNA (25B) de *SAVI* em amostras de câncer de mama em normóxia e hipóxia. (**) $p < 0,01$.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 26 – Correlação entre a expressão gênica e metilação de DNA de *SAVI* em amostras de câncer de mama em normóxia e hipóxia



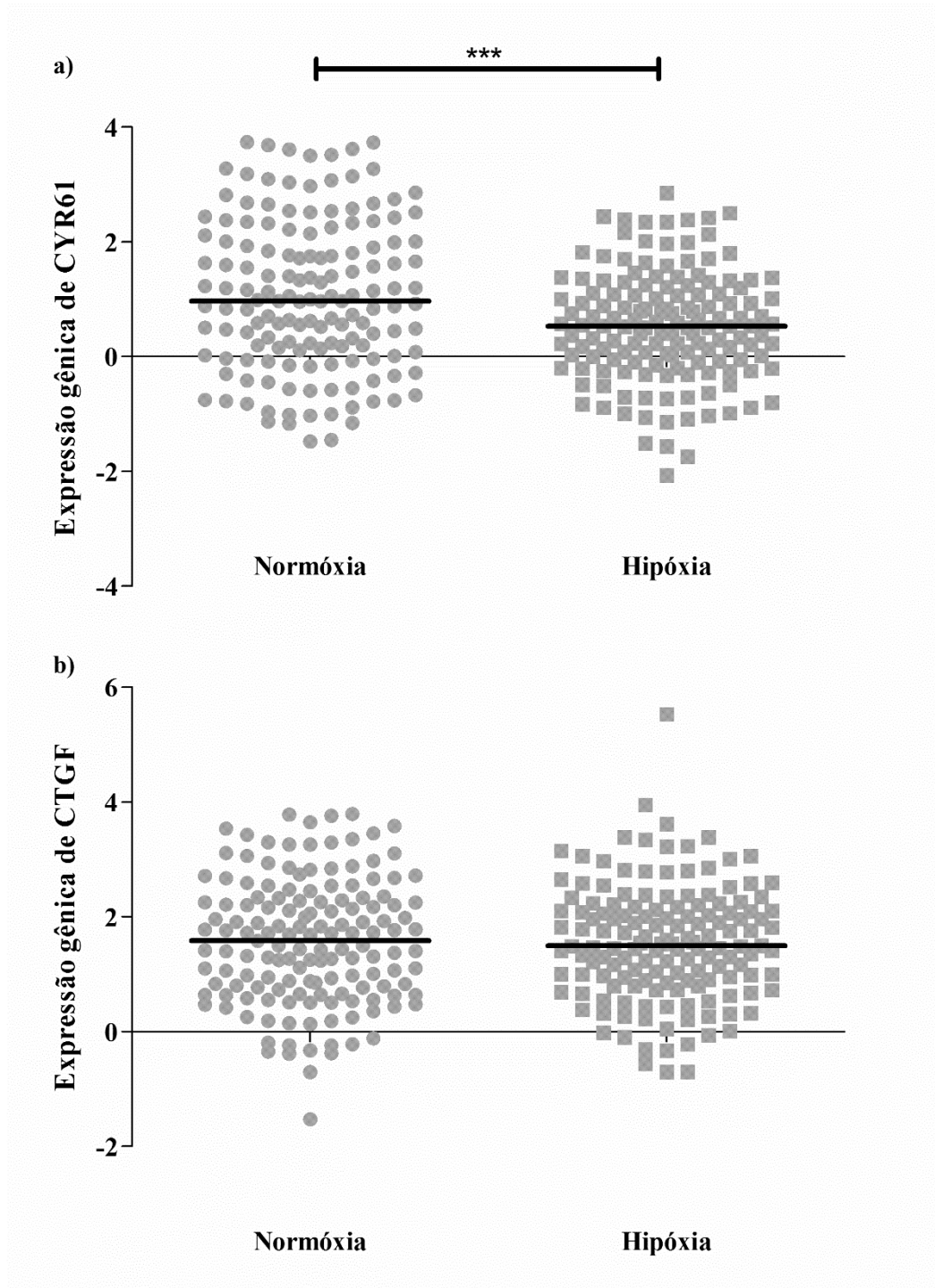
Legenda: Os gráficos mostram as correlações entre a expressão gênica e metilação de DNA de *SAVI* em amostras de câncer de mama em normóxia e hipóxia.

Fonte: A autora, 2020.

4.19 Análise da expressão gênica de *CYR61* e *CTGF*, genes alvo da via de Hippo, em amostras de câncer de mama *in silico*, estratificadas em normóxia e hipóxia

A avaliação da expressão gênica de *CYR61* e *CTGF* em amostras de câncer de mama *in silico*, estratificadas em normóxia e hipóxia, foi executada, utilizando o banco de dados UCSC Xena. De acordo com a figura 27, a expressão de *CYR61* diminuiu em hipóxia, quando comparado à normóxia, $p < 0,001$. Não teve alteração no nível de expressão de *CTGF*.

Figura 27 – Análise da expressão gênica de *CYR61* e *CTGF* em amostras de câncer de mama em normóxia e hipóxia



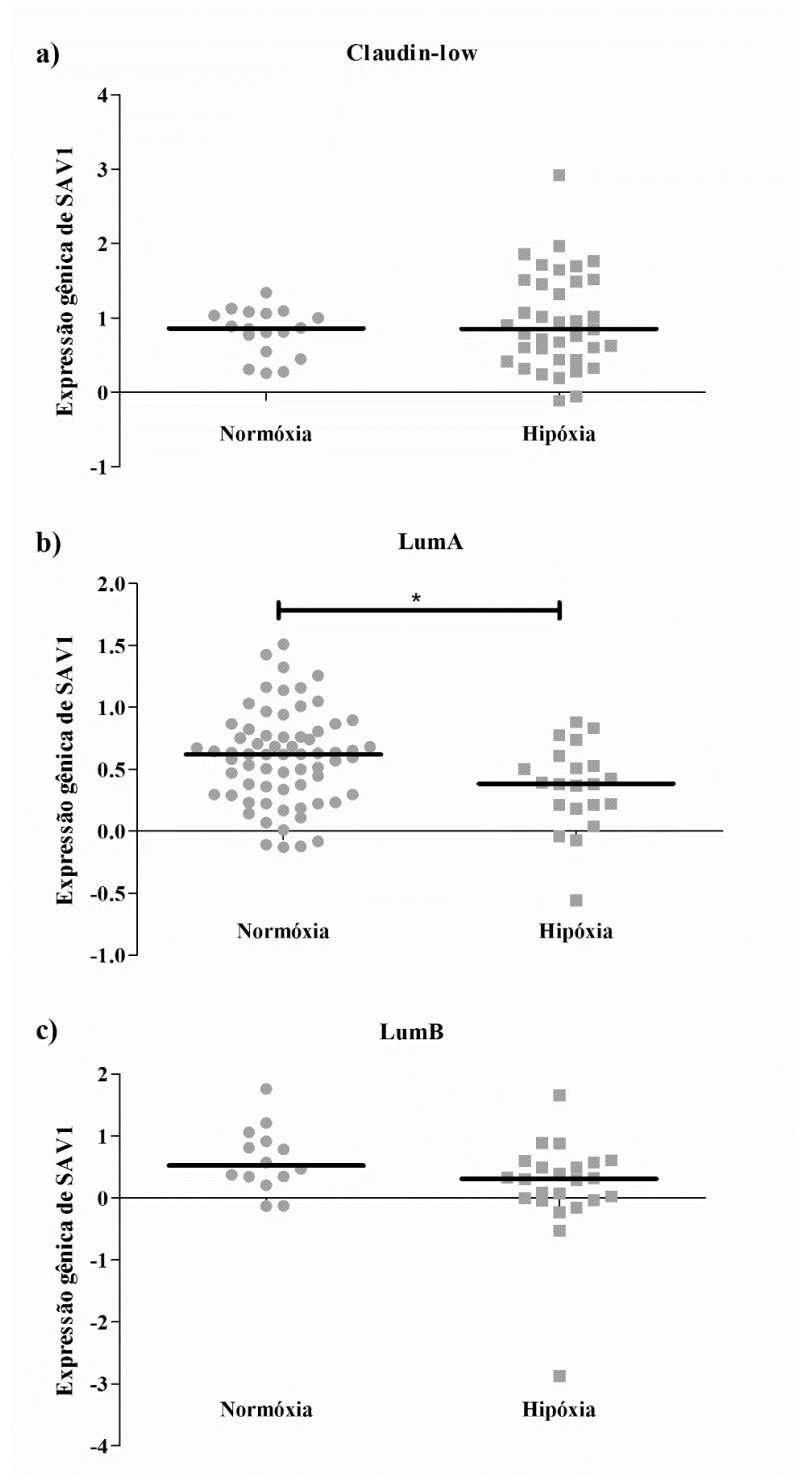
Legenda: Os gráficos representam as medianas da expressão gênica de *CYR61* (27A) e *CTGF* (27B) em amostras de câncer de mama em normóxia e hipóxia. (***) $p < 0,001$.

Fonte: A autora, 2020.

4.20 Análise *in silico* da expressão gênica, metilação de DNA e correlação expressão-metilação de *SAVI* em subtipos de câncer de mama, estratificados em normóxia e hipóxia

Por causa da diversidade tumoral entre os pacientes, foram analisadas expressão gênica, metilação de DNA e correlação expressão-metilação de *SAVI*, em subtipos de câncer de mama, estratificados em normóxia e hipóxia, através da ferramenta online UCSC Xena. Como resultado, somente as amostras LumA (figura 28B) tiveram os níveis de expressão gênica de *SAVI* ($p < 0,05$) diminuídos em hipóxia, em comparação à normóxia, indicando menor ação supressora tumoral em hipóxia do que em normóxia, o que está de acordo com o pior prognóstico da hipóxia. A análise de metilação de DNA mostrou que, para as amostras claudin-low e LumB (figuras 29A e 29C), não teve diferença de nível de metilação entre normóxia e hipóxia. Enquanto que, para as amostras LumA, o nível de metilação diminuiu em tumores em hipóxia, comparando com tumores em normóxia, $p < 0,01$ (figura 29B), no entanto, como foi mostrado na figura anterior, a expressão gênica de *SAVI* também diminuiu. Em relação aos tumores Basal e Her2, não foi possível a análise porque não havia amostras em normóxia. Além disso, a respeito dos tumores em normóxia, a correlação entre expressão gênica e metilação de DNA de *SAVI* foi fraca e não significativa estatisticamente para tumores claudin-low, -0,2 (figura 30A), e LumB, 0,14 (figura 30C). Em contrapartida, a correlação foi negativa e moderada, -0,5, e significativa estatisticamente, $p < 0,01$, para tumores LumA (figura 30B), indicando que o mecanismo de metilação de DNA pode contribuir com a regulação da expressão gênica de *SAVI*, nesse subtipo tumoral, em normóxia. Por outro lado, todas as correlações foram muito fracas para tumores claudin-low (-0,03) (figura 31A), LumA (0,03) (figura 31B) e LumB (-0,09) (figura 31C), em hipóxia.

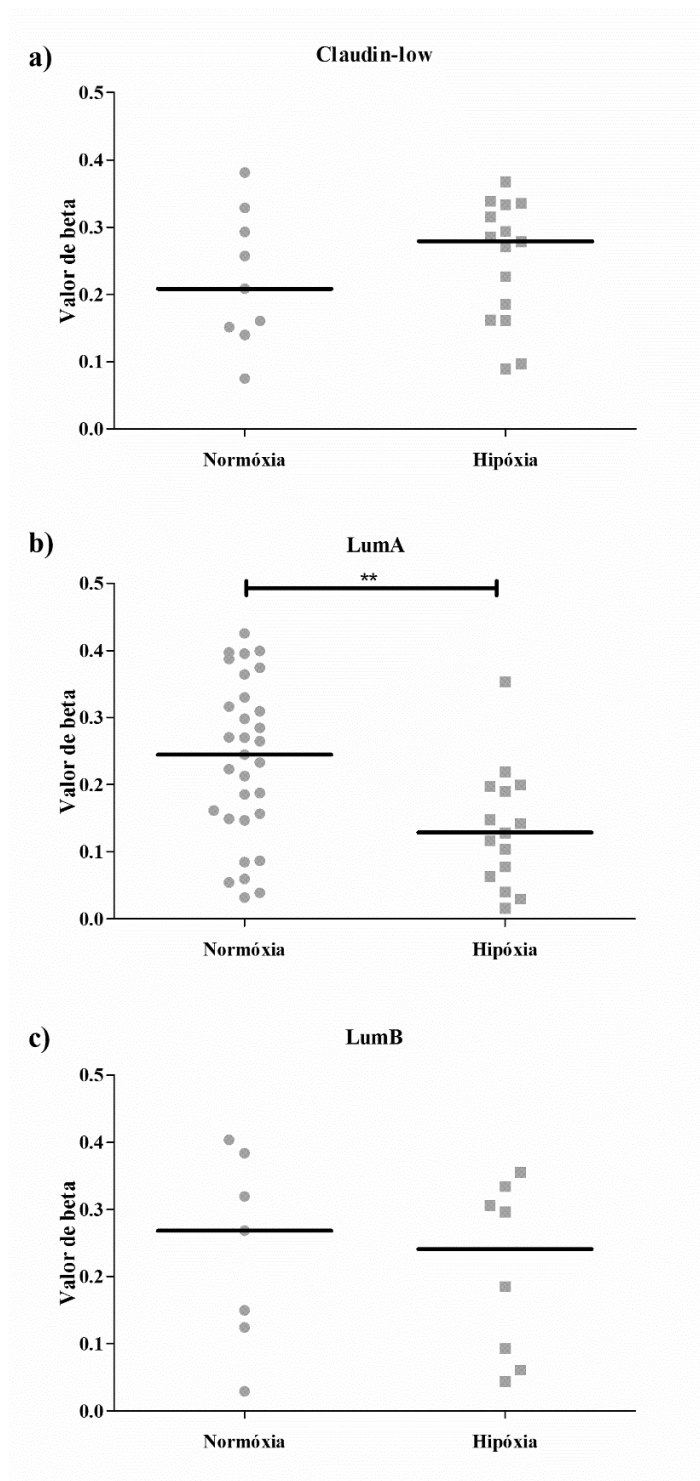
Figura 28 – Análise da expressão gênica de *SAVI* em subtipos de câncer de mama em normóxia e hipóxia



Legenda: Os gráficos representam as medianas da expressão gênica de *SAVI* em subtipos de câncer de mama em normóxia e hipóxia. (*) $p < 0,05$.

