MAGNA MAGALHÃES SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DE MASPINA NO
DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA MAMÁRIA MURINA E A
CORRELAÇÃO COM SUA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

MAGNA MAGALHÃES SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DE MASPINA NO
DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA MAMÁRIA MURINA E A
CORRELAÇÃO COM SUA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Biologia Celular e do
Desenvolvimento do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e
Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Nathalie Cella

Versão Corrigida. A versão original
eletrônica encontra-se disponível tanto
na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca
Digital de Teses e Dissertações da USP
(BDTD)

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Magna Magalhães.

Caracterização da fosforilação de maspina no desenvolvimento da glândula mamária murina e a correlação com sua localização subcelular / Magna Magalhães Silva. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Nathalie Cella.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Desenvolvimento e transformação maligna da glândula mamária.

Versão do título para o inglês: Characterization of maspin phosphorylation in the development of the murine mammary gland and the correlation with subcellular localization.

1. Maspina 2. Fosfoproteínas 3. Localização subcelular 4. Glândula mamárias 5. Núcleo celular I. Cella, Profa. Dra. Nathalie II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0107/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Magna Magalhães Silva.

Título da Dissertação: Caracterização da fosforilação de maspina no desenvolvimento da glândula mamária murina e a correlação com sua localização subcelular.

Orientador(a): Profa. Dra. Nathalie Cella.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **161** nas fls. **137** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Nathalie Cella**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Caracterização da fosforilação de maspina no desenvolvimento da glândula mamária murina*" do qual participam o(s) aluno(s), **Magna Magalhães Silva**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **03.12.2012**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 11 de dezembro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Ao meu irmão Peterson Magalhães (*in memorian*) que
sempre acompanhou todas as minhas
conquistas e sentiu orgulho por todas elas
e que, infelizmente, não está mais aqui
para acompanhar mais essa.

*“Peterson, você estará para sempre no meu coração, nas minhas lembranças e
pensamentos. A saudade é imensa. Você faz muita falta para nós. Te amo!”*

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Nina, minha melhor amiga e fonte de inspiração, por sempre me incentivar e mostrar a importância de estudar, por nunca me deixar desistir e, principalmente, por sempre estar ao meu lado.

Ao meu pai Francisco, por sempre estar ao meu lado em todas as decisões e por vibrar a cada conquista minha.

A minha orientadora, Profa. Dra. Nathalie Cella, pelos ensinamentos passados durante as discussões científicas, pela paciência, pela confiança no meu trabalho, pelo incentivo quando surge uma nova ideia. Obrigada por tratar a mim e aos seus alunos como filhos, nos defendendo, apoiando e também dando puxões de orelha quando necessário. Obrigada, mãe científica!

A Mariana Longhi, por compartilhar comigo não somente a bancada, mas também seus conhecimentos. Obrigada pela paciência e por sempre estar disposta a ajudar.

A Profa. Dra. Vanessa Moraes Freitas e alunas, Heydi Noriega, Maíra de Assis, Suély Vieira e Thaimara Alves, por todo o auxílio nos experimentos e por compartilhar experiências.

A Profa. Dra. Marilene Hohmuth Lopes, por permitir o uso dos equipamentos do seu laboratório.

A Priscila Lara, por todo o apoio no laboratório, ele foi muito importante para o desenvolvimento do projeto. Obrigada!

A Fernanda Barrence e a Gisela Ramos, pelos ensinamentos e apoio técnico.

Ao José Braz Ferreira pelo cuidado com os animais e auxílio na eutanásia.

A Regina Valbom pelo suporte acadêmico e disposição em ajudar.

Ao Júlio Vieira, por toda a ajuda quando precisei e por todos os momentos de diversão.

Ao Cainã Max Couto e Jeffrey Reina pelo auxílio informático nos momentos finais da dissertação.

Aos amigos do “coffee time”, Andrea Romero, Cainã Max Couto, Jeffrey Reina, Heydi Noriega, Mari Longhi e Priscila Lara, pelos momentos diários e necessários de descontração, por vibrarem comigo nos momentos de alegria e me reconfortar nos momentos em que quis jogar tudo para o alto e ir vender coco na praia. Seja qual for nosso destino, levarei vocês no coração. Obrigada.

Ao Andrews Krupinski, Douglas Amaral, Rafael Dalbosco e a todos os outros amigos que fiz no Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, pela ajuda, momentos de descontração e risadas.

A todos da Família Magalhães, Vó Dercília, Vô Zé Moreira, minha irmã Aline, meus tios Magno, Wagner e Teresinha e primos, por serem minha base, por me darem apoio, pelo cuidado e pelo conforto nos momentos que precisei. Além dos vários momentos de diversão. Sem vocês o meu mundo não seria completo. Amo todos!

Ao meu primo Peterson, por no último ano ter deixado a família ainda mais feliz e unida com seus sorrisos, sapequices e fofura.

Aos amigos e bacharéis em Ciências Fundamentais para a Saúde, Aline Ignácio, André Bento, Clarissa Rocha, Leonardo Novaes, Renan Antonialli e Wesley Fotoran, pelos poucos, porém bons momentos de filosofia, discussões sobre ciência, socorro, lamurias e, claro, de muita risada. Valeu meus queridos!

A Josilene Cerqueira e Roseane Nascimento, amigas e roomates, e aos agregados, por me acolherem, abrigarem e fazerem eu me sentir num lar.

Ao CNPq e a FAPESP pelo suporte financeiro.

A todos que não estiveram presentes nesta etapa da minha vida, mas que ajudaram durante a caminhada. Muito obrigada!

RESUMO

SILVA, M. M. **Caracterização da fosforilação de maspina no desenvolvimento da glândula mamária murina e a correlação com sua localização subcelular**. 2015. 62f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Maspina foi primeiramente identificada como uma proteína com propriedades supressoras de tumor devido à perda de sua expressão em células tumorais da mama. Porém, diversos estudos mostraram haver uma divergência na relação dos níveis de maspina e o prognóstico do câncer, onde tumores com níveis elevados de maspina estão relacionados a prognósticos ruins da doença. Estas contradições podem ser explicadas pela localização subcelular de maspina nas células desses tumores. Já foi visto que a presença de maspina no núcleo está associada a um bom prognóstico, enquanto que a sua localização citoplasmática correlaciona-se a um prognóstico ruim. Maspina é encontrada em diversos locais da célula, como em vesículas secretoras, na superfície celular, no citoplasma e no núcleo, sugerindo que a sua localização subcelular pode estar associada às suas funções biológicas. Usando o modelo de linhagem celular MCF-10A, nosso grupo observou uma correlação entre a fosforilação de maspina e seu acúmulo no citoplasma. Ainda, em uma linhagem tumoral que expressa maspina predominantemente no citoplasma, essa molécula apresenta altos níveis de fosforilação. Esses dados sugerem que a fosforilação de maspina está correlacionada à sua localização citoplasmática e à tumorigênese. Em vista desses resultados e da importância da localização subcelular de maspina no prognóstico do câncer de mama, os objetivos deste estudo foram: caracterizar os níveis de expressão, padrão de fosforilação e localização subcelular de maspina ao longo do desenvolvimento da glândula mamária murina. Maspina foi detectada no estágio mais tardio da gestação, na lactação e na involução. Maspina está fosforilada tanto na lactação quanto na involução, embora os níveis de fosforilação estejam diminuídos na involução. Interessantemente, na involução há mais núcleos positivos para maspina do que na lactação. Essa observação indica que a correlação verificada *in vitro* também ocorre *in vivo*. Estes dados mostram que a expressão de maspina, a fosforilação e a localização subcelular são reguladas ao longo do desenvolvimento na glândula mamária murina. Este trabalho poderá trazer novas perspectivas para a terapia contra o câncer de mama e ajudar a elucidar os mecanismos moleculares pelos quais maspina desempenha suas diversas funções biológicas.

Palavras-chave: Maspina. Fosforilação. Localização Subcelular. Núcleo. Glândula mamária.

ABSTRACT

SILVA, M. M. **Characterization of maspin phosphorylation in the development of the murine mammary gland and the correlation with subcellular localization**. 2015. 62p. Masters thesis (Cell and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Maspin was initially identified as a tumor and metastasis suppressor protein due to loss of its expression in breast tumor cells. However, several studies have correlated high maspin expression with poor cancer prognosis. These conflicting data can be explained by maspin subcellular localization in tumor cells. Nuclear localization of maspin has been associated with a better prognosis, whereas maspin cytoplasmic localization is linked to a poor prognosis. Maspin is found in several cell compartments, like secretory vesicles, cell surface, cytoplasm and nucleus, suggesting that maspin subcellular localization is associated with its biological functions. Using MCF-10A cells as a model system, our group observed a correlation between maspin phosphorylation and its cytoplasmic accumulation. In addition, in a tumor cell line which expresses maspin predominantly in the cytoplasm, this protein is highly phosphorylated. These data suggest that maspin phosphorylation correlates with cytoplasmic localization and tumorigenesis. In view of these results and the importance of maspin subcellular localization in the prognosis of breast cancer, the objectives of this study were to investigate maspin protein expression, phosphorylation levels and subcellular localization during the murine mammary gland development. Maspin is phosphorylated both in lactation and involution, although phosphorylation levels decrease in involution. Interestingly, there are many more cells which express maspin in the nucleus during involution compared to lactation. This observation indicates that the correlation verified *in vitro* also takes place *in vivo*. These data indicate that maspin expression, phosphorylation and subcellular localization are developmentally regulated in the murine mammary gland. This study may bring new perspectives for breast cancer therapy and help to elucidate the molecular mechanism underlying maspin diverse biological function.

Keywords: Maspin. Phosphorylation. Subcellular Localization. Nucleus. Mammary Gland.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração mostrando as diferentes fases do desenvolvimento pós-natal da glândula mamária murina e os hormônios envolvidos em cada fase.	16
Figura 2 - O desenvolvimento da glândula mamária murina na fase embrionária e na puberdade.	18
Figura 3 - Representação esquemática do processo de involução.	22
Figura 4 - Ilustração representando a estrutura tridimensional de maspina.	26
Figura 5 - Esquema ilustrando o planejamento de coleta das amostras de glândula mamária murina nas diferentes fases do desenvolvimento.	34
Figura 6 - Perfil de expressão de maspina ao longo do desenvolvimento da glândula mamária murina.	43
Figura 7 - Teste de diferentes anticorpos contra maspina.	45
Figura 8 - Diferentes formas de maspina no desenvolvimento da glândula mamária murina.	46
Figura 9 - Princípio do Mn ²⁺ -Phos-tag TM	47
Figura 10 - Identificação de fosfoformas de maspina nas fases de lactação e involução da glândula mamária murina.	49
Figura 11 - Localização subcelular de maspina nas fases de lactação e involução da glândula mamária murina.	51

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

1L – primeiro dia de lactação
10L – décimo dia de lactação
20L – vigésimo dia de lactação
1Inv – primeiro dia de involução
5Inv – quinto dia de involução
bFGF – fator de crescimento fibroblástico básico
BSA – *Bovine Serum Albumin*
CO₂ – dióxido de carbono
DTT – 1,4-*Dithiothreitol*
E – dia de desenvolvimento embrionário
EDTA – *ethylenediamine tetraacetic acid*
EGTA – *ethylene glycol tetraacetic acid*
ELISA – *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*
ER α – Receptor de estrógeno α
HRE – elemento responsivo ao hormônio
IRF6 – fator regulador de interferon 6
Jak – Janus kinase
LB – *Laemmli Buffer*
MEC – matriz extracelular
MMPs – metaloproteases de matriz
N₂ – nitrogênio
NaCl – cloreto de sódio
P – progesterona
PBS – *phosphate buffered saline*
pI – ponto isoelétrico
PMSF – *Phenylmethanesulfonyl Fluoride*
PR – receptor de progesterona
Prl – prolactina

PrIR – receptor de prolactina

RCL – *reactive center loop*

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate*

uPA – ativador de plasminogênio do tipo uroquinase

uPAR – receptor de ativador de plasminogênio do tipo uroquinase

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

Vir – mama virgem adulta

WAP – proteína ácida do soro do leite

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 O desenvolvimento da glândula mamária murina	15
1.1.1 Desenvolvimento embrionário e na puberdade.....	17
1.1.2 Gestação e lactação.....	19
1.1.3 Involução.....	21
1.2 Maspina	24
1.2.1 Estrutura molecular.....	25
1.2.2 Regulação da expressão e modificações pós-traducionais de maspina	27
1.2.3 Funções biológicas de maspina	28
1.2.4 O papel de maspina no desenvolvimento da glândula mamária	29
1.2.5 Localização subcelular de maspina.....	30
2 OBJETIVOS.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Manutenção dos animais, planejamento do acasalamento e coleta das amostras	33
3.2 Dissecção da glândula mamária murina	34
3.3 Extração de proteínas total da glândula mamária murina	35
3.4 Dosagem proteica	35
3.5 Preparo das amostras para <i>Western Blot</i> e Phos-Tag™	36
3.6 Western Blot	36
3.7 Phos-Tag™ SDS-PAGE	37
3.8 Quantificação do Western Blot e Phos-tag™	37
3.9 2D-SDS-PAGE	37
3.10 Imunofluorescência em cortes da glândula mamária murina	39

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 A expressão de maspina nas diferentes fases do desenvolvimento da glândula mamária murina.....	41
4.2 Avaliação dos níveis de fosforilação de maspina nas fases de lactação e involução do desenvolvimento da glândula mamária murina.....	44
4.3 Caracterização da localização subcelular de maspina na glândula mamária murina	49
5 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

O câncer está entre as principais causas de morbidade e de morte no mundo todo. O aumento da incidência ocorre pelo crescimento e envelhecimento da população mundial associados a fatores hereditários e ambientais, como poluentes na água e no ar, radiação ultravioleta e a fatores de risco associados ao estilo de vida (tabagismo, álcool, sedentarismo, dieta e comportamento sexual) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). De acordo com as estimativas publicadas pelo projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para a Pesquisa em Câncer (FERLAY et al., 2013), ocorreram cerca de 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes por câncer em 2012 em todo o mundo. Destas mortes, mais de 520 mil foram causadas por câncer de mama (FERLAY et al., 2013).

