Universidade de São Paulo FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

"EMC1 contribui para a malignidade em células de câncer de mama"

Roberto Augusto Silva Molina

Tese de Doutorado a ser apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências: Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Enilza Maria Espreafico

RIBEIRÃO PRETO 2014

Ficha Catalográfica

Molina, Roberto Augusto Silva

"EMC1 contribui para a malignidade em células de câncer de mama", Ribeirão Preto, 2014.

107p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Espreafico, Enilza Maria.

1 - EMC1; 2 - KIAA0090; 3 - câncer de mama; 4 - invasão; 5 - EROs

FOLHA DE APROVAÇÃO

Roberto Augusto Silva Molina

"EMC1 contribui para a malignidade em células de câncer de mama"

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

Aprovado em: ___/__/

Banca Examinadora

Professora Dra. Maria Aparecida Nagai Instituição:

Assinatura:

Professora Dra. Mariana Kiomy Osako Instituição:

Assinatura: _____

Professor Dr. Guido Lenz

Instituição:

Assinatura: _____

Professor Dr. Wilson Araujo da Silva Júnior Instituição:

Assinatura: _____

Professora Dra. Enilza Maria Espreafico

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP

Assinatura: _____

Dedico esta dissertação aos meus pais, meus grandes alicerces, pelo amor incondicional, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo apoio em todas as circunstâncias e também às mulheres que sofrem com o câncer de mama.

Agradecimentos...

Primeiramente a **Deus**, que me concedeu o dom da vida, por iluminar meu caminho sempre me dando forças para lutar sem perder o ânimo.

À **Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico**, por me receber de portas abertas em seu laboratório, pela confiança depositada, por todo ensinamento e pela sua empolgação contagiante pela ciência.

Aos professores Dr. Roy Edward Larson, Dras. Constance Oliver, Maria Célia Jamur, Dr. Luis Lamberti, Dr. Dario Zamboni, Dra. Ângela Cruz e Dra. Maria Cristina Roque Barreira, pela disponibilidade, equipamentos e reagentes cedidos.

À **Silmara,** minha segunda mãe, amiga de todas as horas, por me aturar, por sua amizade e companheirismo em todos os momentos e por me socorrer sempre que precisei no laboratório. À **Benedita de Oliveira de Souza (Joana)**, por deixar tudo sempre limpo e organizado, pelo trabalho competente, pelo apoio e carinho, e pelas longas conversas no café.

À técnica e amiga **Roberta Ribeiro** pelas discussões no trabalho, pelo auxílio fundamental na microscopia e pela sua competência como pessoa e como profissional.

Ao **Dr. Rui Reis** e a **Dra. Viviane Aline** do Hospital do Câncer de Barretos por ceder gentilmente as células tumorais de mama.

Á **Dra. Dirce Maria Carraro**, **Dra. Elisa Napolitano** e **Dra. Vanina Elias** do AC Camargo Cancer Center por toda ajuda nos ensaios de expressão gênica em amostras de tumores, pela confiança depositada e por abrir as portas de seu laboratório. Obrigado pelo carinho e tamanha ajuda em São Paulo.

Ao **Dr. Daniel Tiezzi** e ao **Heriton Ribeiro** do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP, pela contribuição fundamental neste trabalho, sobretudo nos ensaios de tumorigênese in vivo, obrigado pela disposição e prontidão em nos ajudar.

À **Dra. Luciane Alberici** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP ao **Dr. Leonardo Silveira** da Faculdade de Educação Física de Ribeirão Preto/USP, por abrir as portas de seus laboratórios e por toda ajuda prestada com os ensaios de metabolismo e também ao **Lucas Bomfim** pela magnífica ajuda com as dosagens de lactato.

À **Dra. Andreia Machado Leopoldino** e ao **Dr. Thiago Cunha** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pelos anticorpos gentilmente cedidos. À **Dra. Lusiane Bendhack** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto por ceder gentilmente a sonda DHE e pela ajuda fundamental do **Bruno Rodrigues da Silva** nos experimentos.

À **Carmen Lucia** pela ajuda e discussões com experimentos de migração e invasão e ao **Lucas Goedert** pelo apoio fundamental com as análises de bioinformática.

Ao Alexandre Neves pela total disposição e ajuda com os camundongos sempre que precisei, obrigado por sua amizade e por esses anos que passamos em Ribeirão Preto.

Aos amigos do laboratório Cibele, Anelisa, Antônio, Cleidson, Carmen, Rui, Rodrigo, Cristiano, Mariani, Lucas, Ana Paula, Denise e Johnny, por toda nossa convivência durante este período, pelos ensinamentos e momentos compartilhados.

Aos demais amigos do Departamento de Biologia Celular e Molecular, pela troca de conhecimentos, pelo tradicional cafezinho após o almoço, pelos churrascos e por todos os momentos inesquecíveis que passamos juntos.

Aos técnicos do departamento: Waldir, Sandra, Izilda, Carol, Silvinha, Tuca, Tereza, Tânia, Mara e Anderson, por todo apoio prestado. Em especial ao Domingos pelo apoio constante no biotério, à Vani pela excelência na histologia e à Carol Kobori e ao Prof. Dr. Jorge Moreira por todo preparo e suporte com a microscopia eletrônica.

Às secretárias do departamento **Lúcia e Camila** e à secretária da pósgraduação **Gabriela Zamoner** pela paciência e pelos serviços prestados.

A meus pais **Roberto e Maria José**, a meu irmão **Rafael** e à minha avó **Geralda Ferreira**, meus verdadeiros alicerces, que mesmo distantes sempre estiveram presentes, me incentivando e dando forças para seguir em frente.

À FAPESP (proc. 2010/11812-8), Capes, CNPq, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos por fornecerem todo o suporte financeiro e de infraestrutura para que essa tese fosse realizada. E enfim a todos aqueles que vibraram juntos de forma sincera pela realização e conquista deste trabalho, meu muito obrigado!!

"Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos."

Isaac Newton

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MODELO DA PROGRESSÃO TUMORAL DO CÂNCER DE MAMA
FIGURA 2. MODELO ESQUEMÁTICO REPRESENTATIVO DA ESTRUTURA TOPOLÓGICA DOS COMPONENTES DO COMPLEXO EMC EM MAMÍFEROS
FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOMÍNIOS ESTRUTURAIS PREDITOS PARA EMC1
FIGURA 4. A ALTA EXPRESSÃO DE EMC1 CORRELACIONA-SE COM O CARCINOMA DE MAMA INVASIVO 40
FIGURA 5. ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS CONHECIDAS E PREDITAS NA PLATAFORMA STRING.
FIGURA 6. EMC1 POSSUI ALTA EXPRESSÃO EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA CONSIDERADAS MAIS AGRESSIVAS
FIGURA 7. CONFIRMAÇÃO DAS LINHAGENS GERADAS SUPEREXPRESSANDO EMC1
FIGURA 8. TAXA DA PROLIFERAÇÃO NA LINHAGEM MCF-7
FIGURA 9. A SUPEREXPRESSÃO DE EMC1 LEVA À ALTERAÇÕES NO CITOESQUELETO DE ACTINA
FIGURA 10. A SUPEREXPRESSÃO DE EMC1 CONDUZ AUMENTO NA CAPACIDADE PROLIFERATIVA E CLONOGÊNICA DAS CÉLULAS SKBR-3
FIGURA 11. A SUPEREXPRESSÃO DE EMC1 AUMENTOU A CAPACIDADE MIGRATÓRIA DAS CÉLULAS SKBR-3 IN VITRO
FIGURA 12. A SUPEREXPRESSÃO DE EMC1 AUMENTOU A CAPACIDADE INVASIVA DAS CÉLULAS
FIGURA 13. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE EMC1 EM AMOSTRAS DE TUMORES DE MAMA
FIGURA 14. A SUPEREXPRESSÃO DE EMC1 DIMINUI O CONSUMO DE OXIGÊNIO PELAS CÉLULAS TUMORAIS 55
FIGURA 15. A SUPEREXPRESSÃO DE EMC1 PODE LEVAR A UMA REPROGRAMAÇÃO DO METABOLISMO ENERGÉTICO DAS CÉLULAS
FIGURA 16. A SUPEREXPRESSÃO DE EMC1 AUMENTOU O POTENCIAL TUMORIGÊNICO DAS CÉLULAS SKBR-3
FIGURA 17. ANÁLISES HISTOLÓGICAS EM TUMORES EXCISADOS DE CAMUNDONGOS
FIGURA 18. PADRÃO DE EXPRESSÃO DE ALGUMAS MOLÉCULAS ASSOCIADAS À INVASÃO TUMORAL
FIGURA 19. MODELO ESQUEMÁTICO REPRESENTATIVO DO PAPEL DESEMPENHADO POR EMC1 NA INDUÇÃO DE UM FENÓTIPO MALIGNO

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUÇÃO	2
1.1 Aspectos epidemiológicos do câncer de mama	2
1.2 Aspectos moleculares do câncer de mama	3
1.3 Metabolismo energético e câncer	9
1.4 A descoberta do complexo EMC (Endoplasmic Reticulum Membr	ane
<i>Complex</i>) e envolvimento de EMC1 com o câncer	13
II. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
III. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Cultivo celular e estabelecimento de linhagens estáveis expressando EMC1	22
3.2 Transfecção por lipofectamina	22
3.3 Dosagem proteica	23
3.4 SDS-PAGE	23
3.5 Western blot	24
3.6 Anticorpos primários e secundários utilizados neste trabalho	25
3.7 Extração de RNA	26
3.8 Transcrição reversa	27
3.9 PCR em tempo real (qPCR)	27
3.10 Imunocitoquímica	28
3.11 Ensaio de proliferação celular	29
3.12 Ensaio Clonogênico	29
3.13 Ciclo celular	30
3.14 Wound healing	30
3.15 Ensaio de crescimento independente de ancoragem (soft-ágar)	31
3.16 Ensaio de invasão	31

3.17	Zimografia	32
3.18	Medida da respiração celular	32
3.19	Dosagem de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	33
3.20	Dosagem de lactato	33
3.21	qPCR em amostras tumorais de pacientes	34
3.22	Análises de bioinformática	35
3.2 3.2 3.2	 22.1 Análise de correlação de expressão gênica	
3.23	Tumorigênese	36
IV. RES	SULTADOS	39
4.1	Análises de bioinformática: EMC1 integra uma potencial rede de proteínas	

com participação em vias de sinalização importantes para a manutenção de um	
fenótipo maligno	39
4.2 A alta expressão de EMC1 está associada a linhagens tumorais de mama mais	
agressivas e sua superexpressão favorece a sustentação de vias proliferativas em	
células da linhagem SKBR-3	43
4.3 EMC1 contribui para atividade invasiva do câncer de mama	50
4.4 Evidências de que EMC1 induz maior malignidade em células da linhagem	
SKBR-3 através da reprogramação de seu metabolismo energético	54
4.5 EMC1 contribui também para uma maior malignidade em tumor xenográfico	
de mama	58

V. DISCUSSÃO	62
5.1 EMC1 integra uma rede de interações gênicas que contribui para aumento da	
atividade migratória e invasiva do câncer de mama	62
5.2 EMC1 aumenta o potencial invasivo e tumorigênico através da reprogramação	
do metabolismo energético: relação entre hipóxia, EROs e transição epitélio-	
mesenquimal	72

VI. CONCLUSÃO	 	 81

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
---------------------------------	----

RESUMO

Molina, R. A. S. **"EMC1 contribui para a malignidade em células de câncer de mama".** Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), Ribeirão Preto, 2014.

O câncer de mama é uma das principais causas de morte por câncer em mulheres em todo o mundo, apresentando-se como uma doença heterogênea composta por distintos subtipos associados a diferentes prognósticos clínicos, mas as bases moleculares que sustentam sua progressão tumoral ainda não estão completamente elucidadas. Evidências de estudos em larga escala apontam uma potencial participação da proteína EMC1 no desenvolvimento do câncer de mama, mas falham em avaliam seu papel específico na progressão e manutenção deste tipo de tumor. EMC1 faz parte de um complexo definido por dez proteínas presente no retículo endoplasmático denominado Endoplasmic Reticulum Membrane Complex, caracterizado recentemente com potencial papel no enovelamento e maturação de proteínas de membrana e na via secretória. Investimos deste modo na caracterização de EMC1 e no seu envolvimento com o câncer de mama. Utilizando um pequeno painel de linhagens tumorais de mama, mostramos por meio de qPCR que os níveis de RNAm de EMC1 estavam aumentados em linhagens consideradas mais agressivas. Duas linhagens tumorais de mama, MCF-7 e SKBR-3 foram utilizadas para expressão estável de EMC1 mediada pelo vetor plasmidial pcDNA3.1. Os efeitos foram notáveis apenas para a linhagem SKBR-3, que apresenta amplificação no locus HER-2, um receptor do tipo tirosina quinase da família EGFR envolvido em vias de invasão e proliferação celular. Observamos uma nítida alteração morfológica após a superexpressão de EMC1 nesta linhagem, sugerindo uma reprogramação para um fenótipo mesenguimal. As células adquiriram filopódios mais proeminentes e mostraram aumento em sua capacidade proliferativa e crescimento clonogênico, sob condições adesivas ou não, bem como aumento nas capacidades invasiva (transwell) e migratória (wound healing). Análises do ciclo celular por iodeto de propídeo indicaram um ligeiro aumento nas populações celulares nas fases S e G2/M em células superexpressando EMC1, corroborando os ensaios funcionais. Notamos também após a superexpressão de EMC1 um aumento na liberação de MMP-2, justificando o aumento na capacidade invasiva destas células. Os resultados dos ensaios funcionais comprovam as análises in silico realizadas nas quais identificamos uma correlação da expressão de EMC1 com proteínas envolvidas em funções no retículo endoplasmático e no processo de transição epitélio-mesenquimal. Avaliamos ainda o metabolismo celular quanto a funções mitocondriais como consumo de oxigênio utilizando um oxígrafo e quanto a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) através da marcação por DHE. A superexpressão de EMC1 levou à diminuição da respiração, ou seja, no consumo de oxigênio e também da produção de EROs, ao passo que os níveis de lactato foram aumentados, características associadas a maior malignidade de células tumorais de mama. Por fim, mostramos através de ensaio de tumorigênese in vivo utilizando camundongos nude que a superexpressão de EMC1 conduziu a formação de tumores mais agressivos e de maior volume. Em conjunto os dados sugerem um importante papel de EMC1 na progressão tumoral do câncer de mama, sobretudo na transição para estágios mais invasivos, servindo como potencial marcador diagnóstico e alvo para terapias futuras.

ABSTRACT

Molina, R. A. S. "EMC1 contributes to breast cancer cells malignancy". Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), Ribeirão Preto, 2014.

Breast cancer is a leading cause of cancer death in women worldwide. It presents as a heterogeneous disease composed of distinct subtypes associated with different clinical prognoses, but the molecular basis underlying their tumor progression are not yet fully comprehended. Evidence from large-scale studies suggests a potential involvement of EMC1 protein in the development of breast cancer, but fail to assess its specific role in the progression and maintenance of this type of tumor. EMC1 is part of a protein complex composed of ten different subunits associated to the endoplasmic reticulum (ER) and recently proposed to play a potential role in the folding and maturation of membrane proteins in the secretory pathway. Thus, our aim here was to do a functional characterization of EMC1 in breast cancer. Using a small panel of breast cancer cell lines, we showed higher EMC1 mRNA expression levels in the most aggressive cell lines, by qPCR. Two breast tumor cell lines, MCF -7 and SKBR -3 were used for stable expression of EMC1 mediated by the plasmidial vector pcDNA3.1. The effects were remarkable only for the SKBR-3 cell line, which carries an amplification of the HER-2 locus, a tyrosine kinase receptor of the EGFR family, involved in cell proliferation and invasion. We observed a clear morphological change after overexpression of EMC1 in this cell line, suggesting a reprogramming to a mesenchymal phenotype. The cells acquired more prominent filopodia and showed an increase of their proliferative capacity and clonogenic growth upon adhesive and non-adhesive conditions, as well as an increase of invasive (collagencoated transwell) and migratory (wound healing) properties. Analysis of the cell cycle by propidium iodide showed a slight increase in the cell population in S phase and G2/M for EMC1-overexpressing cells, corroborating other functional assays. Also, EMC1-overexpressing cells showed an increase in the release of MMP-2, which could explain the increase in the invasive capacity of these cells. The results of the functional assays confirm the in silico analysis performed in which we identified a correlation between the EMC1 expression with proteins involved in functions in the endoplasmic reticulum and in the epithelial-mesenchymal transition. We also evaluated the cellular metabolism and mitochondrial functions such as oxygen consumption using an oxygraph and the generation of reactive oxygen species (ROS) with DHE dye. Overexpression of EMC1 led to decreased respiration, i.e. oxygen consumption and also ROS production whereas lactate was increased, characteristics associated with increased malignancy of breast tumor cells. Finally, we show through in vivo tumorigenesis assay using nude mice that overexpression of EMC1 led to formation of more aggressive tumors. Together the data suggest an important role of EMC1 in tumor progression of breast cancer, especially in the transition to more invasive stages, serving as a potential prognostic marker and target for future therapies.

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos do câncer de mama

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que o câncer afeta cerca de 8 milhões de pessoas por ano em todo o mundo e representa aproximadamente 13% do total de mortes. Esta mortalidade é projetada em aumento contínuo com uma estimativa de 9 milhões de mortes em 2015 e 11,4 milhões em 2030. À exceção do câncer de pele do tipo não melanoma destacamse os cânceres de pulmão, de mama, colo-retal e de próstata como os mais incidentes em todo o mundo (Siegel *et al.*, 2014).

O câncer de mama por sua vez é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres do globo, tanto em países desenvolvidos quanto em países subdesenvolvidos, sendo a principal causa de morte por câncer em mulheres, atingindo um percentual de 20%, o que representa a segunda causa de morte por câncer em países desenvolvidos, atrás apenas do câncer de pulmão (Ferlay et al., 2013). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), cerca de 1,67 milhões de novos casos de câncer de mama foram esperados para o ano de 2012 em todo o mundo, representando 25% de todos os tipos de câncer diagnosticado nas mulheres (INCA, 2014). O instituto ainda aponta o envelhecimento, o estilo de vida, o uso de terapias hormonais, o consumo de álcool e histórico familiar como os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama. As estimativas são de que em 2020 aumente 29% o número de novos casos de câncer de mama em países desenvolvidos ao passo que para países em desenvolvimento a taxa esperada é de 73%, como resultado do envelhecimento populacional, urbanização e mudanças nos hábitos alimentares, compreendendo 15 milhões de novos casos. No Brasil, as estimativas do INCA para o ano de 2014, válidas também para 2015, indicam a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer, reforçando a magnitude do problema do câncer no país, onde o câncer de mama desponta em terceiro lugar no ranking com aproximadamente 57 mil casos, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2014).

Apesar dos significativos avanços em diagnóstico e tratamento, alguns problemas clínicos e científicos ainda permanecem e estão relacionados a fatores como prevenção, ou seja, quem a necessita e quando; a um melhor diagnóstico em termos de métodos mais sensíveis e específicos de detecção; em relação à progressão e recorrência tumoral, isto é, quais as causas e como predizê-las; no que diz respeito ao tratamento, quem e como deve ser tratado, e por fim, superar a barreira da resistência terapêutica (Polyak *et al.*, 2007).

1.2 Aspectos moleculares do câncer de mama

O câncer origina-se do acúmulo de alterações genética e epigenéticas no DNA ao longo do tempo tendo como resultado o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos podendo espalhar-se para outras regiões do corpo, culminando na formação de tumores ou neoplasias malignas (Hanahan; Weinberg, 2000). O câncer de mama por sua vez apresenta-se como uma doença altamente heterogênea e multifacetada do ponto de vista molecular, composta por distintos subtipos associados a diferentes prognósticos clínicos.

O epitélio glandular mamário é composto de lóbulos e ductos que consistem basicamente de duas linhagens epiteliais: as células luminais e as mioepeiteliais, sendo que tamanha heterogeneidade encontrada no câncer de mama resulta em uma diversidade inter e intratumoral, cuja base apoia-se nas

hipóteses das células tronco tumorais e da evolução clonal (Stingl e Caldas, 2007). Os autores ressaltam que além de progenitores multilinhagens já foram também identificados progenitores restritos mioepiteliais e luminais, como por exemplo, células do lúmen que expressam mucina-1, sugerindo que o câncer de mama pode então iniciar-se a partir de diferentes tipos celulares, como células-tronco epiteliais mamárias ou de sua progênie (células amplificadoras transientes ou células já acometidas com a diferenciação).

A caracterização de aberrações cromossômicas, mutações e perfil de expressão gênica têm mostrado que a tumorigênese de mama não progride necessariamente de maneira linear passo-a-passo, mas Polyak e colaboradores (2007) propuseram um modelo esquemático para ilustrar a progressão tumoral do câncer de mama a partir de um epitélio mamário normal (Fig. 1). Um ducto de mama sadio é composto por uma membrana basal e por uma camada de células epiteliais e mioepiteliais formando o lúmen. As células que compõem o estroma incluem vários leucócitos, fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais. Na fase de carcinoma *in situ*, as células mioepiteliais são alteradas fenotípica e epigeneticamente, e seu número é reduzido em razão da degradação da membrana basal, enquanto nota-se um aumento no número de fibroblastos do estroma, miofibroblastos, linfócitos e de células endoteliais. A perda de células mioepiteliais juntamente com o rompimento da membrana basal caracteriza a fase de carcinoma invasivo, em que as células tumorais podem invadir tecidos vizinhos e eventualmente migrar para órgãos mais distantes, levando à metástase.