Fonte: A autora, 2020.

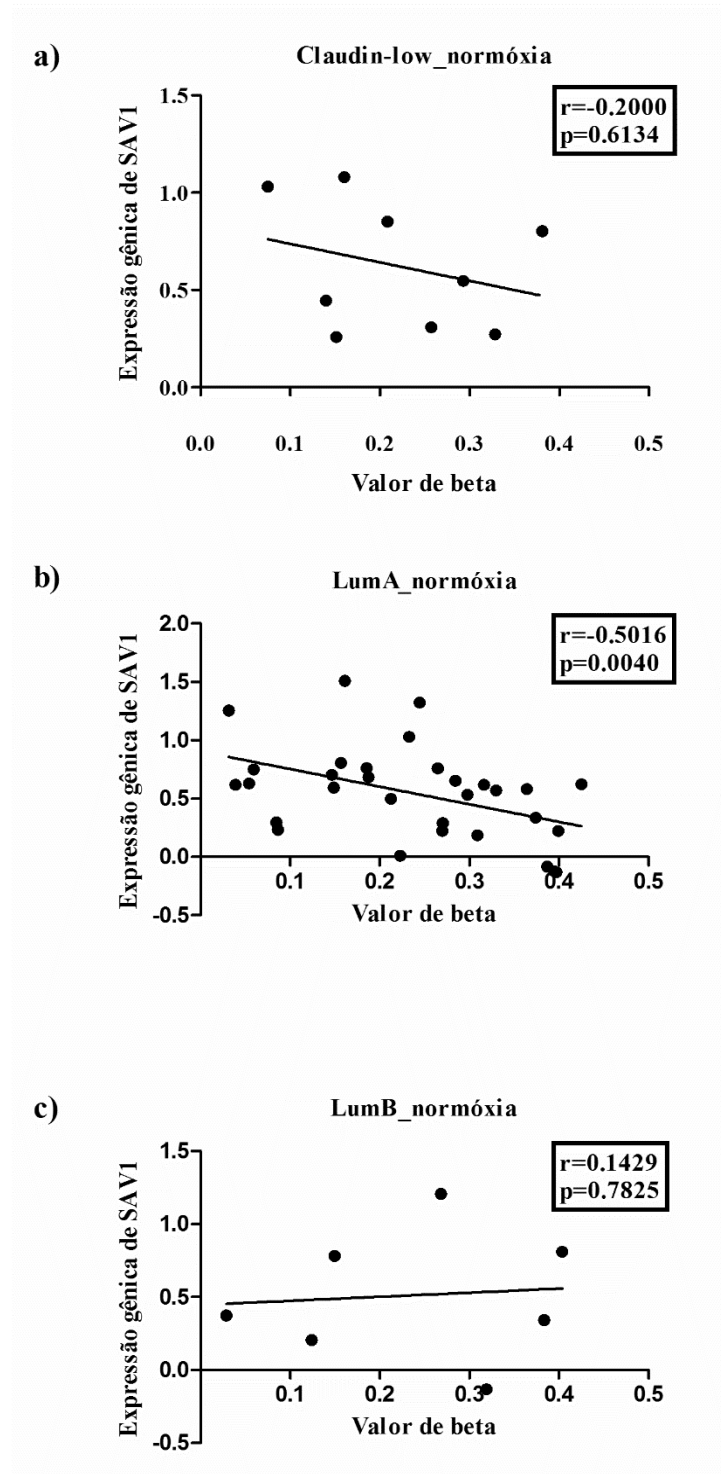
Figura 29 – Análise da metilação de DNA de *SAVI* em subtipos de câncer de mama em normóxia e hipóxia



Legenda: Os gráficos representam as medianas da metilação de DNA de *SAVI* em subtipos de câncer de mama em normóxia e hipóxia. (**) $p < 0,01$.

Fonte: A autora, 2020.

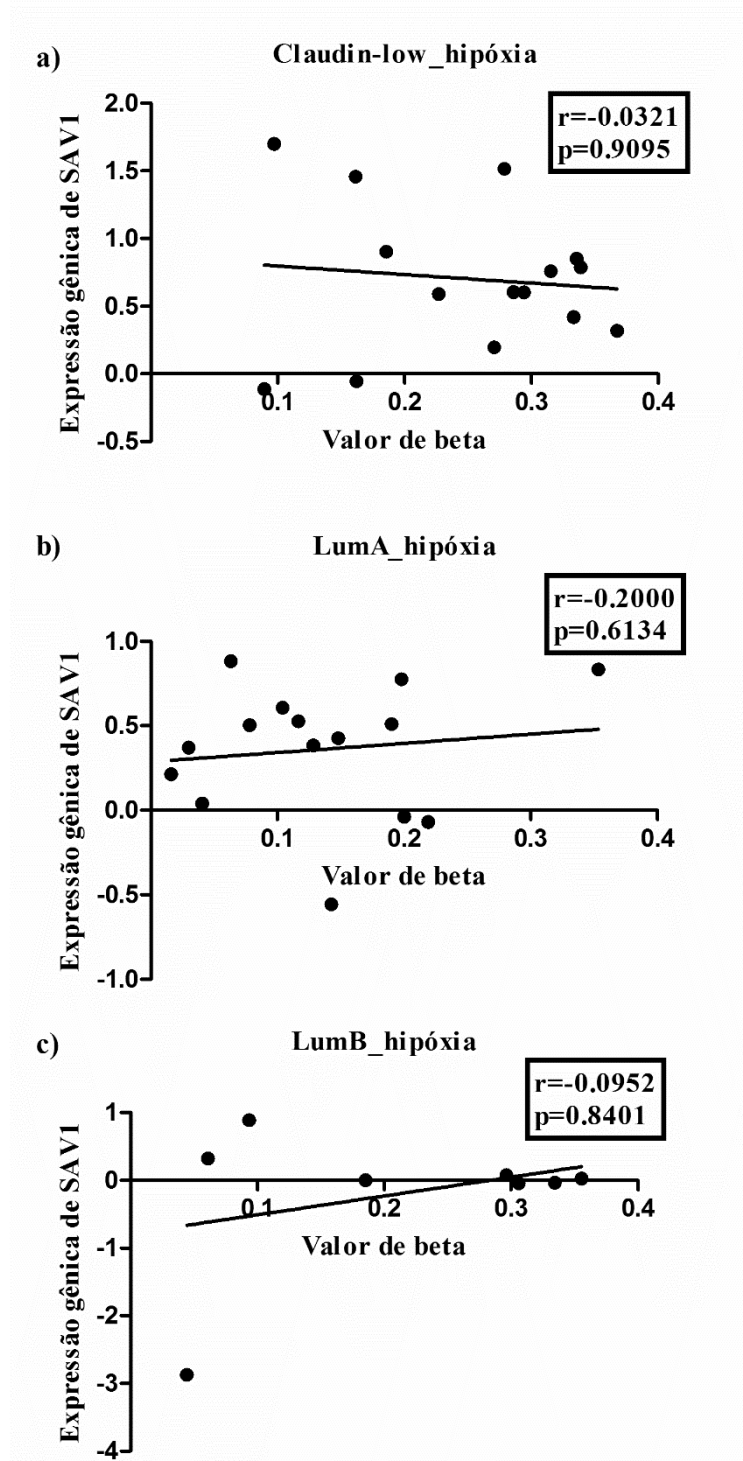
Figura 30 – Análise da correlação da expressão gênica e metilação de DNA de *SAVI* em subtipos de câncer de mama em normóxia



Legenda: Os gráficos mostram as correlações entre a expressão gênica e metilação de DNA de *SAVI* em subtipos de câncer de mama em normóxia.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 31 – Análise da correlação da expressão gênica e metilação de DNA de *SAVI* em subtipos de câncer de mama em hipóxia



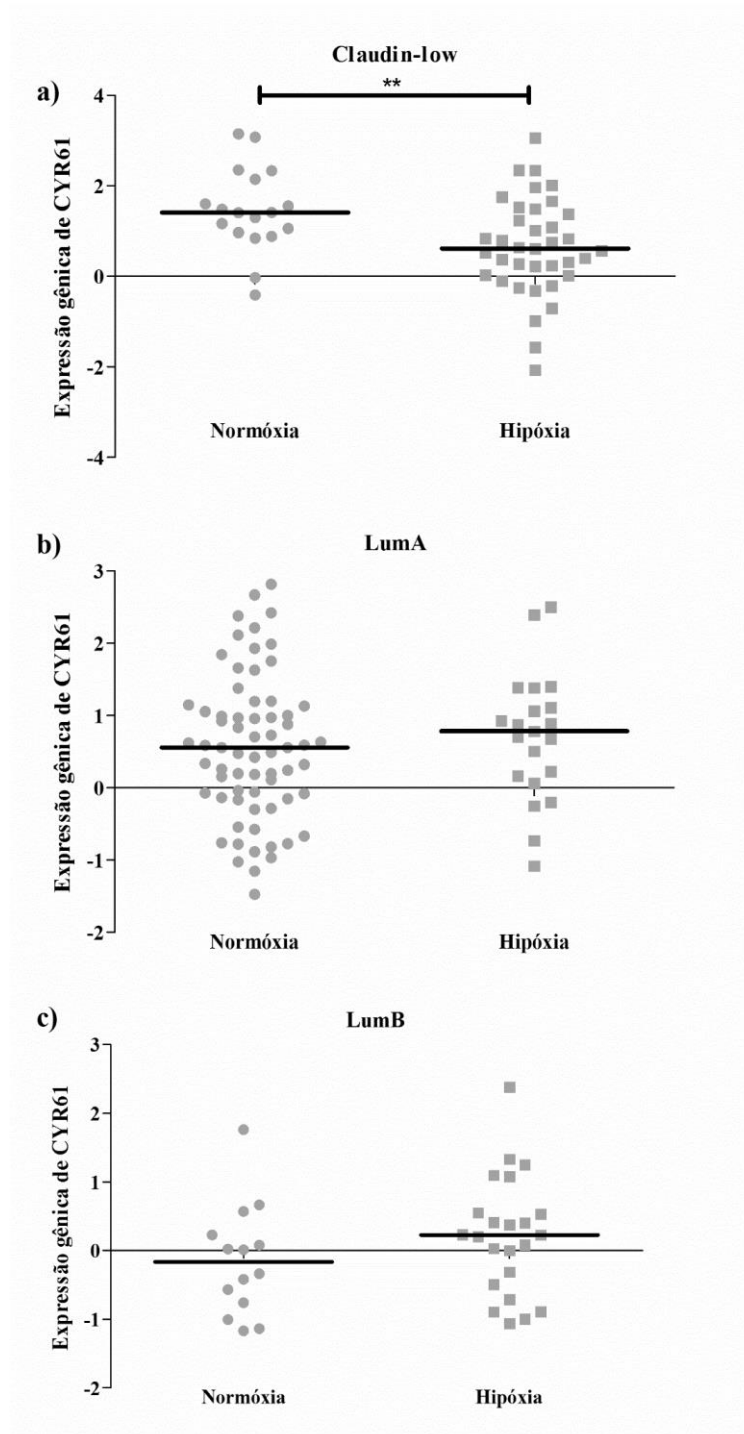
Legenda: Os gráficos mostram as correlações entre a expressão gênica e metilação de DNA de *SAVI* em subtipos de câncer de mama em hipóxia.

Fonte: A autora, 2020.

4.21 Análise *in silico* da expressão gênica de *CYR61* e *CTGF* em subtipos de câncer de mama, estratificados em normóxia e hipóxia

A fim de se obter um indicativo da atividade da via de Hippo, os níveis de mRNA de *CYR61* e *CTGF* foram avaliados em subtipos de câncer de mama, estratificados em normóxia e hipóxia, através da ferramenta online UCSC Xena. Como resultado, somente as amostras claudin-low (figura 32A) tiveram os níveis de expressão gênica de *CYR61* ($p < 0,01$) diminuídos em hipóxia, em comparação à normóxia, enquanto que não houve mudança na expressão de *CTGF* (figura 33).

