PAULA MACIEL DA SILVA

**PAPEL DA NOVA CITOCINA PANDER/FAM3B NA TUMORIGENICIDADE E
INVASIVIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS DE PRÓSTATA DA LINHAGEM
DU145**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós – Graduação em
Farmacologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências

São Paulo
2015

Paula Maciel da Silva

**Papel da nova citocina PANDER/FAM3B na
tumorigenicidade e invasividade de células tumorais
de próstata da linhagem DU145**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Farmacologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Humberto Miguel
Garay Malpartida

Versão corrigida. A versão original
eletrônica encontra-se disponível tanto
na Biblioteca do ICB quanto na
Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações (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 total

Silva, Paula Maciel da.

Papel da nova citocina PANDER/FAM3B na tumorigenicidade e invasividade de células tumorais de próstata da linhagem DU145 / Paula Maciel da Silva. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Miguel Garay Malpartida.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Biologia Molecular.

Versão do título para o inglês: Role of new cytokine PANDER/FAM3B in tumorigenicity and invasiveness of prostate cell line DU145.

1. PANDER/FAM3B 2. Câncer de próstata 3. Citocina I. Malpartida, Prof. Dr. Humberto Miguel Garay II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0105/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Paula Maciel da Silva.

Título da Dissertação: Papel da nova citocina PANDER/FAM3B na tumorigenicidade e invasividade de células tumorais de próstata da linhagem DU145.

Orientador(a): Prof. Dr. Humberto Miguel Garay Malpartida.

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 **036** nas fls. **04** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Humberto Garay Malpartida**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Papel da nova citocina pander/Fam3B na tumorigenicidade e invasividade de células tumorais de próstata da linhagem DU145*" do qual participam o(s) aluno(s) **Paula Maciel da Silva e o pesquisador José Ernesto Belizário**, 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 **21.06.2013, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 24 de junho de 2013.

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

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

A minha amada família a qual
serei eternamente grata por
compartilhar esta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força e saúde para alcançar meus objetivos. A minha mãe Odoya, pela paz e calma no meu coração.

A minha família: Carla, Renata, Tyson e Jojo, meus queridos pais, Hamilton e Silvia que sempre acreditam em mim, mais do que eu mesma, e me mostram que nada é impossível com honestidade e perseverança. Além do apoio incondicional.

Ao meu querido Hideto que me apoia e incentiva em cada desafio das nossas vidas. Para sempre você estará no meu coração “Pokochan”.

Izabela e Beatriz, por todos os ensinamentos, discussões filosóficas, desabafos e desafios da ciência, vamos abrir uma empresa ou parar na terapia meninas.

Ao professor Belizario, pelos ensinamentos no seu laboratório e nos qualificar para lidar com a nossa matéria mais nobre, os animais que sacrificaram suas vidas em nome da ciência. Obrigada.

Ao meu amigo e (des)orientador Miguel, compreensivo, ao qual tenho profundo respeito e eterno agradecimento por me abrir as portas da pesquisa básica mesmo sabendo das imensas dificuldades que existiriam ao longo do caminho. Obrigada pelo voto de confiança e por me estender a mão nesta jornada.

RESUMO

Silva PM. Papel da nova citocina PANDER/FAM3B na tumorigenicidade e invasividade de células tumorais de próstata da linhagem DU145. [Dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