O câncer de mama acomete principalmente mulheres e é um dos tipos mais comuns de câncer e o mais diagnosticado, sendo responsável por mais de 1,3 milhões de novos casos e por cerca de 450 mil mortes todo ano no mundo. Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostram que para o ano de 2014 foram esperados, no Brasil, mais de 57 mil novos casos deste tipo de câncer.

Todos estes dados epidemiológicos mostram que o câncer é um problema de saúde pública, em especial o câncer de mama. Assim, é evidente a importância de se entender não somente os mecanismos que levam a transformação maligna, mas também a biologia do desenvolvimento normal da glândula mamária para a prevenção do câncer e a possível descoberta de novos alvos terapêuticos.

1.1 O desenvolvimento da glândula mamária murina

A glândula mamária é o órgão que distingue os mamíferos dos outros animais e sua função primária é a produção e entrega de leite para a nutrição da prole. Diferentemente da maioria dos órgãos, a glândula mamária é o único que atinge o desenvolvimento total somente após o nascimento (GJOREVSKI; NELSON, 2011).

O desenvolvimento da glândula mamária de camundongo se inicia tardiamente durante a embriogênese onde forma-se um sistema rudimentar de ductos que irá se desenvolver apenas na puberdade. A morfogênese na puberdade é caracterizada pelas

extensões dos ductos mamários e ramificações que formam a árvore ductal que terá preenchido todo o estroma no início da fase virgem adulta. Durante a gestação, o epitélio mamário sofre uma massiva proliferação de estruturas alveolares que irão se diferenciar terminalmente em unidades secretoras ao final da gestação permitindo a lactação. Após o desmame, inicia-se o processo de involução, onde os alvéolos são removidos através de um altamente complexo e regulado programa de morte celular e remodelamento. Quando a involução está completa, a glândula mamária resultante é fenotipicamente semelhante a glândula mamária virgem (Figura 1). Hormônios e fatores de crescimento desempenham um importante papel nos diferentes estágios do desenvolvimento e também estão envolvidos no câncer de mama (MACIAS; HINCK, 2012).

Os estudos do desenvolvimento da glândula mamária têm elucidado muitos mecanismos de regulação da proliferação, diferenciação e morte celular de um órgão funcional. Além disso, muitas das vias e processos que estão desregulados na progressão tumoral do câncer de mama são observadas no desenvolvimento da mama normal (INMAN et al., 2015). Por este motivo, a morfogênese deste órgão tem sido alvo da oncologia experimental e em particular à pesquisa experimental em câncer de mama, usando a glândula mamária murina como modelo animal (MEDINA, 2010).

Figura 1 - Ilustração mostrando as diferentes fases do desenvolvimento pós-natal da glândula mamária murina e os hormônios envolvidos em cada fase. GH – fator de crescimento (growth hormone) (Retirada e modificada de Macias e Hinck (2012)).

As próximas linhas serão dedicadas a uma visão geral dos processos envolvidos nas cinco fases do desenvolvimento da glândula mamária murina (fase embrionária, puberdade, gestação, lactação e involução), com um foco particular na fase pós-natal.

1.1.1 Desenvolvimento embrionário e na puberdade

Em camundongos, no décimo dia da embriogênese (E10) o desenvolvimento mamário inicia-se com a formação de cinco pares de placódios, a partir de cristas ectodérmicas, formando duas linhas bilaterais que se estendem em uma orientação rostral-caudal, conhecidas por linha mamária ou do leite (COWIN; WYSOLMERSKI, 2010). No E15,5, a elongação do placódio pela proliferação das células epiteliais leva a formação de um broto mamário, que penetra no mesênquima subjacente e no precursor do tecido adiposo. Posteriormente, a proliferação celular resulta na formação de dez a quinze pequenos ramos a partir do broto mamário gerando uma estrutura ductal rudimentar no E18,5 (Figura 2), que permanecerá quiescente até a puberdade (INMAN et al., 2015).

Na puberdade, o desenvolvimento da glândula mamária é desencadeado pelos níveis elevados de hormônios ovarianos, em particular o estrógeno, e por fatores de crescimento que atuam paracrinamente. Nas extremidades dos ductos rudimentares há estruturas altamente proliferativas que contêm uma camada externa de células epiteliais (células do córtex) envolvendo internamente células em multicamadas (células da medula). Essas estruturas são chamadas de brotos terminais (Figura 2). Em seguida, os ductos em desenvolvimento passam por sucessivos ciclos de elongação, bifurcação e ramificação lateral até preencher todo o estroma, formando, por fim, a árvore epitelial da mama virgem adulta que sofrerá ciclos de proliferação e morte celular a cada ciclo estral (GJOREVSKI; NELSON, 2011).

Os ductos da mama virgem são compostos por uma camada de células epiteliais luminais envolvidas na porção basal por células mioepiteliais contráteis. Além das células epiteliais, a mama virgem murina é composta por muitos outros tipos celulares, como adipócitos, fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imune, que trabalham juntas para modelar e manter a glândula funcional (INMAN et al., 2015).

Estes diferentes tipos celulares são importantes no desenvolvimento da glândula mamária.

O estroma mamário murino se distingue do estroma encontrado na mama humana pela grande quantidade de células adiposas e poucos fibroblastos encontrados próximos às células epiteliais dos ductos, já o estroma da mama humana é fibroso devido à grande quantidade de fibroblastos que produzem as fibras localizadas ao redor do epitélio mamário e que são encontradas incorporadas no tecido adiposo (HOWARD; GUSTERSON, 2000; JAVED; LTEIF, 2013).

Figura 2 - O desenvolvimento da glândula mamária murina na fase embrionária e na puberdade.

Na fase embrionária, o desenvolvimento começa no meio da gestação (E11.5) com cinco pares de placódios formando um epitélio que invagina para dentro do precursor adiposo para formar o broto mamário. Ao final da gestação (E18.5) está formada uma glândula rudimentar que permanece morfológicamente quiescente até a puberdade. Na puberdade, com o estímulo dos hormônios ovarianos circulantes há a formação de uma estrutura altamente proliferativa, os brotos terminais. Logo após, ciclos de alongação, bifurcação e ramificação lateral ocorrem até preencher todo o estroma formando a árvore epitelial (Retirada e modificada de Gjorevski e Nelson (2011)).

1.1.2 Gestação e lactação

A característica mais marcante do desenvolvimento mamário durante a gestação é o grande remodelamento do tecido dado pela formação de unidades secretoras alveolares, que preenchem todo o estroma mamário no preparo da mama para a lactação (WATSON; KHALED, 2008). Essas mudanças na glândula mamária estão sob o controle de progesterona (P) e prolactina (Prl), hormônios que ativam o programa genético que coordena mudanças na proliferação, migração e diferenciação das células epiteliais mamárias (OAKES; HILTON; ORMANDY, 2006).

A P é um hormônio ovariano que, através de receptores intracelulares, induz uma extensiva ramificação lateral e alveologênese requerida para a formação de uma glândula mamária apta à lactação. Em combinação com a Prl, hormônio produzido na hipófise, a P promove a diferenciação das células alveolares em produtoras e secretoras de leite durante a lactação (MACIAS; HINCK, 2012). A importância destes dois hormônios em ambos os processos foi mostrada em camundongos *knockout* para receptor de P (PR) e receptor de Prl (PrIR). Nestes animais a deleção dos receptores inibiu completamente a ramificação lateral e o desenvolvimento alveolar (BRISKEN et al., 1999; LYDON et al., 1995). Ainda, animais com as isoformas específicas do PR (PR-A e PR-B) deletadas e a análise destes mutantes sugeriu que PR-B é suficiente para induzir a proliferação e diferenciação normal da glândula mamária (MULAC-JERICEVIC et al., 2000).

Estes hormônios desencadeiam uma onda de proliferação celular do dia 2 ao dia 6 de gestação (OAKES; HILTON; ORMANDY, 2006). Por volta do dia 6 da gestação, as ramificações secundárias e terciárias se tornam evidentes. A diferenciação funcional da glândula se torna dominante por volta do dia 10 de gestação, início da fase 1 da lactogênese. Esta fase pode ser distinguida morfológicamente pelos alvéolos, que começam a aparecer de maneira uniforme ao longo da rede de ductos, e pelas gotas lipídicas presentes nas células epiteliais. Essa diferenciação foi verificada pela expressão dos genes que codificam as proteínas que compõem o leite – caseína, proteína ácida do soro do leite (WAP), entre outras (NEVILLE; MCFADDEN; FORSYTH, 2002; ROSEN; LEWIS, 2009).

Os alvéolos são formados por uma única camada de células epiteliais que revestem o lúmen e está ligado à rede de ductos por um único pequeno ducto ramificado. Cada alvéolo é envolvido por uma camada descontínua de células mioepiteliais contráteis formando uma estrutura em forma de rede de basquete (OAKES; HILTON; ORMANDY, 2006). As células luminais alveolares são derivadas de células progenitoras luminais do ducto (INMAN et al., 2015). Na metade da gestação também ocorrem outras mudanças no estroma do tecido mamário: à medida que os alvéolos vão se desenvolvendo, o tecido adiposo interductal vai sendo substituído por uma expressiva vascularização, formando uma rede de capilares ao redor dos alvéolos que fornecem energia, aminoácidos, açúcares e solutos requeridos para a produção do leite (MACIAS; HINCK, 2012; OAKES; HILTON; ORMANDY, 2006).

No dia 18 de gestação, início da fase 2 da lactogênese, os alvéolos ocupam cerca de 90% do tecido mamário e as células epiteliais alveolares estão produzindo proteínas do leite e lipídios no preparo para a fase de lactação (NEVILLE; MCFADDEN; FORSYTH, 2002; RICHERT et al., 2000; ROSEN; LEWIS, 2009). Ao final da gestação, a redução da P leva ao fechamento das junções oclusivas das células luminais alveolares e ao estabelecimento da lactação (NGUYEN; PARLOW; NEVILLE, 2001).

Após o parto, a sucção dos mamilos pelos filhotes desencadeia a expressão dos genes envolvidos na secreção de leite e, talvez, a mais uma rodada de proliferação das células epiteliais e expansão dos alvéolos (NEVILLE; MCFADDEN; FORSYTH, 2002). Em camundongos, no dia 9 de lactação os alvéolos da glândula mamária estão dilatados e as células epiteliais luminais passam da forma cuboide a achatada, devido a grande quantidade de leite no lúmen. Os poucos adipócitos presentes são multiloculares possivelmente devido à utilização da gordura pelas células epiteliais (ANDERSON et al., 2007; RICHERT et al., 2000). Uma vez que a lactação está estabelecida a demanda de leite é regulada de acordo com o tamanho e exigência da ninhada por mecanismos de resposta a sucção do mamilo e a quantidade de leite presente no alvéolo (NEVILLE; MCFADDEN; FORSYTH, 2002).

A Prl e a ocitocina são os dois principais hormônios que influenciam a fase de lactação. A liberação de ocitocina, causada pela sucção dos filhotes, estimula a contração das células mioepiteliais que estão ao redor das células luminais, assim

movendo o leite através da árvore ductal para a liberação deste no mamilo (INMAN et al., 2015; ROSEN; LEWIS, 2009). Já a Prl atua sobre as células luminais promovendo a regulação da expressão das proteínas do leite e a sobrevivência celular durante a lactação, isso ocorre via Janus kinase (Jak)/STAT, especialmente pela ativação de STAT5 (HENNIGHAUSEN; ROBINSON, 2005; ROSEN; LEWIS, 2009).