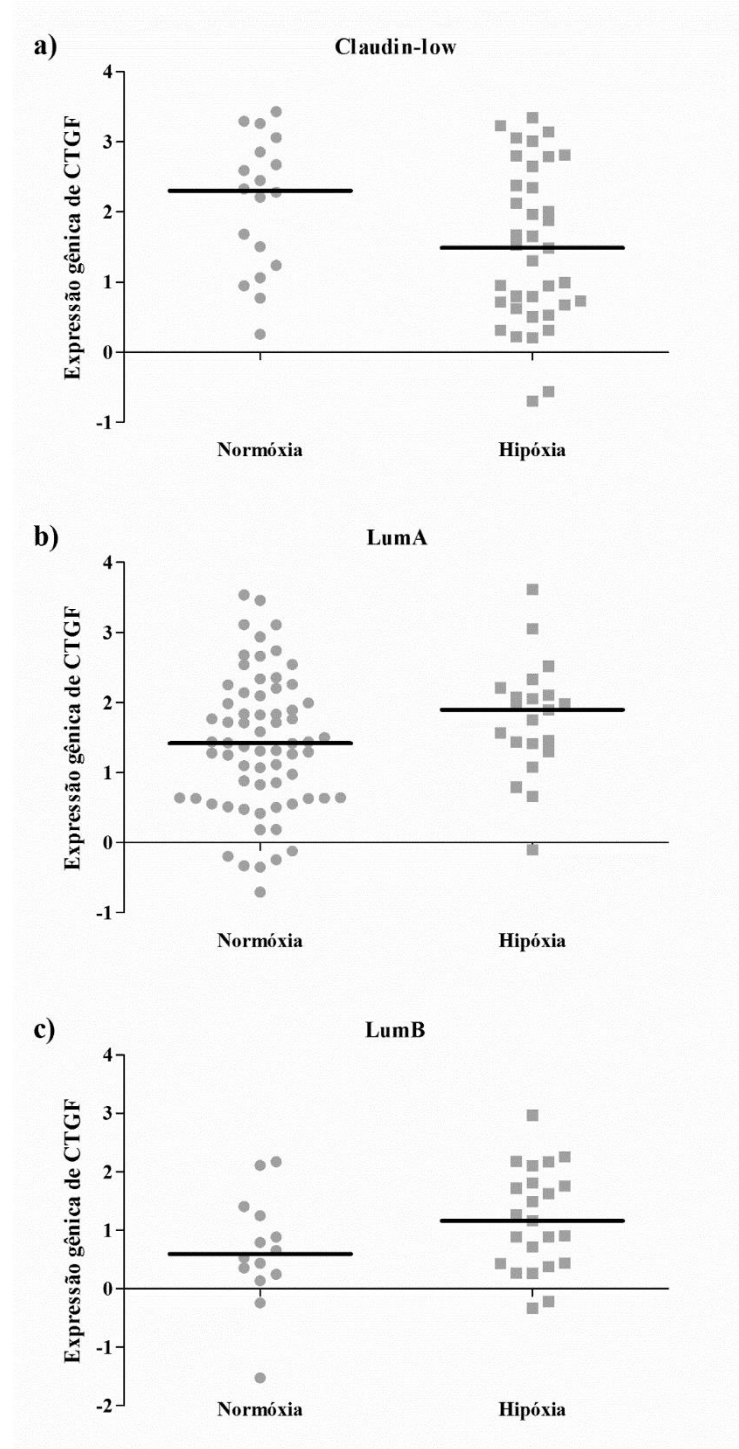
Figura 32 – Análise da expressão gênica de *CYR61* em subtipos de câncer de mama em normóxia e hipóxia



Legenda: Os gráficos representam as medianas da expressão gênica de *CYR61* em subtipos de câncer de mama em normóxia e hipóxia. (**) $p < 0,01$.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 33 – Análise da expressão gênica de *CTGF* em subtipos de câncer de mama em normóxia e hipóxia



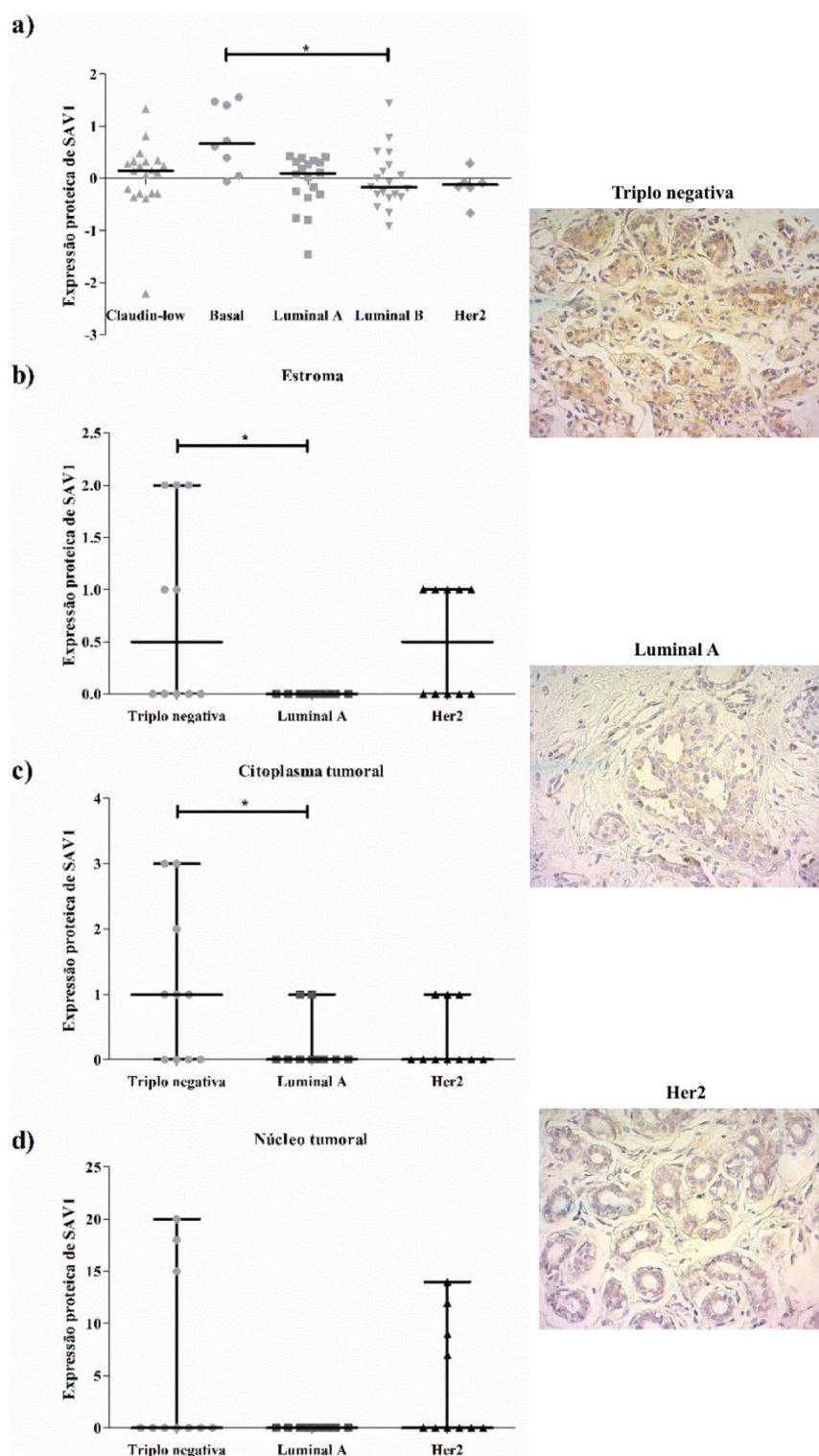
Legenda: Os gráficos representam as medianas da expressão gênica de *CTGF* em subtipos de câncer de mama em normóxia e hipóxia.

Fonte: A autora, 2020.

4.22 Análise da expressão proteica de SAV1 em câncer de mama, subtipos de câncer de mama e em normóxia e hipóxia

A fim de avaliar a expressão proteica de SAV1 dos subtipos de câncer de mama e em normóxia e hipóxia, foi realizada análise *in silico*, através da ferramenta online cBioPortal. O nível de proteína de SAV1 foi menor na amostra LumB ($p < 0,05$), em comparação à Basal (figura 34A). Além disso, O nível proteico de SAV1 foi também verificado em uma coorte brasileira de pacientes de câncer de mama, por IHQ, avaliando marcações em regiões de estroma, citoplasma e núcleo tumorais. Como resultado, na figura 34, os níveis de SAV1 foram maiores em amostras triplo negativas em comparação às Luminais A ($p < 0,05$), tanto em relação à região estromal (figura 34B) quanto citoplasmática tumoral (figura 34C). Por fim, a expressão proteica não foi alterada nas comparações entre normóxia e hipóxia, considerando câncer de mama (figura 35A) e amostras claudin-low (35B). As outras comparações não foram feitas porque não havia amostras suficientes.

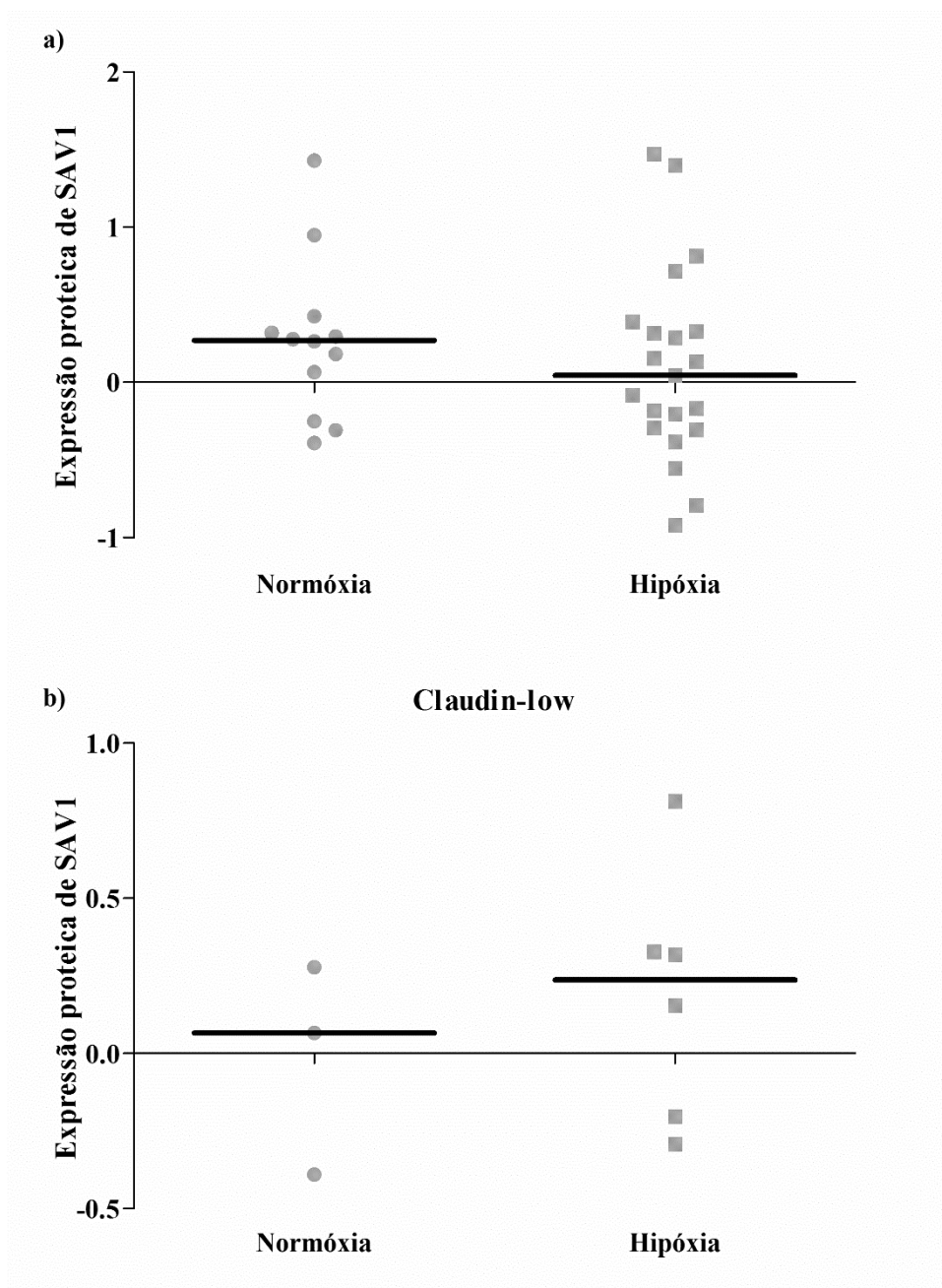
Figura 34 – Análise da expressão proteica de SAV1 em subtipos de câncer de mama



Legenda: Os gráficos representam as medianas da expressão proteica de SAV1 em subtipos de câncer de mama. Análises feitas sobre dados do TCGA (34A) e sobre dados de uma coorte brasileira (34B, 34C e 34D) (*) $p < 0,05$. As fotos representativas de cada subtipo (IHC) estão dispostas à direita.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 35 – Análise da expressão proteica de SAV1 em amostras de câncer de mama e no subtipo claudin-low em normóxia e hipóxia



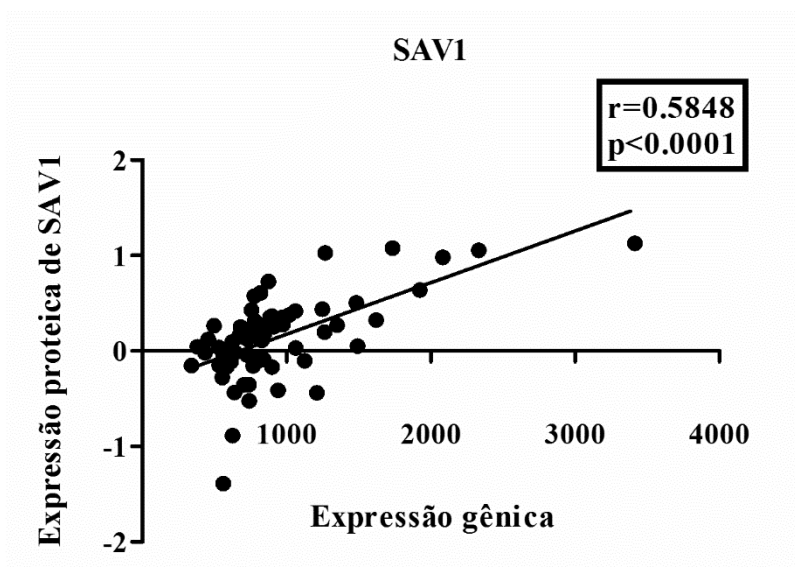
Legenda: Os gráficos representam as medianas da expressão proteica de SAV1 em amostras de câncer de mama (35A) e claudin-low (35B) em normóxia e hipóxia.