Figura 1. Modelo da progressão tumoral do câncer de mama (Adaptado de Polyak et al., 2007).

Castro *et al.* (2008) apresentaram evidências de que durante a progressão do câncer de mama ductal, alterações moleculares ocorrem nas células antes das alterações morfológicas. Utilizando microdissecação a laser para captura específica de células epiteliais do tumor e *arrays* de DNA os autores identificaram 147 genes diferencialmente expressos entre amostras de carcinoma mamário ductal puro e do componente *in situ* de lesões coexistentes com o carcinoma ductal invasivo. Neste estudo os genes LOX e SULF-1 mostraram potencial envolvimento na transformação maligna do carcinoma ductal *in situ*, sugerindo que as células do componente *in situ* exibem alterações moleculares que as permitem invadir tecidos vizinhos antes que alterações morfológicas na lesão se tornem visíveis. No entanto, apesar dos avanços recentes as bases moleculares que sustentam a progressão tumoral do câncer de mama ainda não estão completamente elucidadas, pela intricada variabilidade que o câncer de mama apresenta e pela falta de marcadores que definem a passagem de uma etapa para outra (Malhorta *et al.*, 2010).

Graças ao uso combinado de plataformas tecnológicas e extensivos conjuntos de perfis de expressão gênica de tumores advindos de estudos realizados em larga escala permitindo a identificação de mutações subtipo específicas e mudanças no número de cópias de alguns genes, foi possível estabelecer cinco principais subtipos de tumores de mama: o tipo basal, luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e o tipo *normal-like* (Perou *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2006; Sorlie *et al.*, 2006). Mais recentemente, um novo subtipo classificado como "baixa claudina" foi também identificado (Malhotra *et al.*, 2010). A caracterização destes subtipos tumorais pode ser feita ainda na fase de carcinoma *in situ*, o que confirma o uso de distintas vias de progressão tumoral para cada subtipo de tumor, sendo que tais alterações irão refletir nos resultados clínicos e na resposta a tratamentos (Polyak *et al.*, 2007).

Um dos primeiros genes cuja perda ou mutação foi associada com o câncer de mama foram BRCA1 e BRCA2, que estão diretamente envolvidos em mecanismos de reparo no DNA, sendo genes considerados supressores tumorais. Estima-se que cerca de 5-10% dos tumores de mama ocorram em indivíduos que herdaram mutações altamente penetrantes nestes genes (Claus *et al.*, 1991; Easton *et al.*, 1995; Schubert *et al.*, 1997). Tumores associados à perda de BRCA1 apresentam ainda mutações somáticas nos genes *PTEN* e *TP53*, sendo que a perda de *PTEN* é o primeiro evento mais comum e está associado ao subtipo basal, enquanto que na maioria dos tumores luminais mutações ocorrem primeiramente em *TP53*, sendo raramente detectadas mutações em *PIK3CA* (Martins *et al.*, 2012). Outro gene comumente associado a mal prognóstico, comportamento tumoral agressivo e resistência à terapia é o receptor 2 do fator de crescimento epidermal (HER-2/neu), que é encontrado amplificado em 20-30%

dos carcinomas mamários (Slamon *et al.*, 1989). O gene HER-2, também conhecido como ErbB-2, codifica uma proteína transmembrana que é ativada por ligantes ou parceiros transmoduladores, que coopera com outras proteínas da sua família formando uma complexa rede de sinalização que regula o crescimento celular, diferenciação e sobrevivência (Yarden, 2012). Vale ainda ressaltar que Jiao e colaboradores (2012) identificaram novas mutações somáticas com potencial impacto na função proteica envolvidas com o câncer de mama. Dentre estes genes estão *ADAM12, CENTB1, CENTG1, DIP2C, GL11, GRIN2D, HDLBP, IKBKB, KPNA5, NFKB1, NOTCH1* e *OTOF,* componentes das vias de sinalização de Notch, NF-kB, PI3K e Hedgehog, evidenciando o envolvimento destas vias de sinalização no desenvolvimento do câncer de mama.

O estágio metastático por sua vez é o aspecto mais pobremente compreendido do câncer de mama devido à falta de ferramentas efetivas necessárias para compreender a complexidade da rede de sinalização que dirige as várias etapas da cascata metastática (Blanco; Kang, 2011). Um dos principais mecanismos moleculares que contribui para o processo metastático é a transição epitélio-mesenquimal (TEM), uma estratégia adotada pelas células tumorais que consiste basicamente de uma reprogramação celular definida pela perda das características epiteliais e aquisição de um fenótipo mesenquimal, em resposta à expressão e repressão de genes específicos. O processo consiste em uma cadeia de eventos que se inicia a partir de alterações nas junções célula-célula e no citoesqueleto levando a aumentos na motilidade e na capacidade invasiva das células (Foroni *et al.*, 2012). Este processo é orquestrado por um conjunto de fatores de transcrição que atuam de forma pleiotrópica e inclui Snail, Slug, Zeb1/2 e Twist (Hanahan; Weinberg, 2011).

Yang *et al.* (2004) mostraram que um dos reguladores-chave do processo metastático, também conhecido por ser o principal regulador da morfogênese embrionária, é o fator de transcrição *Twist*, cuja alta expressão está correlacionada com o carcinoma de mama lobular invasivo. Os autores mostraram ainda que a expressão ectópica de *Twist* resultou na perda de adesão celular mediada por E-caderina, ativação de marcadores mesenquimais e indução de motilidade celular, sugerindo que este gene contribui no processo metastático por promover TEM. Recentemente, a partir de uma abordagem de expressão gênica utilizando *micro arrays*, foi mostrado o envolvimento de novos genes tais como *FST*, *LTBP1*, *KRT19*, *KRT5*, *KRT6A*, *FGFBP1* e *TFP1*, que apresentaram estreita relação entre si e que sugerem uma rede molecular que poderia contribuir para a regulação da TEM de modo específico no câncer de mama (Minafra *et al.*, 2008).

Sumariamente, muitos trabalhos têm identificado alterações na expressão de genes, mas muito dos mecanismos que sustentam as vias de sinalização envolvendo estes genes ainda permanece obscuro. Polyak *et al.* (2007) afirma que a chave para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais racionais e preventivas reside na identificação de genes e vias bioquímicas envolvidas no processo de tumorigênese. Como consequência, a caracterização de moléculas envolvidas na progressão do câncer de mama motivou uma substancial quantidade de trabalhos na última década de modo a estabelecer um padrão de assinatura de expressão gênica na busca por diagnósticos mais precisos e tratamentos mais eficazes (Olopade *at al.*, 2008).

1.3 Metabolismo energético e câncer

Hanahan e Weinberg (2000) propuseram que os tumores humanos possuem seis capacidades adquiridas durante seu desenvolvimento, que denominaram de marcas características do câncer, que inclui a sustentação de uma sinalização proliferativa, evasão de supressores tumorais, resistência à morte celular, habilitação da imortalidade replicativa, indução de angiogênese e ativação de invasão e metástase. Este conceito foi evoluído uma década mais tarde em que duas novas marcas características foram inseridas: a evasão do sistema imune e a reprogramação do metabolismo energético (Hanahan; Weinberg, 2011). Os autores salientam que o aumento na taxa proliferativa da célula tumoral que é a essência da doença neoplásica, envolve não somente o descontrole da proliferação, mas também ajustes no metabolismo da glicose de modo a suprir o crescimento e a divisão celular.

A ideia de que o câncer é em parte uma desordem metabólica foi sugerida pela primeira vez na década de 1920 por Warburg e colaboradores (1924), sendo um fenômeno muito bem reconhecido e estudado nos dias de hoje. Warburg (1930) mostrou que mesmo na presença de oxigênio as células tumorais podem reprogramar seu metabolismo energético limitando-o á glicólise, caracterizando um estado de glicólise aeróbica, que foi posteriormente denominada de "efeito Warburg". O aumento na captação e utilização de glicose tem sido documentado para vários tipos de tumores e é um processo que envolve principalmente a alta regulação de transportadores de glicose, principalmente GLUT1, que aumenta substancialmente a importação de glicose para o citoplasma (Jones; Thompson, 2009).

Estudos recentes têm mostrado que oncogenes e supressores tumorais conhecidos regulam também algumas enzimas de vias biosintéticas e bioenergéticas, dentre as quais muitas se mostram com um papel crucial na iniciação e progressão do câncer como genes da via de PI3K e AKT (Semenza, 2010). De acordo com Marín-Hernández e colaboradores (2011) a glicólise pode ser ainda a principal, e talvez única, fonte geradora de energia sob condições nas quais a função mitocondrial está ausente ou diminuída, tal como nos estágios iniciais da progressão tumoral onde predominam condições de hipóxia e ausência de vasculatura. Nessas condições, o sistema de resposta à hipóxia atua pleiotropicamente levando a um aumento de expressão dos transportadores de glicose e de múltiplas enzimas da via glicolítica, aumentando também os níveis dos fatores de transcrição HIF-1a e HIF-2a. O fator HIF-1a por sua vez ativa a transcrição de mais de 100 genes que estão envolvidos em aspectos cruciais da biologia do câncer como invasão, angiogênese, metabolismo de glicose e sobrevivência celular, e, por outro lado, leva à inibição do ciclo de Krebs por aumentar a expressão da piruvato desidrogenase quinase-1, uma enzima que diminui a disponibilidade de piruvato e lactato desidrogenase-A, acarretando um aumento na conversão de piruvato à lactato (Koh et al., 2008).

Do ponto de vista funcional, a eficiência da produção de ATP pela via glicolítica (~4 mol de ATP/mol de glicose) é muito baixa comparada à fosforilação oxidativa mitocondrial (~36 mol de ATP/ mol de glicose), mas há uma razão lógica por trás da opção preferencial das células tumorais pelo uso desta via. Uma célula normal tem a capacidade de bloquear uma atividade proliferativa aberrante por meio de um refinado sistema de controle que permite a ingestão de nutrientes apenas quando ela é estimulada por fatores de crescimento, mesmo que estes

nutrientes estejam disponíveis além das necessidades celulares. A célula tumoral, no entanto, supera a dependência de fatores de crescimento pela aquisição de mutações genéticas que alteram funcionalmente a sinalização de receptores, ativando constitutivamente a ingestão de nutrientes, principalmente glicose. Desta maneira, o aumento da glicólise observado nas células tumorais permite o desvio de intermediários glicolíticos para vias biosintéticas, que por sua vez facilitam a biossíntese de macromoléculas e organelas necessárias para a sustentação da atividade proliferativa das células (Vander-Heiden *et al.*, 2009). O papel essencial da glicólise na proliferação celular é fortalecido por observações experimentais que revelou que a proliferação de células normais e tumorais é inibida quando elas são colocadas em meio deficiente em glicose com alta concentração de fontes alternativas de energia, ou tratadas com 2-deoxiglicose, um análogo da glicose não metabolizável. No entanto, os mecanismos pelos quais essas células evadem a inibição da glicólise induzida pela presença de oxigênio não estão ainda definidos (Fox *et al.*, 2005).

Ahmad e colaboradores (2005) afirmam que a ativação da glicólise aeróbica parece ter um propósito não só de sustentar a atividade proliferativa da célula, mas também de protegê-la contra a morte celular induzida por espécies reativas de oxigênio (EROs), produzidas principalmente na mitocôndria. O papel e a sinalização mediada por EROs em câncer têm sido um assunto discutido exaustivamente e ainda apresenta-se como um grande paradoxo. A produção de EROs teria um papel pró-tumoral uma vez que o estresse oxidativo gerado pela alta produção de EROs pode levar à mutações no DNA e desta forma desempenharia um importante papel na iniciação do processo tumoral. Ao mesmo tempo a formação de EROs resulta em apoptose e morte celular das células

tumorais (Waris; Ahsan, 2006). Em uma elegante revisão sobre o tema, Afanas'ev (2011) aponta que podem existir diferentes origens possíveis para explicar os efeitos contraditórios de EROs em câncer. As duas principais espécies reativas de oxigênio geradas, o ânion superóxido (O_2^{-}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), participam da sinalização mediada por EROs, mas atuam em vias diferentes. Sawada e colaboradores (2001), por exemplo, mostraram que o superóxido induziu apoptose em células de glioma humano enquanto que o peróxido de hidrogênio não apresentou nenhum efeito. Há ainda evidências de que células de câncer de mama consideradas com maior potencial maligno são caracterizadas por apresentar uma produção de EROs reduzida (Xing *et al.*, 2008).

Em resumo, o metabolismo energético desponta como um tópico emergente na biologia do câncer, e a complexa conexão existente entre metabolismo e proliferação permanece ainda como uma área excitante de investigação com muitas lacunas a serem preenchidas. A inibição do fluxo glicolítico tem sido considerada uma estratégia alternativa para o tratamento de diferentes tipos de tumores, mas um ponto crucial é a definição de vias restritas de controle das enzimas que atuam nas células normais e tumorais, uma vez que ambas possuem um conjunto semelhante de enzimas glicolíticas, justificando muitos dos efeitos colaterais derivados da falta de especificidade de algumas drogas utilizadas atualmente no tratamento do câncer que têm como alvo a via glicolítica (Marín-Hernández *et al.*, 2011).

1.4 A descoberta do complexo EMC (*Endoplasmic Reticulum Membrane Complex*) e envolvimento de EMC1 com o câncer

Em uma interessante revisão de Tsai e Weissman (2010) os autores mostram que o retículo endoplasmático (RE) é uma organela essencial envolvida em muitas funções celulares, incluindo o enovelamento e secreção de proteínas, biossíntese de lipídeos e homeostase do cálcio. O RE regula ainda a biossíntese de colesterol e outros lipídeos da membrana e desempenha um papel vital no controle de qualidade da célula através da extração e degradação de proteínas que não são enoveladas corretamente ou associadas em seus complexos nativos. Este processo, conhecido degradação associada retículo como ao endoplasmático (ERAD) assegura que somente as proteínas corretamente enoveladas alcançarão seu destino final. Os autores ainda ressaltam que o retículo endoplasmático pode sofrer variadas formas de estresse que perturbam sua função levando ao acúmulo de proteínas mal enoveladas em seu interior. As células tentam superar esse estresse na busca por restaurar a homeostase do retículo endoplasmático ativando uma integrada via de transdução de sinal conhecida como resposta à proteínas mal enoveladas (UPR), que envolve a ativação de três proteínas transmembranas principais residentes no retículo: PERK, ATF6 e IRE1. Por outro lado, o estresse crônico no retículo endoplasmático está sendo cada vez mais reconhecido como um fator responsável por muitas doenças humanas como diabetes. desordens neurodegenerativas e inclusive o câncer.

A UPR por sua vez está intimamente relacionada com a biologia dos tumores, uma vez que proteínas associadas a esta resposta como GRP78 e XBP1 mostram-se altamente expressas em regiões isquêmicas do tumor e em células submetidas à hipóxia *in vitro* (Shuda *et al.*, 2003). Liu e colaboradores

(2009) apontam que células de tumores que crescem rapidamente lidam com um microambiente extremamente hostil, caracterizado por hipóxia, privação de nutrientes, acidose e interações não permissivas com as células do estroma e da matriz extracelular, condições que levam à ativação de UPR que, por sua vez, desempenha um importante papel na sobrevivência das células tumorais. Os autores mostram ainda que células deficientes ou depletadas para XBP-1, um fator de transcrição que induz a expressão de muitas chaperonas e genes envolvidos em ERAD, apresentam uma produção de EROs mais intensa e prolongada ativação de p38.

Jonikas e colaboradores (2009) identificaram centenas de genes em S. cerevisae atuando no retículo endoplasmático e caracterizaram sistematicamente suas interdependências funcionais medindo os níveis de UPR em duplos mutantes, por meio de uma abordagem de arrays genéticos sintéticos utilizando a UPR como um sensor endógeno da célula. Neste estudo os autores revelaram múltiplos fatores conservados que são críticos para o enovelamento de proteínas no retículo endoplasmático incluindo uma dependência íntima da via secretória, com destaque para um complexo definido por seis proteínas (EMC1-EMC6), denominado Endoplasmic Reticulum Membrane Complex (EMC), apresentando assim a primeira caracterização funcional e evidências da existência deste complexo. Bircham e colaboradores (2011) corroboram os achados anteriores determinando ainda que deleções em qualquer um dos componentes deste complexo em levedura causam a errônea localização da proteína de membrana plasmática MRH1P no retículo endoplasmático, sugerindo que o complexo EMC atuaria no transporte de proteínas durante os primeiros passos da via secretória, mostrando ainda que duplos mutantes para membros deste complexo e HAC1,

que desempenha um papel central na UPR, mostraram-se hipersensíveis ao estresse de retículo induzido por tunicamicina.

Mais recentemente Christianson e colaboradores (2012) investigaram a organização funcional do sistema ERAD em mamíferos utilizando uma estratégia a nível sistêmico que integra proteômica, genômica funcional e resposta transcricional ao estresse de retículo. Essa abordagem revelou em mamíferos a existência do mesmo complexo citado anteriormente, sendo agora nomeado mEMC (*mammalian* EMC), definido no entanto por dez subunidades proteicas (Fig. 2), ao passo que em leveduras o complexo é formado por apenas seis proteínas. Os autores mostram ainda a interação deste complexo com as proteínas UBAC2 e DERLIN-2 envolvidas na maquinaria de ERAD, sugerindo uma estreita relação entre o complexo mEMC e componentes desta via de degradação implicados no reconhecimento por ubiquitina e translocação de proteínas.

Interessantemente, Louie e colaboradores (2012) mostraram um papel do complexo EMC nos primeiros passos da via secretória atuando na biossíntese do receptor de membrana CTFR (regulador de condutância transmembrana da fibrose cística), independentemente de qualquer associação com a indução de UPR, sugerindo que os componentes deste complexo podem atuar de maneira independente além de suas funções previamente estabelecidas. Richard e colaboradores (2013) também mostraram em *C. elegans* a importância do complexo EMC na biossíntese de receptores nicotínicos.



Figura 2: Modelo esquemático representativo da estrutura topológica predita dos componentes do complexo EMC em mamíferos. Nota-se que os componentes EMC2, EMC8 e EMC9 são citosólicos e se associam aos outros componentes do complexo, enquanto os demais se apresentam como proteínas transmembranas residentes no retículo endoplasmático.

Nosso caracterização da proteína EMC1, interesse na notada anteriormente em bases de dados públicas como KIAA0090 (RefSeq NM_015047), se deu durante uma abordagem de expressão diferencial desenvolvida em nosso laboratório, no projeto de doutorado de Josane de Freitas Sousa em que foram selecionados fragmentos ORESTES (Open Reading Frames ESTs) gerados pelo Projeto Genoma Humano do Câncer que alinham em regiões cromossômicas nas quais rearranjos são frequentemente associados com melanoma e outros tipos de tumores. Utilizando dot blots contendo 137 fragmentos ORESTES que mapeiam nas regiões cromossômicas 1p36, 1p11-12 e 1q21, foram detectados, e posteriormente confirmados por Northern blot, quatro genes diferencialmente expressos em linhagens de melanoma metastático, dentre eles EMC1 (dados não mostrados). Esse gene está localizado no cromossomo 1 (1p36.13) e possui 4253pb divididos em 23 éxons, codificando uma proteína de 993 resíduos de aminoácidos com massa molecular predita de 111,8kDa, que não apresenta similaridade com outras proteínas humanas. A proteína é altamente conservada, sendo encontrada em todas as espécies de eucariotos.

Através de análises *in silico* a partir de consultas no banco de dados do NCBI (www.ncbi.nlh.gov), Gene Card (http://www.genecards.org), ECGene (http://genome.ewha.ac.kr/ECgene) e pelo programa PSORT II (http://psort.nibb.ac.jp) foi possível predizer a estrutura linear de domínios da proteína que é ilustrada a seguir:



Figura 3 Representação esquemática dos domínios estruturais preditos para EMC1: peptídeo sinal (PS); repetição WD40-like; região rica em serina (RRS); sítio de fosforilação de tirosina (Y); zíper de leucina (ZL); um sinal de localização nuclear RKPR (SLN); domínio DUF1620; motivo dileucina (LL); um sinal de endereçamento mitocondrial (Mts) e um domínio transmembrana (TM). Os números em parênteses representam os aminoácidos correspondentes aos domínios da proteína.

EMC1 apresenta um peptídeo sinal (SP) na porção amino, que define se a proteína é secretada ou parte integralmente da membrana; ainda na porção Nterminal apresenta um sinal de endereçamento mitocondrial (não indicado no esquema), importante no direcionamento de pré-proteínas para a mitocôndria; um domínio altamente conservado de repetições WD40-like, indicativo de participação na transdução de sinais, regulação da transcrição, controle do ciclo celular ou apoptose; sítio de fosforilação de tirosina (Y) e uma região rica em serina (RRS) que são sítios de fosforilação e glicosilação; zíper de leucina (ZL), que é uma sequência envolvida na dimerização de proteínas, presente em proteínas ligantes de DNA com função em regulação da transcrição; sinal de localização nuclear (SLN) usado para importação de proteínas ao núcleo celular através do poro nuclear; DUF1620, domínio conservado de função desconhecida; motivo dileucina (LL), envolvido na distribuição de proteínas do trans-Golgi para lisossomo e internalização de proteínas e um domínio transmembrana (TM).