A lactação continua por, aproximadamente, três semanas até o desmame dos filhotes (RICHERT et al., 2000). Durante o desmame, o estímulo de sucção cessa e desencadeia sinais locais que levam a remoção do epitélio alveolar pela massiva morte celular, ao remodelamento da matriz extracelular (MEC) e a adipogênese. Todos estes processos, que retornam a glândula mamária ao estado anterior a gestação, pertencem à fase de involução (WATSON; KREUZALER, 2011).

1.1.3 Involução

O desmame é o ponto chave para o início do complexo processo de involução, que não só leva à morte das células epiteliais alveolares, mas também a outras mudanças no tecido mamário. Essas mudanças incluem o influxo de macrófagos e outros tipos celulares do sistema imune (importantes para a remoção das células mortas e resto de leite), a quebra da MEC, o remodelamento dos vasos sanguíneos e a diferenciação dos adipócitos, promovendo assim a reconstrução da árvore epitelial mamária e seu estroma (WATSON; KREUZALER, 2011). A estase do leite no interior dos ductos e alvéolos é o estopim deste processo (QUARRIE; ADDEY; WILDE, 1996). No entanto, ainda não se sabe se os sinais para o início da involução são desencadeados pelo estiramento mecânico do epitélio devido à retenção do leite nos alvéolos ou por fatores biológicos, como o acúmulo de elementos do leite (WATSON; KREUZALER, 2011).

Interessantemente, a involução tem duas fases bem definidas chamadas de primeira e segunda fase (Figura 3). A primeira fase dura aproximadamente 48 horas após o desmame e é potencialmente reversível, de tal forma que a retomada do estímulo de sucção pelos filhotes restabelece a produção de leite. A principal característica morfológica desta fase é o aparecimento de células morrendo dentro do

lúmen do alvéolo expandido pelo acúmulo de leite, outras mudanças não são observadas até o final desta fase. O modelo de selagem do mamilo mostra que a primeira fase é regulada por fatores locais dentro de uma glândula isolada e ocorre sem influência hormonal (LI et al., 1997; MARTI et al., 1997).

A segunda fase (ou fase de remodelamento) é irreversível, tem início após 48 horas do desmame e é acompanhada por uma dramática mudança na estrutura da glândula mamária incluindo a MEC, colapso de alvéolos e diferenciação de adipócitos que irão repopular o estroma (WATSON; KREUZALER, 2111). No dia 4 de involução o epitélio já está muito desorganizado, embora os ductos sejam facilmente observados, com estruturas alveolares ainda presentes e um denso estroma ao redor dos ductos. O processo de morte do epitélio alveolar e a reorganização do estroma continuam até a glândula mamária estar completamente remodelada no dia 21 da involução (RICHERT et al., 2000).

Figura 3 - Representação esquemática do processo de involução. A involução acontece em duas fases. A primeira é reversível e dura 48 horas no camundongo. Na segunda fase ocorre uma segunda onda de morte das células alveolares e um intenso remodelamento do tecido mamário com a ajuda das MMPs (Retirada e modificada de Faupel-Badger et al. (2013)).

Por todos os processos descritos até aqui, está claro que a involução é um processo extremamente complexo no qual todas as etapas são altamente reguladas. Diversos genes estão envolvidos nesse processo, no modelo murino a ativação destes genes acontece poucas horas após o desmame (WATSON; KREUZALER, 2011).

A transição da lactação para a involução é regulada, principalmente, pela família de proteínas chamadas STAT. Na lactação, a Prl tem o efeito de proteção das células alveolares pela ativação de STAT5 (ROSEN; LEWIS, 2009). Em 3 a 6 horas pós-desmame, uma mudança na fosforilação de STAT5 altera sua atividade, levando a inativação de STAT5A/B, mas ativando STAT3. Ao contrário de STAT5, STAT3 promove a via de morte celular (MACIAS; HINCK, 2012).

Até pouco tempo, acreditava-se que as células do epitélio alveolar, durante a involução, morriam através do mecanismo de apoptose. Contudo, as células que perdem a adesão à lâmina basal e são detectadas no lúmen não apresentam morfologia de células em apoptose, pois apresentam volume aumentado, possuem dois núcleos hipercondensados e não há formação de corpos apoptóticos (WATSON; KREUZALER, 2011). A razão desta diferente morfologia foi descoberta recentemente. No trabalho publicado por Kreuzaler et al. (2011), foi verificado que STAT3 induz a morte celular pelo aumento de expressão das enzimas lisossomais catepsinas B e L, que são liberadas dos lisossomos dando início a morte celular. Por consequência, ocorre a liberação destas células para o lúmen alveolar onde as caspases 3 e 6 são clivadas e consequentemente ativadas em resposta a perda de contato da célula alveolar com a MEC (anoikis). Sendo assim, na primeira fase da involução a morte celular é mediada por lisossomos e regulada por STAT3.

A mudança para a segunda fase causa um intenso remodelamento da estrutura mamária, sendo regulada pelos membros da família das MMPs que são responsáveis por degradar a MEC. A função das MMPs é bloqueada na primeira fase pelos inibidores de metaloproteinases, TIMPS, responsáveis por manter a arquitetura mamária intacta (MACIAS; HINCK, 2012).

Todas as características únicas do desenvolvimento durante a puberdade, gestação, lactação e involução fazem da glândula mamária um importante modelo de estudo das vias que controlam proliferação, diferenciação e morte celular. Estas

mudanças são resultantes da ativação de numerosas vias genéticas, onde mais de 100 genes estão envolvidos desde a fase fetal ao remodelamento da mama durante a involução (HENNIGHAUSEN; ROBINSON, 2005). Alguns destes genes se encaixam em vias que podem perfeitamente explicar sua função, porém a função e o mecanismo de ação de outros genes expressos no tecido mamário, como a maspina, ainda não estão bem elucidados.

1.2 Maspina

Maspina (do inglês *Maspin*, Mammary serine protease inhibitor), também conhecida como SerpinB5, é uma proteína de 42 kDa que foi identificada em 1994 a partir de estudos de hibridização subtrativa usando cDNAs produzidos do RNA mensageiro de células epiteliais normais e malignas da glândula mamária. Enquanto as células normais expressavam maspina, foi observada uma drástica diminuição da expressão desta proteína nas células tumorais metastáticas (ZOU et al., 1994). Dessa forma, maspina foi classificada como uma serpina com propriedades supressoras de tumor em células epiteliais da mama humana. A classificação como tal é devido à homologia estrutural de maspina com as serpinas (ZOU et al., 1994). Sabe-se hoje que maspina não apresenta atividade de inibidora de proteases (detalhado a seguir).

A expressão de maspina também foi observada em vários outros tecidos incluindo o epitélio do pulmão, próstata, epiderme e também nas células estromais da córnea (BAILEY et al., 2006). Já foi demonstrado que maspina possui um papel fundamental no desenvolvimento embrionário, pois em modelos *knockout* para esta molécula a perda de maspina é letal para o embrião (GAO et al., 2004). Além disso, vários trabalhos já demonstraram que maspina possui diversas funções biológicas que estão diretamente relacionadas a seu efeito anti-tumoral e que modificações pós-traducionais, como a fosforilação, e a localização desta proteína dentro da célula parecem estar envolvidas na regulação destas diferentes funções (BODENSTINE et al., 2012). Além disso, maspina tem sido caracterizada em espécies como camundongos e ratos. A partir de bibliotecas de cDNA, foi mostrado 88% e 89% de homologia da maspina de camundongos e ratos, respectivamente, com a maspina humana

(UMEKITA; HIIPAKKA; LIAO, 1997; ZHANG et al., 1997a). Nestes animais, estes homólogos de maspina também estão presentes nas células da glândula mamária normal e sua expressão é diminuída em linhagens de células tumorais. Já foi mostrado que maspina também inibe a migração, invasão e metástase (SHI et al., 2001; ZHANG et al., 1997a, 2000a), mostrando que sua função é conservada nestas espécies o que as tornam bons modelos de estudo para a melhor compreensão dos mecanismos moleculares no qual esta molécula está envolvida.

As atividades biológicas de maspina, assim como sua estrutura, modificações pós-traducionais, em especial a fosforilação, e a localização subcelular desta molécula, serão melhor discutidas nas linhas que seguem.

1.2.1 Estrutura molecular

O gene da maspina está localizado no cromossomo 18 em um cluster contendo os genes para outras serpinas (SCOTT et al., 1999). A maspina não é um membro clássico da família das serpinas por não inibir as serina proteases. A estrutura proteica desta molécula, que possui 357 aminoácidos com uma massa molecular de 42 kDa, consiste de nove α -hélices (de A a I) e três folhas β (de A a C) e possui uma região flexível RCL (do inglês, *reactive center loop*; também referida como *reactive site loop* (RSL)), que fica exposta na molécula (Figura 4) (FITZPATRICK et al., 1996; LAW et al., 2005).

Apesar de maspina se assemelhar a estrutura clássica das serpinas, estudos bioquímicos e biofísicos mostraram que o sítio RCL da maspina, local de ligação à protease, é relativamente curto, hidrofóbico e possui uma região não padrão na porção N-terminal, a qual impede a mudança conformacional do estado estressado para o relaxado (PEMBERTON et al., 1995). Durante este rearranjo (nas serpinas inibitórias), o RCL é clivado e se insere dentro da folha β formando uma fita β extra em uma reação irreversível. Esta mudança na conformação da proteína é responsável pelo aprisionamento e consequente inibição da protease alvo (HUNTINGTON; READ; CARRELL, 2000). Porém, apesar de não possuir atividade inibitória, um estudo usando um peptídeo sintético do RCL de maspina mostrou que esta região é importante para a

promoção da adesão celular e inibição da invasão (NGAMKITIDECHAKUL et al., 2003). Além disso, foi observado o efeito do aumento da apoptose como outra habilidade funcional do RCL (LATHA et al., 2005). Porém, o efeito anti-angiogênico de maspina parece ser independente do sítio RCL (ZHANG et al., 2000b).

Figura 4 - Ilustração representando a estrutura tridimensional de maspina. A estrutura molecular de maspina se assemelha a das serpinas, que consiste em nove α -hélices (de hA a hI) e três folhas β (as, sB e sC) e o sítio flexível RCL. Retirada e modificada a partir de Narayan e Twinning (2010).

Outra diferença estrutural de maspina, com relação as outras serpinas, é a capacidade de mudança na conformação da α -hélice G de “aberta para fechada” (LAW et al., 2005). Um estudo mostrou a relação da α -hélice G com uma das funções de maspina, foi observado que a transfecção de maspina com a α -hélice G mutada em células que não expressam maspina não impediu a migração destas células quando comparada a células transfectadas com maspina não mutada (RAVENHILL et al., 2010). Além disso, há evidências de uma interação direta de maspina com os colágenos do tipo I e III através de uma região negativamente carregada próxima a α -hélice (BLACQUE; WORRALL, 2002).

1.2.2 Regulação da expressão e modificações pós-traducionais de maspina

A expressão e função das proteínas podem ser moduladas em muitos pontos entre a transcrição e o seu produto final. A transcrição de maspina é regulada por uma região localizada a 1 kb acima do local de início da transcrição (ZHANG et al., 2000b). Nesta região há muitos sítios regulatórios, como os sítios Ets e AP1 e um elemento responsivo ao hormônio (HRE). Estes sítios podem regular tanto positivamente quanto negativamente a expressão de maspina dependendo do tipo celular, situação fisiológica ou pelos hormônios específicos de um determinado órgão ou tecido (ZHANG et al., 1997b; ZHANG ; MAGIT; SAGER, 1997).

A expressão de maspina também pode ser regulada por fatores epigenéticos, como a inibição da expressão pela metilação do promotor na linhagem celular de câncer de mama, o que não ocorre nas células normais de epitélio mamário humano (DOMANN et al., 2000; LIAO et al., 2014). Outro estudo mostrou que em células normais que expressam maspina as histonas estão acetiladas e a região promotora do gene não está metilada, o que não ocorre em células que não expressam essa molécula (FUTSCHER et al., 2002). Já foi observado que a expressão de maspina pode ser induzida por óxido nítrico (KHALKHALI-ELLIS; HENDRIX, 2003) e Tamoxifen. O Tamoxifen induz a expressão de maspina pela ligação ao ER α que leva a indução da região promotora de maspina (LIU et al., 2004). Além disso, o p53 leva a indução da expressão de maspina pela ligação ao seu promotor (ZOU et al., 2000) e também regula indiretamente sua expressão através de proteínas e vias de sinalização que são dependentes deste (BODENSTINE et al., 2012). Além dos diversos reguladores da expressão de maspina, a função desta molécula também é regulada por modificações pós-traducionais.

As modificações pós-traducionais levam um único gene a diversos produtos proteicos. Já foi relatado que maspina sofre algumas modificações pós-traducionais, como a nitrosilação em células da próstata (LAM et al., 2010) e a formação de pontes dissulfeto intramoleculares em células de epitélio mamário humano normal sob estresse oxidativo (NAWATA et al., 2011), mas esta proteína não é glicosilada (TEOH; WHISSTOCK; BIRD, 2010).