PANDER/FAM3B (*PAN*creatic-*DER*ived factor) é uma citocina capaz de induzir apoptose em células- β secretoras de insulina e regular a homeostase da glicose nos tecidos periféricos. Considerando que PANDER/FAM3B também é expresso em tumores de próstata, o presente trabalho avaliou o papel desta citocina na inibição da apoptose *in vitro*, assim como o crescimento e invasividade tumoral de células de carcinoma de próstata da linhagem DU145 *in vivo*, usando o modelo de superexpressão estável mediada por lentivirus. Os nossos resultados apontam um aumento da viabilidade e uma diminuição da morte celular em células que superexpressam PANDER quando comparadas ao grupo controle. Este efeito protetor é acompanhado por um aumento da expressão de genes anti-apoptóticos e uma diminuição da atividade proteolítica das caspases. Por outro lado, a superexpressão de PANDER/FAM3B por tumores *in vivo* se correlaciona com aumento da massa tumoral e o aumento de vasos sanguíneos nos tumores. Em síntese, nossos dados demonstram que, em contraste ao papel observado em células β -pancreáticas, o PANDER/FAM3B inibe morte celular e promove a tumorigenicidade e o crescimento tumoral *in vivo*, sugerindo ao mesmo tempo, algum envolvimento com angiogênese e metástase em células DU145.

Palavra-chave: PANDER/FAM3B. Câncer de próstata. Citocina

ABSTRACT

Silva PM. Role of new cytokine PANDER/FAM3B in tumorigenicity and invasiveness of prostate cell line DU145. [Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

PANDER / FAM3B (*PANcreatic-DErived factor*) is a cytokine capable of inducing apoptosis in insulin secreting β -cells and regulates glucose homeostasis in peripheral tissues. Since PANDER / FAM3B is also expressed in prostate tumors, this study evaluated the role of this cytokine in the inhibition of apoptosis *in vitro* as well as tumor growth and invasiveness of prostate carcinoma DU145 cells lineage *in vivo*, using the model Stable overexpression mediated by lentivirus. Our results suggest an increase in the viability and a decrease in cell death in cells that overexpress PANDER when compared to the control group. This protective effect is accompanied by an increased expression of anti-apoptotic genes and a decrease in proteolytic activity of caspases. Moreover, overexpression of PANDER / FAM3B by tumors *in vivo* correlates with increased tumor mass and the increase of blood vessels in tumors. In summary, our data demonstrate that in contrast to the role observed in pancreatic cells, PANDER / FAM3B inhibits cell death and promotes tumorigenicity and tumor growth *in vivo*, suggesting at the same time that are some involvement in the angiogenesis and metastasis in cell DU145.

Keywords: PANDER/FAM3B. Prostate Cancer. Cytokine

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Incidência de câncer de próstata no Brasil segundo a região no ano de Ocorrência de 2014.....	18
Figura 2 Coeficiente de mortalidade masculina específicos por neoplasia malignidade próstata.....	19
Figura 3 - Localização cromossômica do gene FAM3B no cromossomo 21	22
Figura 4 - Análise da viabilidade celular por MTT	40
Figura 5 - Análise da fragmentação nuclear em células DU145PANDER após tratamento com TNF.....	43
Figura 6 - Avaliação das modificações na membrana	44
Figura 7 - Expressão de genes pró e anti-apoptóticos.....	48
Figura 8 - Atividade proteolítica das caspases.....	49
Figura 9 - Análise do crescimento tumoral de células DU145-PANDER em camundongos imunocompetente	51
Figura 10 - Análise comparativa dos tumores após eutanásia	52
Figura 11 - Análise Histopatológica dos tumores.....	53
Figura 12 - Análise por imunoistoquímica dos tumores	54
Figura 13 - Análise de expressão gênica dos tumores	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de primers que foram usados para quantificação de expressão gênica.....32