A associação da superexpressão de EMC1 com o câncer já foi demonstrada em diversos estudos de larga escala, dentre os quais podemos citar Wachi et al. (2005), que compararam células de câncer de pulmão com células pulmonares normais e Gebhard et al. (2006), comparando células de leucemia mielóide com monócitos normais. Valsesia e colaboradores (2011) realizaram um elegante estudo em escala genômica utilizando diversas plataformas tecnológicas combinadas no qual identificaram alterações no número de cópias de alguns genes, revelando vias comumente alteradas no melanoma metastático. Nesta abordagem EMC1 foi identificado dentre os genes alterados em três linhagens de melanoma metastático comparadas a melanócitos normais. Evidências prévias em nosso laboratório utilizando abordagens de silenciamento gênico também apontam um importante papel de EMC1 na progressão do melanoma (dados não publicados). Contudo, ainda que o melanoma seja o principal foco de estudo em nosso laboratório, muitas evidências de estudos em larga escala baseados em análises globais de expressão gênica apontam o envolvimento de EMC1 com o câncer de mama (Hedenfalk et al., 2001; Dettling et al., 2005; Creighton et al., 2006; Bhatti et al., 2010), mas falham em avaliar seu papel específico no desenvolvimento e manutenção deste tipo de tumor. Neste contexto direcionamos nossa abordagem para estudos funcionais tendo como modelo o câncer de mama, na tentativa de elucidar o papel de EMC1 na progressão do tumor mamário.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho consistiu em avaliar os efeitos da superexpressão de EMC1 em células de câncer de mama por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*, na busca de elucidar seu papel na progressão tumoral do câncer de mama.

2.2 Objetivos Específicos

- Geração de linhagens de câncer de mama superexpressando estavelmente EMC1;

- Análises funcionais dos efeitos da superexpressão de EMC1 nas linhagens tumorais de mama MCF-7 e SKBR-3.

- Análise *in vivo* do potencial tumorigênico de células tumorais de mama superexpressando EMC1.

MATERIAL E MÉTODOS

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo celular e estabelecimento de linhagens estáveis expressando EMC1

As linhagens de mama normais (Hb4a e MCF-10a) e tumorais (MCF-7, MCF-7/AZ, SKBR-3, MDA-MB231, MDA-MB465, BT20, Hs587T, T47D) utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo Dr. Rui Reis do Hospital do Câncer de Barretos e cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. As linhagens MCF-7 e SKBR-3 foram utilizadas para o estabelecimento de culturas expressando EMC1 de forma constitutiva. Estas duas linhagens foram transfectadas com a construção pcDNA3.1-EMC1 gerada em nosso laboratório (Lopes, 2007) utilizando lipofectamina. Como controle foi utilizado o vetor pcDNA3.1 contendo a sequência de EMC1 clonada de forma invertida, também disponível em nosso laboratório, de modo a não transcrever nenhum produto funcional. Decorridas 48h de transfecção as células foram selecionadas com 1mg/ml de G418 por uma semana e o pool de células resistentes foi mantido com 500µg/ml de G418. As células foram expandidas e submetidas à análise por qPCR e *western blot*.

3.2 Transfecção por lipofectamina

Para cada poço (placa de 6 poços) 2,5µg de DNA plasmidial foi diluído em 500µl de meio Opti-MEM e misturado gentilmente. Adicionou-se 5µl de lipofectamina e incubou-se a solução por 30 minutos à temperatura ambiente para formação do complexo, que foi posteriormente gotejado sobre a cultura celular. Decorridas 24h de transfecção, o meio de cultivo foi reposto por meio fresco.

3.3 Dosagem proteica

A dosagem das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA (1mg/mL) como padrão. Todas as determinações foram feitas em duplicatas. As curvas-padrões foram obtidas por dosagem, também em duplicata, de BSA nas quantidades de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10µg. A absorbância das amostras foi lida em 595nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas das amostras foi inferida a partir da curva obtida por regressão linear dos valores para os padrões.

3.4 SDS-PAGE

As células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e lisadas com 100µL de tampão de amostra 5x (Tris 225mM, SDS 7,5%, glicerol 1%; azul de bromofenol 1% e β-mercaptoetanol 25%) para a obtenção do lisado celular total. O lisado total foi ressuspendido 20 vezes em seringa de 1ml e depois fervido à 100°C por 5 minutos. O perfil eletroforético protéico foi analisado por SDS-PAGE em mini-géis constituídos de um gel de empilhamento (5%) (Tris 0,125M pH6,8; acrilamida/Bis 4,8%; SDS 0,1%; persulfato de amônia 0,06%; azul de bromofenol 1%; TEMED 0,1% e H20) e um gel de separação de poliacrilamida 12% (Tris 0,37M pH8,8; acrilamida/Bis 12%; SDS 0,1%; persulfato de amônia 0,06%; TEMED 0,1% e H20). Para a corrida da eletroforese foi utilizado o tampão de eletrodo (Tris 25 mM; glicina 187 mM e SDS 0,1%), com amperagem inicial de 15 mA, passandose para 20 mA após a entrada das amostras no gel de separação. Ao final da corrida os géis de verificação foram corados com Comassie Blue *R-250* 0,25% (Sigma) em ácido acético 10% e 40% metanol e descorados com a solução descorante (etanol 40%; ácido acético glacial 10% e H2O 50%).

3.5 Western blot

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas por eletroforese por 5 horas com 50 volts a 4º C para uma membrana de nitrocelulose (BioRad), utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25mM; glicina 0,2mM e metanol 20%). Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau 0,5% em ácido tricloroacético (TCA) 3% por 15 minutos e lavada com água para remover o excesso de corante. Antes da imunomarcação os sítios inespecíficos foram neutralizados com solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em TBS/T [Tris 20mM, NaCl 137mM pH7,5 e Tween-20 0,1% (V/V)]) sob agitação contínua por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, o anticorpo primário foi adicionado à membrana, diluído em 5% de BSA em TBS-T, que ficou incubada overnight a 4°C. A membrana foi lavada 4 vezes por 5 minutos em TBS/T, sob agitação contínua à temperatura ambiente para retirada do anticorpo primário não ligado. Foi acrescentado então, o anticorpo secundário policional anti-IgG de coelho ou camundongo, conjugado a peroxidase (Promega) diluído 1:10.000 em TBS/T, e a membrana foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação. Para a retirada do anticorpo secundário não ligado, a membrana foi lavada 4X de 5 minutos em TBS/T, sob agitação contínua à temperatura ambiente. A revelação do anticorpo ocorreu em câmara escura. A membrana foi banhada com soluções caseiras de ECL (Enhanced chemiluminescence) solução [0,11M Tris/HCL pH8,5; 2,78mM Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4l phythalazinedione free acid-Sigma-Aldrich), 0,44mM ácido p-cumárico (Sigma-Aldrich); 98,4% H₂O)] e solução II (0,02% H₂O₂; 0,1M Tris/HCL pH8,5; 89,9% H₂O) na proporção 1:1 por 1 minuto. A revelação foi realizada em sistema automatizado ImageQuant LAS 4000 (GE).
3.6 Anticorpos primários e secundários utilizados neste trabalho

- MMP-2 (Abbiotec #250752) 1:500
- β1-integrina (BD #610468) 1:5.000
- OXPHOS (Mitosciences #MS604) 1:250
- ERK1/2-total (Cell Signaling #9107) 1:2.000
- ERK1/2-fosforilado (Cell Signaling #4377) 1:1.000
- α-tubulina (Sigma #T6074) 1:5.000
- β-tubulina (Sigma #T4026) 1:5.000
- γ-tubulina (Sigma #T6557) 1:10.000
- HIF-1α (Abcam #ab16066) 1:2.000
- β-catenina /armadillo (Santa Cruz #15806) 1:200

 - anticorpo cabra anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 488 (Molecular Probes), utilizado na diluição 1:350;

 - anticorpo cabra anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 594 (Molecular Probes), utilizado na diluição 1:350;

 - anticorpo cabra anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 594 (Molecular Probes), utilizado na diluição 1:350;

 marcador nuclear DAPI (Dihidrocloreto de 4',6 diamino-2-fenilindol – Molecular Probes), utilizado na concentração de 2µg/mL);

- Texas Red-Faloidina (Molecular Probes) utilizado na diluição de 1:100;

- anticorpo policional de cabra anti IgG de camundongo conjugado a HRP (*Horse Radish Peroxidase, Promega*) utilizado na diluição de 1:5000;

- anticorpo policional de cabra anti IgG de coelho conjugado a HRP (*Horse Radish Peroxidase, Promega*) utilizado na diluição de 1:10.000;

3.7 Extração de RNA

A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente Trizol (Invitrogen). O meio de cultura foi retirado do frasco e foi acrescentado 1mL de Trizol para cada 10 cm² de diâmetro da placa de cultivo celular pelo tempo necessário para que as células fossem lisadas. O material foi transferido para um tubo de centrífuga de 15mL no qual foi acrescentado 0,2mL de clorofórmio para cada 1mL de trizol utilizado, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. Em seguida, o material foi deixado em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente. Depois, o material foi centrifugado a 6.500xg por 5 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante incolor foi transferido para outro tubo de centrífuga no qual foi acrescentado igual volume de fenol hidratado e de clorofórmio isoamílico (49:1), agitando-se vigorosamente por 15 segundos, em seguida, o material foi centrifugado a 6.500xg por 5 minutos, em centrífuga refrigerada. O sobrenadante incolor foi transferido para outro tubo de centrífuga no qual foi acrescentado igual volume de isopropanol gelado. O material foi mantido no freezer a -20°C por 18 horas para permitir a precipitação do RNA. Posteriormente, o material foi centrifugado a 6.500xg por 40 minutos em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi desprezado, sendo acrescentados 2 mL de etanol 75% ao *pellet* e, o material foi centrifugado a 6.500xg por 30 minutos; esse passo foi repetido mais uma vez, para garantir que o RNA estivesse livre de contaminação com os reagentes usados na extração. Após a segunda lavagem com etanol 75%, o sobrenadante foi desprezado e o tubo ficou sobre a bancada aberto por alguns minutos para permitir a secagem do *pellet*. O RNA foi diluído em 30 µL de água tratada com DEPC (Dietil Pirocarbonato – Sigma), sendo armazenado a - 80°C. A quantificação do RNA foi feita no espectrofotômetro *Biophotometer* (Eppendorf).

3.8 Transcrição reversa

Utilizamos nesta reação o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Foi transferido um volume contendo 1µg de RNA total tratado com DNase para um tubo de microcentrífuga e o volume foi ajustado para 10µL com H₂O tratada com DEPC. O RNA foi misturado a 2µL do tampão de reação (10X) da transcriptase reversa, suplementado com 0,8µL do mix de dNTPs (25X), 1µL de oligo (dT) 25 (250 ng/µL), 1µL de inibidor de RNAse, 2µL de *random primer* (10X) e 1µL da enzima multiscrib RT, com volume final de 20µL. A reação foi incubada a 25° C por 10 minutos, 37° C por 2 horas e a transcriptase reversa foi inativada por aquecimento a 85° C por 5 segundos.

3.9 PCR em tempo real (qPCR)

Utilizamos para o ensaio de PCR em tempo real o equipamento 7500 Applied Biosystems. Optamos pela utilização do agente intercalante SYBR Green. As seqüências dos *primers* utilizados neste ensaio são descritas a seguir:

EMC1	S – 5' GATCAAGACTACGCCAAGGT 3'	AS – 5' GAAGAAGATGGAAGGGGCA 3'
HER-2	S – 5' AGCATGTCCAGGTGGGTCT 3'	AS – 5' CTCCTCCTCGCCCTCTTG 3'
TBP	S – 5' GAGCTGTGATGTGAAGTTTCC 3'	AS – 5' TCTGGGTTTGATCATTCTGTAG 3'

Como controle endógeno utilizamos a quantificação do transcrito do gene TBP (TATA binding protein). Realizamos a reação de PCR em tempo real para a análise das expressões dos transcritos dos genes KIAA0090, HER-2, GRP78 e CHOP em nossas amostras. Utilizamos 2 µL de cDNA diluído 20 vezes como DNA molde para a reação. Foram adicionados 2,5 µM de cada iniciador e 6 µL do tampão de amplificação *SYBRGreen PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*). Depois de aquecidas a 95° C por 10 minutos, as amostras foram submetidas à seguinte condição de amplificação:

Número de ciclos	Desnaturação	Acoplamento e Extensão
40 ciclos	94° C por 15 segundos	60° C por 1 minuto

Ao final da amplificação adicionamos uma curva de dissociação. Para tal, as amostras foram submetidas às seguintes condições de temperatura:

Número de ciclos	Desnaturação	Acoplamento e Extensão	Desnaturação
1 ciclo	94° C por 15	60° C por 20 segundos	94° C por 15 segundos
	segundos		

A análise dos dados obtidos foi realizada com os valores do *Cycle Threshold* (Ct). O Ct foi convertido em expressão relativa de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Utilizamos o valor de Ct do transcrito do gene TBP (controle endógeno) para normalização e a amostra de melanócito foi usada como amostra de referência.

3.10 Imunocitoquímica

Para o ensaio de imunocitoquímica as células foram lavadas com PBS préaquecido a 37°C e fixadas com paraformaldeído 2% (SIGMA) e EGTA 50mM em PBS por 20 min a 37°C. Após a fixação, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,3% por 15 min à temperatura ambiente e então submetidas a três lavagens de 5 min em PBS. Os aldeídos livres formados no processo de fixação foram bloqueados com Glicina 250 mM (SIGMA) em PBS, por 5 min. Em seguida as células foram lavadas 2 vezes de 5 min com PBS. Os sítios inespecíficos foram então bloqueados com BSA 1% em PBS (solução de bloqueio) durante 1h à temperatura ambiente. Após o bloqueio as células foram incubadas por 1h à temperatura ambiente com o anticorpo primário devidamente diluído em solução de bloqueio. As lamínulas foram submetidas a 5 lavagens de 5 min com PBS e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com radical fluorescente, diluído em solução de bloqueio contendo o corante DAPI (Molecular Probes) para marcação nuclear. As células foram posteriormente submetidas a 5 lavagens de 5min com PBS. As lamínulas foram montadas sobre lâminas com a solução de montagem *Fluoromount G* (*Electron Microscopy Sciences*) e selagem com esmalte cosmético. As lâminas de imunocitoquímica foram observadas e documentadas em microscópio confocal (Leica SP5) e armazenadas a 4°C.

3.11 Ensaio de proliferação celular

Foram plaqueadas 5.000 células em quintuplicata em placas de 96 poços. As análises foram realizadas nos tempos de 24h, 48h, 72h, 96h e 120h. Para o ensaio o meio foi retirado e os poços foram lavados com 200µL PBS 1X, seguindo-se fixação das células com 100µL etanol 70% por 10 minutos, e posteriormente adição de 40µL de cristal violeta 0,5% por 30 minutos. Após esse período, os poços foram lavados por 5x com 200µL de água Milli-Q e foi adicionado 100µL de ácido acético 10% para a lise celular. As células ficaram incubadas por 30 minutos e a absorbância (540nm) foi analisada utilizando o leitor de placas (PowerWave, microplate scanning spectrophotometer-Biotech Incorporation).

3.12 Ensaio Clonogênico

As células foram transferidas para placas de 60mm (600 células/placa) e cultivadas por 10 dias a 37°C, 5% de CO₂. Após este período, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído e coradas com cristal violeta 2% em etanol 0,2% para visualização das colônias. As colônias foram fotografadas e contadas no software ImageJ para determinar a porcentagem de clonogenicidade.

3.13 Ciclo celular

As células foram lavadas duas vezes com 1ml de PBS/EDTA 0,5mM (50ml PBS 1X + 50µl EDTA 0,5M pH 8,0) e posteriormente fixadas com 350µl de etanol absoluto gelado e mantidas a -20°C por 16h. As células foram então centrifugadas por 8 minutos a 2.000 rpm e ressuspendidas em 125µl de PBS/EDTA. As células foram tratadas com 25µl de RNAse 10µg/ml e incubadas por 30 minutos a 37°C. O volume final foi completado para 500µl com PBS/EDTA e então adicionado 0,2µg/ml de iodeto de propídeo, sendo as células mantidas à temperatura ambiente por 15 minutos. Os dados foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCanto (BD Bioscience), no Laboratório de Citometria de Fluxo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, e analisados pelo programa ModFit LT, desconsiderando as células que estivessem agregadas (*doblets* ou *triplets*).

3.14 Wound healing

Para analisar a migração celular usando o ensaio de *wound healing*, 9x10⁴ células foram plaqueadas em placas de 24 poços e no dia seguinte, uma vez atingida a confluência, foram mantidas por 24h na ausência de soro. O risco foi feito através da monocamada confluente utilizando uma ponteira estéril de 200µl. Cada poço foi então lavado três vezes com PBS para remoção das células soltas e dos restos celulares; as células foram então incubadas em meio sem soro para inibir a proliferação sem afetar a migração. Fotos das células invadindo o espaço criado com a pipeta foram capturadas em períodos pré-determinados através de microscopia invertida de contraste de fase com a objetiva de 4x (microscópio Leica). A porcentagem da área invadida foi medida com auxílio do software ImageJ e os dados foram plotados em um gráfico.

3.15 Ensaio de crescimento independente de ancoragem (soft-ágar)

Em placas de 6 poços, foi semeado 1 mL de solução de ágar 0,5% (Sigma), denominada camada acelular, que foi incubado a 4º C por 10 minutos. Após contagem, 5.000 células foram misturas a 1mL de solução de ágar 0,35% (diluído em DMEM 10%) e semeado sobre a camada acelular. Após a solidificação da camada celular, foi adicionado 1mL de meio DMEM 10%. O meio foi trocado a cada três dias por meio fresco. As colônias foram fotografadas utilizando-se sistema de Lupa Leica 165C e as colônias contadas e medidas utilizando o software ImageJ. Os dados obtidos foram analisados no software GraphPad Prisma 5.

3.16 Ensaio de invasão

Para realizar o ensaio de invasão em matriz de colágeno, utilizou-se placas de cultura e *inserts transwell* (BD Lifescience) recobertos com colágeno tipo IV extraídos da cauda de rato, que foi cedido gentilmente pelo Dr. Antônio Cláudio Tedesco da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Uma suspensão de 10⁵ células para cada condição foi plaqueada na porção superior do *insert* em meio DMEM sem soro. Na porção inferior foi adicionado 500µL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Incubou-se por 20 horas em estufa contendo 5% de CO2. Após o período de incubação, os *inserts* foram lavados em um novo poço contendo PBS. Prosseguiu-se com a limpeza da porção superior do *insert* para a retirada das células que não alcançaram a face externa da membrana. Para tanto, utilizou-se algodão umedecido e gentilmente promoveu-se a limpeza seguida de outra lavagem com PBS. Após a lavagem, as células foram fixadas com metanol absoluto por 20 minutos a -20°C. As membranas foram dos *inserts* foram coradas com cristal violeta. Para a

quantificação, foram adquiridas imagens de cinco campos aleatórios por membrana. As células presentes nas imagens foram contadas e os dados plotados em um gráfico. Os dados obtidos foram analisados por teste t de Student considerando-se significativos os valores com P<0.05.

3.17 Zimografia

O meio condicionado contido no interior dos insertos após os tempos de invasão foram coletados e centrifugados a 10.000xg durante 5 minutos a 4°C para a remoção dos debris celulares. Foram utilizados 25µg de proteínas totais do sobrenadante de cada condição diluídos em tampão de amostra sem β-mercaptoetanol, em géis de poliacrilamida 10% com 0,1% de gelatina. A eletroforese foi realizada a 4°C, 80v constantes durante 3 horas. Após resolução das amostras em gel de poliacrilamida com gelatina, o gel foi lavado 2X com Triton X-100 2.5% durante 30 minutos para cada lavagem e incubado durante 16-20 horas a 37°C com (50 mM Tris–HCl pH 7.6, 0.2M NaCl, 5mM CaCl2, 0.2% (v/v) Brij-35). Passado o período de incubação o gel foi corado com Comassie Blue R-250 e descorado com acido acético: metanol: água para a visualização de bandas claras de atividade das gelatinases. A intensidade das bandas foi mensurada pelo software Image J.

3.18 Medida da respiração celular

Um suspensão contendo 10⁶ células diluídas em 100µL do tampão de incubação (0.3M sucrose, 10mM TES, 10mM KCI, 2mM MgSO4, 5mM KH2PO4, 0.1% (w/v) BSA, 2µM EGTA, pH 7.5) foi submetida ao Oxígrafo-2k (Oroboros, Innsbruck, Austria) a 25°C em 2ml do mesmo tampão. Como substrato foram utilizados malato (5mM) e glutamato (10mM) para estimular a respiração. Em

seguida 800µM de ADP foi adicionado para medir a respiração dependente de ADP. Foi adicionado posteriormente 5µM de oligomicina como inibidor da ATP sintase para medir o consumo de oxigênio devido à atividade desacopladora e o ionóforo carbonil cianida *m*-clorofenil hidrazona (CCCP) foi utilizado na concentração de 2µM para determinar o consumo máximo de oxigênio.

3.19 Dosagem de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

A quantificação dos níveis de EROs foi aferida baseando-se na fluorescência da sonda dihidroetidina (DHE). As culturas de SKBR-3 (controle e superexpressora) foram ressuspensas por 20 min com 2,5µmol/L da sonda DHE (excitada com laser azul em 488nm, com emissão em 585/42, utilizando detector C). A sonda DHE permeia as membranas celulares onde é oxidada a 2-hidroxietídio (2-OHEt⁺) por O₂⁻, ou a etídio (Et⁺) por outras EROs, que por sua vez, são então intercaladas ao DNA celular sob a forma de brometo de etídio, responsável pela emissão de fluorescência vermelha. A leitura dessa amostra foi realizada para obtenção dos valores basais de fluorescência emitidos pelo DHE no interior das células.