Fonte: A autora, 2020.

4.23 Correlação entre os níveis de mRNA e proteína de SAV1 em câncer de mama

A correlação entre a níveis de mRNA e proteína de SAV1 em câncer de mama foi realizada, utilizando banco de dados do cBioPortal. A figura 36 mostrou que há uma correlação positiva e moderada entre níveis de mRNA e proteica de SAV1 em câncer de mama, 0,58 ($p < 0,001$), indicando que os dados de mRNA obtidos podem ser aplicáveis aos dados de proteína e vice-versa.

Figura 36 – Análise da correlação da expressão gênica e proteica de SAV1 em câncer de mama

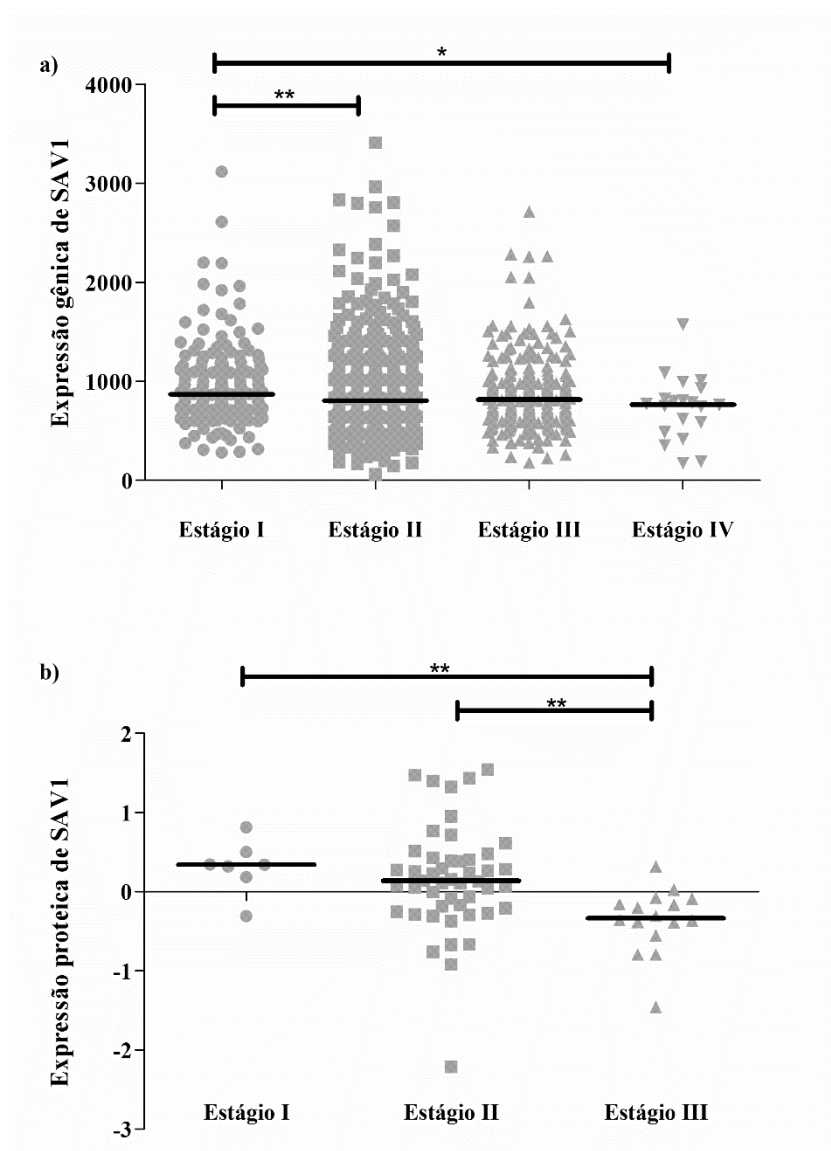


Legenda: O gráfico mostra a correlação entre a expressão gênica e proteica de SAV1 em câncer de mama.
Fonte: A autora, 2020.

4.24 Avaliação *in silico* dos níveis de mRNA e proteico de SAV1 e potencial prognóstico para o câncer de mama

Com o propósito de avaliar o potencial prognóstico da expressão de SAV1 para o câncer de mama, os níveis de mRNA e os níveis proteicos de SAV1 foram avaliados de acordo com estágio tumoral e status livre de doença e foi feita análise de curva de sobrevida relacionada à expressão gênica de SAV1. Os níveis de mRNA e proteico de SAV1 reduziram de maneira estágio dependente. Para os níveis de mRNA, as comparações significativas estatisticamente foram: estágio I x estágio II ($p < 0,01$) e estágio I x estágio IV ($p < 0,05$) (figura 37A). Em relação ao nível proteico, as comparações foram: estágio I x estágio III ($p < 0,01$) e estágio II x estágio III ($p < 0,01$) (figura 37B). Não houve dados de proteína para estágio IV. A figura 38 mostra que os níveis de transcritos e proteína de SAV1 não foram alterados pelo status livre de doença. Além disso, a curva de sobrevida associada à expressão de SAV1 mostrou que pacientes com mais alto nível de expressão gênica de SAV1 tem mais probabilidade de sobrevivência do que pacientes com baixo nível ($p < 0,05$; long-rank test statistics=4,202) (figura 39), ou seja, menor nível de expressão gênica de SAV1 diminui a probabilidade de sobrevivência ao câncer de mama. Os dados sugeriram um potencial prognóstico dos níveis de mRNA e proteico de SAV1 para o câncer de mama, no qual baixa expressão de SAV1 está associada a um pior prognóstico.

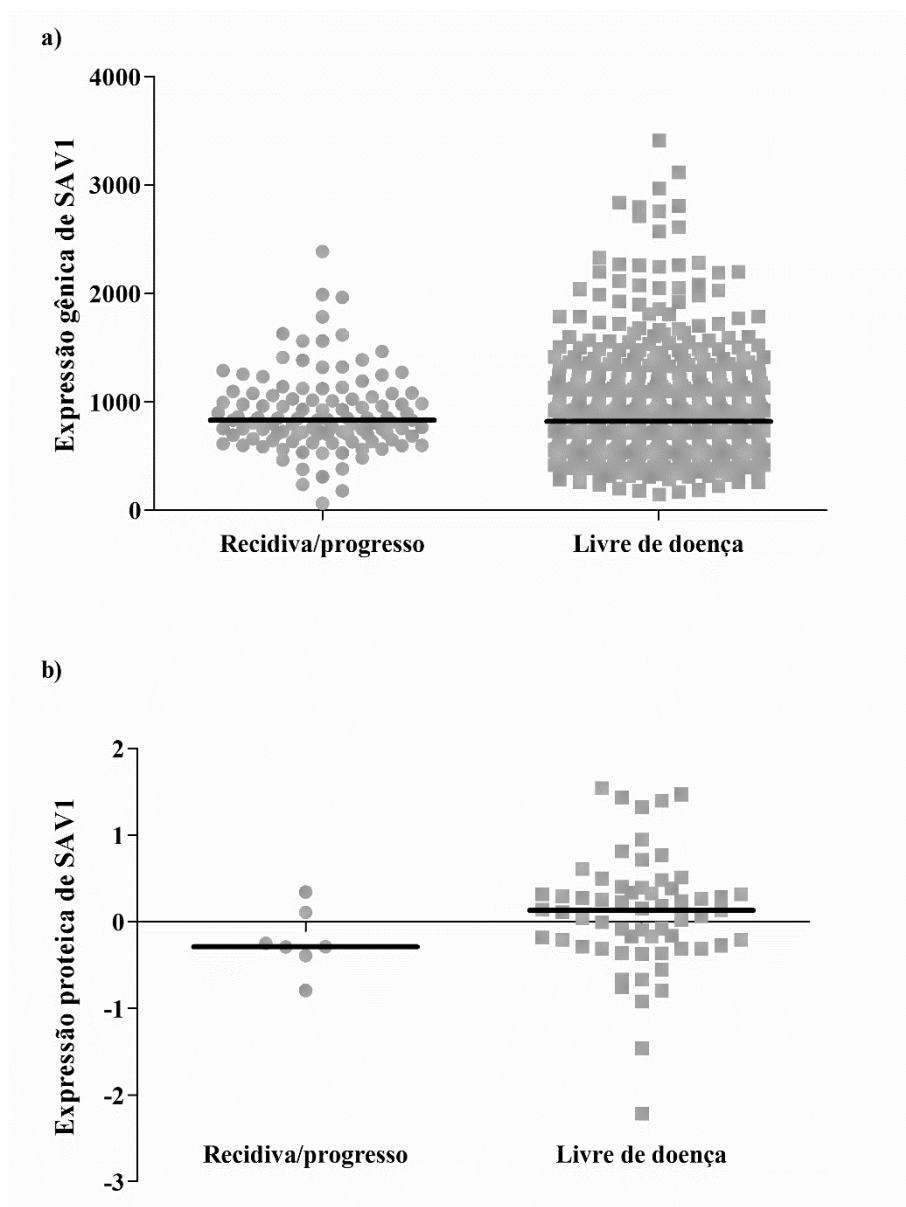
Figura 37 – Análise da expressão gênica e proteica de SAV1 de acordo com estágio tumoral em amostras de câncer de mama



Legenda: Os gráficos representam as medianas das expressões gênica (37A) e proteica (37B) de SAV1 de acordo com estágio tumoral em amostras de câncer de mama.

Fonte: A autora, 2020.

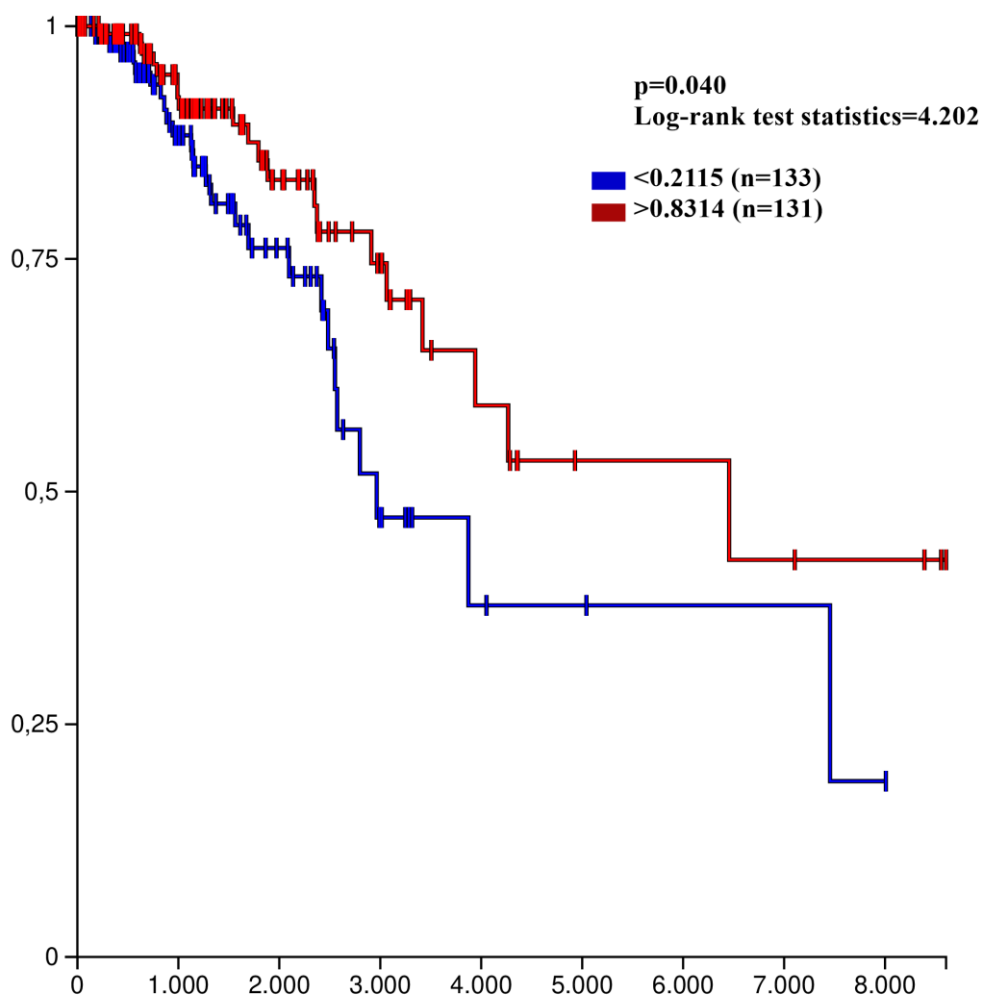
Figura 38 – Análise da expressão gênica e proteica de SAV1 de acordo com status livre de doença em amostras de câncer de mama



Legenda: Os gráficos representam as medianas das expressões gênica (38A) e proteica (38B) de SAV1 de acordo com status livre de doença em amostras de câncer de mama.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 39 – Curva de sobrevida relacionada à expressão de *SAVI* em pacientes de câncer de mama



Legenda: O gráfico representa a curva de sobrevida relacionada à expressão de *SAVI* em pacientes de câncer de mama. Em azul, curva de sobrevida de pacientes com baixa expressão gênica de *SAVI*, e em vermelho, curva de sobrevida de pacientes com alta expressão gênica de *SAVI*. O eixo x corresponde ao tempo em dias e o eixo y representa a probabilidade de sobrevivência.

Fonte: A autora, 2020.