Tabela 2 - Lista de anticorpos que serão usados os ensaios de imunodeteccção.....33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKt	Proteína Kinase B
BrdU	Bromodeoxiuridina
Bcl-X _L	B cell linfoma X, forma longa
Bcl-2	B cell linfoma 2
Bid	BH3 domínio de interação
DAB	Diamino Benzidina
DU 145	linhagem de célula tumoral
ERG 3	ETS-related gene
ETS	Protein C-ets-1
ETV1	ETV1 gene (protein-coding
FAM3B	Família com sequência similar 3
ILEI	secreted interleukin-related protein
IFN-	Interferon-gama
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
INCA	Instituto Nacional do Cancer
mRNA	RNA mensageiro
ORF	Ostensible Recognition of Folds
PSA	Antígeno Prostático Específico
PBS	Tampão fosfato salino
PANDER	Pancreatic Derived Factor
cDNA	DNA complementar
PC3	linhagem de célula tumoral
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida com SDS
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 A Evolução Epidemiológica do Câncer	14
1.2 Câncer de Próstata no Brasil	16
1.3 Marcadores Moleculares para Diagnóstico e Tratamento	20
1.4 Citocinas Como Marcadores de Câncer	21
1.5 PANDER como Nova Citocina	22
1.6 PANDER no Contexto do Diabetes Mellitus	23
1.7 Papel do PANDER na progressão tumoral	24
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3 JUSTIFICATIVA	28
4 MÉTODOS	29
4.1 Cultura de células	29
4.2 Avaliação da viabilidade celular	29
4.3 Análises de modificações na membrana plasmática	30
4.4 Ensaios de fragmentação nuclear	30
4.5 Análise da expressão gênica	31
4.5.1 <i>RT-PCR quantitativo em tempo real</i>	31
4.5.2 <i>Imunodeteção por western blot</i>	32
4.6 Medição da atividade das caspases	33
4.7 Animais	34
4.8 Inoculação de células tumorais em camundongos imunodeficientes	34
4.9 Avaliação do peso e da massa tumoral dos animais	34
4.10 Eutanásia dos animais	35
4.11 Análise histopatológica e imuno-histoquímica dos tumores	36
4.11.1 <i>Processamento do material proveniente dos tumores</i>	36
4.11.2 <i>Análise histopatológica: coloração com Hematoxilina-Eosina (HE)</i>	36
4.11.3 <i>Ensaios de Imuno-histoquímica</i>	37
4.12 Análise estatística	38

5 RESULTADOS	39
5.1 PANDER/FAM3B confere resistência à morte celular em células de tumor de próstata DU145	39
5.1.1 <i>Análise da viabilidade celular</i>	39
5.1.2 <i>Avaliação da fragmentação nuclear</i>	41
5.1.3 <i>Avaliação das modificações na membrana plasmática</i>	41
5.2 PANDER/FAM3B modifica a expressão gênica de proteínas associadas à apoptose	45
5.3 PANDER/FAM3B altera a atividade proteolítica das caspases	46
5.4 PANDER/FAM3B estimula o crescimento tumoral em camundongos imunodeficientes	47
5.5 PANDER/FAM3B induz mudanças morfológicas nos tumores em animais imunodeficientes	50
5.6 A expressão de PANDER/FAM3B se correlaciona mais com o tamanho dos tumores.....	55
6 DISCUSSÃO	57
REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

A primeira descrição médico-cirúrgica, sem influência religiosa ou mística, característica da época sobre câncer é conhecido como Papiro de Edwin Smith (1600 a.C). Famoso traficante de antiguidades que adquiriu o papiro na cidade Luxor, antiga cidade egípcia. Este documento apenas em 1920 James Henry Breasted, diretor do Instituto dos Estudos Orientais da Universidade de Chicago, junto com outros cientistas traduziram o manuscrito. Basicamente, o manuscrito descreve uma doença sem cura, e que o único recurso era a excisão do tumor.^{1,2}

Em contraponto, o oncologista Siddhartha Mukherjee em seu livro sobre a biografia do câncer, afirma que o primeiro papiro que relata a doença, datado de 2600 a. C, é denominado Papiro de Imhotep, um personagem ilustre da civilização egípcia, arquiteto, engenheiro e primeiro médico egípcio. O papiro de Edwin Smith, seria apenas uma reescrita do papiro de Imhotep.³

Mas afinal, o que é o Câncer? A origem da palavra câncer foi criada por Hipócrates (460-370 a.C) na Grécia que ao descrever uma ulceração e a chamava de crab (*caranguejo*), e utilizou o termo *carcino* e *carcinoma*, pois sua forma lembrava o caranguejo com suas patas que mais tarde foi traduzida por Celsus (28-50 a.C), o termo grego em câncer. Galeno (130-200 d.C) utilizou o termo *oncos*, a palavra inchaço em grego ao relatar tumores. O que posteriormente utilizou-se como radical da palavra para definir especialistas em câncer, os oncologistas.⁴ Atualmente o câncer é definido como um conjunto de mais de 100 doenças cuja característica em comum é a proliferação descontrolada e a perda do controle de morte celular, o que leva ao crescimento desordenado das célula, e denomina-se tumor. Sua capacidade de invadir outros órgãos e tecidos através do sistema linfático é denominado de metástase, e define a malignidade do câncer.