3.20 Dosagem de lactato

A dosagem de lactato foi realizada gentilmente pelo Laboratório de Metabolismo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, sob a coordenação do Dr. Leonardo dos Reis Silveira. Foi utilizado o kit *Cayman's Glycolysis Cell-Based* (Cayman Chemical) que baseia-se nos princípios da reação lactato + NAD > piruvato + NADH, catalisada pela enzima lactato desidrogenase. O NADH formado reduz um substrato tretrazólio para um formazano altamente corado que absorve energia a 490nm. Assim a quantidade de formazano produzida é

proporcional à quantidade de lactato liberado. Foram plaqueadas 10⁵ células em placa de 6 poços e após 24h de plaqueamento as células foram lavadas com PBS 1X e mantidas por 3h a 37°C com 2ml de PBS/Ca⁺⁺ suplementado com 25mM glicose. Após o período de incubação das células o meio foi coletado para dosagem dos níveis de lactato. A reação enzimática foi realizada em tampão de Tris-HCl 100mM, pH 7.2 com 1µg da enzima LDH (lactato desidrogenase) e 10mM de NAD+. A leitura foi realizada em placa de 96 poços utilizando 20µl de amostra, completando-se o volume final para 200µl. A curva padrão foi estabelecida com as concentrações de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50 e 100µM de lactato. Como controle positivo da reação foi utilizado rotenona. A leitura foi realizada por um espectrofluorímetro.

3.21 qPCR em amostras tumorais de pacientes

A análise da expressão de EMC1 em tumores de mama de pacientes foi realizada no AC Camargo Cancer Center utilizando cDNAs cedidos gentilmente pela Dra. Dirce Maria Carraro do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular. As células epiteliais do tumor foram capturadas pro microdissecção a laser utilizando o sistema PixCell II LCM (Arcturus Engineering, Mountain View, CA, USA) evitando a contaminação por células do estroma, e submetidas posteriormente à extração de RNA e produção de cDNA. Um primeiro painel continha amostras oriundas dos diferentes subtipos de câncer de mama (luminal A, luminal B, HER2 e basal) e outro painel continha amostras aleatórias representativas dos estágios de progressão tumoral mamário (epitélio normal, carcinoma ductal *in situ* puro e carcinoma invasivo). Como normalizadores foram utilizados os genes GAPDH, TBP, RPLO e GUSB.

3.22 Análises de bioinformática

3.22.1 Análise de correlação de expressão gênica

Esta análise foi realizada gentilmente pelo doutorando Lucas Goedert de nosso laboratório. Foram selecionadas 59 linhagens tumorais de mama para download dos valores de expressão gênica diferencial pré-normalizados do banco de dados da CCLE (Cancer Cell Line Encyclopedia), disponível em <http://www.broadinstitute.org/ccle/home>, que contém informações sobre os níveis de expressão gênica diferencial. O site promove a normalização por RMA (Robust Multi-array Average), um algoritmo que transforma os dados de Affymetrix em log2 e, em seguida, normaliza-os em quantile. Os valores foram posteriormente normalizados pela média geral de cada gene entre as linhagens analisadas. Em seguida realizou-se a correlação de Pearson, que mede o grau da correlação entre duas variáveis de escala métrica, e pode ser calculada com um comando do programa Excel (=PEARSON expressões_gene_x, expressões_gene_y). Foi realizada a correlação de EMC1 com todos os genes presentes no arquivo proveniente do Affymetrix (aproximadamente 19000 genes) e com os dados processados, utilizamos como cut off os valores de -0,5 para correlação negativa e 0,5 para correlação positiva.

3.22.2 Análise de interação pela plataforma STRING

De modo a analisar potenciais interações entre o conjunto de genes selecionados que apresentaram correlação positiva ou negativa com a expressão de EMC1 na correlação de Pearson, utilizamos a base de dados STRING v9.1 (<u>http://string-db.org</u>) de interações protéicas conhecidas e preditas. As associações diretas (físicas) ou indiretas (funcionais) são derivadas de quatro

fontes: contexto genômico, experimentos de larga-escala, co-expressão conservada e conhecimento bibliográfico prévio (Franceschini *et al.*, 2013).

3.22.3 Análise de interação pela plataforma Webgestalt

Uma segunda abordagem foi utilizada para análise do conjunto de genes gerados pela correlação de Pearson. A lista dos genes correlacionados a EMC1 foi submetida à plataforma WebGestalt (http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/) para explorar as funções biológicas que estes genes compreendem. A classificação funcional possibilita a visualização em listas que exibe o nome do gene, família e subfamília de acordo com classificação própria, inferindo função molecular, processo biológico, componente celular, vias de sinalização e classe proteica, que auxiliam para determinar funções do gene de interesse (Wang *et al*, 2013).

3.23 Tumorigênese

Para o ensaio de tumorigênese *in vivo*, camundongos fêmeas Swiss Nude de 5 semanas de idade foram utilizados para injeção subcutânea de células. Cada grupo foi definido por seis animais que foram mantidos em gaiolas apropriadas e suplementados com água e ração à vontade, acondicionados em ambiente climatizado. Uma única suspensão celular contendo $2x10^6$ células (grupo controle ou superexpressando EMC1) ressuspensas em 40ul de PBS foi injetada subcutaneamente com uma seringa #28G1/2 sobre a quarta glândula mamária. Após as injeções, o tamanho do tumor foi medido com um paquímetro digital (Caliper) a cada semana até o fim do experimento, sendo o volume do tumor calculado de acordo com a fórmula elipsoide V= $\pi/6x(d1^2xd2)$ (mm)³. Decorridos 50 dias após a inoculação das células os camundongos foram eutanasiados com doses excessivas de cetamina/xilazina (2:1) e os tumores de cada animal foram retirados e pesados, sendo que uma porção foi utilizada para análises por *western blot* e outra para processamento histológico. Para a lise do tumor fragmentos do tecido foram macerados em N₂ líquido e ressuspensos em tampão RIPA (20mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 1% NP40, 1% deoxicolato de sódio e 1mM Na₃VO₄). A suspensão foi incubada a 4°C sob agitação constante durante 30 minutos, sonicada e centrifugada por 10 minutos a 10.000xg. O sobrenadante foi quantificado como descrito previamente e submetido à SDS-PAGE. Para análises histológicas, fragmentos do tecido tumoral e do pulmão foram fixados em formol 4%, parafinizados e seccionados em 5µm. Os cortes foram corados com hematoxilina/eosina para visualização das estruturas celulares. O trabalho seguiu todas as normas e padrões estabelecidos pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

4.1 Análises de bioinformática: EMC1 integra uma potencial rede de proteínas com participação em vias de sinalização importantes para a manutenção de um fenótipo maligno

O banco de dados Oncomine (<u>https://www.oncomine.org</u>) integra uma plataforma online que reúne dados de estudos em larga-escala do mundo todo acerca da biologia do câncer. Utilizamos assim parâmetros e filtros específicos na busca por evidências do envolvimento de EMC1 com o câncer de mama. Os dados obtidos revelam que EMC1 tende a ser mais expressa em tumores de mama invasivos comparados ao epitélio de mama normal e também se correlaciona com a expressão do receptor ErbB2 (Fig. 4), fortalecendo os indícios do envolvimento de EMC1 com o câncer de mama.

Aprofundando nossas análises de bioinformática, dados de expressão gênica diferencial de 59 linhagens tumorais de mama advindos do banco de dados da CCLE (*Cancer Cell Line Encylcopedia*) foram processados, normalizados e submetidos à análise de correlação de Pearson. Com o processamento destes dados obtivemos uma tabela da correlação da expressão de EMC1 com uma biblioteca de aproximadamente 19.000 genes. A lista com os genes que apresentaram *score* significativo encontra-se em anexo neste trabalho. O gene que apresentou maior *score* positivo foi PLOD1, que codifica uma proteína ligada à membrana residente no retículo endoplasmático com funções relacionadas à síntese de colágeno, enquanto que o gene de *score* mais negativo foi MCF2L, um fator de troca de guanina que funciona como um efetor de RAC1 (www.ncbi.nih.gov).



Figura 4: A alta expressão de EMC1 correlaciona-se com o carcinoma de mama invasivo. Análises no banco de dados Oncomine utilizando como filtros "EMC1" e "câncer de mama", com p<0.05. Em **(A)** nota-se um aumento da expressão de EMC1 em tumores de mama invasivos e em **(B)** uma evidência da correlação positiva entre a expressão de EMC1 e o receptor ErbB2.

De modo a verificar potenciais interações entre os genes que apresentaram correlação positiva ou negativa com a expressão de EMC1, geramos uma rede molecular introduzindo estes genes na plataforma STRING v9.1, uma ferramenta molecular que é capaz de elaborar associações físicas e funcionais entre proteínas. Apesar da heterogeneidade dos dados muitos genes apresentaram estreitas relações entre si (Fig. 5). A análise revelou que os processos biológicos mais significativos que caracterizam a rede formada pelos genes positivamente correlacionados com EMC1 estão envolvidos na organização da matriz extracelular, wound healing, angiogênese, transporte mediado por vesículas, morfogênese celular e diferenciação, mostrando ainda que a maioria das proteínas codificadas por estes genes estão localizadas no retículo endoplasmático (RE), em vesículas associadas ou não à membranas, e no Golgi. Interessantemente estes genes mostraram-se ainda envolvidos com vias de adesão focal, interação com receptores da matriz extracelular, processamento de proteínas no RE, regulação do citoesqueleto de actina, via de sinalização por cálcio, vias de MAPK e JAK-STAT e vias envolvidas em câncer (Tab. 1).



Figura 5: Análise da interação entre proteínas conhecidas e preditas na plataforma STRING. É mostrada a rede formada pelos genes que apresentaram correlação positiva com a expressão de EMC1. Nota-se a formação de uma rede com clusters de genes intimamente relacionados.

Por outro lado, as proteínas que apresentaram correlação negativa com a expressão de EMC1 mostraram-se, em grande parte, a localizar-se no núcleo e estão envolvidas em processos transcricionais, processos metabólicos e biossintéticos de RNA, metilação de histonas e regulação da adesão celular mediada por caderina. Estes genes apresentaram-se envolvidos com as vias de fosforilação oxidativa, de P53 e com a via de degradação de RNA (Tab. 2).

Processamento de proteínas no RE	Interação com MEC	Vias em Câncer	Glicólise	Adesão Focal	Via de JAK-STAT	Sinalização por Ca ⁺⁺	Regulação do citoesqueleto	Via de MAPK
DERL2	LAMB1	MMP2	PKM2	LAMB1	IL6	BST1	MYH9	FLNC
SEC61A1	LAMC1	LAMB1	ALDH1B1	CAV2	OSMR	ATP2B4	ITGA5	MAP2K3
SSR1	ITGA5	LAMC1	ENO1	LAMC1	IFNE	MYLK	SSH1	FAS
SSR3	COL1A2	IL6	PKM2	ITGA5		PTGFR	FN1	TGFBR2
PDIA6	COL6A2	HSP90B1		COL1A1			ACTB	NGF
HYOU1	FN1	WNT5B		COL6A2			MSN	FLNA
HSP90B1	COL4A2	MET		MET			MYLK	GNG12
GANAB	COL6A1	FN1		FLNC			GNG12	GADD45A
RRBP1	COL5A1	FAS		CAV1			ACTN1	ZAK
DDOST	HSPG2	TGFBR2		FN1				
CKAP4	COL4A1	COL4A2		ACTB				
STT3A		VEGFA		MYLK				
		COL4A1		COL4A2				
		ETS1		COL6A1				
				FLNA				
				COL5A1				
				VEGFA				
				COL4A1				
				ACTN1				
				PARVB				

 Tabela 1: Classificação em vias funcionais (KEGG) dos genes que apresentaram correlação positiva com a expressão de EMC1 de acordo com a plataforma STRING

* RE = retículo endoplasmático; MEC = matriz extracelular

 Tabela 2: Classificação em vias funcionais (KEGG) dos genes que apresentaram correlação negativa com a expressão de EMC1 de acordo com a plataforma STRING

Fosforilação oxidativa	Via de p53	Degradação de RNA	Junções Aderentes
COX6B1	MDM\$	TOB1	INADL
NDUFA2	GADD45G	CNOT6	TJP3
COX6C	RFWD2	NAA38	CGN
NDUFA5			
ATP5C1			
ATP6V1G1			

Uma segunda abordagem de bioinformática para análise gênica funcional foi também utilizada de modo a garantir maior confiabilidade dos resultados gerados. Os novos dados confirmam os achados obtidos anteriormente, sugerindo ainda novas vias funcionais envolvidas para o conjunto de genes que apresentaram correlação positiva ou negativa com a expressão de EMC1. A lista de genes foi submetida à plataforma WebGestalt (http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/) que incorpora informações de diferentes bases de dados públicas e fornece uma variada possibilidade de análises de enriquecimento.

Os genes que apresentaram correlação positiva mostraram-se envolvidos em vias de sinalização de integrinas, via de glipicanas e vias de sinalização mediada por receptores de estrógeno e ErbB na membrana plasmática. Por outro lado, os genes que apresentaram correlação negativa estão associados com vias de sinalização de endotelinas, de LKB1, de ATM, com o transporte de elétrons na cadeia respiratória e na síntese de ATP.

4.2 A alta expressão de EMC1 está associada a linhagens tumorais de mama mais agressivas e sua superexpressão favorece a sustentação de vias proliferativas em células da linhagem SKBR-3

Frente às evidências de estudo em larga escala que apontam um potencial envolvimento de EMC1 com o câncer de mama, nos propusemos a avaliar o efeito de sua superexpressão em linhagens tumorais de mama. Primeiramente, analisamos por meio de qPCR a expressão endógena de EMC1 em um painel contendo amostras de linhagens de mama normais e tumorais que possui representantes dos distintos subgrupos de câncer de mama (Fig. 6). A análise revelou que EMC1 tende a ser mais expresso em linhagens que apresentam um comportamento mais agressivo e invasivo como os representantes dos grupos basal e de baixa claudina. Notamos ainda que à exceção da linhagem MCF-7, todas as linhagens tumorais apresentaram maior expressão de EMC1 comparada à linhagem de mama normal Hb4a.



Figura 6: EMC1 possui alta expressão em linhagens tumorais de mama consideradas mais agressivas. Análise por qPCR em um painel de linhagens de mama contendo amostras normais e tumorais. As mesmas quantidades de cDNA foram analisadas por PCR em tempo real (400nM) e SyBR Green PCR Power Mix (Applied Biosystems, Foster City) utilizando o sistema de detecção ABI PRISM 7500. Cada amostra foi medida em triplicata. Cycle Treshold (Ct) foi convertido para expressão relativa de acordo com o método 2^{-ΔΔCT}, usando TBP como controle endógeno.

Para analisar os efeitos da superexpressão de EMC1 utilizamos as linhagens MCF-7 e SKBR-3. Embora a linhagem SKBR-3 apresente alta expressão endógena de EMC1 dentro do painel analisado, ela foi escolhida por apresentar amplificação do gene HER-2, uma amplificação que se apresenta em 20-30% dos tumores de mama e está associada a tumores mais agressivos e que apresentam resistência terapêutica, apesar de não ser uma linhagem invasiva e metastática (Slamon et al., 1989). Utilizamos a construção pcDNA3-EMC1 gerada em nosso laboratório (Lopes, 2007) para transfecção das linhagens e posterior seleção G418 estabelecimento com de culturas estáveis para 0 superexpressando EMC1. Como controle negativo, utilizamos o vetor pcDNA3 contendo a sequência de EMC1 clonada de forma invertida, de modo a não gerar nenhum produto funcional. A figura sete ilustra a caracterização e confirmação por qPCR e western blot das linhagens geradas.



Figura 7: Confirmação das linhagens geradas superexpressando EMC1. As linhagens foram submetidas à análise por qPCR e western blot para confirmação da superexpressão de EMC1. Em **(A)** é mostrado o aumento na expressão de EMC1 de 2,9 vezes para a linhagem MCF-7 (barra negra) e de 3,7 vezes para SKBR-3 (barra cinza). Em **(B)** confirmamos a amplificação do gene HER-2 na linhagem SKBR-3. As mesmas quantidades de cada cDNA foram analisadas por PCR em tempo real (400nM) e SyBR Green PCR Power Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando o sistema de detecção ABI PRISM 7500. Cada amostra foi medida em triplicata. Cycle Treshold (Ct) foi convertido para expressão relativa de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, usando TBP como controle endógeno. **(C)** representa a morfologia das células controle e superexpressando EMC1 (a barra corresponde a 100µm) e em **(D)** a análise por western blot, confirmando o aumento na expressão da proteína no peso molecular esperado. Nota-se que o anticorpo reconheceu fracamente a proteína endógena.

Obtivemos um aumento na expressão de EMC1 de 2,9 vezes e de 3,7 vezes, respectivamente, para as linhagens MCF-7 e SKBR-3. Com essas ferramentas em mãos conduzimos ensaios funcionais de modo a avaliar os efeitos da superexpressão de EMC1 nessas linhagens. Não notamos qualquer alteração morfológica na linhagem MCF-7 após a superexpressão de EMC1. Avaliamos também a capacidade proliferativa desta linhagem, mas também não detectamos diferenças após a superexpressão (Fig. 8), e desta forma decidimos focar apenas na linhagem SKBR-3 que apresentou alterações mais significantes.



Figura 8: Taxa da proliferação na linhagem MCF-7. A taxa de proliferação após a superexpressão de EMC1 na linhagem MCF-7 foi avaliada por cristal violeta durante cinco dias, mas não foram observadas diferenças. O gráfico representa a média de três ensaios realizados de maneira independente.

Para a linhagem SKBR-3 notamos uma distinta alteração morfológica após a superexpressão de EMC1 (Fig 7c). Células dessa linhagem são células epiteliais, que apresentam morfologia cubóide e crescem mantendo contato célula-célula. No entanto, após a superexpressão da proteína observamos que estas células passaram a crescer de forma mais esparsa e com morfologia mais afilada, remetendo ao um fenótipo do tipo mesenquimal. Alterações visíveis no citoesqueleto de actina foram também observadas como filopódios proeminentes e borda celular acentuada (Fig. 9).

A marcação da proteína superexpressa corresponde ao padrão de marcação perinuclear da proteína endógena, já observado e caracterizado para o anticorpo gerado contra a região c-terminal de EMC1 (Molina, 2010). No entanto, a proteína superexpressa apresentou-se mais concentrada na região perinuclear, podendo refletir um possível efeito de sua superexpressão na linhagem SKBR-3. Nota-se ainda nas células superexpressoras uma marcação mais basal de EMC1 que se distribui de forma mais difusa pela célula e se assemelha ao padrão de distribuição de retículo endoplasmático.



Figura 9: A superexpressão de EMC1 leva à alterações no citoesqueleto de actina. Imunocitoquímica em células SKBR-3 utilizando anti-EMC1 (c-terminal) evidenciando a localização perinuclear da proteína superexpressa (verde) e uma marcação mais basal que se assemelha ao padrão de distribuição do retículo endoplasmático. A actina foi marcada com faloidina-tritc (vermelho) e o núcleo com DAPI (azul). As células controle preservam sua morfologia característica, crescendo agrupadas, enquanto que células superexpressando EMC1 apresentaram um fenótipo mais mesenquimal. Notam-se ainda filopódios mais proeminentes nas células superexpressoras. Todas as imagens foram adquiridas através do eixo Z, em microscópio confocal Leica TCSP5 utilizando a objetiva de 100x, sendo realizadas com os mesmos parâmetros de intensidade de laser. A barra superior corresponde a 20µm e a inferior a 15µm. Sabe-se que uma importante característica das células tumorais é a habilidade para proliferar em condições isoladas e crescer com uma reduzida dependência de estímulos externos. Realizamos então alguns ensaios funcionais de modo a avaliar as consequências da superexpressão de EMC1 nesta linhagem.

Por meio de um ensaio de proliferação através da marcação por cristal violeta, observamos que a taxa de proliferação nas células SKBR-3 aumentou nitidamente em resposta à superexpressão de EMC1 (Fig. 10a). Em seguida, para testar a influência de EMC1 sobre a capacidade clonogênica, células SKBR-3 superexpressando a proteína ou células controle foram plaqueadas em baixa densidade e mantidas em cultura por 10 dias. Após este tempo, avaliamos o número bem como a média da área total das colônias formadas. Observamos também significativo aumento no potencial clonogênico após um а superexpressão de EMC1 (Fig. 10b). A capacidade de crescimento independente de ancoragem foi também avaliada através do ensaio de formação de colônia em ágar. Curiosamente o número de colônias formadas foi reduzido mediante superexpressão de EMC1, porém, foi notório o aumento na área total destas colônias (Fig. 10c). Mediante a tais alterações funcionais observadas, avaliamos o comportamento do ciclo celular destas linhagens por meio da marcação com iodeto de propídeo e citometria de fluxo. As células superexpressando EMC1 apresentaram um pequeno aumento nas populações de células na fase S e em G2/M, justificando os efeitos funcionais observados. Por fim, na busca por mecanismos que estariam sustentando essa maior capacidade proliferativa interferir investigamos se EMC1 era capaz de com vias de proliferação/sobrevivência ativadas downstream à ativação do receptor HER-2.