5 DISCUSSÃO

O microambiente de hipóxia é uma característica comum a tecidos sólidos e é associado à agressividade tumoral e pior prognóstico (AEBERSOLD, 2001; PENNACCHIETTI et al., 2003; EVANS e KOCH, 2003; HUNG et al., 2009). Neste microambiente, os baixos níveis de oxigênio estabilizam os fatores de transcrição HIFs que regulam genes responsáveis pela sobrevivência da célula tumoral nesse ambiente hostil (WENGER; STIEHL; CAMENISCH, 2005; LAND e TEE, 2007). A via de HIF-1 α atua coordenando a expressão de genes relacionados à diversas funções importantes no contexto do câncer e da progressão tumoral, estimulando a expressão de genes relacionados à proliferação celular, à invasão/metástase, sobrevivência celular e resistência à apoptose, angiogênese e metabolismo anaeróbico de glicose (AEBERSOLD, 2001; PENNACCHIETTI et al., 2003).

Além disso, é sabido que a hipóxia tumoral induz hipometilação genômica global (LIU et al., 2011) e hipermetilação de genes específicos que, através de novos estudos voltados para identificar quais seriam os genes afetados por esse mecanismo, vem sendo determinados (OKAMI et al., 2004). Assim, evidenciando o papel da hipóxia como reguladora do mecanismo de metilação de DNA em tumores (THIENPONT et al., 2016).

A metilação de DNA é uma modificação epigenética reversível, geralmente associada com a repressão da expressão gênica (YOO e JONES, 2006; BIRD, 2002). Pelo uso de agentes demetilantes, tais como 5-Aza-2'-deoxicitidina, é possível promover a expressão de genes silenciados (YOO e JONES, 2006).

Estudos indicam que os efeitos do tratamento com agente demetilante, na expressão gênica, são devidos, além da demetilação do promotor associada ao aumento da expressão gênica (KIM et al., 2015; RAWLUSZKO et al., 2015), à demetilação do corpo gênico, normalmente relacionada à diminuição da expressão gênica (JONES, 1999), e aos efeitos indiretos, como ativação de fator de transcrição (EVANS et al., 2016) e modificações de histona (HONG et al., 2012). Além disso, as alterações induzidas pelo agente demetilante são dependentes do contexto e podem promover a ativação da via de sinalização do interferon, com funções pró-inflamatórias (CHIAPPINELLI et al., 2015; ROULOIS et al., 2015).

As mudanças no padrão de metilação de DNA são conhecidas por contribuir com a carcinogênese (EDEN et al., 2003; WILSON; POWER; MOLLOY, 2007; JONES e LAIRD, 1999) e progressão tumoral (BAYLIN, 2005; LONG et al., 2007). Com isso, a identificação de genes regulados por metilação de DNA poderia ajudar na compreensão de mecanismos de carcinogênese e progressão tumoral.

Além disso, a identificação de genes regulados por metilação de DNA no microambiente de hipóxia pode ajudar no entendimento da biologia do câncer e futuramente, na prática clínica, especialmente de tumores de mama agressivos em hipóxia, que são mais difíceis de tratar. Nesse sentido, torna-se mais interessante, pois o modelo utilizado neste trabalho é de linhagem celular de câncer de mama triplo negativo e com fenótipo agressivo, assim os dados podem ser ainda mais úteis, por se associarem aos tumores mais resistentes aos tratamentos e sem um alvo terapêutico.

Diante disso, a análise do microarranjo de DNA da linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231, agressiva e sem um alvo terapêutico, foi usada para identificar genes superexpressos após tratamento com agente demetilante em normoxia e hipóxia, a fim de se revelar vias de sinalização potencialmente silenciadas por metilação de DNA, além de aumentar a compreensão a respeito dos perfis de expressão gênica e efeitos moleculares em resposta ao tratamento com agente demetilante em microambientes de normóxia e hipóxia.

Em relação aos genes superexpressos após o tratamento com 5-Aza-2'-dC, em normóxia, deve-se notar que a grande maioria dos genes foi classificada em vias pró-inflamatórias, como resposta à interleucina-1, resposta inflamatória aguda, interação citocina-receptor de citocina, vias de sinalização de TNF, quimiocina e IL-17.

Nesse sentido, além das vias pró-inflamatórias superexpressas após o tratamento com 5-Aza-2'-dC em normóxia, observamos um aumento na expressão e localização nuclear de NF- κ B, um dos principais reguladores da inflamação, bem como uma regulação positiva de seus genes-alvo, *IL1A* e *IL1B* (LIU et al., 2017), após tratamento com agente demetilante, somente em condição de normóxia.

Na literatura, foi relatado que o tratamento com agentes demetilantes aumentou a expressão de genes com funções imunes, no contexto do câncer (HENINGER et al., 2015, LI et al., 2014). Tekpli et al. (2013) demonstraram que os promotores dos genes *IL1B*, *IL6* e *IL8* são silenciados por metilação de DNA, em câncer de pulmão, inclusive que o promotor de *IL1B* exibiu o maior grau de metilação do promotor.

Além disso, Chiappinelli et al. (2015), mostraram que os agentes demetilantes regularam positivamente a resposta ao interferon, por meio da ativação da defesa viral, no contexto do câncer, e sensibilizaram à terapia de checkpoint imune, anti-CTLA4, em um modelo de melanoma de camundongo, o que pode incentivar novos estudos envolvendo imunoterapia combinada com agente demetilante.

Por outro lado, apenas a via de sinalização pró-inflamatória IL-17 foi observada superexpressa após o tratamento com 5-Aza-2'-dC em hipóxia. Além disso, o tratamento com 5-Aza-2'-dC em hipóxia não induziu alterações na expressão de NF- κ B.

Na literatura, D'anna et al. (2020) identificaram que a demetilação do DNA em regiões de repetição do genoma, abrigando sequências consenso de ligação ao HIF, levou à expressão de transcritos mimetizadores de infecção viral, o que ativou a resposta imune e promoveu o efeito antitumoral. Esses dados sugeriram que a metilação do DNA coopera para a imunotolerância tumoral, em condições de hipóxia.

Além disso, Thienpont et al. (2016) agruparam os genes mais frequentemente hipermetilados em tumores hipóxicos, comparados aos em normóxia, em parada do ciclo celular, reparo de DNA e apoptose. Além disso, também foi observado que os genes supressores da glicólise, angiogênese e metástase são hipermetilados, o que está de acordo com a resposta induzida pela hipóxia.

Assim, foi observado que as vias pró-inflamatórias foram reguladas positivamente pelo tratamento com 5-Aza-2'-dC, em ambas as condições. No entanto, o tratamento com 5-Aza-2'-dC em normóxia mostrou uma quantidade maior de vias pró-inflamatórias superexpressas do que 5-Aza-2'-dC em hipóxia. Nesse sentido, observamos que a expressão de NF- κ B aumentou apenas após 5-Aza-2'-dC em normóxia. Além disso, aumento da marcação nuclear para NF- κ B e elevação dos níveis de mRNA dos genes alvo de NF- κ B, *IL1A* e *IL1B*, foram também observados após 5-Aza-2'-dC em normóxia. Assim, nossos resultados sugerem que 5-Aza-2'-dC induz uma maior alteração inflamatória, a níveis moleculares, em normóxia do que no ambiente tumoral de hipóxia.

Após validação do microarranjo de DNA e análise global de vias de sinalização e processos biológicos majoritariamente alterados, em resposta ao tratamento com 5-Aza-dC em normóxia e hipóxia, o gene supressor tumoral *SAVI* foi selecionado para análises mais aprofundadas, em virtude da sua importante função no contexto tumoral, por ser potencialmente regulado por metilação de DNA e pouco reportado na literatura. Então, foram

feitas análises de metilação de DNA de *SAVI* em linhagem celular de câncer de mama, MDA-MB-231, em normóxia e hipóxia, uma vez que os níveis de mRNA de *SAVI* aumentaram após tratamento com agente demetilante em ambas condições.

Nesse sentido, a presença de sítio de metilação no promotor de *SAVI* reforçou ainda mais a ideia de que sua expressão gênica pudesse ser regulada por metilação de DNA, já que aproximadamente 60% dos genes apresentam ilhas CpGs na sua região promotora e/ou no primeiro éxon (WANG e LEUNG, 2004; BRENET et al., 2011).

Diante disso, foi sequenciado um trecho do sítio predito de metilação e encontrado uma citosina precedida de guanina metilada, somente em hipóxia, e ainda foi predito que essa região compõe sequência de ligação de fatores de transcrição. Com isso, nossos dados sugerem a presença de metilação em uma possível região de controle da expressão gênica de *SAVI* e indicou possíveis fatores de transcrição, que podem ser sensíveis à metilação. No entanto, experimentos de ligação à cromatina, tal como ChIP, podem elucidar se tais fatores de transcrição identificados são realmente ligados a essa região.

Portanto, o mecanismo de metilação de DNA pode exercer um papel no controle da expressão gênica de *SAVI* em hipóxia, e possivelmente em normóxia. Na literatura, foi relatada metilação do promotor de *SAVI* em várias linhagens celulares de câncer, inclusive de mama (ALOKAIL e ALENAD, 2014). No entanto, até o momento nenhum trabalho tinha demonstrado metilação de DNA de uma determinada região do promotor de *SAVI*, exclusivamente em hipóxia. Cabe ressaltar que o presente trabalho não analisou a ilha CpG inteira de *SAVI*, pode haver metilação em outros trechos, inclusive em normóxia.

Dentre os fatores de transcrição preditos, destacam-se THAP1 e NRF1, em virtude do alto score e por não serem fatores de transcrição basais. O fator de transcrição THAP1 é um fator pró-apoptótico (ROUSSIGNE et al., 2003), além de modulador da progressão do ciclo celular (G1/S) e da proliferação celular (CAYROL et al., 2007), enquanto que NRF1 ativa a expressão de alguns genes metabólicos-chave, reguladores do crescimento celular e genes nucleares requeridos para respiração, biossíntese de heme e transcrição e replicação do DNA mitocondrial (BISWAS e CHAN, 2010).

Além disso, foi feita a comparação da expressão de *SAVI* entre linhagem menos agressiva de câncer de mama, MCF-7, e mais agressiva, MDA-MB-231, em condições de normóxia e hipóxia, assim como análises de expressão de genes alvo da via de Hippo, *CYR61*

e *CTGF*, a fim de avaliar associação da expressão de *SAVI* com agressividade e obter um indicativo do direcionamento, antitumoral ou pró-tumoral, da via de Hippo.

Conforme mostrado, os níveis de mRNA de *SAVI* foram menores na linhagem celular mais agressiva MDA-MB-231, em comparação à linhagem menos agressiva, MCF-7, sugerindo uma associação entre expressão de *SAVI* e agressividade. Nesse sentido, os níveis de transcritos de *CYR61* e *CTGF* foram maiores na MDA-MB-231, do que na MCF-7. Ambos dados sugerem que na MDA-MB-231, a via de Hippo pode estar mais direcionada para a face pró-tumoral, do que na MCF-7, visto que os níveis de mRNA de *SAVI* diminuíram e os níveis dos genes alvo da via de Hippo aumentaram, o que pode estar associado com a maior agressividade daquela linhagem.

Em 24h de hipóxia, na MDA-MB-231, a expressão gênica de *SAVI* não foi alterada, enquanto que os níveis de *CYR61* e *CTGF* diminuíram, em comparação com normóxia, o que indicou um direcionamento da via de Hippo mais para o lado antitumoral, de forma independente da expressão de *SAVI*. Por outro lado, em relação à MCF-7, os níveis de transcritos de *SAVI*, *CYR61* e *CTGF* se mantiveram inalterados em hipóxia, quando comparado à normóxia. Os dados mostraram resultados diferentes entre as duas linhagens, em hipóxia. Em contrapartida, a expressão proteica não mostrou alteração em nenhuma das comparações: MCF-7 x MDA-MB-231 e normóxia x hipóxia na MDA-MB-231 e MCF-7.

Entretanto, tem sido sugerido pela literatura que a hipóxia desativa a via de Hippo, culminando com a atividade de YAP, e conseguinte sobrevivência e crescimento tumoral, colaborando para a resposta à hipóxia. Foi observado que a MDA-MB-231 exposta a uma hipóxia aguda, de 6h, apresentou aumento dos níveis de mRNA de *CYR61* e *CTGF*. E ainda demonstraram que YAP é fundamental para a estabilidade e função de HIF-1 α (MA et al., 2015). Essa diferença entre o dado obtido pelo presente trabalho e o da literatura, relacionada à expressão dos genes alvo de Hippo, pode ser em decorrência da duração da hipóxia. Além disso, também foi relatado que HIF-2 α promoveu o crescimento de câncer de colon por potencializar a atividade de YAP (MA et al., 2017). Yan et al. (2014) mostraram que a hipóxia regulou YAP e TAZ de forma oposta em linhagens celulares de câncer ovariano epitelial, induzindo a redução da fosforilação de YAP e sua expressão total e aumento dos níveis de TAZ fosforilado.

Como pode ser observado, A relação entre a hipóxia e a via de Hippo ainda se restringe mais a dados sobre YAP e TAZ, as proteínas mais estudadas da via, no entanto,

acerca de SAV1 pouco foi descrito. O que se sabe, são dados obtidos por esse trabalho até então.

Após as análises *in vitro* e com a finalidade de se conhecer melhor a importância de SAV1 no contexto do câncer de mama, foi feito estudo *in silico* para avaliação da expressão gênica, proteica e metilação de DNA de SAV1. Para isso, foram utilizados dados públicos de pacientes com câncer de mama, e as análises foram realizadas de acordo com critérios clínicos, como subtipo tumoral, estágio tumoral, status livre de doença e sobrevida global, e também com base em uma assinatura gênica de hipóxia clínica. Além disso, para facilitar comparações, foi traçado um paralelo entre os resultados das análises *in vitro* e *in silico*, ou seja, entre os dados das linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e os subtipos tumorais, aos quais se assemelham respectivamente, claudin-low e LumA. (APÊNDICE A).