A fosforilação de maspina tem sido detectada e estudada. Maspina contém cinco resíduos de tirosina e a fosforilação destes resíduos em célula epitelial mamária normal foi avaliada no trabalho de Otero-Marrah et al. (2002), este estudo mostrou que maspina está fosforilada nos resíduos de tirosina em células normais da glândula mamária. Usando uma diferente linhagem celular de epitélio mamário humano normal que expressa maspina endogenamente, MCF-10A, Longhi e Cella (2012) também observaram a fosforilação de maspina em resíduos de tirosina. Além disso, este trabalho mostrou uma correlação entre a fosforilação de maspina e sua localização subcelular, que será melhor discutida no item 1.2.5. Diferentemente das células mamárias normais, não foram detectadas fosforilações nos resíduos de tirosina na forma extracelular de maspina das células epiteliais da córnea, mas foram identificados 8 sítios de fosforilação em serina e treonina (NARAYAN; MIRZA; TWINING, 2011). Estes dados sugerem que a fosforilação de maspina é dependente das quinases específicas de cada tecido e que, provavelmente, está diretamente relacionada à sua função dentro deste.

1.2.3 Funções biológicas de maspina

A atividade supressora de tumor de maspina levantou o interesse de diversos grupos de pesquisa para o entendimento das vias pelas quais maspina desenvolve essa atividade. Sendo assim, diversas atividades biológicas de maspina já foram caracterizadas, como a inibição da invasão e metástase, regulação da adesão celular, inibição da angiogênese e promoção da apoptose (BAILEY et al., 2006).

Os primeiros estudos sobre a função de maspina, usando tumores de mama e de próstata, mostraram sua habilidade em inibir metástase e invasão celular (SHENG et al., 1996; ZOU et al., 1994). Estudos posteriores mostraram que esta inibição pode ocorrer pela alteração do perfil das integrinas, que diminuem a invasão por aumento da aderência da célula à fibronectina (SEFTOR et al., 1998). Já foi observado que maspina também impede a invasão celular pela redução do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA) secretado e pelos níveis reduzidos do receptor de uPA (uPAR) da superfície celular que leva a redução da plasmina ativa (AMIR et al., 2005; BILIRAN;

SHENG, 2001; YIN et al., 2006). Além disso, a inibição da motilidade da linhagem celular de câncer de mama invasivo e metastático tratado com maspina foi regulada pela diminuição da atividade de Rac1 e o aumento da adesão destas células através de uma aumentada adesão focal e formação de fibras de estresse promovida pela via PI3K/ERK (ODERO-MARAH et al., 2003). Já em células MCF-10A, maspina promove a adesão celular pela associação a $\beta 1$ integrina na superfície da célula e a outras proteínas do citoesqueleto (CELLA et al., 2006).

A inibição da angiogênese é outra função de maspina que já foi descrita por diversos estudos. Maspina se tornou um efetivo inibidor da angiogênese atuando diretamente sobre as células endoteliais inibindo sua migração através do fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (NICKOLOFF et al., 2004; ZHANG et al., 2000b). Esta atividade anti-angiogênica de maspina não acontece pelo domínio RCL (ZHANG et al., 2000b).

Consistente com o seu papel na tumorigênese, maspina também promove a apoptose (ou morte celular programada). A superexpressão de maspina em camundongos transgênicos aumentou a taxa de apoptose tanto de células epiteliais mamárias carcinogênicas quanto em células pré-neoplásicas. Além disso, a superexpressão inibiu a progressão tumoral do câncer de mama pelo aumento da apoptose, inibição da angiogênese e diminuição da metástase pulmonar (ZHANG et al., 2000a). A superexpressão de maspina em células endoteliais também levou a apoptose destas células e foi observado que este efeito é dependente da região RCL, pois a deleção desta região aboliu sua atividade apoptótica (LI; SHI; ZHANG, 2005). Tem sido demonstrado que maspina aumenta a sensibilidade a apoptose induzida por estaurosporina através da ativação de caspases (JIANG et al., 2002) e pela regulação das proteínas da família Bcl2 (ZHANG; SHI; ZHANG, 2005).

1.2.4 O papel de maspina no desenvolvimento da glândula mamária

O papel de maspina no desenvolvimento da glândula mamária murina foi estudado por Zhang et al. (1999) através da expressão de maspina sob o controle do promotor de WAP em camundongos transgênicos. O promotor WAP só é ativado na

metade da gestação e permanece ativo durante a lactação, portanto a função de maspina foi avaliada nestes estágios. A superexpressão de maspina levou a inibição do desenvolvimento alveolar pelo aumento da apoptose, formando estruturas menores e com lúmen colabado, e a inibição da diferenciação com consecutiva diminuição da produção de leite nas fases de gestação e lactação quando comparado com o camundongo selvagem.

A interação de maspina com o fator regulador de interferon 6 (IRF6) foi relatada em células epiteliais mamárias usando o sistema de duplo-híbrido em leveduras e é regulada pela fosforilação de IRF6 (BAILEY et al., 2005). A expressão de maspina e IRF6 durante o desenvolvimento mamário foi analisado em camundongos C57/Black6 durante a gestação, lactação e involução. A expressão de maspina e IRF6 está regulada através do desenvolvimento da glândula mamária e a máxima expressão de ambas ocorre nas células lobuloalveolares na lactação. Porém, nesta fase, IRF6 é secretada no lúmen do alvéolo enquanto maspina permanece dentro das células (BAILEY et al., 2009).

Aqui foi relatado um pouco do que é sabido sobre a expressão de maspina no desenvolvimento da glândula mamária. Porém, as vias através das quais maspina é regulada durante o desenvolvimento ainda não foi esclarecida.

1.2.5 Localização subcelular de maspina

A localização de maspina aparenta ter um importante papel em sua função biológica, pois em células normais da glândula mamária esta proteína possui várias localizações subcelulares, estando presente no citoplasma e no núcleo (ZOU et al., 1994), na superfície celular (CELLA et al., 2006; ENDSLEY et al., 2011a; QIN; ZHANG, 2010; TOILLON et al., 2007) e secretada para o meio extracelular (KATZ; TAICHMAN, 1999; KHALKHALI-ELLIS; HENDRIX, 2007; PEMBERTON et al., 1997).

Estudos clínicos já mostraram que a localização citoplasmática de maspina coincide com um mau prognóstico do câncer enquanto a localização nuclear indica uma lesão mais benigna (LONARDO et al., 2006; MAASS et al., 2002; MARIONI; STAFFIERI; BLANDAMURA, 2010; MOHSIN et al., 2003; SOOD et al., 2002). Este

paradoxo foi demonstrado por Sood et al. (2002), onde a localização citoplasmática da maspina nas células do carcinoma ovariano indicava um prognóstico ruim da doença, no entanto a localização nuclear desta proteína foi indicativo de uma lesão mais benigna, sugerindo a importante relação entre a localização celular e a função de maspina. Outros estudos que corroboram com este resultado foram realizados com câncer de mama e de cabeça e pescoço, onde mostram que a localização nuclear de maspina é requerida para as funções supressoras de tumor e metástase *in vivo*, sugerindo que este mecanismo de ação envolve a associação direta de maspina com os genes-alvo (MARIONI; STAFFIERI; BLANDAMURA, 2010; MOHSIN et al., 2003). Maspina é detectada em diversos compartimentos celulares, como já mencionado, no entanto o mecanismo que regula o tráfego desta proteína na célula é desconhecido.

Um estudo *in vitro* utilizando o modelo MCF-10A verificou que a fosforilação de maspina pode ter um papel importante na regulação dos níveis desta proteína e em sua localização subcelular. Os experimentos realizados mostraram que a inibição de tirosina fosfatases resultou em um rápido aumento nos níveis da proteína e seu acúmulo no citoplasma, indicando uma associação entre a fosforilação de maspina e a sua localização subcelular (LONGHI; CELLA, 2012). Entender como essa regulação acontece na glândula mamária normal é de extrema importância para o desenvolvimento de novas terapias.

2 OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho é caracterizar a fosforilação de maspina nas diferentes fases do desenvolvimento da glândula mamária murina e verificar se há correlação com a sua localização subcelular

Objetivos específicos

1. Verificar a expressão de maspina ao longo do desenvolvimento d.a glândula mamária murina
2. Avaliar os níveis de fosforilação de maspina no desenvolvimento da mama murina: fase de lactação e involução
3. Caracterizar a localização nuclear e citoplasmática de maspina nas fases de lactação e involução do desenvolvimento mamário murino

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção dos animais, planejamento do acasalamento e coleta das amostras

Neste estudo coletamos amostras de glândula mamária de animais da linhagem de camundongos isogênicos BALB/c procedentes do biotério de criação do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais permaneceram no biotério de manutenção do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento em salas com luz (ciclos de 12 horas claro e escuro) e temperatura (23 °C) controladas para a realização dos acasalamentos e coleta das amostras em cada ponto previsto no projeto. Para tal, fêmeas e machos BALB/c (2 fêmeas e 1 macho por gaiola) de 60 dias de idade foram colocados em gaiolas e no dia seguinte foi checada a presença do “plug vaginal”. O primeiro dia de gestação foi considerado o dia seguinte ao da confirmação do “plug vaginal”. O dia 1 de lactação é o dia seguinte ao parto. O desmame foi realizado no dia 21 de lactação e o dia seguinte pós-desmame foi dado como o dia 1 da involução da glândula mamária.

As glândulas mamárias foram coletadas nas seguintes fases de seu desenvolvimento: virgem (Vir); terceiro (3P), décimo (10P), e décimo oitavo (18,5P) dia de gestação; primeiro (1L), décimo (10L) e vigésimo (20L) dia de lactação; e no primeiro (1Inv) e quinto (5Inv) dia de involução. Para cada ponto de coleta utilizamos três fêmeas. O planejamento dos acasalamentos e coleta das amostras está esquematizado na Figura 5.

A eutanásia dos animais adultos foi realizada pelo bioterista José Braz Ferreira de Melo através do método químico na câmara de CO₂ (dióxido de carbono). Já os filhotes das fêmeas lactantes e das fêmeas após o desmame foram sacrificados com dose excessiva de anestésico (ketamina 100 mg/ml + xilasina 23 mg/ml), uma dose de 0,5 ml por 100 g de peso aplicada via intraperitoneal.

Este protocolo foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e registrado sob o nº 161 nas fls. 137 do livro 02.

3.3 Extração de proteínas total da glândula mamária murina

O tecido mamário murino congelado em N₂ líquido foi pulverizado em um almofariz com a ajuda de um pistilo de porcelana. Para as técnicas de *Western blot* e Phos-TagTM, o tecido pulverizado foi lisado com tampão RIPA 1X (50 mM Tris pH 7.4, 1% Triton X-100, 0,1% SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*), 0,5% deoxicolato de sódio, 150 mM NaCl (cloreto de sódio), 1 mM EDTA (*ethylenediamine tetraacetic acid*) pH 8.0 e 1mM EGTA (*ethylene glycol tetraacetic acid*)). Já para o preparo de extrato de tecido em condições compatíveis com a focalização isoeletrica usamos o tampão de extração *2D Protein Extraction Buffer I* (GE Healthcare #28-9435-23) e *Sample Grinding Kit* (GE Healthcare #80-6483-37) de acordo com as instruções do fabricante. A todos os extratos foram adicionados inibidores de protease (1 mM PMSF (*Phenylmethanesulfonyl Fluoride*) e 1X coquetel de inibidores de protease (Sigma #P2714)) e de fosfatase (1 mM Na₃VO₄ e 1X coquetel de inibidores de fosfatase (Sigma #P2850)).

Após a pulverização das amostras e a adição do tampão apropriado, os materiais obtidos foram incubados por 30 minutos a 4 °C sob agitação e, em seguida, centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C (MIKRO 200R, Hettich). O sobrenadante, que contém o extrato total de proteínas solubilizadas, foi coletado, colocado em tubos eppendorf devidamente identificados e congelados em alíquotas a - 20 °C. A dosagem proteica foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.4 Dosagem proteica

A dosagem proteica foi feita em uma placa de 96 poços de fundo chato, onde uma curva padrão de BSA (*Bovine Serum Albumin*) (Cell Signalling) e as amostras foram aplicadas em duplicata. A determinação da dosagem proteica foi feita pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando o reagente *Quick StartTM Bradford 1x Dye Reagent* (Biorad #500-0205) em leitor de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) (Epoch, BioTek) com valores de absorbância obtidos a 595 nm.

3.5 Preparo das amostras para *Western Blot* e Phos-Tag™

As proteínas dos extratos proteicos totais de tecido mamário (preparados conforme o item 3.3) foram desnaturadas pelo tratamento com tampão de amostra LB (*Laemmli Buffer*) 1X contendo 5% de β -mercaptoetanol e fervidas a 95 °C por 5 minutos.