Como ilustrado na Fig. 10e, a superexpressão de EMC1 claramente aumentou os níveis de fosforilação de ERK1/2.

Figura 10: A superexpressão de EMC1 conduz aumento na capacidade proliferativa e clonogênica das células SKBR-3. Células controle ou superexpressando EMC1 foram submetidas a ensaios funcionais. Em (A) observamos um claro aumento na capacidade proliferativa das células após superexpressão de EMC1 através do ensaio de cristal violeta. O pontencial clonogênico (B) e capacidade de crescimento em ágar (C) foram também aumentados. Alterações no ciclo celular foram também observadas através de citometria de fluxo (D), como um pequeno aumento nas populações de células na fase S e em G2/M, justificando os efeitos funcionais observados. Os níveis de ERK1/2 fosforilado se mostraram aumentados mediante superexpressão de EMC1 (E), indicando uma intensificação indireta de vias de proliferação/sobrevivência. O gráfico ao lado representa a quantificação da intensidade de expressão de ERK1/2 fosforilado relativa à expressão de ERK1/2 total, a densitometria das bandas foi realizada no software ImageJ. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e representam e média de três ensaios realizados de maneira independente.

4.3 EMC1 contribui para atividade invasiva do câncer de mama

Tendo em vista o fenótipo mesenquimal e a aquisição de evidentes filopódios induzidos pela superexpressão de EMC1, postulamos que essas células teriam adquirido maior capacidade de migração e invasão, propriedades críticas para o espalhamento e metástase de células tumorais. É interessante ressaltar que embora essas células possuam amplificação do gene HER-2, elas são pouco migratórias e invasivas e apresentam baixa capacidade metastática (Fogh *et al.*, 1975). Buscamos então avaliar a motilidade dessas células através do ensaio de *wound healing* e também a sua capacidade de invasão em matriz de colágeno utilizando *transwell*. Como apresentado na Fig. 11, células de carcinoma mamário SKBR-3 superexpressando EMC1 mostraram após 24h um aumento significativo em sua motilidade (~85%) comparado às células controle (~40%).



Figura 11: A superexpressão de EMC1 aumentou a capacidade migratória das células SKBR-3 *in vitro*. O ensaio de *wound healing* foi utilizado para avaliar a migração de células SKBR-3 após superexpressão de EMC1. Após atingir confluência de 90% as células foram mantidas na ausência de soro por 24h e então realizado o risco com uma pipeta de 200µl. A lesão foi monitorada em um microscópio Leica a cada 12h utilizando objetiva com aumento de 4x. A migração foi determinada pela porcentagem da área lesionada coberta. O gráfico ao lado representa a quantificação da área de fechamento da lesão expressa em porcentagem. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados expressam a média de três ensaios independentes.

Para avaliar a capacidade invasiva das células mediante superexpressão de EMC1, as células foram plaqueadas em insertos *transwell* revestidos por uma matriz de colágeno. Decorridas 20h após o plaqueamento das células, a membrana foi corada com cristal violeta e o número de células invasoras foi contado. O sobrenadante destas células foi também coletado para quantificação das metaloproteinases liberadas. Revelamos que as células adquiriram uma notória capacidade de invasão após a superexpressão de EMC1 (Fig. 12) e apresentaram também um aumento da atividade enzimática de MMP-2, evidenciada pelo ensaio de zimografia (Fig. 12c), corroborando os dados das análises de bioinformática.



Figura 12: A superexpressão de EMC1 aumentou a capacidade invasiva das células. A capacidade invasiva das células foi avaliada através do ensaio de invasão em *transwell* utilizando matriz de colágeno. A membrana dos insertos foi corada com cristal violeta permitindo a visualização e contagem das células invasoras. Em (A) nota-se um grande aumento na capacidade invasiva das células após a superexpressão de EMC1. O gráfico em (B) representa a quantificação da média do número de células invasoras por campo. Análises de zimografia (C) revelam também um aumento de aproximadamente quatro vezes na quantidade de MMP-2 liberada pelas células superexpressoras. O experimento foi realizado em triplicata e as células fotografadas em microscópio de luz comum (Nikon) sendo registrados cinco campos aleatórios por inserto.

Entretanto, um ponto a ser considerado é que grande parte da pesquisa em câncer de mama é conduzida utilizando-se linhagens tumorais pré-estabelecidas, pois são fáceis de serem manipuladas e representam uma fonte ilimitada de autoreplicação. No entanto, linhagens celulares exibem um alto grau de estabilidade e homogeneidade, e pode às vezes não refletir a real heterogeneidade encontrada em tumores mamários (Burdall *et al.*, 2003).

Neste contexto, expandimos nossas análises avaliando a expressão de EMC1 por qPCR em amostras de tumores de mama de pacientes advindas do Hospital do Câncer AC Camargo, por meio de uma colaboração estabelecida com o Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do AC Camargo Cancer Center/SP, sob a supervisão da Dra. Dirce Maria Carraro. Utilizamos amostras de cDNA de células epiteliais do tumor que foram capturadas por microdissecção a laser, evitando a contaminação por células do estroma e garantindo assim uma maior pureza do material amostrado.

Nossa primeira abordagem consistiu em avaliar a expressão de EMC1 em um painel contendo 46 amostras distintas representativas dos diferentes subgrupos de câncer de mama (luminal A, luminal B, HER-2 e triplo negativo). Das 46 amostras testadas, apenas 24 amplificaram e foram validadas para análises de expressão gênica. Neste painel não observamos diferenças quanto à expressão de EMC1 nos subgrupos tumorais de mama (Fig. 13a). As amostras foram ainda classificadas de acordo com estado do receptor HER-2 ou de receptores hormonais (Fig. 13b), e também subclassificadas dentro do grupo de tumores HER-2 positivo ou HER-2 negativo quanto ao estado dos receptores hormonais (Fig. 13c). Nestes últimos casos, ainda que não significativo, notamos uma tendência no aumento de expressão de EMC1 em tumores positivos para os receptores hormonais. Em nossa segunda abordagem avaliamos a expressão de EMC1 em um painel contendo amostras distintas representativas dos estágios de progressão tumoral do câncer de mama (epitélio normal, carcinoma ductal in situ puro e carcinoma invasivo). A expressão de EMC1 aumentou ~122 vezes no tumor invasivo em relação ao epitélio normal e ~165 vezes em relação ao carcinoma in situ (Fig. 13d).



Figura 13: Análise da expressão de EMC1 em amostras de tumores de mama. Análise por qPCR em painéis de amostras tumorais de mama. As mesmas quantidades de cada cDNA foram analisadas por PCR em tempo real (400nM) e SyBR Green PCR Power Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando o sistema de detecção ABI PRISM 7500. Cada amostra foi medida em duplicata. Cycle Treshold (Ct) foi convertido para expressão relativa de acordo com o método 2⁻ ΔΔCT.</sup> O primeiro painel (A) contém amostras representativas dos subtipos tumorais de mama e como controle endógeno foi utilizada a média entre os normalizadores TBP e GAPDH. Essas amostras foram reclassificadas também de acordo com estado do receptor HER-2 ou com receptores hormonais (B), e ainda subclassificadas dentro do grupo de tumores HER-2 positivo ou HER-2 negativo quanto ao estado dos receptores hormonais (C). No segundo painel (D) foram utilizadas amostras representativas dos estágios de progressão tumoral de mama e como controle endógeno foi utilizada a média entre os normalizadores RPLO e GUSB.

Em conjunto os dados sugerem que EMC1 pode contribuir de maneira significativa durante a progressão do câncer de mama, sobretudo na transição para estágios mais invasivos.

4.4 Evidências de que EMC1 induz maior malignidade em células da linhagem SKBR-3 através da reprogramação de seu metabolismo energético

Um dos mecanismos responsáveis por permitir às células tumorais a se proliferarem rapidamente é a reprogramação do metabolismo energético que consiste basicamente na conversão de glicose para lactato mesmo na presença de oxigênio, um processo conhecido por glicose aeróbica ou efeito Warburg (Hanahan; Weinberg, 2011). As análises de bioinformática realizadas sustentam potenciais evidências de que vias de angiogênese e migração estariam ativadas ao passo de que a fosforilação oxidativa e outras vias metabólicas estariam prejudicadas mediante expressão de EMC1. Desta maneira, avaliamos algumas funções relacionadas ao metabolismo energético das células frente à superexpressão de EMC1.

Primeiramente, avaliamos a capacidade respiratória dessas células, ou seja, o consumo de oxigênio frente à dependência ou não de ADP. Os dados revelaram que mesmo o consumo basal de oxigênio pelas células que superexpressam EMC1 estava reduzido comparado às células controle (Fig. 14). As células superexpressoras também não responderam ao estímulo por ADP, sugerindo que a via de fosforilação oxidativa poderia estar comprometida.



Figura 14: A superexpressão de EMC1 diminui o consumo de oxigênio pelas células tumorais. Análise do consumo de oxigênio pelas células SKBR-3. (A) Células controle ou superexpressando EMC1 foram submetidas a um oxígrafo para leitura dos níveis basais de respiração celular. Como substrato foi utilizado malato/glutamato. A respiração dependente de ADP foi medida adicionando-se essa molécula à suspensão celular. Para bloquear a atividade de ATP sintase foi utilizado oligomicina e para estimular a capacidade máxima de respiração o ionóforo CCCP. Os valores médios em cada evento obtido foram plotados no gráfico (B).

Frente a este cenário, expandimos nossas análises investigando nestas células algumas funções mitocondriais como produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), produção de lactato e quantificação da expressão de algumas moléculas críticas nestes processos como HIF-1α, β-catenina e complexos da cadeia respiratória mitocondrial, o que poderia nos fornecer maiores eslcarecimentos acerca do estado metabólico destas células.

A dosagem de EROs foi realizada por citometria de fluxo utilizando a sonda DHE, que se liga com alta afinidade a estas moléculas em um processo na qual é clivada liberando alta fluorescência. Obervamos uma acentuada diminuição na produção de EROs pelas células superexpressando EMC1, representada pela população de células que exibiram alta fluorescência (Fig. 15a). Já os níveis de lactato liberado pelas células superexpressando EMC1 foram significativamente maiores comparados às células controle (Fig. 15b). Por fim avaliamos a expressão relativa de algumas proteínas por western blot e revelamos que os níveis de HIF-1α e β-catenina estavam aumentados nas células que superexpressam EMC1 (Fig. 15c). Para quantificação da expressão relativa dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial utilizamos um coquetel de denominado OXPHOS, anticorpos que compreende cinco anticorpos monoclonais: um contra a subunidade NDUFB8 (Cl, ~20kDa), um contra a subunidade SDHB (CII, ~30kDA), um contra a subunidade UQCRC2 (CIII, ~47kDa), um contra a subunidade MTCO1 (CIV, ~39kDa) e outro contra a subunidade ATP5A (CV, ~53kDa). Vale ressaltar que as amostras foram aquecidas à 50°C apenas antes de serem submetidas à SDS-PAGE, uma vez que o aquecimento à temperaturas elevadas pode desnaturar o complexo gerando um resultado falso negativo. Revelamos desta maneira que após a superexpressão de EMC1 os complexos I, III e V estavam reduzidos, ao passo que um ligeiro aumento na expressão do complexo II foi também observado. A redução mais evidente foi do complexo I, que extrai energia da molécula de NADH produzida pela oxidação de açúcares e ácidos graxos, sendo considerado ainda um complexo central no processo de produção de energia pela célula e também responsável pela produção de EROs (Birrel; Hirst, 2013).

O complexo IV corresponde a uma proteína codificada pelo DNA mitocondrial altamente hidrofóbica, e isso pode explicar o seu não aparecimento no blot, uma vez que o tampão RIPA utilizado para a lise celular pode não ter sido suficientemente adequado para solubilizar esta proteína e tornar sua marcação visível no *western blot*.



Figura 15: A superexpressão de EMC1 pode levar a uma reprogramação do metabolismo energético das células. Análise de algumas funções mitocondriais relacionadas ao metabolismo energético. Em (A) quantificamos a produção de espécies reativas de oxigênio através de citometria de fluxo e marcação com a sonda DHE (diidroetídio), evidenciando uma acentuada redução na produção de EROs após a superexpressão de EMC1. Em (B) mostramos através de ensaio enzimático um aumento da produção de lactato mediante aumento da expressão de EMC1; a rotenona foi utilizada como controle positivo. Em (C) avaliamos a expressão relativa de HIF-1 α e de β -catenina por western blot, mostrando que ambas as moléculas apresentaram expressão aumentada após a superexpressão de EMC1. Avaliamos ainda a expressão dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial utilizando o coquetel de anticorpos OXPHOS, evidenciando uma redução na expressão dos complexos I, III e V, e um ligeiro aumento na expressão do complexo II. Os gráficos representam a quantificação da intensidade relativa da expressão destas moléculas em relação à expressão de γ -tubulina utilizada como controle endógeno.

4.5 EMC1 contribui também para uma maior malignidade em tumor xenográfico de mama

Camundongos Swiss nude foram utilizados para implantação das células SKBR-3 controle ou superexpressando EMC1 na 4ª glândula mamária. Uma suspensão contendo 2x10⁶ células foi injetada em cada animal e os mesmos foram acompanhados por aproximadamente dois meses (50 dias), período em que as medidas do tumor foram registradas a cada semana até o ponto final do experimento. Decorridos 50 dias após a inoculação das células, os animais foram eutanasiados, os tumores foram excisados, pesados e fragmentos foram coletados para análises histológicas e por *western blot*. Os tumores mostraram-se perceptíveis após duas semanas seguidas à inoculação das células, e a figura 16 mostra que a superexpressão de EMC1 aumentou nitidamente o potencial tumorigênico das células SKBR-3 quando comparados ao grupo controle, notando-se ainda um aumento de 20 vezes no peso final do tumor. A média do volume final do tumor revelou que tumores que carregam a superexpressão de EMC1 tiveram um aumento de aproximadamente 60 vezes em seu volume.

As análises histológicas mostraram ainda que os tumores do grupo controle apesar de possuírem uma lesão de tamanho relativamente pequeno, apresentaram uma intensa área de necrose e poucos vasos formados, enquanto que nos tumores que carregam a superexpressão de EMC1 foi praticamente imperceptível a presença de regiões de necrose. A formação de um número significativo de vasos sugerindo um processo angiogênico foi também evidenciada para os tumores superexpressando EMC1 (Fig. 17).



Figura 16: A superexpressão de EMC1 aumentou o potencial tumorigênico das células SKBR-3. Camundongos Swiss nude foram utilizados para ensaios de tumorigênese in vivo. Em (A) é ilustrado camundongos representativos dos grupos controle e que superexpressam EMC1 ao final do experimento, podendo-se notar o tamanho dos tumores formados. Em (B) é mostrado os tumores que foram excisados dos animais. O gráfico em (C) representa a média do volume do tumor em relação aos dias após a inoculação das células, observando que após 30 dias o potencial tumorigênico aumentou em praticamente 5x no grupo que carrega a superexpressão de ECM1. O gráfico em (D) ilustra o peso médio e a média do volume ao final do experimento dos tumores gerados, que foram estatisticamente significativos.

Fragmentos do pulmão foram também retirados para analisar a ocorrência de nódulos metastáticos, mas não foram observadas metástases, mesmo no pulmão de camundongos cujos tumores carregavam a superexpressão de EMC1, indicando que a superexpressão de EMC1 aumentou o potencial tumorigênico das células SKBR-3, mas não seu potencial metastático. Quantificamos ainda a expressão relativa de integrina-β1 e MMP-2 que estão associadas ao processo de invasão tumoral. Mostramos que os tumores que carregam a superexpressão de EMC1 apresentaram aumento na expressão dessas moléculas, sugerindo vias funcionais que sustentam este processo tumorigênico.



Figura 17: Análises histológicas em fragmentos de tumores excisados de camundongos. Fragmentos dos tumores excisados foram processados para análises histológicas. Os cortes foram corados com hematoxilina/eosina para visualização da morfologia tecidual. No quadro superior o corte foi fotografado utilizando a objetiva de 5x para uma visão mais panorâmica do tecido tumoral. Notam-se áreas de intensa necrose no tumor do grupo controle, que não foram evidenciadas nos tumores carregando a superexpressão de EMC1. O quadro inferior mostra em maior aumento (10x) que os tumores superexpressando EMC1 ao contrário do controle que se apresentou com células de morfologia mais cubóide, é um tumor de células fusiformes com padrão sarcomatóide, indicando que mesmo *in vivo* as células preservaram sua morfologia vista em cultura *in vitro*. Nota-se ainda a presença de muitos vasos formados nos tumores superexpressando EMC1, um indicativo da ativação de um processo angiogênico. A barra inferior corresponde a 0,2mm.



Figura 18: Padrão de expressão de algumas moléculas associadas à invasão tumoral. Fragmentos dos tumores foram macerados em N₂ líquido, lisados em tampão RIPA e processados para *western blot*. A expressão de EMC1, integrina- β 1 e MMP-2 foram avaliadas, notando-se um aumento na expressão dessas moléculas nos tumores que carregam a superexpressão de EMC1. Os gráficos representam a quantificação da intensidade relativa de cada molécula que foi normalizada em relação aos níveis endógenos de α -tubulina.
DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

Nos últimos anos intensificou-se a busca por moléculas críticas que estariam envolvidas com a progressão tumoral através da otimização de tecnologias emergentes como espectrometria de massas e *micro arrays* de DNA, permitindo um diagnóstico mais refinado e preciso, desde os estágios mais inicias da doença, caracterizando um fator crucial para a sobrevivência do paciente. Alguns dados de estudos desenvolvidos em larga escala já apontavam evidências que a alta expressão de EMC1 estava associada ao carcinoma de mama, mas nenhum trabalho focado particularmente em sua caracterização funcional havia sido realizado. Desta forma, apresentamos aqui a primeira evidência funcional da participação de EMC1 no processo de progressão tumoral do câncer de mama.

5.1 EMC1 integra uma rede de interações gênicas que contribui para aumento da atividade migratória e invasiva do câncer de mama

EMC1 é parte de um complexo caracterizado recentemente que se mostra envolvido no enovelamento de proteínas de membrana no retículo endoplasmático (Jonikas *et al.*, 2009; Christianson *et al.*, 2012) e está também associado ao mecanismo de UPR, porém seus componentes parecem apresentar funções além das exercidas pelo complexo como um todo de acordo com alguns autores (Louie *et al.*, 2012; Richard *et al.*, 2013). A estrutura primária de EMC1 apresenta domínios bem estabelecidos que inclui um peptídeo sinal que funciona como uma marca para o endereçamento de proteínas para a via secretória ou organelas específicas (Choo *et al.*, 2005), e possui também um domínio WD40*like*, que têm sido associado à proteínas que atuam na regulação da divisão celular, fusão de vesículas e sinalização transmembrana (Neer *et al.*, 1994). Além disso, EMC1 foi identificada por Chen e colaboradores (2009) em um conjunto de 523 glicoproteínas, através de espectrometria de massas em um estudo em larga escala, corroborando predições *in silico* que indicam um potencial sítio de N-glicosilação no resíduo de aminoácido 913, suportando evidências de que a glicosilação pode desempenhar um papel central no processamento e função de EMC1. Vale ainda mencionar que EMC1 foi identificada no câncer de mama como uma proteína secretada e associada à membrana, em outra abordagem de estudo em larga escala (Stitziel *et al.*, 2004). Todos esses dados sugerem papéis estruturais para EMC1 uma vez que a maioria das proteínas eucarióticas secretadas e de membrana é glicosilada e participa em processos de comunicação celular (Lis; Sharon, 1993).

Primeiramente, utilizando um painel de linhagens celulares com representantes dos diversos subtipos de câncer de mama, mostramos que a expressão endógena de EMC1 tende a ser maior em linhagens consideradas mais agressivas e invasivas, como por exemplo, em linhagens do grupo basal em que as células apresentam uma morfologia mais mesenguimal. Geramos então linhagens estáveis de MCF-7 e SKBR-3 superexpressando EMC1 de modo a avaliar seu efeito em diversos processos celulares críticos para 0 desenvolvimento tumoral como proliferação, migração e invasão. De fato o fenótipo causado pela superexpressão de EMC1 na linhagem SKBR-3 remete à transição epitélio-mesenquimal, uma vez que as células outrora de aspecto cubóide mostraram-se então com morfologia mais fusiforme e ainda com filopódios proeminentes (Figs. 7 e 9).

É curioso também salientar que a proteína superexpressa apresentou-se concentrada em uma região perinuclear que se assemelha à localização do complexo de Golgi, ainda que um nível mais basal de marcação pareça estar associado ao retículo endoplasmático, corroborando achados anteriores visto que o complexo foi caracterizado por proteínas que residem nesta organela (Jonikas *et al.*, 2008). No entanto Goytain e Quamme (2007) mostraram que em células da linhagem COS-7 a subunidade EMC5 deste complexo é uma proteína residente no Golgi e pode ainda ser encontrada em vesículas pós-Golgi incluindo endossomos iniciais, embora os níveis de Mg²⁺ pareçam influenciar a localização desta proteína de modo específico, uma vez que ela atua no transporte deste íon. De qualquer forma, isso indica que os componentes deste complexo podem atuar em outras regiões além do retículo endoplasmático, mas seu papel específico

As células da linhagem SKBR-3 que carregavam a superexpressão de EMC1 apresentaram ainda um aumento significativo na sua capacidade proliferativa, no seu potencial clonogênico e em sua capacidade de crescimento independente de ancoragem como ilustrado na figura 10. Curiosamente, não observamos alterações morfológicas e quanto à capacidade proliferativa na linhagem MCF-7 após a superexpressão de EMC1, o que poderia ser explicado em parte pela eficiência da superexpressão conseguida, uma vez que a taxa alcançada para esta linhagem foi praticamente duas vezes menor quando comparada à SKBR-3. Não podemos ainda descartar o fato que interações específicas podem ser estabelecidas apenas nessa linhagem, o que não permitiu que os mesmos mecanismos pudessem ser ativados na linhagem MCF-7 como a ativação ou interação com receptores de membrana específicos.