1.1 A Evolução Epidemiológica do Câncer

O levantamento epidemiológico do câncer teve início no século 18 com o médico Bernardino Ramazzini na Itália que percebeu a ausência de câncer cervical em freiras e a alta incidência de câncer de mama nas mesmas, este foi o primeiro

passo para associação de estilo de vida e identificação de fatores de risco para o desenvolvimento de células cancerígenas.

Em 1620, Thomas Venner em Londres escreveu: *“immoderate use of tobacco hurts the brain and the eye and induces trembling of the limbs and the heart.”*; Em 1761 John Hill publica um livro cuja tradução literal do título é: *“Cuidados contra o uso imoderado do rapé”*; primeiras associações de câncer e tabaco. Em 1775, o cirurgião inglês e um dos fundadores da ortopedia Percival Pott, em sua tarefa de pesquisador, percebeu a alta incidência de câncer de escroto em trabalhadores que tinham como ocupação, limpar chaminés em Londres, o que identificou os primeiros casos confirmados de substâncias carcinogêneas e levou a diferentes pesquisas quanto a exposição a carcinógenos e seu risco ocupacional. Somente em 1950 os pesquisadores confirmam que o tabaco causa câncer de pulmão e temos a primeira publicação pela escola de cirurgias americana que associa o fumo à saúde.⁴

Estas descobertas foram importantes para os epidemiologistas descobrirem outros fatores de risco para o câncer além do fumo, como obesidade, exposição a raios ultravioletas e até mesmo as infecções como transformadores de células saudáveis.

Em 1904 no II Congresso Médico Latino-Americano, em Buenos Aires, o médico brasileiro Azevedo Sodré apresentou um estudo sobre a frequência de câncer no Brasil e observou a dificuldade do levantamento de dados desta patologia. O mesmo percebeu uma baixa frequência de câncer no país e associou como uma doença relacionada a países desenvolvidos.² Já em 1913, o trabalho apresentado pelo uruguaio Julio Etchepare sobre a ocorrência de câncer na América teve muita repercussão sobre a comunidade médica e conclui que era necessário divulgar a doença entre a população e especialmente dar ênfase ao diagnóstico precoce. Assim, a medicina brasileira, iniciou seu interesse pelo conhecimento do câncer e seus centros de tratamentos específicos. Apesar de intenso interesse pelo tema na América Latina, somente em 1919 no Brasil com a criação do Departamento Nacional de Saúde Pública (DNSP), com seu primeiro diretor, o médico Carlos Chagas, iniciou o interesse em dados epidemiológicos precisos que não se limitavam aos grandes centros e abrangiam além das doenças infecto contagiosas como a tuberculose que atingiam a população brasileira. Este órgão contou com sanitaristas formados em cursos na John Hopkins University, que viam a saúde

pública como ferramenta de prevenção de doenças e como consequência, o câncer teve um olhar voltado para a prevenção.²

Porém, a mudança curricular da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, ocorreu apenas em 1980, com novas clínicas de estudos e assemelhou-se ao modelo europeu de especialidades médicas, o que permitiu a participação dos médicos brasileiros em congressos e encontros internacionais. O interesse pelo câncer pela classe médica brasileira teve o intuito dos mesmos serem reconhecidos pela classe médica européia e estadunidense no desenvolvimento do câncer. Porém, segundo Teixeira, esse foco não tinha o intuito primário de compreender o câncer na população brasileira, mas o único objetivo era pertencer aos grupos de elite médica internacional.