3.6 Western Blot

As proteínas dos extratos proteicos (preparados como descrito no item 3.5) foram separadas de acordo com sua massa molecular por *Western Blot*. Para tal, no primeiro poço do gel foi aplicado o marcador molecular *BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen #10748-010) e nos poços seguintes as amostras de tecido mamário. Logo após, os extratos proteicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% contendo SDS como descrito em (LAEMMLI, 1970). Ao término da eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (Biorad #162-0177) usando tampão de transferência (25 mM Tris, 150 mM glicina e 20% metanol) em sistema de transferência *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Biorad #170-3940) a 20 V por 2 horas e 30 minutos. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 30 minutos em 5% de leite em pó sem gordura (Molico) dissolvido em PBS (PBS-Molico). Logo após, a membrana foi incubada na mesma solução de bloqueio contendo anticorpo primário monoclonal mouse anti-maspin Millipore MAB4035 (1:10000) *overnight* à 4 °C. No dia seguinte, a membrana foi lavada 3 vezes por 10 minutos com PBS-Tween 0,1% e o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à peroxidase (Sigma) foi incubado por 1 hora à temperatura ambiente em PBS-Molico 5%, a membrana foi lavada novamente conforme já descrito. Como controle de *loading* usamos anticorpo anti- β -Tubulina Abcam (ab6046) (1:1000) e o anticorpo secundário anti-coelho conjugado à peroxidase (Sigma). A imunodeteção foi realizada por quimiluminescência com o Clarity™ Western ECL Substrate (Biorad # 170-5061) e a membrana exposta a filme de raio-X (Ortho CP-G Plus - AGFA).

3.7 Phos-Tag™ SDS-PAGE

O Phos-Tag™ é um método usado para a detecção de proteínas fosforiladas e não fosforiladas em bandas separadas em um gel SDS-PAGE (KINOSHITA et al., 2006). O preparo do gel SDS-PAGE usando Phos-Tag™ Acrylamide AAL-107 (Wako #304-93521) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante para um gel 8% de acrilamida acrescido 50 µM Phos-Tag™. A transferência, o *immunoblot* e a exposição da membrana foram realizados da mesma forma que no item 3.6. Porém, a membrana foi incubada com o anticorpo primário rabbit anti-maspin Sigma HPA020132 (1:2000). Como controle de *loading* usamos anticorpo anti-HSP90 Cell Signaling (C45G5) (1:1000) e o anticorpo secundário anti-coelho conjugado à peroxidase (Sigma).

3.8 Quantificação do Western Blot e Phos-tag™

A quantificação das auto-radiografias foi feita através do software NIH ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Para tanto, a primeira banda da imagem foi demarcada, em seguida foi selecionado *Analyze>Gels>Select First Lane*. A próxima banda foi selecionada arrastando a demarcação da primeira e selecionando *Analyze>Gels>Select Next Lane*, esse passo foi repetido para as bandas subsequentes. A seguir, utilizamos a ferramenta *Analyze>Gels>Plot Lanes*, que gerou vários gráficos referentes às bandas. A área dos gráficos foi quantificada a partir de *Analyze>Measure*.

3.9 2D-SDS-PAGE

Os extratos proteicos totais de glândula mamária murina (preparados conforme o item 3.3) foram precipitados com acetona para eliminar resíduos de sais que possam interferir na focalização isoeletrica. Para tal, um volume três vezes maior de acetona gelada foi adicionada à amostra e colocada no freezer a - 20 °C por 4 horas. Em seguida, o extrato proteico contendo as proteínas precipitadas foi centrifugado a 4 °C por 15 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* de proteínas deixado à temperatura ambiente até a completa evaporação da acetona. O *pellet* de

proteínas foi ressuspensionado em tampão de hidratação (8 M uréia e 2% CHAPS, 50 mM DTT (1,4-*Dithiothreitol*) (Merck #3483-12-3)) e, em seguida, quantificado.

O método de 2D-SDS-PAGE consiste em duas etapas de separação das proteínas, a primeira separação é de acordo com ponto isoelétrico (pI) e a segunda é de acordo com a massa molecular (O'FARRELL, 1975). Para a separação na primeira dimensão, utilizamos fitas de IPG (Bio-Rad #163-2021) de 17 cm de pH em gradiente linear imobilizado de 4,7 a 5,9 (LONGHI; CELLA, 2012).

As fitas foram hidratadas em um volume de 300 μ L de extrato proteico (2 mg) ressuspensionado em tampão de hidratação e 1x ReadyStrip pH 4,7-5,9 Buffer (Biorad #163-2097). Para tal, a mistura de hidratação foi colocada numa das canaletas do Dry Strip Reswelling Tray (GE Healthcare) e o gel da fita de IPG foi colocado voltado para esta solução de hidratação. Para evitar o ressecamento da fita, sobre ela foram colocados 2 mL de óleo PlusOne DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare #17-1335-01). A hidratação foi realizada *overnight* a temperatura ambiente. As focalizações isoelétricas foram conduzidas no sistema Ettan IPG phorIII (GE Healthcare), onde as fitas hidratadas foram acomodadas com o gel voltado para cima e cobertas com óleo PlusOne DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare #17-1335-01). O programa utilizado para a focalização isoelétrica de uma fita de 17 cm e pH 4,7 a 5,9 está mostrado na Tabela 1. Ao término da focalização isoelétrica, as fitas foram guardadas a - 20 °C.

Passo		Voltagem [V]	Volt-hora (Vh) ou Tempo (h)
1	Step	500 V	500 Vh
2	Grad	1000 V	800 Vh
3	Grad	10000 V	16500 Vh
4	Step	10000 V	39200 Vh
5	Step	500 V	16 horas
6	Step	10000 V	1 hora

Tabela 1 - Programa utilizado na focalização isoelétrica para a fita de IPG 17 cm com gradiente de pH 4,7 a 5,9.

Momentos antes de submeter as fitas à segunda dimensão, estas foram retiradas do freezer - 20 °C e tratadas por 30 minutos em 2 soluções distintas. A primeira é uma solução redutora que consiste em solução de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M uréia, 30% glicerol, 2% SDS e azul de bromofenol) adicionada de 1% DTT (Merck #3483-12-3). Já a segunda solução (2,5% de 2-iodoacetamida (Merck #144-48-9) em solução de equilíbrio) é necessária para alquilação das proteínas.

Para a segunda dimensão, as fitas focalizadas e tratadas foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 12% vertical utilizando o sistema SE 600 Ruby (GE Healthcare). As fitas foram colocadas na parte superior do gel de poliacrilamida e o padrão de massa molecular *BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen #10748-010) aplicado ao lado.

As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (maiores detalhes ver item 3.6) e analisadas por *immunoblot* com o anticorpo policlonal rabbit anti-maspin Santa Cruz H130 (1:1000).

3.10 Imunofluorescência em cortes da glândula mamária murina

Para permitir a análise do tecido mamário, os blocos de parafina (ver item 3.2) foram cortados em secções de 5 µm. Logo após, os cortes foram passados para água a 42 °C onde foram “pescados” por lâminas de vidro silanizadas (Sigma #S4651-72EA) e colocados na estufa a 60 °C, para a aderência do tecido à lâmina.

Os cortes foram desparafinizados em xilol aquecido a 60 °C por 5 minutos, hidratados em uma bateria decrescente de etanol (100%, 95%, 80% e 70%) por 3 minutos cada, lavados com PBS 1X por 5 minutos. Em seguida, foram submetidos à recuperação antigênica usando tampão citrato (10 mM ácido cítrico e 0,05% Tween 20) pH 6 em banho-maria a 95 °C por 30 minutos. Passados os 30 minutos foram feitas 4 lavagens de 5 minutos cada com água MilliQ (Millipore) e 2 lavagens com PBS 1X por 5 minutos. Para o bloqueio dos sítios inespecíficos, uma barreira hidrofóbica ao redor dos cortes foi feita usando uma PAP PEN (Daido Sangyo) e aos cortes foram adicionados 70 µL de tampão de bloqueio (5% BSA em PBS 1X) em câmara umidificada por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo

policlonal anti-maspina Sigma HPA020132 numa diluição 1:200 no mesmo tampão de bloqueio *overnight* à temperatura ambiente em câmara umidificada. No dia seguinte, os cortes foram lavados 5 vezes por 10 minutos em PBS 1X.

Após as lavagens, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário cabra anti-coelho IgG (H+L) Alexa-Fluor 568 conjugado (Life Technologies #A11011) diluído em 10% soro de cabra (KPL #71-00-27) por 1 hora à temperatura ambiente em câmara umidificada. Passado o tempo de incubação, os cortes foram novamente lavados 5 vezes com PBS 1X. Logo após, os cortes foram montados com meio de montagem contendo DAPI (Prolong Gold[®] and SlowFade Gold Antifade Reagents – Life Technologies #P36935). As imagens foram adquiridas no Microscópio Confocal Multifotônico Zeiss LSM-780 NLO no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP) ICB/USP.

A análise das imagens foi realizada pela contagem das células com núcleo positivo e negativo para a marcação de maspina. Para a contagem de células, utilizou-se o software ImageJ, que possui a ferramenta *Cell Counter*. Para quantificar o núcleo foi realizada a separação dos canais, Image>Colors>Split Channels, e com a imagem aberta no canal de interesse foi selecionado Plugins>Analyze>Cell Counter. Foi realizado um clique em cima de cada célula núcleo positiva, estas são as células “tipo 1”. Já as células núcleo negativas são consideradas células “tipo 2”.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 A expressão de maspina nas diferentes fases do desenvolvimento da glândula mamária murina

Os estudos sobre a expressão e a localização subcelular de maspina têm sido realizados *in vitro* e em condições patológicas. Nosso grupo de pesquisa vem utilizando o modelo de MCF-10A, uma linhagem celular de epitélio mamário humano que expressa maspina endogenamente e por isso tem sido muito utilizada por muitos grupos que procuram entender os mecanismos moleculares pelo qual esta molécula regula seus diversos efeitos biológicos. Porém, embora os estudos utilizando culturas celulares sejam apropriados para compreender muitos dos mecanismos celulares e testar algumas hipóteses, é importante investigar se esses processos ocorrem *in vivo*. A glândula mamária de camundongo é o modelo animal comumente utilizado para a pesquisa experimental em câncer de mama e desenvolvimento mamário normal (ENDSLEY; ZHANG, 2011b; MEDINA, 2010). Sendo assim, como a relação entre a fosforilação de maspina e a sua localização subcelular foi mostrada *in vitro* no modelo de MCF-10A (LONGHI; CELLA, 2012), surgiu o interesse em investigar se o mesmo fenômeno ocorre *in vivo* no modelo de glândula mamária murina. Para tal, optamos por utilizar neste estudo a linhagem isogênica de camundongos BALB/c.

Inicialmente buscamos determinar a expressão de maspina ao longo do desenvolvimento normal da glândula mamária de fêmeas BALB/c. Para esta proposta, o tecido foi coletado em diversos estágios do desenvolvimento, incluindo fase virgem adulta (Vir), gestação (P), lactação (L) e involução (Inv). Essas amostras foram processadas para análise por *Western blot* (Figura 6). A forma canônica de maspina de 42 kDa (Figura 6A; cabeça de seta) está expressa em baixos níveis na glândula mamária virgem e no início da gestação (colunas 1-3), mas podemos observar que os níveis de expressão começam a aumentar ao final da gestação (coluna 4) e na fase de lactação da glândula mamária (colunas 5-6). Na involução os níveis voltam a diminuir (colunas 8 e 9). O extrato proteico total de MCF-10A foi usado como controle positivo (coluna 10). Este dado está de acordo com os previamente mostrados pela análise do mRNA por *Northern Blot* (ZHANG; MAGIT; SAGER, 1999) e *Western blot* (BAILEY et

al., 2009), embora este último não tenha avaliado a fase virgem, início da gestação e a fase mais avançada da involução. Uma forma de maior massa molecular (Figura 6A; seta) está presente em níveis mais elevados ao final da fase de lactação e início da involução (colunas 7 e 8). Esta forma representa possíveis polímeros de maspina (LIU, T; PEMBERTON; ROBERTSON, 1999), porém não foi investigada neste estudo. Os níveis de expressão de maspina foram quantificados e normalizados pelos níveis de tubulina (Figura 6B).

Ensaio semelhante foi realizado usando fêmeas da linhagem heterogênica Swiss Webster e verificou-se o mesmo padrão de expressão que a linhagem BALB/c (dados não mostrados). Este resultado mostra que a expressão de maspina é temporalmente regulada no desenvolvimento da glândula mamária murina e que este perfil de expressão não é linhagem específico.

Concluindo que maspina está mais expressa nas fases de lactação e involução, nos ensaios seguintes focamos nessas duas fases para avaliar o perfil proteico, os níveis de fosforilação e a localização subcelular de maspina.