Porém não avaliamos para esta linhagem a capacidade de migração e invasão mediante a superexpressão de EMC1. Entretanto, experimentos em andamento em nosso laboratório utilizando abordagens de silenciamento gênico na linhagem tumoral de mama MDA-MB231, considerada invasiva e metastática, têm sugerido uma redução em sua capacidade proliferativa e de crescimento independente de ancoragem mediante redução nos níveis de EMC1. Desta forma, podemos sugerir de forma mais prudente que os efeitos observados estão mais relacionados aos níveis de expressão de EMC1 a que interações exclusivas dentro de cada linhagem, uma vez que a linhagem MDA-MB231 apresenta alto nível de EMC1 endógeno, comparada à linhagem MCF-7, ou seja, os níveis de superexpressão atingidos na linhagem MCF-7 não foram suficientes para ativar os mesmos mecanismos observados para a linhagem SKBR-3.

Por outro lado, a linhagem SKBR-3 é uma linhagem que carrega amplificação no gene HER-2 que corresponde a aproximadamente 30% das mutações oncogênicas encontradas em tumores de mama (Pust *et al.*, 2012). Sabe-se que a amplificação de HER-2 está associada à mal prognóstico, comportamento tumoral agressivo e resistência à terapia, uma vez que este receptor codifica uma proteína transmembrana que é ativada por ligantes e coopera com outras proteínas da sua família formando uma complexa rede de sinalização que regula o crescimento celular, diferenciação e sobrevivência (Slamon *et al.*, 1989; Yarden, 2012), fornecendo ainda alta capacidade clonogênica, uma vez que a inibição deste receptor por herceptina leva à uma clara redução dessas capacidades (Constantini *et al.*, 2008; Cheyne *et al.*, 2011).

Em conjunto essas evidências nos levam a propor que os efeitos proliferativos observados nesta linhagem podem ser ainda devidos à hiperativação de HER-2, uma vez que observamos aumentos nos níveis de ERK1/2 fosforilado, um alvo *downstream* a este receptor, e pelas evidências que mostram o envolvimento de EMC1 no enovelamento e reciclagem de receptores na membrana, sugerindo que a superexpressão de EMC1 possa acelerar a reciclagem de HER-2 de volta à membrana, intensificando assim vias de proliferação e sobrevivência. No entanto, futuros estudos devem ser direcionados para avaliar se EMC1 de fato auxilia no enovelamento e/ou tráfego a partir do Golgi ou na reciclagem de receptores de membrana em compartimentos endocíticos envolvidos na ativação da via de MAPK.

Outro ponto a se considerar, é que observamos também um claro aumento na motilidade e na capacidade invasiva das células SKBR-3 após a superexpressão de EMC1, associado a maior atividade enzimática de MMP-2 que foi aproximadamente quatro vezes maior comparada às células controle, corroborando as análises de bioinformática que indicaram que a expressão de EMC1 correlaciona-se positivamente com a expressão de MMP-14 e MMP-2. Mostramos ainda que tumores carregando a superexpressão de EMC1 também apresentaram aumento nos níveis de expressão de MMP-2, indicando uma ativação desta via de modo a contribuir no processo invasivo também em modelo xenográfico. Além disso, a expressão de EMC1 mostrou-se maior em pacientes com tumor de mama no estágio invasivo da progressão comparado ao carcinoma *in situ* ou ao epitélio de mama normal. A atuação das metaloproteinases no processo de invasão tumoral já é bem estabelecida e permite às células transpor barreiras e invadir outros locais. Essas moléculas compreendem uma grande

família de endopeptidases responsáveis pela degradação da membrana basal e outros componentes da matriz como colágeno, fibronectina, laminina e proteoglicanas (Gomes *et al.*, 2011). A MMP-2 é uma colagenase do tipo IV secretada na forma pró-ativa que é processada posteriormente em sua forma ativa através da interação com MMP-14 em seu sítio alvo na superfície celular (Itoh; Seiki, 2006). Mohammad e colaboradores (2012) realizaram um estudo comparativo entre 47 pacientes com câncer de mama e mostraram que MMP-2 e MMP-14 estavam superexpressos em aproximadamente 65% dos tecidos tumorais comparados ao tecido normal adjacente, ressaltando a importância dessas moléculas no processo invasivo do câncer de mama.

Estes dados sugerem que a invasão das células SKBR-3 desencadeada pela superexpressão de EMC1 é mediada pela ativação de MMP-2. Dados de nosso laboratório mostram ainda que o silenciamento de EMC1 em células de melanoma murino foi responsável por reduzir a atividade migratória e invasiva das células bem como do seu potencial tumorigênico em modelo xenográfico (dados não publicados). Fortalecendo estes resultados, outros estudos funcionais obtidos também em nosso laboratório com enfoque na ortóloga de EMC1 em *Drosophila melanogaster* (CG2943), através do silenciamento tecido-dirigido por RNA de interferência utilizando o sistema UAS-GAL4, mostram uma nítida deficiência locomotora e no desenvolvimento das larvas bem como alterações na estrutura morfológica do tecido muscular (Lima, 2013). Sabe-se que fatores tais como aumento de migração, proliferação e motilidade bem como alterações na adesão celular estão envolvidas com a progressão tumoral, colocando a metástase como o principal problema no câncer de mama (Bernards *et al.*, 2002).

Embora as células da linhagem SKBR-3 carreguem amplificação do gene HER-2, elas são pouco migratórias e invasivas, com baixa capacidade metastática (Fogh et al., 1975) e desta maneira, somando-se aos dados obtidos neste estudo, as evidências apontam que a superexpressão de EMC1 pode contribuir com outros genes de modo a ativar e sustentar potenciais vias de migração e invasão celular favorecendo uma maior malignidade do câncer de mama. O aumento da expressão de integrina-β1 que foi observado nos tumores carregando a superexpressão de EMC1 é condizente com a maior atividade invasiva destes tumores, uma vez que a expressão aberrante de integrina-β1 tem sido associada ao câncer de mama desde a década de 90 (Jones et al., 1992), e corrobora nossas análises de bioinformática realizadas previamente. Na célula epitelial da mama β1 é a integrina mais predominante expressa e é indispensável para o apropriado desenvolvimento da glândula mamária, além de exercer um impacto significante sobre o controle hormonal por controlar a expressão do receptor de estrógeno α (Gardner et al., 1996). A integrina-β1 faz parte de uma família de moléculas de adesão que compreende distintas subunidades, e é capaz de formar até doze receptores heterodiméricos por meio de combinações com subunidades α que se ligam aos diversos componentes da matriz extracelular, ativando uma cascata de sinalização que culmina com a fosforilação de ERK1/2 (Hynes, 2002). Estes receptores são frequentemente endocitados e reciclados de volta à membrana, e tem sido mostrado que a via de sinalização por integrinas em conjunto com outros receptores celulares desempenha um papel crucial na adesão, sobrevivência, diferenciação e proliferação celular, sobretudo na iniciação e progressão tumoral e no processo metastático (Barkan; Chambers, 2001).

O uso de modelos murinos de tumorigênese mamária têm fornecido evidências diretas da importância de integrina-β1 na progressão do câncer de mama e tentam estabelecer tal molécula como um mediador crítico da progressão do carcinoma mamário e consequentemente um potencial alvo terapêutico. É interessante saber que há ainda uma estreita associação entre os receptores de integrina com outros receptores do tipo tirosina quinase como, por exemplo, EGFR. Já foi mostrado em modelos murinos de tumorigênese mamária induzida por HER2, no qual os camundongos eram deficientes para integrina β1, alterações na reciclagem de EGFR ou em vias de sinalização associadas a EGFR, que por sua vez estão envolvidas com processo de invasão celular (Lahlou; Muller, 2011). À luz dessas informações, poderíamos postular que a alta expressão de EMC1 contribuiu na reciclagem desses receptores para a superfície celular, intensificando dessa forma vias de sinalização associadas à migração e invasão.

Vale também ressaltar que Ewing e colaboradores (2007) por meio de uma abordagem em larga escala utilizando imunoprecipitação combinada à espectrometria de massa, identificaram mais de 6000 interações com 338 proteínas pouco caracterizadas, selecionadas como alvos segundo predições de envolvimento em doenças. Dentre estas interações, detectou-se que EMC1 pode interagir fisicamente com cinco proteínas diferentes que atuam em processos críticos para o desenvolvimento do tumor, como destaque para TSC-22 e ARF6. Sabe-se que TSC-22 é um fator de transcrição ativado por TGF-β e é diminuído ou não detectado em mais de 60% dos casos de câncer de mama, atuando, portanto, como um supressor tumoral neste tipo de câncer (Choi *et al.*, 2005).

Por outro lado, alguns estudos têm mostrado a importância de ARF6 na maturação e reciclagem de receptores de membrana bem como na atividade invasiva do câncer de mama (Hashimoto *et al.*, 2004; Sabe *et al.*, 2008). Estes autores mostram que ARF6 é necessária para a atividade invasiva do câncer de mama por regular membros da família RhoA, uma vez que sua supressão por RNA de interferência ou mutantes nulos efetivamente bloqueiam a atividade invasiva da célula, sobretudo a formação de invadopódios e a degradação da matriz extracelular. ARF6 é capaz ainda de atuar na periferia da célula regulando a endocitose e reciclagem de componentes e receptores de superfície de volta à membrana em um processo mediado por GEP100.

As análises de bioinformática revelaram que EMC1 pode formar uma rede de interações que integra vias de sinalização particularmente interessantes e contribui de forma significativa para a atividade invasiva do câncer de mama bem como para a sustentação de um comportamento mais agressivo das células tumorais. As vias que se mostraram em destaque por estarem ativas foram vias de interação com a matriz extracelular, via de integrina-β1, vias de regulação do citoesqueleto, MAPK e glipicanas, enquanto as vias de LKB1, de fosforilação oxidativa e p53 mostraram-se reprimidas. A via de glipicanas, por exemplo, merece especial atenção uma vez que a molécula de GLIPICANA-1 é encontrada superexpressa em tumores de mama ao passo que no tecido mamário normal seus níveis são reduzidos (Matsuda *et al.*, 2001). Filmus e colaboradores (2008) apontam que as glipicanas constituem uma família de proteoglicanas de heparan sulfato que desempenha um papel vital na morfogênese do desenvolvimento, atuando como reguladores das vias de Wnt e Hedgehog. Sua implicação na progressão tumoral está associada ao crescimento do tumor, angiogênese e

metástase, sobretudo por servir como uma fonte de armazenamento de fatores de crescimento no microambiente tumoral, desempenhando um papel chave na regulação da progressão do ciclo celular. Cappellen e colaboradores (2007) mostraram que a regulação positiva da via de Wnt contribui com os efeitos prómitogênicos de c-MYC em células de câncer cervical e de mama, onde sua anormalidade é encontrada. Utilizando *microarrays* os autores mostraram ainda que a depleção de c-MYC em câncer de mama levou à repressão de EMC1, sugerindo que EMC1 possa ser um alvo transcricional de c-MYC, mas seu papel na via de Wnt ainda permanece desconhecido.

Por fim evidências consideráveis advindas de vários estudos em larga escala apontam cada vez mais para a contribuição de EMC1 no desenvolvimento do câncer de mama. Esta proteína foi identificada como sendo altamente expressa em tumores com perda de BRCA1 em relação a tumores de mama esporádicos. Além disso, o perfil de expressão de EMC1 foi altamente correlacionado com a expressão de CTPS, um gene que desempenha um papel chave no crescimento celular e no desenvolvimento e também na tumorigênese (Dettling et al., 2005). Hedenfalk e colaboradores (2001) sugerem que mutações herdáveis como as encontradas para os genes BRCAs influenciam o perfil de expressão gênica do câncer e de fato, em uma análise global de expressão gênica estes autores mostraram que EMC1 foi identificado entre 176 genes cuja expressão foi correlacionada a mutações em BRCA1 e BRCA2. Nossos resultados indicaram ainda que tumores positivos para receptores hormonais (estrógeno e progesterona) tendem a apresentar maior expressão de EMC1. O estrógeno por sua vez desempenha um papel central no desenvolvimento do câncer de mama sendo um regulador chave do crescimento e diferenciação em

alguns tecidos, que atua alterando a transcrição gênica através de interações diretas com seu promotor (Hall *et al.*, 2001). Interessantemente, EMC1 foi identificado por *microarray* em um cluster de genes regulados por estrógeno *in vitro* e também *in vivo* em camundongos xenográficos (Creighton *et al.*, 2006). EMC1 é ainda apontado como um alelo de risco em potencial no câncer de mama, identificado juntamente com mais 27 genes por Bhatti e colaboradores (2010). Em suma, a superexpressão de EMC1 parece estar associada a um desbalanço na expressão de muitos genes que integram vias de sinalização específicas, em que genes pró-tumorais estariam mais expressos e genes anti-tumorais estariam mais reprimidos, garantindo assim o sucesso da atividade tumoral e a sustentação de um fenótipo maligno.

5.2 EMC1 aumenta o potencial invasivo e tumorigênico através da reprogramação do metabolismo energético: relação entre hipóxia, EROs e transição epitélio-mesenquimal

Os dados de estudos funcionais aqui apresentados sugerem que a superexpressão de EMC1 foi capaz de reprogramar o metabolismo energético das células SKBR-3, sobretudo por modular a expressão de moléculas-chave envolvidas neste processo como HIF-1 α , β -catenina e componentes da cadeia respiratória mitocondrial. As células adquiriram também maior potencial tumorigênico após a superexpressão de EMC1, indicando ainda a ativação de um processo angiogênico, que por sua vez está intimamente relacionado com a expressão de HIF-1 α (Poon *et al.*, 2009). Notamos que os tumores do grupo controle apresentaram áreas de intensa necrose, que pode ser decorrente da falta de vasos para suprir as necessidades metabólicas do tumor, influenciando desta

forma o crescimento tumoral. Uma vez ativada a via de angiôgenese, sugerida pelas análises de bioinformática e histológicas que revelaram a presença de muitos vasos em tumores carregando a superexpressando EMC1, foi praticamente imperceptível a presença de áreas de necrose nessas condições, mesmo em lesões de tamanho relativamente grande. Zeng e colaboradores (2011) mostraram efeitos semelhantes indicando que o gene MUC18 é capaz de aumentar a migração, invasão e potencial tumorigênico das células SKBR-3 por intensificar vias de sobrevivência cruciais e também por causar uma reprogramação no metabolismo energético aumentando a glicólise aeróbica.

As evidências de que a superexpressão de EMC1 foi capaz de reprogramar o metabolismo energético da célula sustentam-se em vários aspectos: primeiro, observamos um acentuado aumento na expressão de HIF-1α; segundo, os níveis de lactato liberado foram aumentados e o consumo de oxigênio diminuído; por fim, observamos uma redução na produção de EROs e na expressão dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, com destaque para o complexo I, que teve sua expressão diminuída em aproximadamente cinco vezes comparada às células controle. O aumento na expressão do complexo II mediante superexpressão de EMC1 pode se dar em reposta a um mecanismo compensatório frente à redução dos demais complexos da cadeia.

O aumento na expressão de HIF-1α mediante superexpressão de EMC1 é justificável frente à redução no consumo de oxigênio observado nas células, uma vez que o complexo transcricional HIF é ativado em resposta a mudanças nos níveis de oxigênio celular, e tem como alvo proteínas que estão envolvidas em vários aspectos da biologia do tumor incluindo o transporte de oxigênio e glicose, sobrevivência e proliferação celular, angiogênese, invasão e metástase (Poon *et*

al., 2009). Os autores ainda apontam que a atividade de HIF é desregulada em muitos tumores humanos devido à superexpressão de sua subunidade regulatória HIF-a. Brito e colaboradores (2011) mostraram que a expressão de HIF-1a foi aproximadamente 67% dos pacientes observada em analisados aue apresentavam câncer de mama localmente avançado, enfatizando seu papel como um fator de prognóstico ruim. Esses achados se complementam com outros registros na literatura que indicam que a glicólise é mediada parcialmente por HIF-1α, indicando ainda que a conversão de glicose para lactato na presença de oxigênio é uma via aeróbica crítica que permite às células tumorais se proliferarem rapidamente e que a quantidade de lactato produzida está correlacionada com a agressividade do tumor (Griffin; Shockcor, 2004). O fator HIF-1α leva ao aumento na conversão de piruvato à lactato em resposta ao aumento na expressão da piruvato desidrogenase quinase-1, uma enzima que diminui a disponibilidade de piruvato e lactato desidrogenase-A (Koh et al., 2008), sugerindo que o aumento nos níveis de lactato produzido nas células SKBR-3 após a superexpressão de EMC1 é mediado por HIF-1α. É interessante ainda salientar que Li e colaboradores (2014) por meio de abordagens contemporâneas proteômica. identificaram EMC1 dentre um conjunto de proteínas em consideradas mediadores críticos de funções celulares modulados por hipóxia.

O papel de outras vias que atuam de modo a complementar a reprogramação do metabolismo energético sugerido em resposta à superexpressão de EMC1 deve ser também considerado. Os genes que apresentaram correlação negativa com a expressão de EMC1 mostraram-se associados às vias de LKB1 e de moléculas associadas à fosforilação oxidativa e à síntese de ATP. A redução no consumo de oxigênio pelas células em resposta à

superexpressão de EMC1 pode ser desta maneira justificada pela redução nos componentes da cadeia respiratória mitocondrial como sugerido pelos estudos funcionais e pelas análises de bioinformática bem como pelo uso mais intenso da via glicolítica em detrimento a via aeróbica. LKB1 por sua vez é uma quinase caracterizada com papel supressor tumoral e está associada ao metabolismo energético da célula (Shackelford; Shaw, 2009). Faubert e colaboradores (2013) mostraram que a perda de LKB1 promove reprogramação metabólica das células via HIF-1α e que células depletadas para essa molécula mostram aumento na ingestão de glicose e glutamina. Essas informações reforçam a ideia de que a superexpressão de EMC1 pode levar à reprogramação do metabolismo energético da célula e que este processo é em parte mediado pela repressão da via de LKB1.

A redução na produção de EROs foi um ponto que nos chamou à atenção sobretudo por ser um assunto ainda controverso no que tange o papel das espécies reativas de oxigênio na biologia tumoral. Tais moléculas teriam um papel pró-tumoral decorrente de mutações e danos ao DNA em virtude do estresse oxidativo gerado pela alta produção de EROs, desempenhando um importante papel na iniciação do processo tumoral, mas por outro lado a formação de EROs resultaria em apoptose e morte das células tumorais (Waris; Ahsan, 2006). A produção de EROs está ainda intimamente relacionada com a ativação da glicose aeróbica, uma vez que este processo tem o propósito não só de sustentar a atividade proliferativa da célula, mas também de protegê-la contra a morte celular induzida por espécies reativas de oxigênio produzidas na mitocôndria (Ahmad *et al.*, 2005). O complexo I da cadeia respiratória mitocondrial é considerado um pivô no processo de produção de energia pela célula e também responsável pela

produção de EROs (Birrel; Hirst, 2013), o que pode justificar a diminuição da produção destas moléculas após a superxpressão de EMC1 uma vez que a expressão do complexo I mostrou-se reduzida neste estado.

As duas principais espécies reativas de oxigênio geradas, o ânion superóxido (O_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) , participam da sinalização mediada por EROs, mas atuam em vias diferentes e podem explicar seus efeitos contraditórios vistos em câncer (Afanas'ev, 2011). A sonda DHE utilizada para a quantificação de EROs apresenta alta afinidade pelo ânion superóxido e efeitos semelhantes aos apresentados neste estudo foram observados em outros trabalhos. Sawada e colaboradores (2001) mostraram que o superóxido induziu apoptose em células de glioma humano enquanto que o peróxido de hidrogênio não apresentou nenhum efeito, revelando que a diminuição de EROs teria um efeito protetor para o tumor. Há ainda evidências de que células de câncer de mama consideradas com maior potencial maligno são caracterizadas por apresentar uma produção de EROs reduzida (Xing et al., 2008). Ros e colaboradores (2012) fortalecem a ideia do papel anti-tumoral de EROs por mostrarem que células tumorais de próstata apresentam alta dependência de PFKFB4, uma enzima glicolítica que desempenha um papel importante em atenuar espécies reativas de oxigênio de modo a garantir a sobrevivência celular e a síntese de lipídeos, necessárias para a replicação da célula tumoral. É interessante ainda ressaltar que a expressão heteróloga em levedura de EMC4, uma subunidade do complexo do qual EMC1 faz parte, promove crescimento celular e previne contra a morte causada por estresse oxidativo (Ring et al., 2008). Os autores ainda mostram que a superexpressão de sua ortóloga em levedura (YGL231c) também leva a aumento na resistência a este mesmo tipo de

estresse, sugerindo que a superexpressão de EMC1 pode de fato atenuar a formação de EROs e contribuir de forma positiva para a manutenção da atividade tumoral do câncer de mama.