Uma vez que SAV1 é considerado um supressor tumoral, foi efetuada a comparação da expressão gênica de *SAV1* entre amostras normais adjacentes e de câncer de mama. O resultado mostrou que a expressão foi maior em amostras normais do que em amostras de câncer, reforçando o papel supressor tumoral de SAV1, também em câncer de mama.

Estudos tem apontado que SAV1 exerce papel como supressor tumoral em vários tipos de câncer. A partir da análise do banco de dados de microarranjos (Oncomine), Luo et al. (2011) mostraram que os níveis de mRNA de SAV1 estão diminuídos em câncer de mama quando comparados ao tecido de mama normal. Nesse estudo, foram analisadas poucas amostras.

Jiang et al. (2017) mostraram que os níveis de mRNA e proteína de SAV1 estão diminuídos em tecidos de câncer colorretal humano comparado com tecidos não tumorais adjacentes e que SAV1 reprimiu o desenvolvimento do câncer colorretal por meio da inibição da sinalização Akt-mTOR, de uma maneira dependente de YAP.

De acordo com Wang et al. (2016), o nível de mRNA de SAV1 em adenocarcinoma ductal pancreático foi menor em comparação com tecidos paratumorais. Linhagens celulares pancreáticas exibiram menor nível proteico de SAV1 em comparação com linhagem celular pancreática normal. Da mesma maneira, Li et al. (2016) relatou que SAV1 está diminuído em tecidos tumorais de pulmão comparados com não tumoral e também em linhagens de câncer de pulmão.

Como a expressão gênica de *SAV1* foi maior em amostras normais do que tumorais, com a finalidade de avaliar se o mecanismo de metilação de DNA poderia estar contribuindo

com a regulação dessa expressão gênica, foi realizada a comparação da metilação de DNA de *SAVI*, entre amostras normais e de câncer de mama. A região localizada no éxon 1 e referente à ilha CpG, representada pela sonda cg26071680, se mostrou mais metilada em amostras tumorais do que normais, um indicativo de que a metilação de DNA poderia contribuir para a menor expressão gênica de *SAVI* observada em amostras tumorais comparadas às normais.

No entanto, a análise de correlação usada para avaliar se a alteração na metilação de DNA poderia se refletir em mudança na expressão gênica mostrou correlações negativas muito fracas entre a expressão gênica e metilação de DNA da região analisada de *SAVI*, para amostras normais e para amostras tumorais, sugerindo que a metilação de DNA da região analisada não contribuiu para regulação da expressão gênica de *SAVI*, em ambos tipos de amostras. Portanto, outros mecanismos de controle da expressão gênica podem estar colaborando para a diminuição dos níveis de expressão de *SAVI* observados.

Na literatura, Wang et al. (2017) mostraram que *SAV1* é silenciado por metilação de DNA e atua como supressor tumoral no adenocarcinoma ductal pancreático.

Devido à diversidade tumoral entre os pacientes, foi avaliada a expressão gênica, proteica, metilação de DNA e correlação expressão-metilação de *SAVI*, entre os subtipos de câncer de mama. De modo controverso, os subtipos triplo-negativos, basal e claudin-low, tiveram maior expressão gênica de *SAVI*, em comparação com os subtipos LumA, LumB e HER2. O nível de expressão de *SAVI* foi menor no subtipo LumB em comparação ao LumA, o que está em conformidade com a maior taxa proliferativa, dada pela maior expressão do marcador de proliferação, Ki-67, no subtipo LumB, quando comparado ao LumA (FRAGOMENI; SCIALIS; JERUSS, 2018). A expressão proteica de *SAV1* nos subtipos tumorais seguiu tendência similar à expressão gênica, reforçada pelo dado de correlação positiva moderada observado entre ambas. Os dados proteicos da coorte brasileira se mostraram semelhantes aos obtidos pelo TCGA. Vale ressaltar que os resultados de expressão de proteína foram similares, permanecendo inalterados, entre as linhagens, MDA-MB-231 e MCF-7, e entre seus respectivos subtipos assemelhados, claudin-low e LumA.

Em relação à metilação de DNA, não teve diferença de nível de metilação entre os subtipos de câncer de mama. A análise de correlação mostrou negativa, fraca e significativa somente para subtipo claudin-low, sugerindo uma contribuição da metilação de DNA da

região analisada, na regulação da expressão gênica de *SAVI*, considerando o subtipo claudin-low.

Para ter um indicativo do direcionamento da via de Hippo, para o lado pró-tumoral ou antitumoral, foi analisada a expressão gênica de alvos da via, *CTGF* e *CYR61*, em subtipos tumorais. A análise de expressão gênica de *CTGF* teve resultado similar ao de *CYR61*, o que reforça que eles são regulados em conjunto. Não foi observada uma relação negativa entre as expressões de *SAVI* e *CYR61* ou *CTGF*, no entanto, pode-se notar que um dos subtipos de câncer de mama mais agressivos e de pior prognóstico, claudin-low, tiveram maiores níveis de expressão de *CYR61* e *CTGF* do que os demais, sugerindo que outro mecanismo, independente da expressão gênica de *SAVI*, pode estar deslocando a via de Hippo mais para o modo oncogênico nesse subtipo tumoral.

Como a hipóxia tumoral confere maior agressividade e pior prognóstico para o paciente (AEBERSOLD, 2001; PENNACCHIETTI et al., 2003) e não há dados sobre a relevância de *SAVI* em hipóxia, foi avaliada a expressão gênica, proteica e metilação de DNA de *SAVI*, em amostras de pacientes com câncer de mama, com base em uma assinatura gênica de hipóxia clínica.

A expressão gênica de *SAVI* diminuiu em pacientes do grupo hipóxia, quando comparados aos do grupo normóxia, sugerindo uma menor ação supressora tumoral em hipóxia do que em normóxia, o que está em conformidade com o pior prognóstico associado à hipóxia tumoral (AEBERSOLD, 2001; PENNACCHIETTI et al., 2003). Uma vez que o nível de *SAVI* diminuiu em hipóxia, foi avaliado se o mecanismo de metilação de DNA, normalmente associado ao silenciamento gênico (BIRD, 2002), poderia contribuir na regulação da expressão gênica de *SAVI*. Não houve diferença na metilação da região investigada, ao comparar amostras de câncer de mama em normóxia e hipóxia, no entanto, houve correlação, entre expressão gênica e metilação de DNA, negativa, fraca e significativa estatisticamente, para amostras em normóxia, sugerindo que a metilação de DNA pode estar relacionada à regulação da expressão gênica de *SAVI*, nessas amostras. Em contrapartida, a expressão proteica permaneceu inalterada nas comparações realizadas, entre normóxia e hipóxia. A expressão gênica de *CYR61*, gene alvo de hippo, diminuiu em hipóxia, quando comparado à normóxia, o que não mostrou relação inversa com a expressão de *SAVI*, que também apresentou seus níveis de mRNA reduzidos. Não foi encontrada diferença de

expressão, a nível proteico, de SAV1, quando comparadas normóxia e hipóxia, em câncer de mama.

Em relação às análises de hipóxia para cada subtipo tumoral, somente as amostras LumA apresentaram os níveis de expressão gênica de *SAVI* diminuídos em hipóxia, em comparação à normóxia, também indicando uma menor ação supressora tumoral em hipóxia do que em normóxia, de acordo com o pior prognóstico associado à hipóxia tumoral (AEBERSOLD, 2001; PENNACCHIETTI et al., 2003). Em comparação, a MCF-7, análoga ao subtipo LumA, apresentou os níveis de mRNA de SAV1 inalterados em hipóxia, quando em comparação à normóxia. Em relação ao subtipo claudin-low e sua análoga, MDA-MB-231, ambos apresentam os níveis de mRNA de *SAVI* inalterados, comparando normóxia e hipóxia.

Os níveis de proteína de SAV1 se mantiveram sem alteração nas linhagens, MDA-MB-231 e MCF-7, e o subtipo claudin-low, quando comparada normóxia e hipóxia. Para LumA, não teve dado de nível proteico de SAV1 nessas condições. (APÊNDICE A).

Somente a respeito das amostras LumA, o nível de metilação diminuiu em tumores em hipóxia, comparando com tumores em normóxia. No entanto, como foi mostrado e discutido anteriormente, a expressão gênica de *SAVI* também diminuiu em hipóxia, indicando que a metilação de DNA não contribui para diminuição dos níveis de mRNA de *SAVI*, nessas condições. Em contrapartida, a correlação entre metilação de DNA e expressão gênica de *SAVI* foi negativa e moderada, para o mesmo subtipo tumoral em normóxia, indicando que o mecanismo de metilação de DNA pode contribuir com a regulação da expressão gênica de *SAVI*, no subtipo LumA, em normóxia.

Além disso, somente as amostras claudin-low, assim como a linhagem análoga, MDA-MB-231, apresentaram seus níveis de expressão gênica de *CYR61* diminuídos em hipóxia, em comparação à normóxia, assim como os níveis de *SAVI* inalterados, não mostrando relação inversa com *SAVI*.

Em relação ao subtipo LumA e sua linhagem análoga MCF-7, os resultados de expressão gênica de *CYR61* e *CTGF* se mantiveram sem alteração, em hipóxia, quando comparados à normóxia.

Por fim, os níveis de mRNA e proteicos de SAV1 foram avaliados de acordo com estágio tumoral e status livre de doença, além disso foi feita análise de curva de sobrevida

relacionada à expressão gênica de *SAVI*, com o propósito de avaliar o potencial prognóstico da expressão de *SAVI* para o câncer de mama.

Os níveis de mRNA e proteico de *SAVI* diminuíram de maneira estágio dependente, enquanto que não foram alterados pelo status livre de doença. Além disso, a curva de sobrevida, associada à expressão de *SAVI*, mostrou que pacientes com maior nível de expressão gênica de *SAVI* tem mais probabilidade de sobrevivência do que pacientes com baixo nível, ou seja, menor nível de expressão gênica de *SAVI* diminuiu a probabilidade de sobrevivência ao câncer de mama. Os dados sugeriram um potencial prognóstico dos níveis de mRNA e proteico de *SAVI* para o câncer de mama, no qual baixa expressão de *SAVI* está associada a um pior prognóstico.

Nesse sentido, Wang et al. (2016) indicaram que baixo nível de proteína *SAVI* tende a se correlacionar com características clinicopatológicas desfavoráveis em pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático comparado com o perfil de alto nível proteico de *SAVI*, além de ser associado a menor taxa de sobrevivência global.

CONCLUSÃO

- a) 5-Aza-dC induz maior alteração inflamatória, a níveis moleculares, em microambientes normóxicos do que hipóxicos, usando a linhagem MDA-MB-231 como modelo;
- b) A metilação de DNA parece exercer um papel no controle da expressão gênica de *SAVI*, na linhagem MDA-MB-231, em hipóxia, e possivelmente em normóxia;
- c) A expressão gênica de *SAVI* pode estar inversamente associada à expressão gênica de alvos da via de Hippo e à agressividade, em linhagens de câncer de mama, MDA-MB-231 e MCF-7;
- d) Apesar da diminuição dos níveis de expressão e aumento da metilação de DNA de *SAVI*, observados nas amostras tumorais, em comparação às normais adjacentes, outros mecanismos de controle da expressão gênica, que não a metilação de DNA, podem estar controlando a expressão gênica de *SAVI*;
- e) A metilação de DNA pode contribuir com a regulação da expressão gênica de *SAVI*, no subtipo claudin-low;
- f) A metilação de DNA pode contribuir na regulação da expressão gênica de *SAVI*, no subtipo luminal A, em normóxia;
- g) *CYR61* e *CTGF*, genes alvo da via de Hippo, foram mais expressos no subtipo claudin-low, o que pode estar associado à maior agressividade e pior prognóstico desse subtipo;
- h) O menor nível de mRNA de *SAVI* em amostras do grupo hipóxia, quando comparadas às do grupo normóxia, sugere uma menor ação supressora tumoral em hipóxia do que em normóxia, e pode contribuir com o pior prognóstico associado à hipóxia tumoral;
- i) Os dados sugeriram o papel de *SAVI* como um supressor tumoral, no contexto do câncer de mama e um potencial prognóstico dos níveis de mRNA e proteico de *SAVI* para o câncer de mama, no qual baixa expressão de *SAVI* está associada a um pior prognóstico.

REFERÊNCIAS

- AEBERSOLD, D. M. et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. **Cancer research**, v. 61, n. 7, p. 2911–6, 2001.
- ALARCÓN, C. et al. Nuclear CDKs Drive Smad Transcriptional Activation and Turnover in BMP and TGF- β Pathways. **Cell**, v. 139, n. 4, p. 757–769, 2009.
- ALOKAIL, M.; ALENAD, A. Methylation of hippo pathway genes in bone, kidney, breast and prostate cancer cells. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, 2014.
- APPELHOFF, R. J. et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 37, p. 38458–65, 2004.
- APPLETON, K. et al. Phase I and pharmacodynamic trial of the DNA methyltransferase inhibitor decitabine and carboplatin in solid tumors. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 25, n. 29, p. 4603–9, 2007.
- ASHBURNER, M. et al. Gene ontology: Tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, p. 25–29, 2000.
- AZAD, N. et al. The future of epigenetic therapy in solid tumours--lessons from the past. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 10, n. 5, p. 256–266, 2013.
- BARTUCCI, M. et al. TAZ is required for metastatic activity and chemoresistance of breast cancer stem cells. **Oncogene**, v. 34, n. 6, p. 681–690, 2015.
- BAUMAN, J. et al. A phase I study of 5-azacytidine and erlotinib in advanced solid tumor malignancies. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 69, n. 2, p. 547–554, 2012.
- BAYLIN, S. B. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 2 Suppl 1, p. S4–11, 2005.
- BELINSKY, S. A. et al. Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer. **Cancer research**, v. 63, n. 21, p. 7089–93, 2003.
- BENDER, C. M.; ZINGG, J. M.; JONES, P. A. DNA methylation as a target for drug design. **Pharm Res**, v. 15, n. 2, p. 175–187, 1998.
- BERNSTEIN, B. E.; MEISSNER, A.; LANDER, E. S. The Mammalian Epigenome. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 669–681, 2007.
- BERRA, E. et al. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. **The EMBO journal**, v. 22, n. 16, p. 4082–90, 2003.

- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes and Development**, v. 16, n. 1, p. 6-21, 2002.
- BISWAS, M.; CHAN, J. Y. Role of Nrf1 in antioxidant response element-mediated gene expression and beyond. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 244, p. 16-20, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Brasília, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Atlas da mortalidade**. Brasília, 2017.
- BRENET, F. et al. DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.
- BRENNAN, K. et al. Intragenic ATM methylation in peripheral blood DNA as a biomarker of breast cancer risk. **Cancer Research**, v. 72, n. 9, p. 2304–2313, 2012.
- BUFFA, F. M. et al. Large meta-analysis of multiple cancers reveals a common, compact and highly prognostic hypoxia metagene. **British Journal of Cancer**, v. 102, p. 428–435, 2010.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of molecular endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 169–93, 2000.
- CALLUS, B. A.; VERHAGEN, A. M.; VAUX, D. L. Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. **FEBS Journal**, v. 273, n. 18, p. 4264–4276, 2006.
- CAMERON, E. E. et al. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer [In Process Citation]. **Nature genetics**, v. 21, n. 1, p. 103–107, 1999.
- CARBON, S. et al. AmiGO: Online access to ontology and annotation data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 2, p. 288-9, 2009.
- CARBON, S. et al. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D330–D338, 2019.
- CARMELIET, P. et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. **Nature**, v. 394, n. 6692, p. 485–90, 1998.
- CAYROL, C. et al. The THAP-zinc finger protein THAP1 regulates endothelial cell proliferation through modulation of pRB/E2F cell-cycle target genes. **Blood**, v. 109, n. 2, p. 584–594, 2007.

- CERAMI, E. et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 5, p. 401-4, 2012.
- CHAN, E. H. Y. et al. The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. **Oncogene**, v. 24, n. 12, p. 2076–2086, 2005.
- CHENG, J. C. et al. Preferential response of cancer cells to zebularine. **Cancer Cell**, v. 6, n. 2, p. 151–158, 2004.
- CHIAPPINELLI, K. B. et al. Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. **Cell**, v. 162, n. 5, p. 974-86, 2015.
- CORTEZ, C. C.; JONES, P. A. Chromatin, cancer and drug therapies. **Mutation research**, v. 647, n. 1-2, p. 44–51, 2008.
- CREUSOT, F.; ACS, G.; CHRISTMAN, J. K. Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 4, p. 2041–2048, 1982.
- CUI, H. et al. Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. **Science**, v. 299, p. 1753–1755, 2003.
- DAI, X. et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **American Journal of Cancer Research**, v. 5, n. 10, p. 2929–2943, 2015.
- DATTA, J. et al. A new class of quinoline-based DNA hypomethylating agents reactivates tumor suppressor genes by blocking DNA methyltransferase 1 activity and inducing its degradation. **Cancer Research**, v. 69, n. 10, p. 4277–4285, 2009.
- DEDEURWAERDER, S.; DESMEDT, C.; CALONNE, E. Largest ever DNA methylation dataset for breast cancer completed. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 11, n. 5, p. 470, 2011.
- DENEKAMP, J.; DASU, A. Inducible repair and the two forms of tumour hypoxia--time for a paradigm shift. **Acta oncologica (Stockholm, Sweden)**, v. 38, n. 7, p. 903–18, 1999.
- DIAS, K. et al. Claudin-low breast cancer; clinical & pathological characteristics. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0168669, 2017.
- DÍAZ-MARTÍN, J. et al. Nuclear TAZ expression associates with the triple-negative phenotype in breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 22, n. 3, p. 443–454, 2015.
- DÍEZ-VILLANUEVA, A.; MALLONA, I.; PEINADO, M. A. Wanderer, an interactive viewer to explore DNA methylation and gene expression data in human cancer. **Epigenetics and Chromatin**, v. 8, 2015.
- DONG, J. et al. Elucidation of a Universal Size-Control Mechanism in Drosophila and Mammals. **Cell**, v. 130, n. 6, p. 1120–1133, 2007.

DONNINGER, H. et al. Salvador protein is a tumor suppressor effector of RASSF1A with hippo pathway-independent functions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 21, p. 18483–18491, 2011.

ECKHARDT, F. et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. **Nature genetics**, v. 38, n. 12, p. 1378–85, 2006.

EDEN, A. et al. Chromosomal Instability and Tumors Promoted by DNA Hypomethylation. **Science**, v. 300, n. April, p. 2003, 2003.

EGGER, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 457–463, 2004.

EHMER, U.; SAGE, J. Control of Proliferation and Cancer Growth by the Hippo Signaling Pathway. **Molecular Cancer Research**, v. 14, n. 2, p. 127–140, 2016.

EVANS, I. C. et al. Epigenetic regulation of cyclooxygenase-2 by methylation of c8orf4 in pulmonary fibrosis. **Clinical Science**, v. 130, n. 8, p. 575–586, 2016.

EVANS, S. M.; KOCH, C. J. Prognostic significance of tumor oxygenation in humans. **Cancer letters**, v. 195, n. 1, p. 1–16, 2003.

FEINBERG, A P.; VOGELSTEIN, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. **Nature**, v. 301, n. 5895, p. 89–92, 1983.

FERRIGNO, O. et al. Yes-associated protein (YAP65) interacts with Smad7 and potentiates its inhibitory activity against TGF- β /Smad signaling. **Oncogene**, v. 21, n. 32, p. 4879–4884, 2002.

FORNES, O. et al. JASPAR 2020: Update of the open-Access database of transcription factor binding profiles. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D87–D92, 2020.

FRAGOMENI, S. M.; SCIAL LIS, A.; JERUSS, J. S. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 27, n. 1, p. 95-120, 2018.

FU, S. et al. Phase 1b-2a study to reverse platinum resistance through use of a hypomethylating agent, azacitidine, in patients with platinum-resistant or platinum-refractory epithelial ovarian cancer. **Cancer**, v. 117, n. 8, p. 1661–9, 2011.

GAO, J. et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. **Science Signaling**, v. 6, n. 269, p. p11, 2013.

GOFFIN, J.; EISENHAUER, E. DNA methyltransferase inhibitors-state of the art. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 13, n. 11, p. 1699–1716, 2002.

GOLDMAN, M. J. et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. **Nature Biotechnology**, v. 38, p. 675–678, 2020.

GORDAN, J. D. et al. HIF-2 α promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. **Cancer cell**, v. 11, n. 4, p. 335–47, 2007.

- GREENHOUGH, A. et al. Cancer cell adaptation to hypoxia involves a HIF-GPRC5A-YAP axis. **EMBO Molecular Medicine**, v. 10, p. e8699, 2018.
- HEIKKILA, M. et al. Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α variants in the hypoxia response. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 68, n. 23, p. 3885–901, 2011.
- HÉNINGER, E.; KRUEGER, T. E. G.; LANG, J. M. Augmenting antitumor immune responses with epigenetic modifying agents. **Frontiers in Immunology**, 2015.
- HONG, X. et al. Heparanase expression is associated with histone modifications in glioblastoma. **International Journal of Oncology**, v. 40, n. 2, p. 494-500, 2012.
- HOWARD, G. et al. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. **Oncogene**, v. 27, n. 3, p. 404–8, 2008.
- HUANG, K. T. et al. DNA methylation analysis of the HIF-1 α prolyl hydroxylase domain genes PHD1, PHD2, PHD3 and the factor inhibiting HIF gene FIH in invasive breast carcinomas. **Histopathology**, v. 57, n. 3, p. 451–460, 2010.
- HUNG, J.-J. et al. Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1 α , TWIST1 and Snail expression in resectable non-small cell lung cancer. **Thorax**, v. 64, n. 12, p. 1082–9, 2009.
- HUO, X. et al. Overexpression of Yes-associated protein confers doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma. **Oncology Reports**, v. 29, n. 2, p. 840–846, 2013.
- ILLINGWORTH, R. et al. A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. **PLoS Biology**, v. 6, n. 1, p. 0037–0051, 2008.
- JIANG, C.; PUGH, B. F. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. **Nature reviews. Genetics**, v. 10, n. 3, p. 161–172, 2009.
- JIANG, J. et al. SAV1 represses the development of human colorectal cancer by regulating the Akt-mTOR pathway in a YAP-dependent manner. **Cell Proliferation**, v. 50, n. 4, 2017.
- JIANG, Y. et al. MERTK mediated novel site Akt phosphorylation alleviates SAV1 suppression. **Nature Communications**, v.10, 2019.
- JOHNSON, R.; HALDER, G. The two faces of Hippo: Targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, p. 63–79, 2014.
- JONES, P. A. The DNA methylation paradox. **Trends in Genetics**, v. 15, n. 1, p. 34-37, 1999.
- JONES, P. A; LAIRD, P. W. Cancer epigenetics comes of age. **Nature genetics**, v. 21, n. 2, p. 163–167, 1999.

JONES, P. L. et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. **Nature genetics**, v. 19, n. 2, p. 187–191, 1998.

JÜTTERMANN, R.; LI, E.; JAENISCH, R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 25, p. 11797–801, 1994.

KANAI, F. et al. TAZ: A novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. **EMBO Journal**, v. 19, n. 24, p. 6778–6791, 2000.

KEITH, B.; JOHNSON, R. S.; SIMON, M. C. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 1, p. 9–22, 2012.

KIM, G. D. et al. Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. **EMBO Journal**, v. 21, n. 15, p. 4183–4195, 2002.

KIM, J. T. et al. Differential expression and tumorigenic function of neurotensin receptor 1 in neuroendocrine tumor cells. **Oncotarget**, v. 6, p. 26960-26970, 2015.

KOMURO, A. et al. WW domain-containing protein YAP associates with ErbB-4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxyl-terminal fragment of ErbB-4 that translocates to the nucleus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 35, p. 33334–33341, 2003.

KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693-705, 2007.

LAND, S. C.; TEE, A. R. Hypoxia-inducible factor 1 α is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 28, p. 20534–43, 2007.

LAPIDUS, R. G. et al. Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors. **Clin Cancer Res**, v. 2, p. 805–810, 1996.

LEE, Y. et al. Mammalian MST2 kinase and human Salvador activate and reduce estrogen receptor alpha in the absence of ligand. **Journal of Molecular Medicine**, v. 89, n. 2, p. 181–191, 2011.

LEI, Q.-Y. et al. TAZ Promotes Cell Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition and Is Inhibited by the Hippo Pathway. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 7, p. 2426–2436, 2008.

LI, H. et al. Immune regulation by low doses of the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacitidine in common human epithelial cancers. **Oncotarget**, v. 5, n. 3, p. 587–598, 2014.

- LI, L. C.; DAHIYA, R. MethPrimer: Designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**, v. 18, n. 11, p. 1427–1431, 2002.
- LI, X. et al. WW45, a Gli1 binding protein, negatively regulated Hedgehog signaling in lung cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 42, 2016.
- LIAN, I. et al. The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. **Genes and Development**, v. 24, n. 11, p. 1106–1118, 2010.
- LIAO, Y. et al. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W199–W205, 2019.
- LIU, C. Y. et al. The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF β -TrCPE3 ligase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 48, p. 37159–37169, 2010.
- LIU, Q. et al. Hypoxia induces genomic DNA demethylation through the activation of HIF-1 α and transcriptional upregulation of MAT2A in hepatoma cells. **Molecular cancer therapeutics**, v. 10, n. 6, p. 1113–1123, 2011.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, 2001.
- LONG, C. et al. Promoter hypermethylation of the RUNX3 gene in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer investigation**, v. 25, n. 8, p. 685–690, 2007.
- LUO, X. et al. hSav1 interacts with HAX1 and attenuates its anti-apoptotic effects in MCF-7 breast cancer cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 28, n. 3, p. 349–355, 2011.
- LUO, X. et al. The human WW45 protein enhances MST1-mediated apoptosis in vivo. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 23, n. 3, p. 357–362, 2009.
- MA, B. et al. Hypoxia regulates Hippo signalling through the SIAH2 ubiquitin E3 ligase. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 1, p. 95–103, 2015.
- MA, X. et al. Hypoxia-inducible factor 2 (HIF-2) promotes colon cancer growth by potentiating Yes-associated protein 1 (YAP1) activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 41, p. 17046–17056, 2017.
- MADEIRA, F. et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W636–W641, 2019.
- MAO, B. et al. Hippo signaling in stress response and homeostasis maintenance. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 47, p. 2-9, 2014.