Figura 6 - Perfil de expressão de maspina ao longo do desenvolvimento da glândula mamária murina. **A.** 100 µg de extratos proteicos de tecido mamário de camundongo isolados nas fases Vir, 3P, 10P, 18,5P, 1L, 10L, 20L, 1Inv e 5Inv foram submetidos a eletroforese em gel SDS-PAGE a 12%, transferidos para membrana de PVDF e analisados por imunoblot com anti-maspina (Millipore). 50 µg do extrato proteico de células MCF-10A foi usado como controle positivo (painel superior). Anti- β -tubulina foi usada como controle de *loading* (painel inferior). **B.** A quantificação das bandas foi realizada pelo programa ImageJ e a razão da quantificação das bandas de maspina/ β -tubulina está representada no gráfico.

4.2 Avaliação dos níveis de fosforilação de maspina nas fases de lactação e involução do desenvolvimento da glândula mamária murina

A fosforilação de maspina foi observada em algumas linhagens celulares. Já foi mostrada a fosforilação nos resíduos de serina e treonina de maspina extracelular em células epiteliais da córnea (NARAYAN; MIRZA; TWINING, 2011) e nos resíduos de tirosina em linhagem celular de epitélio mamário normal (LONGHI; CELLA, 2012; ODERO-MARAH et al., 2003). No trabalho de Longhi e Cella (2012), a fosforilação de maspina nas células MCF-10A foi caracterizada por 2D-SDS-PAGE. Então, utilizamos 2D-SDS-PAGE para caracterizar as possíveis formas fosforiladas de maspina no desenvolvimento da glândula mamária murina.

Por razão não compreendida, o anticorpo usado no ensaio da Figura 6 não reconheceu maspina no *immunoblot* do ensaio de 2D-SDS-PAGE quando usado extrato proteico de glândula mamária murina, por isso vimos a necessidade de testar outros anticorpos. Para tal, testamos sete anticorpos anti-maspina comerciais, a saber: ABCAM, Santa Cruz (H130), BD, R&D, Sigma HPA19025 (Sigma 25), Sigma HPA019132 (Sigma 32) e Sigma HPA020136 (Sigma 36) (Figura 7). Este teste foi realizado com extrato proteico total de tecido mamário de camundongo BALB/c em 5Inv. O extrato de MCF10A foi usado como controle positivo.

No resultado, podemos observar que somente o *immunoblot* com os anticorpos Sigma 32 e Santa Cruz (H130) apresentou uma forte banda (Figura 7) no tecido mamário murino. O anticorpo R&D apresentou uma banda bem fraca. Assim, nos ensaios subsequentes de *immunoblot* utilizamos os anticorpos Santa Cruz (H130) e Sigma 32.

Figura 7 - Teste de diferentes anticorpos contra maspina. Os anticorpos indicados na figura foram testados quanto à capacidade de reconhecer maspina murina em *immunoblot*. Nas colunas positivas para extrato proteico de mama murina foram aplicados 100 µg de extrato total de glândula mamária de camundongo BALB/c em 5Inv. 50 µg extrato proteico total de células, usado como controle positivo, foi aplicado nas colunas positivas para MCF-10A. As diluições dos anticorpos foram as seguintes: ABCAM 1:1000; Santa Cruz (H130) 1:2000; BD 1:3000; Sigma 36 1:5000; R&D 1:1000; Sigma 25 1:1000; Sigma 32 1:1000.

Optamos por avaliar as diferentes formas de maspina somente nas fases de lactação e involução, pois essas apresentam níveis mais elevados de maspina (Figura 6). 2 mg de extrato total de tecido mamário murino isolado nos estágios 1L, 10L, 20L, 1Inv e 5Inv foram analisados por focalização isoeletrica em uma fita de IPG de 17 cm em gradiente de pH linear de 4,7-5,9, seguida por eletroforese SDS-PAGE na segunda dimensão e *immunoblot* com anticorpo anti-maspina. Nós detectamos diversas formas de maspina com massa molecular de aproximadamente 42 kDa nos diferentes estágios de lactação e involução da glândula mamária (Figura 8). Há um único *spot* de maspina localizado na extremidade mais básica da fita (Figura 8; cabeça de seta). Já os demais *spots* de maspina possuem pI localizado na porção mais ácida da fita do que esta forma

mais básica, sugerindo que estas outras formas estão sendo modificadas por um grupamento químico carregado negativamente. Estudos anteriores mostraram em linhagem celular normal de epitélio mamário humano (MCF-10A) (LONGHI; CELLA, 2012) e linhagem de células epiteliais da córnea humana (HCEC) (NARAYAN; MIRZA; TWINING, 2011) que os *spots* detectados por 2D-SDS-PAGE eram fosfoformas de maspina.

Figura 8 - Diferentes formas de maspina no desenvolvimento da glândula mamária murina. Extratos proteicos de tecido mamário murino BALB/c (2 mg) nos estágios 1L, 10L, 20L, 1Inv e 5Inv foram analisados por 2D-SDS-PAGE. A focalização isoeletrica foi realizada em uma fita de IPG de 17 cm contendo gradiente linear de pH 4,7 a 5,9. As proteínas foram detectadas por *immunoblot* com anti-maspina Santa Cruz (H130). Cabeça de seta aponta o *spot* de maspina localizado na porção mais básica. Este dado é representativo de 3 amostras distintas de cada fase.

Podemos observar que há menos *spots* em 1L e 5Inv quando comparados com 10L, 20L e 1Inv. Já em 10L, 20L e 1Inv observamos um padrão semelhante de *spots* de maspina, porém essa semelhança é mais evidente em 20L e 1Inv. Podemos observar também que os *spots* que estão presentes em 10L, 20L e 1Inv e que não aparecem em 1L e 5Inv são mais ácidos, indicando que a maspina está mais negativa nestas fases. Estes dados demonstram que há várias formas de maspina na glândula mamária e essas formas parecem diferir entre a lactação e a involução, sugerindo que a presença/expressão dessas formas de maspina é regulada ao longo do desenvolvimento da glândula mamária. Como já havíamos observado que as diferentes formas de maspina presente nas células MCF10A são fosforiladas, buscamos avaliar os

níveis de fosforilação de maspina nestas fases pela técnica de Phos-tag™ SDS-PAGE, os resultados serão relatados a seguir.

O Mn^{2+} -Phos-tag™ SDS-PAGE é uma ferramenta usada para a detecção e separação de proteínas fosforiladas e não fosforiladas (KINOSHITA et al., 2006). A molécula de Mn^{2+} -Phos-tag™ possui dois íons de manganês que colaboram com a ligação do grupo fosfato da proteína fosforilada ao seu sítio de ligação (Figura 9A). Durante a migração no gel SDS-PAGE, as proteínas fosforiladas se ligam ao Phos-tag™ diminuindo a velocidade de migração destas. A diminuição da velocidade de migração das proteínas fosforiladas as separa das proteínas não fosforiladas e quanto mais fosforilada a proteína menor é a sua mobilidade no gel (Figura 9B).

Figura 9 - Princípio do Mn^{2+} -Phos-tag™. **A.** Estrutura do Mn^{2+} -Phos-tag™. **B.** Representação esquemática do princípio de Mn^{2+} -Phos-tag™ SDS-PAGE (Retirada e modificada de Kinoshita, Kinoshita-Kikuta e Koike, (2009)).

Para avaliar níveis de fosforilação de maspina na glândula mamária lactante e em involução, 100 µg de extrato proteico das amostras nos estágios 1L, 10L, 20L, 1Inv e 5Inv foram avaliadas por gel SDS-PAGE 8% contendo 50 µM Mn²⁺-Phos-tagTM. As proteínas foram posteriormente detectadas através de *immunoblot* com anti-maspina.

A Figura 10A, mostra dois tempos de exposição (maior/menor exposição). Podemos observar bandas com migração distinta em todos os estágios na maior exposição. A banda com maior mobilidade eletroforética corresponde à proteína não fosforilada, como indicado pela seta à direita da figura. Em 1L, 1Inv e 5Inv (colunas 2, 5 e 6), observamos maiores níveis da banda de maspina não fosforilada quando comparada as bandas equivalentes nos estágios 10L e 20L (colunas 3 e 4). Essa observação está em perfeito acordo com o aumento das bandas de maspina fosforilada em 10L e 20L (setas à direita). Para quantificar essa variação dos níveis de fosforilação de maspina, a membrana foi reincubada com anti-HSP90, uma proteína que não sofre fosforilação (YANG et al., 2010) (Figura 10B). Esses dados demonstram que na fase de lactação os níveis de fosforilação de maspina são muito maiores do que na involução.

Este resultado mostra que fosfoformas de maspina estão presentes em todos os estágios da lactação e da involução, mas possuem níveis de fosforilação distintos no início da lactação e na involução comparado ao meio e ao fim da lactação, corroborando com o resultado anterior obtido pela análise das formas de maspina por 2D-SDS-PAGE (Figura 8), reforçando a hipótese de que as formas anteriormente observadas correspondem a fosfoformas de maspina. É importante mencionar, porém, que existe a possibilidade das variantes de maspina presentes no resultado de 2D-SDS-PAGE serem produtos de outras modificações pós-traducionais que conferem carga negativa a estas. Para testar essa possibilidade outros ensaios serão necessários.

Figura 10 - Identificação de fosfoformas de maspina nas fases de lactação e involução da glândula mamária murina. A. 100 µg de amostra nos estágios 1L, 10L, 20L, 1 Inv e 5 Inv do desenvolvimento da glândula mamária murina correram num gel SDS-PAGE 8% contendo 50 µM de Phos-tag. *Immunoblot* com anti-maspina Sigma 32. Maspina recombinante (Sigma SRP3108) foi usada como controle não fosforilado. B. A quantificação das bandas fosforiladas e não fosforiladas foi realizada pelo programa ImageJ e a razão da quantificação destas por HSP90 está representada no gráfico.

4.3 Caracterização da localização subcelular de maspina na glândula mamária murina

Diferentes trabalhos já mostraram que maspina possui diversas localizações subcelulares e que sua localização nuclear ou citoplasmática indica um bom ou mau prognóstico do câncer, respectivamente (BAILEY et al., 2006; MARIONI; STAFFIERI; BLANDAMURA, 2010; MOHSIN et al., 2003; SOOD et al., 2002). O trabalho realizado por Longhi e Cella (2012) mostrou em MCF-10A uma interessante correlação entre a fosforilação de maspina e a localização subcelular desta proteína, onde maspina

fosforilada está presente predominantemente no citoplasma. Para verificar se há a mesma correlação entre a fosforilação de maspina e a localização subcelular desta na glândula mamária murina, utilizamos cortes de 5 μm de tecido mamário lactante (10L e 20L), onde maspina está muito fosforilada, e de glândula mamária involuindo (1Inv e 5Inv), onde maspina está pouco fosforilada. Estes cortes foram analisados por imunofluorescência com anti-maspina.

Maspina está expressa tanto nas células epiteliais quanto nas mioepiteliais alveolares (Figura 11, A e C, seta azul). A localização citoplasmática de maspina pode ser observada em todos os estágios avaliados (Figura 11, A-H). Já a marcação nuclear foi encontrada em três formas distintas de distribuição: núcleo negativo para maspina (Figura 11, setas brancas), núcleo parcialmente positivo (quando ainda é possível delimitar o núcleo) (Figura 11, cabeça de seta branca) e núcleo positivo (quando o núcleo está completamente marcado) (Figura 11, cabeça de seta amarela). A contagem dos núcleos negativos e positivos (que inclui tanto núcleos positivos quanto parcialmente positivos) revelou que a porcentagem de núcleos positivos para maspina aumentam levemente ao final da lactação, mas aumenta drasticamente na involução (Figura 11, I). O acúmulo de maspina no núcleo na involução pode ser melhor visualizado nas projeções ortogonais criadas a partir de z-stacks contendo 17 imagens adquiridas num intervalo de 1 μm (Figura 11, L-M, cabeça de seta vermelha). Em suma, os dados apresentados aqui mostram que a porcentagem de núcleos positivos na involução é quase duas vezes maior do que na lactação, mostrando que na fase de involução a translocação de maspina para o núcleo é importante para esta fase.

Figura 11 - Localização subcelular de maspina nas fases de lactação e involução da glândula mamária murina. Cortes de glândula mamária murina nos estágios 10L (A, B e J), 20L (C, D e K), 1Inv (E, F e L) e 5Inv (G, H e M) submetidos a imunofluorescência com anti-maspina Sigma 32 (vermelho), para a marcação do núcleo foi usado DAPI (azul). Nas imagens de A-H, setas azuis apontam células epiteliais lumbais e mioepiteliais, os núcleos negativos (setas brancas), positivos (setas amarelas) e parcialmente positivos (cabeça de seta branca) para maspina também são apontados. Em I, a porcentagem de núcleos negativos e positivos (incluindo os parcialmente positivos) para maspina em cada estágio analisado da lactação e involução está representado graficamente. Projeções ortogonais realizadas a partir de imagens z-stack confocal mostram os núcleos negativos para maspina na lactação (J-K, cabeça de seta azul) e núcleos positivos na involução (L-M, cabeça de seta vermelha). Barra de escala: 20 µm (A, C, E e G); 10 µm (J-M).