Há ainda uma estreita relação entre a diminuição da produção de EROs e o processo de transição epitélio-mesenquimal (TEM). A morfologia apresentada pelas células SKBR-3 após a superexpressão de EMC1 somada aos achados das análises de bioinformática que indicam uma correlação positiva entre a expressão de EMC1 e os genes TGFβRII, ZEB1, SLUG, WNT5B, MMP14 e MMP2, críticos para o processo de TEM (Gomes *et al.*, 2011), nos levam a propor que um mecanismo semelhante de reprogramação celular poderia ocorrer de modo a contribuir para uma maior atividade invasiva como foi observado para estas células, embora não tenhamos conseguindo mostrar experimentalmente alterações nas moléculas envolvidas no processo de TEM.

Dong e colaboradores (2013) mostraram que o complexo formado por Snail-G9a-Dnmt1 que é crítico para o silenciamento do promotor de E-caderina (Dong *et al.*, 2012), é também necessário para promover a metilação da enzima frutose-1,6-bifosfato (FBP1) em tumores de mama do tipo basal. Os autores mostraram que a perda de FBP1 induz glicólise, inibe o consumo de oxigênio e a produção de EROs por suprimir a atividade do complexo I mitocondrial. Todas essas alterações resultam em uma reprogramação celular levando à ativação de β -catenina mediada pela redução de EROs e aumento no ganho de propriedades do tipo células-tronco que por sua vez apresentam um fenótipo de TEM. Em conjunto esses dados reforçam ainda mais os resultados obtidos neste presente trabalho e ainda sugerem que o aumento na expressão de β -catenina nas células que superexpressam EMC1 pode ser mediado pela redução na quantidade de

EROs produzida. Uma transição epitélio-mesenquimal parcial em resposta ao colaboradores (2012) após a expressão de Wnt3 em células da linhagem SKBR-3 resistentes à herceptina. Vale ainda ressaltar que quando a expressão de LKB1 é suprimida, como sugerido neste trabalho, a integridade das células epiteliais é desestabilizada, tornando-as susceptíveis à transformação induzida por MYC (Partanem et al., 2009). Por outro lado, há também evidências indicando que a transição epitélio-mesenguimal pode ser promovida por hipóxia como o trabalho de Hwang-Versules e colaboradores (2013) mostrando que em células da linhagem SKBR-3 e em outras linhagens tumorais de mama sob condições de hipóxia, ocorre a degradação de PER2 e de seu complexo repressor, que leva à ativação de genes envolvidos com o processo de TEM como TWIST, SLUG e SNAIL. Os autores propõem que a perda de PER2, uma proteína envolvida na regulação do relógio circadiano, está também associada com o processo de tumorigênese mamário. Tiezzi e colaboradores (2013) estabeleceram um elegante modelo de carcinoma mamário murino no qual mostraram que a hipóxia dirigida ao sítio do tumor induz transição epitélio-mesenguimal além de acelerar a disseminação metastática do carcinoma de mama alográfico, revelando ainda que SLUG é um fator crucial para a TEM induzida por hipóxia.

Em conjunto esses achados apontam para uma convergência de vias que envolvem hipóxia, produção de EROs e a reprogramação do metabolismo energético como um todo atuando sobre a transição epitélio-mesenquimal, de modo a conferir maior capacidade migratória e invasiva às células. Tais evidências apontam também que a reprogramação do metabolismo energético não é uma simples consequência em resposta a fatores secundários, mas desempenha um papel fundamental em ditar diferentes estados fenotípicos exibidos pelas células tumorais. Propomos assim um modelo esquemático de modo a ilustrar um possível papel de EMC1 regulando o metabolismo energético de modo a favorecer a manutenção de um fenótipo maligno e conferir propriedades associadas à transição epitélio-mesenquimal (Fig. 19).



Figura 19: Modelo esquemático representativo do possível papel desempenhado por EMC1 na indução de um fenótipo maligno. A superexpressão de EMC1 pode levar a alterações na expressão global de muitos genes, dentre eles reguladores-chave do processo de transição epitélio-mesenquimal como Slug, Wnt e Zeb1. Tais alterações podem ainda levar à reprogramação do metabolismo energético principalmente por suprimir a via de LKB1 e consequentemente intensificar a via glicolítica. A superexpressão de EMC1 conduz ainda à diminuição no consumo de oxigênio e na produção de espécies reativas de oxigênio, contribuindo desta forma para o aumento de características agressivas no câncer de mama.

CONCLUSÃO

VI. CONCLUSÃO

Os dados aqui apresentados fornecem fortes evidências de que a superexpressão de EMC1 tem impacto na expressão global de muitos genes que integram uma intricada rede de interações gênicas específicas atuando em importantes vias de sinalização como a via de Wnt/ β -catenina e, sobretudo na reprogramação do metabolismo energético da célula, de modo a sustentar uma intensa atividade tumoral contribuindo assim para a manutenção de um fenótipo maligno. Os dados sugerem ainda que EMC1 pode estar envolvida na biossíntese e reciclagem de receptores de membrana críticos em vias de migração/invasão como, por exemplo, o receptor integrina- β 1. Desta forma EMC1 apresenta-se como um candidato em potencial a marcador prognóstico no câncer de mama e alvo para futuras terapias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afanas'ev, I. Reactive Oxygen Species Signaling in câncer: comparison with aging. Aging and disease, v. 2:1.219-230, 2011.

Ahmad IM, Aykin-Burns N, Sim JE, Walsh SA, Higashikubo R, Buettner GR, Venkataraman S, Mackey MA, Flanagan S, Oberley LW, and Spitz DR: Mitochondrial O2 and H2O2 mediate glucose deprivation-induced cytotoxicity and oxidative stress in human cancer cells. J. Biol. Chem. 280(6):4254-4263, 2005.

Barkan, D.; Chambers, A. F. β1-integrin: a potential therapeutic target in a battle against cancer recurrence. Clinical Cancer Research, 17(23), 2011.

Bernards R, Weinberg RA: A progression puzzle. Nature, 418(6900):823, 2002.

Bhatti, P.; Doody, M. M.; Rajaraman, P.; Alexander, B. H.; Yeager, M.; Hutchinson, A.; Burdette, L.; Thomas, G.; Hunter, D. J.; Simon, S. L.; Weinstock, R. M., Rosenstein, M.; Stovall, M.; Preston, D. L.; Linet, M. S.; Hoover, R. N.; Chanock, S. J. and Sigurdson, A. J. Novel breast cancer risk alleles and interaction with ionizing among U.S. radiologic. Radiat. Res. 173(2):214-224, 2010.

Bircham, P. W.; Maass, D. R.; Roberts, C. A.; Kiew, P. Y.; Low, Y. S.; Yegambaram, M.; Matthews, J.; Jack, C. A. e Atkinson, P. H. Secretory Secretory pathway genes assessed by high-throughput microscopy and synthetic genetic array analysis. Mol. BioSystems, 7, 2589-2598, 2011.

Birrel, J. A.; Morina, K.; Bridges, H.R.; Fridrich, T. e Hirst, J. Investigating the function of [2Fe-2S] cluster N1a, the off-pathway cluster in complex I, by manipulating its reduction potential. Biochemical Journal, 15;456(1):139-46, 2013.

Blanco, M. A.; Kang, Y. Signaling pathways in breast cancer metastasis - novel insights from functional genomics. Breast Cancer Res. 13: 206, 2011.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-54, 1976.

Brito, L. G. O.; Schiavon, V. F.; Andrade, J. M.; Tiezzi, D. G.; Peria, F. M. e Marana, H. R. C. Expression of Hypoxia-inducible factor 1-a and Vascular endothelial growth factor–C in locally advanced breast cancer patients. Clinical Science, 66(8):1313-1319, 2011.

Burdall, S. E.; Hanby, A. M.; Lansdown, M. R. J. e Speirs, V. Breast cancer cell lines: friend or foe? (review). Breast Cancer Research, v.5, n.2, 2003.

Cappellen, D.; Schlange, T.; Bauer, M.; Maurer, F. and Hynes, N. Novel c-MYC target genes mediate differential effects on cell proliferation and migration. Embo Reports, v. 8, 2007.

Castro, N.P.; Osório, C.A.B.T.; Torres, C.; Bastos, E.P.; Mourão-Neto, M.; Soares, F. A.; Brentani, H.P. e Carraro, D.M. Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal carcinoma. Breast Cancer Research, v. 10, n.5, 2008.

Chen, R.; Jiang, X.; Sun, D.; Han, G.; Wang, F.; Ye, M.; Wang, L.; Zou, H. Glycoproteomics Analysis of Human Liver Tissue by Combination of Multiple Enzyme Digestion and Hydrazide Chemistry. Journal of Proteome Research, v.8 (2), 651-661. 2009.

Cheyne, R. W.; Trembleau, L.; McLaughlin, A. and Smith, T. A. D. Changes in 2-fluoro-2-deoxy-Dglucose incorporation, hexokinase activity and lactate production by breast cancer cells responding to treatment with the anti-HER-2 antibody trastuzumab. Nuclear Medicine and Biology, 38, 2011. Choi, S.; Moon, J.; Ahn, Y.; Ahn, J.; Kim, D. and Han, T. Tsc-22 enhances TGF- β signaling by associating with Smad-4 and induces erythroid cell differentiation. Mollecular and Cellular Biochemistry, n. 271:23-28, 2005.

Choo, K. H.; Tan, T. W. and Ranganathan, S. SPdb – a signal peptide database. BMC Bioinformatics, 6:249, 2005.

Christianson, J. C.; Olzmann, J. A.; Shaler, T. A.; Sowa, M. E.; Bennett, E. J.; Caleb M. Richter, C. M.; Tyler, R. E.; Greenblatt, E. J.; Harper, W. and Kopito, R. R. De ning human ERAD networks through an integrative mapping strategyNature Cell Biology, v. 14, n. 1, 2012.

Claus EB, Risch N,ThompsonWD. Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. AmJHum Genet, v. 48, 1991.

Costantini, D. L.; Bateman, K.; McLarty, K.; Vallis, K. A. and Reilly, R. M. Trastuzumab-Resistant Breast Cancer Cells Remain Sensitive to the Auger Electron–Emitting Radiotherapeutic Agent ¹¹¹In-NLS-Trastuzumab and Are Radiosensitized by Methotrexate. The Journal of Nuclear Medicine, v. 49, 2008.

Creighton, C. J.; Cordero, K.; Larios, J.M.; Miller, R. S.; Johnson, M. D.; Chinnaiyan, A. M.; Lippman, M. E.; Rae, J. M. Genes regulated by estrogen in breast tumor cells in vitro are similarly regulated in vivo in tumor xenografts and human breast tumors. Genome Biology, volume 7, Issue 4. 2006.

Dettling, M.; Gabrielson, E.; Parmigiani, G. Searching for differentially expressed gene combinations. *Johns Hopkins University, Dept. of Biostatistics. Working Papers,* n. 77. 2005.

Dong, C., Wu, Y., Yao, J., Wang, Y., Yu, Y., Rychahou, P.G., Evers, B.M., and Zhou, B.P. G9a interacts with Snail and is critical for Snail-mediated Ecadherin repression in human breast cancer. J. Clin. Invest. 122, 1469–1486, 2012.

Dong, C.; Yuan, T.; Wu, Y.; Wang, Y.; Fan, T.W.M.; Miriyala, S.; Lin, Y.; Yao, J.; Shi, J.; Kang, T.; Lorkiewicz, P.; Clair, D.S.; Hunh, M.; Evers, B.M. e Zhou, B.P. Loss of FBP1 by Snail-Mediated Repression Provides Metabolic Advantages in Basal-like Breast Cancer. Cancer Cell 23, 316-331, 2013.

Easton DF, Ford D, Bishop DT. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet, v. 56, 1995.

Ewing, R. M.; Chu, P.; Elisma, F.; Li, H.; Taylor, P.; Climie, S.; Mcbroom-Cerajewski, L.; Robinson, M. D.; O'connor, L.; Li, M.; Taylor, R.; Dharsee, M.; Ho, Y.; Heilbut, A.; Moore, L.; Zhang, S.; Olga, O.; Bukhman, Y. V.; Ethier, M.; Sheng, Y.; Vasilescu, J.; Abu-Farha, M.; Lambert, J.; Duewel, H. S.; Stewar, I. I.; Kuehl, B.; Hogue, K.; Colwill, K.; Gladwish, K.; Muskat, B.; Kinach, R.; Adams, S.; Moran, M. F.; Morin, G. B.; Topaloglou, T. and Figeys, D. Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. Molecular systems biology, v. 3, n. 89. 2007.

Faubert, B.; Emma E. Vincenta; Takla Grissa; Bozena Samborska; Said Izreiga; Robert U. Svenssonc; Orval A. Mamera; Daina Avizonisa; David B. Shackelford; Reuben J. Shaw and Russell G. Jones. Loss of the tumor suppressor LKB1 promotes metabolic reprogramming of cancer cells via HIF-1α. PNAS, Early Edition, 2013.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Disponível em http://globocan.iarc.fr, accessed on day/month/year, 2013.

Filmus, J.; Capurro, M. e Rast, J. Glypicans – protein family review. Genome Biology, 9:224, 2008.

Fogh, J. Human tumor cells in vitro. New York: Plenum Press, 1975.

Foroni, C.; Broggini, M.; Generali, D. e Damia, G. Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact. Cancer Treatment Reviews, v.38:689-697, 2012.

Fox, CJ; Hammerman, PS.; Thompson, CB; Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. Nat Rev Immunol., 5, 844, 2005.

Franceschini, A.; Szklarczyk, D.; Frankild, S.; Kuhn, M.; Simonovic, M.; Roth, A.; Lin, J.; Minguez, P.; Bork, P.; von Mering, C. e Jensen, LJ. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. Nucleic Acids Research, v. 41, 2013.

Gardner, H.; Kreidberg, J.; Kot eliansky, V.; Jaenisch, R. Deletion of integrin alpha1 by homologous recombination permits normal murine development but gives rise to a specifi c defi cit in cell adhesion. *Dev Biol*,175:301-313, 1996.

Gebhard C, Schwarzfischer L, Pham TH, Schilling. Genome-wide profiling of CpG methylation identifies novel targets of aberrant hypermethylation in myeloid leukemia. Cancer Res, 15;66(12):6118-28, 2006.

Gomes, L.R.; Terra, L.F.; Sogayar, M.C. e Labriola, L. Epithelial-Mesenchymal Transition: Implications in Cancer Progression and Metastasis. Current Pharmaceutical Biotechnology, v.12:1881-1890, 2011.

Goytain, A. e Quamme, G. A. Identification and characterization of a novel family of membrane magnesium transporters, MMgT1 and MMgT2. Am J Physiol Cell Physiol 294: C495–C502, 2007.

Griffin, J.L. e Shockcor, J.P.Metabolic profiles of cancer cells. Nature reviews (cancer), v.4, 2004.

Hall J. M., Couse J. F., Korach K. S.: The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. Journal of biological chemistry, 276:36869-36872. 2001.

Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. Cell 100: 57-70, 2000.

Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. Cell 144: 646-674, 2011.

Hashimoto, S.; Onodera, Y.; Hashimoto, A.; Tanaka, M.; Hamaguchi, M.; Yamada, A. and Sabe, H. Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. PNAS, v. 101, n. 17: 6647-6652, 2004.

Hedenfalk, I.; Duggan, D.; Chen, Y.; Radmacher, M.; Bittner, M.; Simon, R.; Meltzer, P.; Gusterson, B.; Esteller, M.; Kallioniemi, O.; Wilfond, B.; Borg, A. and Trent, J. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. The New England Journal of Medicine, v. 344, n. 8, 2001.

Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell, 110:673–87. 2002.

Hu, Z., et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. BMC Genomics. 7:96, 2006.

Hwang-Verslues et al. Loss of corepressor PER2 under hypoxia up-regulates OCT1-mediated EMT gene expression and enhances tumor malignancy. PNAS, v. 110, n. 30:12331-12336, 2013.

Instituto Nacional Do Câncer (INCA). Estimativas de incidência e mortalidade. http://www.inca.gov.br. Página acessada em maio de 2014.

Itoh Y, Seiki M. MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. J Cell Physiol 206:1–8, 2006.

Jiao, X. et al. Somatic Mutations in the Notch, NF-KB, PIK3CA, and Hedgehog Pathways in Human Breast Cancers. Genes, Chromosomes & Cancer. 51:480-489, 2012.

Jones, J.L.; Critchley, D.R.; Wal ker, R.A. Alteration of stromal protein and integrin expression in breast – a marker of premalignant change? *J Pathol* 167:399-406, 1992.

Jones, R.G., and Thompson, C.B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. Genes Dev. 23, 537–548, 2009.

Jonikas MC, Collins SR, Denic V, Oh E, Quan EM, Schmid V, Weibezahn J, Schwappach B, Walter P, Weissman JS, Schuldiner M. Comprehensive characterization of genes required for protein folding in the endoplasmic reticulum. Science, 2009.

Koh, M.Y.; Spivak-Kroizman, T. R. e Powis, G. HIF-1 regulation: not so easy come, easy go Trends in Biochemical Sciences Vol.33 No.11, 2008.

Lahlou, H.; Muller, W. J. β1-integrins signaling and mammary tumor progression in transgenic mouse models: implications for human breast cancer. Breast Cancer Research, v. 13:229. 2011.

Li, X.; Ren, Y.; Sorokin, V.; Poh, K.K.; Ho, H.H.; Lee, C.N.; Kleijn, D.; Lim, S.K.; Tam, J. P.; Sze, S.K. Quantitative profiling of the rat heart myoblast secretome reveals differential responses to hypoxia and re-oxygenation stress. Journal of proteomics, 98:138-149, 2014.

Lima, Carlos Antônio Couto. Análise funcional e molecular do gene CG2943, o ortólogo do gene KIAA0090 em Drosophila melanogaster (Dissertação de Mestrado), 2013.

Lis, H. and Sharon, N. Protein Glycosylation – structural and functional aspects (Review). Eur. J. Biochem., v. 218, 1-27, 1993.

Liu Y, Adachi M, Zhao S, et al. Preventing oxidative stress: a new role for XBP1. Cell Death Differ.16:847-57, 2009.

Lopes, Milene Mantovani. Caracterização do produto de um novo gene humano, kiaa0090, com indícios de envolvimento em processos celulares vitais relevantes em câncer (Dissertação de Mestrado), 2007.

Louie, R.J. et al. A yeast phenomic model for the gene interaction network modulating CFTR- Δ F508 protein biogenesis. Genome Medicine, 4:103, 2012.

Malhotra GK, Zhao X, Band H, et al (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Therapy*, 10, 955-60.

Marín-Hernández, A.; Gallardo-Pérez, J.C.; Rodríguez-Enríquez, S.; Encalada, R.; Moreno-Sánchez, R.; Saavedra, E. Modeling cancer glycolysis. Biochimica et Biophysica Acta 1807:755–767, 2011.

Martins, F.C. et al. Evolutionary Pathways in BRCA1-Associated Breast Tumors. Cancer Discovery, 2:503-511, 2012.

Matsuda, K.; Maruyama, H.; Guo, F.; Kleeff, J.; Itakura, J.; Matsumoto, Y.; Lander, A.D. e Korc, M. Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells. Cancer Research. 61 (14): 5562-9, 2001.

Minafra, L.; Bravatà, V.; Forte, G.I.; Cammarata, F.P.; Gilardi, M.C. e Messa, C. Gene Expression Profiling of Epithelial–Mesenchymal Transition in Primary Breast Cancer Cell Culture. Anticancer Research, v.34:2173-2184, 2014.

Mohammad, M.A. et al. Clinical relevance of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinases (MMP-2 and MT1-MMP) in human breast cancer tissue. Mol Cell Biochem, 366:269-275, 2012.

Molina, R.A.S. Caracterização da distribuição subcelular e tecidual da proteína KIAA0090 e estudos de seu envolvimento em câncer e resposta a estresses (Dissertação de Mestrado), 2010.

Neer, E. J.; Schmidt, C. J.; Nambudripad, R. and Smith, T. F. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. Nature, v. 371, 1994.

Olopade, O.; Grushko, T.; Nanda, R. and Huo, D. Advances in breast cancer: pathways to personalized medicine. Clinical cancer research, v. 14(24), 2008.

Partanen, J.I., Nieminen, A.I., and Klefstrom, J. 3D view to tumor suppression: Lkb1, polarity and the arrest of oncogenic c-Myc. Cell Cycle 8, 716–724, 2009.

Perou, C.M., et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 406:747–752, 2000.

Polyak, K. Breast Cancer: origins and evolution. The Journal of Clinical Investigation, v. 117, n. 11, 2007.

Poon, E.; Harris, A.L. e Aschcroft, M. Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. Molecular Medicine (expert reviews), v.11, 2009.

Pust, S.; Klokk, T.; Musa, N.; Jenstad, M.; Risberg, B.; Erikstein, B.; Tcatchoff, L.; Liestøl, K.; Danielsen, H.; Deurs, B. and Sandivg, K. Flotillins as regulators of ErbB2 levels in breast cancer. Oncogene, 1-9, 2012.

Richard M, Boulin T, Robert VJ, Richmond JE, Bessereau JL. Biosynthesis of ionotropic acetylcholine receptors requires the evolutionarily conserved ER membrane complex. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013.

Ring, G.; Khoury, C.M.; Solar, A.J.; Yang, Z.; Mandato, C.A.; Greenwood, M.T. Transmembrane protein 85 from both human (TMEM85) and yeast (YGL231c) inhibit hydrogen peroxide mediated cell death in yeast. FEBS Letters 582:2637–2642, 2008.