- MARDIN, B. R. et al. Components of the Hippo pathway cooperate with Nek2 kinase to regulate centrosome disjunction. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 12, p. 1166–1176, 2010.
- MARIANI, C. J. et al. TET1-mediated hydroxymethylation facilitates hypoxic gene induction in neuroblastoma. **Cell Reports**, v. 7, n. 5, p. 1343–1352, 2014.
- MATALLANAS, D. et al. RASSF1A Elicits Apoptosis through an MST2 Pathway Directing Proapoptotic Transcription by the p73 Tumor Suppressor Protein. **Molecular Cell**, v. 27, n. 6, p. 962–975, 2007.
- MATSUURA, K. et al. Downregulation of SAV1 plays a role in pathogenesis of high-grade clear cell renal cell carcinoma. **BMC Cancer**, v. 11, 2011.
- MAUGERI-SACCÀ, M. et al. The Hippo transducers TAZ and YAP in breast cancer: Oncogenic activities and clinical implications. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, 2015.
- MESSEGUER, X. et al. PROMO: Detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. **Bioinformatics**, v. 18, n. 2, p. 333–334, 2002.
- MIN, B. et al. Identification of RUNX3 as a component of the MST/Hpo signaling pathway. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, n. 2, p. 839–849, 2012.
- MORINAKA, A. et al. Oligomeric peroxiredoxin-I is an essential intermediate for p53 to activate MST1 kinase and apoptosis. **Oncogene**, v. 30, n. 40, p. 4208–4218, 2011.
- MOULTON, T. et al. Epigenetic lesions at the H19 locus in Wilms' tumour patients. **Nature genetics**, v. 7, n. 3, p. 440–7, 1994.
- MURAI, M. et al. Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 3, p. 1021–1027, 2005.
- NAN, X. et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. **Nature**, v. 393, n. 6683, p. 386–389, 1998.
- OGATA, H. et al. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 1, p. 29–34, 1999.
- OGAWA, O. et al. Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. **Nature**, v. 362, n. 6422, p. 749–751, 1993.
- OKAMI, J.; SIMEONE, D. M.; LOGSDON, C. D. Silencing of the hypoxia-inducible cell death protein BNIP3 in pancreatic cancer. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5338–5346, 2004.
- OKANO, M. et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, n. 3, p. 247–257, 1999.

PENNACCHIETTI, et al. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. **Cancer cell**, v. 3, n. 4, p. 347–61, 2003.

PLIMACK, E. R.; KANTARJIAN, H. M.; ISSA, J.-P. Decitabine and its role in the treatment of hematopoietic malignancies. **Leukemia & lymphoma**, v. 48, n. 8, p. 1472–1481, 2007.

POHLMANN, P. et al. Phase II trial of cisplatin plus decitabine, a new DNA hypomethylating agent, in patients with advanced squamous cell carcinoma of the cervix. **American journal of clinical oncology**, v. 25, n. 5, p. 496–501, 2002.

POULIOT, M.-C. et al. The Role of Methylation in Breast Cancer Susceptibility and Treatment. **Anticancer research**, v. 35, n. 9, p. 4569–74, 2015.

PRASKOVA, M.; XIA, F.; AVRUCH, J. MOBKL1A/MOBKL1B Phosphorylation by MST1 and MST2 Inhibits Cell Proliferation. **Current Biology**, v. 18, n. 5, p. 311–321, 2008.

PRENDERGAST, G. C.; ZIFF, E. B. Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. **Science (New York, N.Y.)**, v. 251, n. 4990, p. 186–189, 1991.

RAINIER, S. et al. Relaxation of imprinted genes in human cancer. **Nature**, v. 362, n. 6422, p. 747–9, 1993.

RAMACHANDRAN, S. et al. Epigenetic therapy for solid tumors: Highlighting the impact of tumor hypoxia. **Genes**, v. 6, n. 4, p. 935–956, 2015.

RAWLUSZKO, A. A. et al. Expression and DNA methylation levels of prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, PHD3 and asparaginyl hydroxylase FIH in colorectal cancer. **BMC cancer**, v. 13, p. 526, 2013.

RAWŁUSZKO, A. A. et al. Prognostic potential of DNA methylation and transcript levels of HIF1A and EPAS1 in colorectal cancer. **Molecular cancer research : MCR**, v. 12, n. 8, p. 1112–27, 2014.

RAWŁUSZKO, A. A. et al. Effect of DNA methylation profile on OATP3A1 and OATP4A1 transcript levels in colorectal cancer. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 74, p. 233–42, 2015.

RAZIN, A.; SZYF, M. DNA methylation patterns. Formation and function. **Biochimica et biophysica acta**, v. 782, n. 4, p. 331–42, 1984.

RIGGS, A. D.; JONES, P. A. 5-methylcytosine, gene regulation, and cancer. **Advances in cancer research**, v. 40, p. 1–30, 1983.

ROBERTSON, K. D. DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. **Oncogene**, v. 21, n. 35, p. 5361–5379, 2002.

- RODRIGUEZ, J. et al. Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. **Cancer research**, v. 66, n. 17, p. 8462–9468, 2006.
- ROULOIS, D. et al. DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts. **Cell**, v. 162, n. 5, p. 961-73, 2015.
- ROUSSIGNE, M. et al. THAP1 is a nuclear proapoptotic factor that links prostate-apoptosis-response-4 (Par-4) to PML nuclear bodies. **Oncogene**, v. 22, n. 16, p. 2432–2442, 2003.
- SAITO, Y. et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. **Cancer cell**, v. 9, n. 6, p. 435–43, 2006.
- SANTINI, V.; KANTARJIAN, H. M.; ISSA, J. P. Changes in DNA methylation in neoplasia: Pathophysiology and therapeutic implications. **Annals of Internal Medicine**, 2001.
- SHAHRZAD, S. et al. Induction of DNA hypomethylation by tumor hypoxia. **Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society**, v. 2, n. June, p. 119–25, 2007.
- SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 27-36, 2009.
- SHI, P.; FENG, J.; CHEN, C. Hippo pathway in mammary gland development and breast cancer. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 47, n. 1, p. 53–9, 2015.
- SHINOZAKI, M. et al. Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 6, p. 2156–62, 2005.
- SKOWRONSKI, K. et al. Ischemia dysregulates DNA methyltransferases and p16INK4a methylation in human colorectal cancer cells. **Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society**, v. 5, n. 6, p. 547–56, 2010.
- SONG, M. et al. AKt as a therapeutic target for cancer. **Cancer Research**, v. 79, n. 6, p. 1019-1031, 2019.
- STRANO, S. et al. Physical Interaction with Yes-associated Protein Enhances p73 Transcriptional Activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 18, p. 15164–15173, 2001.
- SUBIK, K. et al. The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, KI-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 4, p. 35–41, 2010.

- SUNG BAE, J.; KIM, S. MI; LEE, H. The Hippo signaling pathway provides novel anti-cancer drug targets. **Oncotarget**, v. 8, n. 9, p. 16084–16098, 2015.
- SUZUKI, M. M.; BIRD, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. **Nature reviews. Genetics**, v. 9, n. 6, p. 465–76, 2008.
- SZYF, M. DNA methylation signatures for breast cancer classification and prognosis. **Genome medicine**, v. 4, n. 3, p. 26, 2012.
- TAKAHASHI, Y. et al. Down-regulation of LATS1 and LATS2 mRNA expression by promoter hypermethylation and its association with biologically aggressive phenotype in human breast cancers. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 4, p. 1380–1385, 2005.
- TAKAI, D.; JONES, P. A. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 6, p. 3740–5, 2002.
- TAN, E. Y. et al. Cytoplasmic location of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor is associated with an enhanced hypoxic response and a shorter survival in invasive breast cancer. **Breast cancer research : BCR**, v. 9, n. 6, p. R89, 2007.
- TEKPLI, X. et al. DNA methylation at promoter regions of interleukin 1B, interleukin 6, and interleukin 8 in non-small cell lung cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 62, n. 2, p. 337–345, 2013.
- THIENPONT, B. et al. Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity. **Nature**, v. 537, n. 7618, p. 63–68, 2016.
- TSUNODA, T.; TAKAGI, T. Estimating transcription factor bindability on DNA. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 15, n. 7-8, p. 622-630, 1999.
- TUFAIL, R. et al. Loss of Yes-associated protein (YAP) expression is associated with estrogen and progesterone receptors negativity in invasive breast carcinomas. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 131, n. 3, p. 743–750, 2012.
- URA, S. et al. Caspase cleavage of MST1 promotes nuclear translocation and chromatin condensation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 18, p. 10148–10153, 2001.
- VARELAS, X. et al. TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 7, p. 837–848, 2008.
- VASSILEV, A. et al. TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. **Genes and Development**, v. 15, n. 10, p. 1229–1241, 2001.
- VAUPEL, P.; HARRISON, L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. **The oncologist**, v. 9 Suppl 5, p. 4–9, 2004.

- WANG, J. et al. WebGestalt 2017: A more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W130–W137, 2017.
- WANG, L. et al. Expression profile and prognostic value of SAV1 in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, 2016.
- WANG, L. et al. Protein salvador homolog 1 acts as a tumor suppressor and is modulated by hypermethylation in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 38, p. 62953–62961, 2017.
- WANG, Y.; LEUNG, F. C. C. An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 20, n. 7, p. 1170–7, 2004.
- WANG, Y.; YU, A.; YU, F. X. The Hippo pathway in tissue homeostasis and regeneration. **Protein and Cell**, v. 8, n. 5, p. 349–359, 2017.
- WANG, Z. et al. Interplay of mevalonate and Hippo pathways regulates RHAMM transcription via YAP to modulate breast cancer cell motility. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 1, p. E89–E98, 2014.
- WATT, F.; MOLLOY, P. L. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. **Genes & development**, v. 2, n. 9, p. 1136–1143, 1988.
- WENGER, R. H.; STIEHL, D. P.; CAMENISCH, G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v. 2005, n. 306, p. re12, 2005.
- WIERZBICKI, P. M. et al. Underexpression of LATS1 TSG in colorectal cancer is associated with promoter hypermethylation. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 27, p. 4363–4373, 2013.
- WILSON, A. S.; POWER, B. E.; MOLLOY, P. L. DNA hypomethylation and human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1775, n. 1, p. 138–162, 2007.
- WON, G. W. et al. Mammalian Hippo kinase pathway is downregulated by BCL-2 via protein degradation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 512, n. 1, p. 87-92, 2019.
- WRANGLE, J. et al. Alterations of immune response of non-small cell lung cancer with azacytidine. **Oncotarget**, v. 4, n. 11, p. 2067–2079, 2013.
- WU, S. et al. The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. **Developmental cell**, v. 14, n. 3, p. 388–398, 2008.

YAGI, R. et al. A WW domain-containing Yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator. **EMBO Journal**, v. 18, n. 9, p. 2551–2562, 1999.

YAN, L.; CAI, Q.; XU, Y. Hypoxic conditions differentially regulate TAZ and YAP in cancer cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 562, p. 31–36, 2014.

YERSAL, O.; BARUTCA, S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 3, p. 412-24, 2014.

YOO, C. B.; JONES, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 1, p. 37–50, 2006.

YUAN, M. et al. Yes-associated protein (YAP) functions as a tumor suppressor in breast. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, n. 11, p. 1752–1759, 2008.

ZHANG, L. et al. The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. **Developmental cell**, v. 14, n. 3, p. 377–387, 2008.

ZHANG, X. et al. Yes-associated protein (YAP) binds to HIF-1 α and sustains HIF-1 α protein stability to promote hepatocellular carcinoma cell glycolysis under hypoxic stress. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 37, 2018.

ZHAO, B. et al. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF β -TRCP. **Genes and Development**, v. 24, n. 1, p. 72–85, 2010.

ZHAO, B. et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. **Genes & development**, v. 21, n. 21, p. 2747–61, 2007.

ZHAO, B. et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. **Genes and Development**, v. 22, n. 14, p. 1962–1971, 2008.

ZYGULSKA, A. L.; KRZEMIENIECKI, K.; PIERZCHALSKI, P. **Hippo pathway - brief overview of its relevance in cancer** *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2017.

APÊNDICE A - Comparação entre linhagem e subtipo tumoral análogo

Tabela 1 - Comparação entre linhagem e subtipo tumoral análogo

Análise	MDA-MB-231	MCF-7	claudin-low	Luminal A
mRNA <i>SAV1</i>	-	+	+	-
proteína <i>SAV1</i>	=	=	=	=
mRNA <i>CYR61/CTGF</i>	+	-	=	=
mRNA <i>SAV1</i> (N/H)	=	=	=	-
proteína <i>SAV1</i> (N/H)	=	=	=	
mRNA <i>CYR61</i> (N/H)	-	=	-	=
mRNA <i>CTGF</i> (N/H)	-	=	=	=

Legenda: A tabela mostra comparação entre linhagem e subtipo tumoral análogo, em relação à expressões gênica e proteica de *SAV1* e gênica de *CYR61* e *CTGF*. O destaque em vermelho (+) representa aumento na expressão, enquanto que o destaque em verde (-) representa diminuição na expressão. Lacunas descoloridas significam expressão inalterada. Lacuna destacada em cinza representa ausência de dado.

Fonte: o autor

APÊNDICE B – Dados produzidos e não exibidos

O presente trabalho fez várias tentativas para padronizar a transfecção de SAV1, tanto superexpressão quanto silenciamento, nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, no entanto, os resultados de confirmação da transfecção por Western blotting não foram satisfatórios. Caso a transfecção de SAV1 tivesse ocorrido de forma satisfatória, seu papel em linhagens de câncer de mama seria avaliado por ensaios de viabilidade celular por WST-1, migração por wound healing, invasão por ensaio de transwell e matrigel, apoptose/necrose e ciclo celular por citometria de fluxo. Alguns pilotos dos experimentos citados foram realizados, mas foram descartados.

APÊNDICE C – Trabalhos científicos em diferentes fases de elaboração

A presente tese gerou trabalhos científicos que estão em diferentes fases:

- 1) “5-Aza-2'-deoxycytidine induces a greater inflammatory change, at the molecular levels, in normoxic than hypoxic tumor microenvironment” – O manuscrito está em fase de submissão.
- 2) “The tumor suppressor role of scaffold protein salvador homolog 1 (hWW45): One Piece in Tumor Puzzle” – O manuscrito está finalizado e está sendo revisado pelo orientador para ser submetido.
- 3) “SAV1 tumor suppressor expression analysis in normoxia or hypoxia microenvironment and its association with poor prognosis in breast cancer” – O manuscrito está sendo elaborado pela aluna.