No início da involução, o acúmulo de leite no interior dos alvéolos desencadeia a morte celular (LI et al., 1997). Neste ponto, os glóbulos de gordura do leite são captados pelas células lumbais dos alvéolos e metabolizados em ácidos graxos livres, os quais levam a permeabilização da membrana lisossomal, a liberação de catepsinas e a morte celular desencadeada por lisossomos (KREUZAULER et al., 2010; SARGEANT et al., 2014). A catepsina D, a qual é encontrada no vacúolo citoplasmático e também cliva histona H3 no núcleo, foi apontada como um iniciador da involução da glândula mamária (KHALKHALI-ELIS et al., 2014). Como maspina aumenta a sensibilidade das células a morte (LATHA et al., 2005; LIU, J et al., 2004) e se liga a catepsina D (KHALKHALI-ELIS; HENDRIX., 2007), nossos dados suportam a hipótese do papel de maspina no processo de involução. Para responder essa hipótese outros experimentos são necessários, como a deleção de maspina nessa fase do desenvolvimento.

5 CONCLUSÕES

Em resumo, os resultados apresentados neste trabalho mostram que maspina está expressa de forma distinta nas diferentes fases do desenvolvimento da glândula mamária murina, aumentando os níveis de expressão ao final da gestação e voltando a diminuir no estágio mais avançado da involução. Essa variação nos níveis de maspina sugere que sua expressão esteja sob controle hormonal. Verificamos ainda que maspina possui diversas formas nas fases de lactação e involução e que pelo menos parte dessas formas são produtos de fosforilação. Além disso, assim como em MCF-10A, é notável a correlação entre a fosforilação de maspina e sua localização predominantemente citoplasmática nas células epiteliais da glândula mamária murina na fase de lactação.

REFERÊNCIAS*

AMIR, S.; MARGARYAN, N. V.; ODERO-MARAH, V.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; HENDRIX, M. J. Maspin regulates hypoxia-mediated stimulation of uPA/uPAR complex in invasive breast cancer cells. **Cancer Biol. Ther.**, v. 4, n. 4, p. 400-406, 2005.

ANDERSON, S. M.; RUDOLPH, M. C.; MCMANAMAN, J. L.; NEVILLE, M. C. Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! **Breast Cancer Res.**, v. 9, n. 1, p. 204, 2007.

BAILEY, C. M.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; KONDO, S.; MARGARYAN, N. V.; SEFTOR, R. E.; WHEATON, W. W.; AMIR, S.; PINS, M. R.; SCHUTTE, B. C.; HENDRIX, M. J. Mammary serine protease inhibitor (Maspin) binds directly to interferon regulatory factor 6: identification of a novel serpin partnership. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 40, p. 34210-34217, 2005.

BAILEY, C. M.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; SEFTOR, E. A.; HENDRIX, M. J. Biological functions of maspin. **J. Cell Physiol.**, v. 209, n. 3, p. 617-624, 2006.

BAILEY, C. M.; MARGARYAN, N. V.; ABBOTT, D. E.; SCHUTTE, B. C.; YANG, B.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; HENDRIX, M. J. Temporal and spatial expression patterns for the tumor suppressor Maspin and its binding partner interferon regulatory factor 6 during breast development. **Dev. Growth Differ.**, v. 51, n. 5, p. 473-481, 2009.

BILIRAN, H., JR.; SHENG, S. Pleiotrophic inhibition of pericellular urokinase-type plasminogen activator system by endogenous tumor suppressive maspin. **Cancer Res.**, v. 61, n. 24, p. 8676-8682, 2001.

BLACQUE, O. E.; WORRALL, D. M. Evidence for a direct interaction between the tumor suppressor serpin, maspin, and types I and III collagen. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 13, p. 10783-10788, 2002.

BODENSTINE, T. M.; SEFTOR, R. E.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; SEFTOR, E. A.; PEMBERTON, P. A.; HENDRIX, M. J. Maspin: molecular mechanisms and therapeutic implications. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 31, n. 3-4, p. 529-551, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, n., p. 248-254, 1976.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BRISKEN, C.; KAUR, S.; CHAVARRIA, T. E.; BINART, N.; SUTHERLAND, R. L.; WEINBERG, R. A.; KELLY, P. A.; ORMANDY, C. J. Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. **Dev. Biol.**, v. 210, n. 1, p. 96-106, 1999.

CELLA, N.; CONTRERAS, A.; LATHA, K.; ROSEN, J. M.; ZHANG, M. Maspin is physically associated with β 1 integrin regulating cell adhesion in mammary epithelial cells. **FASEB J.**, v. 20, n. 9, p. 1510-1512, 2006.

COWIN, P.; WYSOLMERSKI, J. Molecular Mechanisms Guiding Embryonic Mammary Gland Development. In: (Ed.). **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v.2, 2010.

DOMANN, F. E.; RICE, J. C.; HENDRIX, M. J.; FUTSCHER, B. W. Epigenetic silencing of maspin gene expression in human breast cancers. **Int. J. Cancer**, v. 85, n. 6, p. 805-810, 2000.

ENDSLEY, M. P.; HU, Y.; DENG, Y.; HE, X.; WAREJCKA, D. J.; TWINING, S. S.; GONIAS, S. L.; ZHANG, M. Maspin, the molecular bridge between the plasminogen activator system and β 1 integrin that facilitates cell adhesion. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 28, p. 24599-24607, 2011a.

ENDSLEY, M.P.; ZHANG, M. Investigating maspin in breast cancer progression using mouse models. **Methods Enzymol.**, v. 499, p.149-165, 2011b.

FAUPEL-BADGER, J. M.; ARCARO, K. F.; BALKAM, J. J.; ELIASSEN, A. H.; HASSIOTOU, F.; LEBRILLA, C. B.; MICHELS, K. B.; PALMER, J. R.; SCHEDIN, P.; STUEBE, A. M.; WATSON, C. J.; SHERMAN, M. E. Postpartum remodeling, lactation, and breast cancer risk: summary of a National Cancer Institute-sponsored workshop. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 105, n. 3, p. 166-174, 2013.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. GLOBOCAN 2012 v1.0. IARC Cancer Base No. 11: Cancer Incidence and Mortality Worldwide, 2013. Disponível em: <globocan.iarc.fr>. Acesso em: 07 de maio de 2015.

FITZPATRICK, P. A.; WONG, D. T.; BARR, P. J.; PEMBERTON, P. A. Functional implications of the modeled structure of maspin. **Protein Eng.**, v. 9, n. 7, p. 585-589, 1996.

FUTSCHER, B. W.; OSHIRO, M. M.; WOZNIAK, R. J.; HOLTAN, N.; HANIGAN, C. L.; DUAN, H.; DOMANN, F. E. Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. **Nat. Genet.**, v. 31, n. 2, p. 175-179, 2002.

GAO, F.; SHI, H. Y.; DAUGHTY, C.; CELLA, N.; ZHANG, M. Maspin plays an essential role in early embryonic development. **Development**, v. 131, n. 7, p. 1479-1489, 2004.

GJOREVSKI, N.; NELSON, C. M. Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 12, n. 9, p. 581-593, 2011.

HENNIGHAUSEN, L.; ROBINSON, G. W. Information networks in the mammary gland. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 6, n. 9, p. 715-725, 2005.

HOWARD, B. A.; GUSTERSON, B. A. Human breast development. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, v. 5, n. 2, p. 119-137, 2000.

HUNTINGTON, J. A.; READ, R. J.; CARRELL, R. W. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. **Nature**, v. 407, n. 6806, p. 923-926, 2000.

INCA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), 2014.

INMAN, J. L.; ROBERTSON, C.; MOTT, J. D.; BISSELL, M. J. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. **Development**, v. 142, n. 6, p. 1028-1042, 2015.

JAVED, A.; LTEIF, A. Development of the human breast. **Semin. Plast. Surg.**, v. 27, n. 1, p. 5-12, 2013.

JIANG, N.; MENG, Y.; ZHANG, S.; MENSAH-OSMAN, E.; SHENG, S. Maspin sensitizes breast carcinoma cells to induced apoptosis. **Oncogene**, v. 21, n. 26, p. 4089-4098, 2002.

KATZ, A. B.; TAICHMAN, L. B. A partial catalog of proteins secreted by epidermal keratinocytes in culture. **J. Invest. Dermatol.**, v. 112, n. 5, p. 818-821, 1999.

KHALKHALI-ELLIS, Z.; HENDRIX, M. J. Nitric oxide regulation of maspin expression in normal mammary epithelial and breast cancer cells. **Am. J. Pathol.**, v. 162, n. 5, p. 1411-1417, 2003.

KHALKHALI-ELLIS, Z.; HENDRIX, M. J. Elucidating the function of secreted maspin: inhibiting cathepsin D-mediated matrix degradation. **Cancer Res.**, v. 67, n. 8, p. 3535-3539, 2007.

KHALKHALI-ELLIS, Z.; GOOSSENS, W.; MARGARYAN, N. V.; HENDRIX, M. J. Cleavage of Histone 3 by Cathepsin D in the involuting mammary gland. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e103230, 2014

KINOSHITA, E.; KINOSHITA-KIKUTA, E.; TAKIYAMA, K.; KOIKE, T. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. **Mol. Cell Proteomics**, v. 5, n. 4, p. 749-757, 2006.

KINOSHITA, E.; KINOSHITA-KIKUTA, E.; KOIKE, T. Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. **Nat. Protoc.**, v. 4, n.10, p. 1513- 1521, 2009.

KREUZALER, P. A.; STANISZEWSKA, A. D.; LI, W.; OMIDVAR, N.; KEDJOUAR, B.; TURKSON, J.; POLI, V.; FLAVELL, R. A.; CLARKSON, R. W.; WATSON, C. J. Stat3 controls lysosomal-mediated cell death in vivo. **Nat. Cell Biol.**, v. 13, n. 3, p. 303-309, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAM, Y. W.; YUAN, Y.; ISAAC, J.; BABU, C. V.; MELLER, J.; HO, S. M. Comprehensive identification and modified-site mapping of S-nitrosylated targets in prostate epithelial cells. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9075, 2010.

LATHA, K.; ZHANG, W.; CELLA, N.; SHI, H. Y.; ZHANG, M. Maspin mediates increased tumor cell apoptosis upon induction of the mitochondrial permeability transition. **Mol. Cell Biol.**, v. 25, n. 5, p. 1737-1748, 2005.

LAW, R. H.; IRVING, J. A.; BUCKLE, A. M.; RUZYLA, K.; BUZZA, M.; BASHTANNYK-PUHALOVICH, T. A.; BEDDOE, T. C.; NGUYEN, K.; WORRALL, D. M.; BOTTOMLEY, S. P.; BIRD, P. I.; ROSSJOHN, J.; WHISSTOCK, J. C. The high resolution crystal structure of the human tumor suppressor maspin reveals a novel conformational switch in the G-helix. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 23, p. 22356-22364, 2005.

LI, M.; LIU, X.; ROBINSON, G.; BAR-PELED, U.; WAGNER, K. U.; YOUNG, W. S.; HENNIGHAUSEN, L.; FURTH, P. A. Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, n. 7, p. 3425-3430, 1997.

LI, Z.; SHI, H. Y.; ZHANG, M. Targeted expression of maspin in tumor vasculatures induces endothelial cell apoptosis. **Oncogene**, v. 24, n. 12, p. 2008-2019, 2005.

LIAO, X. H.; LI, Y. Q.; WANG, N.; ZHENG, L.; XING, W. J.; ZHAO, D. W.; YAN, T. B.; WANG, Y.; LIU, L. Y.; SUN, X. G.; HU, P.; ZHOU, H.; ZHANG, T. C. Re-expression and epigenetic modification of maspin induced apoptosis in MCF-7 cells mediated by myocardin. **Cell Signal.**, v. 26, n. 6, p. 1335-1346, 2014.

LIU, J.; YIN, S.; REDDY, N.; SPENCER, C.; SHENG, S. Bax mediates the apoptosis-sensitizing effect of maspin. **Cancer Res.**, v. 64, n. 5, p. 1703-1711, 2004.

LIU, T.; PEMBERTON, P. A.; ROBERTSON, A. D. Three-state unfolding and self-association of maspin, a tumor-suppressing serpin. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 42, p. 29628-29632, 1999.

LIU, Z.; SHI, H. Y.; NAWAZ, Z.; ZHANG, M. Tamoxifen induces the expression of maspin through estrogen receptor- α . **Cancer Lett.**, v. 209, n. 1, p. 55-65, 2004.

LONARDO, F.; LI, X.; SIDDIQ, F.; SINGH, R.; AL-ABBADI, M.; PASS, H. I.; SHENG, S. Maspin nuclear localization is linked to favorable morphological features in pulmonary adenocarcinoma. **Lung Cancer**, v. 51, n. 1, p. 31-39, 2006.