Ros S, Santos CR, Moco S, Baenke F, Kelly G, Howell M, et al. Functional metabolic screen identifies 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4 as an important regulator of prostate cancer cell survival. Cancer Discov;2:328–43, 2012.

Sabe, H.; Hashimoto, S.; Morishige, M.; Hashimoto, A. and Ogawa, E. The EGFR-GEP100-Arf6 pathway in breast cancer. Cell adhesion and migration, v. 2:2, 2008.

Sawada M, Nakashima S, Kiyono T, Nakagawa M, Yamada J, Yamakawa H, Banno Y, Shinoda J, Nishimura Y, Nozawa Y, Sakai Y. p53 regulates ceramide formation by neutral sphingomyelinase through reactive oxygen species in human glioma cells. Oncogene, 20: 1368-78, 2001.

Schubert E L, Mefford H C, Dann J L, Argonza R H, Hull J, King M C. BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish families with breast and ovarian cancer. GenetTest, v. 1:41-46, 1997.

Semenza, G.L. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism.Curr. Opin. Genet. Dev. 20, 51–56, 2010.

Shackelford, D.B. e Shaw, R.J. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumor suppression. Nat Rev Cancer, 9(8): 563–575, 2009.

Shuda, M. et al. Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. J. Hepatol. 38, 605–614, 2003.

Siegel, R.; Ma, J.; Zou, Z. e Jemal, A. Cancer Statistics – 2014. Cancer J Clin, 64:9–29, 2014.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science v. 235: 177-182, 1987.

Sorlie, T., et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. BMC Genomics. 7:127, 2006.

Stingl, J. e Caldas, C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. Nature Reviews (cancer), v.7, 2007.

Stitziel, N.; Mar, B.; Liang, J. and Westbrook, C. Membrane-associated and secreted genes in breast cancer. Cancer Research, v. 64, 2004.

Tiezzi, D.G.; Antonio, H.M.R; Sicchieri, R.D.; Milanezi, C.M.; Mandarano, L.R.M.; Coelho, A.A.; Andrade, J.M. A novel *in vivo*model of breast cancer hypoxia reveals an epithelial-to-mesenchymal transition switch. [abstract]. In: Proceedings of the 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 73(8 Suppl): Abstract nr 4047, 2013.

Tsai, Y.C. and Weissman, A.M. The Unfolded Protein Response, Degradation from the Endoplasmic Reticulum, and Cancer. Genes Cancer, v.1(7):764–778, 2010.

Valsesia, A.; Rimoldi, D.; Martinet, D.; Ibberson, M.; Benaglio, P.; Quadroni, M.; Waridel, P.; Gaillard, M.; Pidoux, M.; Rapin, B.; Rivolta, C.; Xenarios, I.; Simpson, A.J.G.; Antonarakis, S. E.; Beckmann, J.S.; Jongeneel, C.V.; Iseli, C.; Stevenson, B. J. Network-Guided Analysis of Genes with Altered Somatic Copy Number and Gene Expression Reveals Pathways Commonly Perturbed in Metastatic Melanoma. Plos One, v. 6, 2011.

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science 324, 1029–1033, 2009.

Wachi, S.; Yoneda, K.; Wu, R. Interactome-transcriptome analysis reveals the high centrality of genes differentially expressed in lung cancer tissues. Bioinformatics. 21:4205-8, 2005.

Wang, J., Duncan, D., Shi, Z., Zhang, B. WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. Nucleic Acids Res, 41, 2013.

Warburg, O.H. The Metabolism of Tumours: Investigations from the Kaiser Wilhelm Institute for Biology, Berlin-Dahlem (London, UK: Arnold Constable), 1930.

Warburg, O.; Posener, K. and Negelein, E. Ueber den Stoffwechsel der Tumoren; Biochemische Zeitschrift, Vol. 152, pp. 319-344, 1924. (German). Reprinted in English in the book On metabolism of tumors by O. Warburg, Publisher: Constable, London, 1930.

Waris, G.; Ahsan, H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. Journal of Carcinogenesis (review), 5:14, 2006.

Wu, Y.; Ginther, C.; Kim, J.; Mosher, N.; Chung, S.; Slamon, D. e Vadgama, J.V. Expression of Wnt3 Activates Wnt/b-Catenin Pathway and Promotes EMT-like Phenotype in Trastuzumab-Resistant HER2-Overexpressing Breast Cancer Cells. Molecular Cancer Research, v.15, 2012.

Xing, G.; Romanyukha, A. e Bunger, R. Reactive Oxygen Species (ROS) in Human Breast Cancer cell lines Differing in Malignancy: An Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Study. FASEB Journal, v. 22 (Meeting Abstract Supplement) 794.10, 2008.

Yang, J.; Mani, S.A.; Donaher, J.L.; Ramaswamy, S.; Itzykson, R.A.; Come, C.; Savagner, P.; Gitelman, I.; Richardson, A and Weinberg, R. Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis. Cell, Vol. 117, 927–939, 2004.

Yarden, Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. Oncology, v. 61, 2012.

Zeng, G.; Cai, S.; Liu, Y. e Wu, G. METCAM/MUC18 augments migration, invasion, and tumorigenicity of human breast cancer SK-BR-3 cells. Gene, 492:229–238, 2012.

ANEXO: Lista dos genes de *score* significativo obtidos da análise de correlação de Pearson que apresentaram correlação positiva ou negativa com a expressão de EMC1

CORRELAÇÃO POSITIVA		CORRELAÇÃO NEGATIVA	
GENE	P	GENE	Р
PLOD1	0,740279754	C19orf79	-0,50029
SEC61A1	0,718354978	CPNE4	-0,50042
GLG1	0,708817099	ACTR6	-0,50044
PLEKHM2	0,697315847	SOX13	-0,50044
DDOST	0,676446679	ZNF420	-0,5006
ECE1	0,66539187	ZNF235	-0,50067
SDF4	0,661729642	CGN	-0,50079
MYO1E	0,659477234	TFAP2C	-0,50197
UBR4	0,657578351	MIR600HG	-0,50221
CALU	0,653866782	PIK3C2B	-0,50225
ITGA5	0,638002642	UBN2	-0,50242
ACTN1	0,633418196	LOC100652860	-0,50257
PTRF	0,632933036	EAPP	-0,50262
SERPINH1	0,631965274	C9orf152	-0,50306
ATG9A	0,629875354	KLHDC9	-0,50313
CLSTN1	0,629621286	KIAA0895	-0,50314
SNAI2	0,629173918	RYBP	-0,50375
PVR	0,62770222	LRRCC1	-0,50492
HSPG2	0,627526097	SEPP1	-0,50507
TPM2	0,622099611	PLAC2	-0,50511
MYLK	0,620774713	SLC4A8	-0,50518
TGFBR2	0,620396298	CD46	-0,50536
FNDC3B	0,619167851	NACAP1	-0,50552
EIF5A	0,616312586	PHF2	-0,50633
LEPREL1	0,615993999	SLTM	-0,50645
MMP14	0,615309113	KIAA0907	-0,50665
GALNT2	0,614506121	PCDHA9	-0,50718
EMP3	0,613841647	EPCAM	-0,50722
GLT25D1	0,612262753	LYPLAL1	-0,50754
EHD2	0,610220775	PBX1	-0,50768
LGMN	0,605445824	CYP2R1	-0,50799
MYH9	0,604991027	LLGL2	-0,50833
SGK1	0,603882569	NBEAL2	-0,5085
CAV1	0,602567573	POGZ	-0,50881
OSMR	0,602253388	LOC692247	-0,50891
EXT1	0,601740765	ADSS	-0,50899
HIC1	0,599488611	FANCF	-0,50925
CHPF	0,599380437	RC3H1	-0,50935
CTSC	0,598611786	MFSD8	-0,50942

TGOLN2	0,597587741	SPTSSA	-0,50969
LUZP1	0,59483658	CCDC64B	-0,50975
LOXL2	0,593201522	DKFZP586I1420	-0,50981
MBNL1	0,592750626	EPS8L1	-0,51001
LAMC1	0,591314152	ST6GALNAC2	-0,5103
CCDC80	0,591220888	ELL3	-0,51075
NF2	0,590669714	ZNF571	-0,51084
SLC16A1	0,590665762	PPIL6	-0,51087
IFI16	0,588588264	NDUFA2	-0,51087
MIR100HG	0,588068164	UFC1	-0,51153
DCBLD2	0,586127527	TBC1D30	-0,5118
GBE1	0,58415565	ZNF124	-0,5119
ENO1	0,583984925	AGGF1	-0,512
PDIA5	0,583945513	DCAF10	-0,51203
CYB5R3	0,583636363	SLC37A1	-0,51204
CKAP4	0,583017593	ERBB3	-0,51225
DSE	0,582781919	ZNF33A	-0,51252
SIRPA	0,582382013	ZNF260	-0,51267
CD109	0,582001233	STX3	-0,5127
TMEM171	0,581702858	CXXC4	-0,51279
FN1	0,580907539	TOM1L1	-0,5131
DERL2	0,580697689	NUDT12	-0,51318
NNMT	0,579609513	TMEM106C	-0,51323
ACTC1	0,579167313	TMEM116	-0,51353
SRPX	0,577365429	DCUN1D2	-0,51355
GADD45A	0,57686703	RERG	-0,51362
FKBP10	0,576423862	TMEM125	-0,51374
NDEL1	0,576299454	NAA38	-0,51386
LAMB1	0,575935294	FOXA1	-0,51392
PKM2	0,57468285	ZNF607	-0,51441
OBFC2A	0,574127235	CPEB3	-0,51449
NECAP2	0,573117321	NEBL	-0,51465
CLMP	0,571873691	SRSF7	-0,51521
LOX	0,571393497	ZFP30	-0,51545
CYR61	0,571104379	FAM179B	-0,51577
MTHFD1L	0,570836457	PPP1R26	-0,51596
LEPRE1	0,570668166	PRRG4	-0,51607
PLOD3	0,570453672	ASB8	-0,5161
TMEM30A	0,569626203	SPOPL	-0,51614
WWTR1	0,5688049	RSPH1	-0,51638
C3orf64	0,568778206	CERS2	-0,51749
MICALL1	0,567600136	SRP9	-0,51756
SRGN	0,567248778	TOB1	-0,51765
SLC9A9	0,566900738	CDC42SE1	-0,51776
FSTL1	0,566401042	GPD1L	-0,51795

STT3A	0,566370271	LOC100294362	-0,51796
DKK3	0,564011005	CASP6	-0,51821
AXL	0,563248789	NDUFA5	-0,51871
ERLIN1	0,562563491	RBAK	-0,51925
SYDE1	0,560827639	KIAA1598	-0,51966
GNG12	0,560730199	CAPN8	-0,5199
PRKCDBP	0,560304721	LOC728537	-0,51995
EFHD2	0,560222652	CBX3	-0,52009
MUL1	0,559703742	GOLGA2P5	-0,52023
COTL1	0,559682506	PRCC	-0,52025
ITPRIP	0,559548716	FBXO3	-0,521
GPC1	0,559492416	TRIM24	-0,52137
TMEM22	0,559217321	GCA	-0,52162
ALDH1B1	0,559150486	ASB13	-0,52241
FLNC	0,557683734	CPAMD8	-0,52362
MGAT1	0,557585449	PPCS	-0,52378
CSPG4	0,557343355	ZNF180	-0,52387
DCBLD1	0,55732009	CHMP4C	-0,52451
PLAUR	0,557103998	ETNK2	-0,52501
NPC1	0,55598185	CRBN	-0,52519
FLNA	0,555827447	MB	-0,5253
LRP1	0,555136525	GPRC5C	-0,52601
ANXA2P2	0,554648599	VPS72	-0,52652
TRIO	0,554265202	E2F5	-0,52692
VAMP3	0,553783852	LIN9	-0,52723
NLRP1	0,553559995	ATP2C2	-0,52755
ATP1B3	0,553549329	FAM110C	-0,52762
SPTBN1	0,553301909	RCOR3	-0,52792
MSN	0,552962997	INADL	-0,52897
TMCO7	0,55254249	ZNF565	-0,52903
VEGFA	0,552160234	RAB11FIP4	-0,52965
LOC100506941	0,55191961	CAMSAP3	-0,5305
FBXO42	0,551669554	C1orf9	-0,53067
TNFRSF10B	0,551524143	FLVCR1	-0,53086
HSP90B1	0,551305719	SLC26A11	-0,53091
ANTXR1	0,55126474	ZNF195	-0,53109
AMPD2	0,551227239	RAB25	-0,53189
ETS1	0,551021618	EFHD1	-0,5319
MYO1C	0,550670919	MREG	-0,5323
TMEM200B	0,550296416	ZNF138	-0,53239
LARP6	0,55024926	VEZF1	-0,53264
BMP1	0,550145415	ANXA9	-0,53343
WNT5B	0,549084804	GATAD2B	-0,53366
SLC12A4	0,549052955	LCOR	-0,53386
SEMA7A	0,548991938	LOC100128822	-0,53393

GPR176	0,548740237	RAB15	-0,53407
MET	0,548614178	DAP3	-0,53448
GANAB	0,548198236	WWP1	-0,53466
COL1A2	0,548144687	LOC100506599	-0,53488
ANKRD11	0,547228877	KCTD3	-0,53552
TAGLN	0,547147094	ZBTB34	-0,53564
CAV2	0,547105986	ZNF84	-0,53583
VGLL3	0,546892819	SH3GLB2	-0,53639
PPP1R18	0,54664595	DNALI1	-0,53658
SACS	0,546209866	PCMTD2	-0,53685
AHNAK2	0,545388997	KIFC2	-0,53695
ATP10D	0,545237873	KIAA1244	-0,53756
MCFD2	0,545219857	TFF1	-0,53833
COL4A1	0,544648569	VIPR1	-0,53989
MAP7D1	0,544489052	TJP3	-0,54016
TMEM43	0,544464614	CXCR4	-0,54086
CTDNEP1	0,544257891	WDR26	-0,54146
PHLDB2	0,543833966	TTC9	-0,54168
ATP2B4	0,543049018	SUMO4	-0,54197
MIR31HG	0,542988062	EPB41L5	-0,5432
BLID	0,542987914	BOLA1	-0,54408
COL4A2	0,542697151	ZFP14	-0,54435
ERCC2	0,542067509	CACNA1D	-0,54497
RIN3	0,541360984	ZNF200	-0,54514
MARVELD1	0,541062612	AFTPH	-0,54516
SLC39A14	0,540554239	MBD6	-0,54522
C1orf144	0,539934019	ATP6V1G1	-0,54542
COL6A2	0,539816195	STX17	-0,54624
DHDDS	0,539522816	ABCG1	-0,54629
MICAL2	0,539224438	PAQR6	-0,54639
WARS	0,538001556	GPR137C	-0,54648
BST1	0,537838661	ZSCAN16	-0,54688
GRN	0,537694322	CRNKL1	-0,54708
ANXA5	0,537442369	RASEF	-0,54744
NGF	0,536997084	MGAT4A	-0,54746
EHBP1L1	0,535193463	ARID4A	-0,54761
SLC7A1	0,534889874	RFWD2	-0,54795
FOSL1	0,534374102	COX6C	-0,54859
FSCN1	0,534344144	RAB11A	-0,54861
SERPINE2	0,533874997	ALDH3B2	-0,5487
ZAK	0,533851519	LUC7L3	-0,54927
RNF145	0,533531875	COX6B1	-0,55018
EXTL3	0,53342957	GATC	-0,55059
TNFRSF10D	0,533397806	PRR15L	-0,55063
FBN1	0,532529109	ZC3H8	-0,55122

MAP4	0,532350157	SBK1	-0,55252
IL6	0,532339561	MTERFD3	-0,55424
SH3BGRL3	0,532083598	ARHGAP39	-0,55469
MYBBP1A	0,531869771	CNOT6	-0,55472
C11orf68	0,531374294	POGK	-0,55502
REXO2	0,53070722	LRRC8B	-0,55531
SERPINE1	0,530516685	C1orf115	-0,55597
PPM1M	0,53014566	PDIK1L	-0,55698
KIF1C	0,530122953	CCDC125	-0,55728
ITGBL1	0,529368777	TSNAX	-0,55739
ADM	0,528881478	RBM11	-0,55757
PDIA6	0,528447893	ATP5C1	-0,558
ADAM12	0,528393576	FAM184A	-0,55831
NEXN	0,52802168	ENSA	-0,55882
PHLDB1	0,52793207	GDPD1	-0,55884
NPR2	0,527457925	SLC25A29	-0,55885
FAM176A	0,527375903	KIAA0232	-0,55908
FBLIM1	0,527094231	COA5	-0,55924
SPARC	0,526458864	USP38	-0,55933
THY1	0,526102149	LAMTOR2	-0,55967
FAS	0,526037305	JTB	-0,55992
CDH11	0,525507095	ZNF12	-0,56262
TNFRSF11B	0,525277744	ZNF32	-0,56284
KIF13A	0,524913894	C1orf27	-0,56295
SSR1	0,524422001	LOC100505938	-0,56315
RRBP1	0,524170844	MLF1IP	-0,56369
C14orf149	0,524108636	RBM8A	-0,56376
TGFBI	0,523982695	GADD45G	-0,56384
CHSY3	0,523728467	GPR160	-0,56436
COPZ2	0,523374681	RAPGEF5	-0,56502
GMPPA	0,522754058	MAPK9	-0,56535
ATL3	0,522279001	BRWD1	-0,56557
C19orf10	0,52212392	PAIP2	-0,5683
BNC2	0,522122402	ENOPH1	-0,56846
DZIP1L	0,521994694	MYB	-0,56884
ZEB1	0,521701152	ZCCHC8	-0,56982
LAYN	0,521224645	C18orf1	-0,56982
FSTL3	0,519791337	C12orf73	-0,56998
LOC100506718	0,519493607	RAB11FIP1	-0,57016
FOSL2	0,519181647	PSMA2	-0,57066
LMF2	0,519169423	GGCT	-0,5709
ANXA2P1	0,51911289	ANGEL2	-0,57092
VCAN	0,518527191	GRTP1	-0,57158
GPN2	0,51780741	STARD10	-0,57173
CALD1	0,517195006	PRUNE	-0,57181

HEG1	0,516859413	ZNF552	-0,57226
PELO	0,516851955	ZBTB41	-0,57234
VIM	0,516846959	LNX1	-0,57433
YAP1	0,516659548	ZNF652	-0,57459
LHFP	0,516629054	TFF3	-0,57486
IFNE	0,516389903	ZMAT1	-0,57556
C1S	0,516377985	C4orf29	-0,57565
LOC100132891	0,51636009	AHCTF1	-0,5768
FHL1	0,516065391	BSPRY	-0,57791
MMP2	0,51599299	ZNF554	-0,57807
EHBP1	0,515826999	ISOC1	-0,57833
SH2D5	0,515722534	PPP1R15B	-0,57875
GOPC	0,515575278	COG2	-0,57886
GALNT5	0,515107946	RALGAPA1	-0,57937
COX7A1	0,51503193	ZNF823	-0,57992
CORO1C	0,514836909	SAP30L	-0,58114
FAM101B	0,514638749	IMMP1L	-0,58237
CNTNAP1	0,514401449	MDM4	-0,58291
CRYBG3	0,514171309	PEX19	-0,58307
ACTB	0,514012197	KANSL2	-0,58397
PTGFR	0,513730635	CYTH2	-0,58399
IGFBP6	0,510814663	CREB3L4	-0,58436
PROCR	0,510814271	SECISBP2	-0,58492
SSR3	0,509117765	TTC39A	-0,58551
IL1RAP	0,509089106	ZNF678	-0,58566
AVEN	0,509016566	C1orf43	-0,58713
CHST7	0,508696032	CEP350	-0,58774
DHX38	0,508659985	DCAF8	-0,58931
EXT2	0,508545723	CEP95	-0,59101
TBRG1	0,507314887	KIAA1737	-0,59218
CHST14	0,507026883	C19orf46	-0,5926
ADAMTS6	0,506961089	ISG20L2	-0,59278
GLIPR1	0,506934617	CACYBP	-0,59598
SSH1	0,506870731	ERO1LB	-0,59648
TMED9	0,506342155	HNRNPU-AS1	-0,60095
DNAJB4	0,506224522	PHOSPHO2	-0,60302
HYOU1	0,50614657	GGPS1	-0,60678
PDLIM7	0,506100803	EXOC6	-0,60692
MAP1B	0,506095914	ARID4B	-0,60822
PARVB	0,506020813	METTL18	-0,61095
MSRB3	0,505520147	TC2N	-0,6122
CD59	0,505268384	C2orf15	-0,61244
ARSK	0,505161993	SCYL3	-0,61258
BRD9	0,505028932	PLA2G12A	-0,61329
IGFBP7	0,504981217	ADAM1	-0,61398

RCN3	0,504900739	GPR137B	-0,61476
MAP2K3	0,504443059	STRBP	-0,62518
CXorf69	0,504019399	BPNT1	-0,62526
MYO10	0,503969933	ZNF664	-0,62769
CNN1	0,503860212	TADA1	-0,62802
COL6A1	0,503223258	RALGPS1	-0,63404
TRAM2	0,503104945	FAAH2	-0,64467
MFAP5	0,502847376	MBTD1	-0,64516
ETV5	0,502113748	SHANK2	-0,64721
PSMD2	0,501977628	ICA1	-0,65334
GOLIM4	0,501481644	GKAP1	-0,65859
PRRX2	0,501355534	MCF2L	-0,69279
COL5A1	0,501123566		
PANX1	0,500752942		
KLHL21	0,500336743		
TRNP1	0,500156084		