LONGHI, M. T.; CELLA, N. Tyrosine phosphorylation plays a role in increasing maspin protein levels and its cytoplasmic accumulation. **FEBS Open Bio.**, v. 2, n., p. 93-97, 2012.

LYDON, J. P.; DEMAYO, F. J.; FUNK, C. R.; MANI, S. K.; HUGHES, A. R.; MONTGOMERY, C. A., JR.; SHYAMALA, G.; CONNEELY, O. M.; O'MALLEY, B. W. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. **Genes Dev.**, v. 9, n. 18, p. 2266-2278, 1995.

MAASS, N.; RÖLVER, L.; ZIEBART, M.; NAGASAKI, K.; RUDOLPH, P. Maspin locates to the nucleus in certain cell types. **J. Pathol.**, v. 197, n. 2, p. 274-275, 2002.

MACIAS, H.; HINCK, L. Mammary gland development. **Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.**, v. 1, n. 4, p. 533-557, 2012.

MARIONI, G.; STAFFIERI, A.; BLANDAMURA, S. Maspin expression in head and neck carcinoma: subcellular localization matters. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 39, n. 3, p. 279-280, 2010.

MARTI, A.; FENG, Z.; ALTERMATT, H. J.; JAGGI, R. Milk accumulation triggers apoptosis of mammary epithelial cells. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 73, n. 2, p. 158-165, 1997.

MEDINA, D. Of mice and women: A short history of mouse mammary cancer research with an emphasis on the paradigms inspired by the transplantation method. **Cold Spring Harb Perspect. Biol.**, v. 2, n. 10, p. a004523, 2010.

MOHSIN, S. K.; ZHANG, M.; CLARK, G. M.; CRAIG ALLRED, D. Maspin expression in invasive breast cancer: association with other prognostic factors. **J. Pathol.**, v. 199, n. 4, p. 432-435, 2003.

MULAC-JERICEVIC, B.; MULLINAX, R. A.; DEMAYO, F. J.; LYDON, J. P.; CONNEELY, O. M. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. **Science**, v. 289, n. 5485, p. 1751-1754, 2000.

NARAYAN, M.; TWINING, S. Focus on molecules: maspin. **Exp. Eye Res.**, v. 90, n. 1, p. 2-3, 2010.

NARAYAN, M.; MIRZA, S. P.; TWINING, S. S. Identification of phosphorylation sites on extracellular corneal epithelial cell maspin. **Proteomics**, v. 11, n. 8, p. 1382-1390, 2011.

NAWATA, S.; SHI, H. Y.; SUGINO, N.; ZHANG, M. Evidence of post-translational modification of the tumor suppressor maspin under oxidative stress. **Int. J. Mol. Med.**, v. 27, n. 2, p. 249-254, 2011.

NEVILLE, M. C.; MCFADDEN, T. B.; FORSYTH, I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, v. 7, n. 1, p. 49-66, 2002.

NGAMKITIDECHAKUL, C.; WAREJCKA, D. J.; BURKE, J. M.; O'BRIEN, W. J.; TWINING, S. S. Sufficiency of the reactive site loop of maspin for induction of cell-matrix adhesion and inhibition of cell invasion. Conversion of ovalbumin to a maspin-like molecule. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 34, p. 31796-31806, 2003.

NGUYEN, D. A.; PARLOW, A. F.; NEVILLE, M. C. Hormonal regulation of tight junction closure in the mouse mammary epithelium during the transition from pregnancy to lactation. **J. Endocrinol.**, v. 170, n. 2, p. 347-356, 2001.

NICKOLOFF, B. J.; LINGEN, M. W.; CHANG, B. D.; SHEN, M.; SWIFT, M.; CURRY, J.; BACON, P.; BODNER, B.; RONINSON, I. B. Tumor suppressor maspin is up-regulated during keratinocyte senescence, exerting a paracrine antiangiogenic activity. **Cancer Res.**, v. 64, n. 9, p. 2956-2961, 2004.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

OAKES, S. R.; HILTON, H. N.; ORMANDY, C. J. The alveolar switch: coordinating the proliferative cues and cell fate decisions that drive the formation of lobuloalveoli from ductal epithelium. **Breast Cancer Res.**, v. 8, n. 2, p. 207, 2006.

ODERO-MARAH, V. A.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; SCHNEIDER, G. B.; SEFTOR, E. A.; SEFTOR, R. E.; KOLAND, J. G.; HENDRIX, M. J. Tyrosine phosphorylation of maspin in normal mammary epithelia and breast cancer cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 295, n. 4, p. 800-805, 2002.

ODERO-MARAH, V. A.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; CHUNTHAPONG, J.; AMIR, S.; SEFTOR, R. E.; SEFTOR, E. A.; HENDRIX, M. J. Maspin regulates different signaling pathways for motility and adhesion in aggressive breast cancer cells. **Cancer Biol. Ther.**, v. 2, n. 4, p. 398-403, 2003.

PEMBERTON, P. A.; WONG, D. T.; GIBSON, H. L.; KIEFER, M. C.; FITZPATRICK, P. A.; SAGER, R.; BARR, P. J. The tumor suppressor maspin does not undergo the stressed to relaxed transition or inhibit trypsin-like serine proteases. Evidence that maspin is not a protease inhibitory serpin. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 26, p. 15832-15837, 1995.

PEMBERTON, P. A.; TIPTON, A. R.; PAVLOFF, N.; SMITH, J.; ERICKSON, J. R.; MOUCHABECK, Z. M.; KIEFER, M. C. Maspin is an intracellular serpin that partitions

into secretory vesicles and is present at the cell surface. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 45, n. 12, p. 1697-1706, 1997.

QIN, L.; ZHANG, M. Maspin regulates endothelial cell adhesion and migration through an integrin signaling pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 42, p. 32360-32369, 2010.

QUARRIE, L. H.; ADDEY, C. V.; WILDE, C. J. Programmed cell death during mammary tissue involution induced by weaning, litter removal, and milk stasis. **J. Cell Physiol.**, v. 168, n. 3, p. 559-569, 1996.

RAVENHILL, L.; WAGSTAFF, L.; EDWARDS, D. R.; ELLIS, V.; BASS, R. G-helix of maspin mediates effects on cell migration and adhesion. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 47, p. 36285-36292, 2010.

RICHERT, M. M.; SCHWERTFEGER, K. L.; RYDER, J. W.; ANDERSON, S. M. An atlas of mouse mammary gland development. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, v. 5, n. 2, p. 227-241, 2000.

ROSEN, J. M.; LEWIS, M. Molecular Mechanisms Regulating Breast Development. In: HARRIS, J. R., et al. (eds.) **Diseases of the Breast**. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009. p. 12-21.

SARGEANT, T. J.; LLOYD-LEWIS, B.; RESEMANN, H. K.; RAMOS-MONTOYA, A.; SKEPPER, J.; WATSON, C. J. Stat3 controls cell death during mammary gland involution by regulating uptake of milk fat globules and lysosomal membrane permeabilization. **Nat. Cell Biol.**, v. 16, n.11, p. 1057-1068, 2014.

SCOTT, F. L.; EYRE, H. J.; LIOUMI, M.; RAGOISSIS, J.; IRVING, J. A.; SUTHERLAND, G. A.; BIRD, P. I. Human ovalbumin serpin evolution: phylogenic analysis, gene organization, and identification of new PI8-related genes suggest that two interchromosomal and several intrachromosomal duplications generated the gene clusters at 18q21-q23 and 6p25. **Genomics**, v. 62, n. 3, p. 490-499, 1999.

SEFTOR, R. E.; SEFTOR, E. A.; SHENG, S.; PEMBERTON, P. A.; SAGER, R.; HENDRIX, M. J. maspin suppresses the invasive phenotype of human breast carcinoma. **Cancer Res.**, v. 58, n. 24, p. 5681-5685, 1998.

SHENG, S.; CAREY, J.; SEFTOR, E. A.; DIAS, L.; HENDRIX, M. J.; SAGER, R. Maspin acts at the cell membrane to inhibit invasion and motility of mammary and prostatic cancer cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, n. 21, p. 11669-11674, 1996.

SHI, H. Y.; ZHANG, W.; LIANG, R.; ABRAHAM, S.; KITTRELL, F. S.; MEDINA, D.; ZHANG, M. Blocking tumor growth, invasion, and metastasis by maspin in a syngeneic breast cancer model. **Cancer Res.**, v. 61, n. 18, p. 6945-6951, 2001.

SOOD, A. K.; FLETCHER, M. S.; GRUMAN, L. M.; COFFIN, J. E.; JABBARI, S.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; ARBOUR, N.; SEFTOR, E. A.; HENDRIX, M. J. The paradoxical

expression of maspin in ovarian carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 8, n. 9, p. 2924-2932, 2002.

TEOH, S. S.; WHISSTOCK, J. C.; BIRD, P. I. Maspin (SERPINB5) is an obligate intracellular serpin. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 14, p. 10862-10869, 2010.

TOILLON, R. A.; LAGADEC, C.; PAGE, A.; CHOPIN, V.; SAUTIERE, P. E.; RICORT, J. M.; LEMOINE, J.; ZHANG, M.; HONDERMARCK, H.; LE BOURHIS, X. Proteomics demonstration that normal breast epithelial cells can induce apoptosis of breast cancer cells through insulin-like growth factor-binding protein-3 and maspin. **Mol. Cell Proteomics.**, v. 6, n. 7, p. 1239-1247, 2007.

UMEKITA, Y.; HIIPAKKA, R. A.; LIAO, S. Rat and human maspins: structures, metastatic suppressor activity and mutation in prostate cancer cells. **Cancer Lett.**, v. 113, n. 1-2, p. 87-93, 1997.

WATSON, C. J.; KHALED, W. T. Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. **Development**, v. 135, n. 6, p. 995-1003, 2008.

WATSON, C. J.; KREUZALER, P. A. Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 55, n. 7-9, p. 757-762, 2011.

WHO. World Cancer Report 2014. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2014.

YANG, L.; XUE, Z.; HE, Y.; SUN, S.; CHEN, H.; QI, L. A Phos-Tag-Based Approach Reveals the Extent of Physiological Endoplasmic Reticulum Stress. **PLoS One**, v. 5, n.7, p. e11621, 2010.

YIN, S.; LOCKETT, J.; MENG, Y.; BILIRAN, H., JR.; BLOUSE, G. E.; LI, X.; REDDY, N.; ZHAO, Z.; LIN, X.; ANAGLI, J.; CHER, M. L.; SHENG, S. Maspin retards cell detachment via a novel interaction with the urokinase-type plasminogen activator/urokinase-type plasminogen activator receptor system. **Cancer Res.**, v. 66, n. 8, p. 4173-4181, 2006.

ZHANG, M.; SHENG, S.; MAASS, N.; SAGER, R. mMaspin: the mouse homolog of a human tumor suppressor gene inhibits mammary tumor invasion and motility. **Mol. Med.**, v. 3, n. 1, p. 49-59, 1997a.

ZHANG, M.; MAASS, N.; MAGIT, D.; SAGER, R. Transactivation through Ets and Ap1 transcription sites determines the expression of the tumor-suppressing gene maspin. **Cell Growth Differ.**, v. 8, n. 2, p. 179-186, 1997b.

ZHANG, M.; MAGIT, D.; SAGER, R. Expression of maspin in prostate cells is regulated by a positive ets element and a negative hormonal responsive element site recognized by androgen receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, n. 11, p. 5673-5678, 1997.

ZHANG, M.; MAGIT, D.; BOTTERI, F.; SHI, H. Y.; HE, K.; LI, M.; FURTH, P.; SAGER, R. Maspin plays an important role in mammary gland development. **Dev. Biol.**, v. 215, n. 2, p. 278-287, 1999.

ZHANG, M.; SHI, Y.; MAGIT, D.; FURTH, P. A.; SAGER, R. Reduced mammary tumor progression in WAP-TAg/WAP-maspin bitransgenic mice. **Oncogene**, v. 19, n. 52, p. 6053-6058, 2000a.

ZHANG, M.; VOLPERT, O.; SHI, Y. H.; BOUCK, N. Maspin is an angiogenesis inhibitor. **Nat. Med.**, v. 6, n. 2, p. 196-199, 2000b.

ZHANG, W.; SHI, H. Y.; ZHANG, M. Maspin overexpression modulates tumor cell apoptosis through the regulation of Bcl-2 family proteins. **BMC Cancer**, v. 5, n., p. 50, 2005.

ZOU, Z.; ANISOWICZ, A.; HENDRIX, M. J.; THOR, A.; NEVEU, M.; SHENG, S.; RAFIDI, K.; SEFTOR, E.; SAGER, R. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. **Science**, v. 263, n. 5146, p. 526-529, 1994.

ZOU, Z.; GAO, C.; NAGAICH, A. K.; CONNELL, T.; SAITO, S.; MOUL, J. W.; SETH, P.; APPELLA, E.; SRIVASTAVA, S. p53 regulates the expression of the tumor suppressor gene maspin. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 9, p. 6051-6054, 2000.