1.2 Câncer de Próstata no Brasil

A próstata é uma glândula do aparelho genital masculino de consistência fibroclástica, localizada abaixo da bexiga e a frente do reto palpável através do toque retal e envolve a parte inicial da uretra. Tem formato de uma castanha e pesa aproximadamente 30 gramas. A partir dos 40 anos o homem pode apresentar alterações na próstata como hiperplasia prostática que é clinicamente detectável pela dificuldade de micção. Sua histologia caracteriza-se por dois tipos de glândulas, compostas e ramificadas cujo objetivo do líquido prostático é fornecer condições de viabilidade aos espermatozóides. As glândulas da zona periférica caracterizam-se por pequenos espaços acinares delimitados por um epitélio colunar secretor, rodeado por um estroma muscular rico em fibras lisas que, durante a ejaculação, auxiliam o esvaziamento das secreções prostáticas na uretra. A zona central, por sua vez, contém ácinos relativamente grandes delimitados por um epitélio colunar baixo. A disposição com que os duetos dessa região desembocam na uretra parece torná-los relativamente livre do refluxo urinário intraprostático, ao contrário daqueles da região periférica. Uma terceira zona pode ainda ser identificada, a de transição, que compreende 5% a 10% da glândula e cujos duetos desembocam na uretra, próximos aos da zona central. Figura 1 COLOCAR A FOTO

A partir dessa época, seu crescimento é contínuo e dependente de um sistema regulatório complexo, com participação dos andrógenos durante os processos de morfogênese, citodiferenciação, proliferação e produção de secreções específicas. Esses hormônios, são produzidos principalmente nos testículos do complexo hormônio-receptor e pela indução da transcrição de genes alvo. Os andrógenos desempenham uma importante função na diferenciação e desenvolvimento da próstata normal e também no desenvolvimento de hiperplasia prostática. Seus mecanismos de ação são multivariados e respondem a testosterona, hormônio de crescimento (GH) e a prolactina, esta responsável pelo efeito mitogênico sobre a próstata. Os produtos resultantes da transcrição incluem fatores de crescimento, além de seus receptores e outras proteínas tecido-específicas relacionadas com o desenvolvimento e diferenciação da glândula.⁵

Estas características fisiológicas favorecem as alterações celulares e podem ser responsáveis ou exercer função maior ou menor no desenvolvimento, seu efeito biológico na próstata atravessa a membrana plasmática das células por difusão e liga-se a receptores intracelulares. Essa união é responsável pela dimerização e transporte das neoplasias malignas.

Contudo, o câncer de próstata é uma doença com etiologia multifatorial e de complexidade em sua origem, sendo a patologia que mais acomete o sexo masculino e a segunda causa de morte entre os homens no mundo, incluindo o Brasil. Nos Estados Unidos em 2012 ocorreram aproximadamente 29 mil mortes de câncer de próstata.⁶ A estatística para câncer de próstata na população brasileira seria de 68.800 casos novos de câncer, o que corresponde a 70,42 casos novos a cada 100 mil homens no ano de 2014. Ao excluirmos o câncer de pele não melanoma, entre os homens, o câncer de próstata apresenta maior incidência em todo o país , verificado na tabela a seguir:

Figura 1 – Incidência de câncer de próstata no Brasil segundo a região no ano de ocorrência de 2014. Fonte: Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2015.

A última estimativa mundial (2012) apontou como o segundo câncer mais frequente entre os homens (1,1 milhão de casos novos em 2012), acredita-se que este aumento está relacionado ao rastreamento realizado pelo teste do Antígeno Prostático Específico (PSA) e sua detecção no início da doença.⁷ De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o aumento da expectativa de vida e a exposição à agentes carcinogênicos e estilo de viver, fizeram o risco por morte de câncer aumentar entre a população brasileira. Segundo Friestino(2013), no Brasil, os homens morrem mais que as mulheres de neoplasias malignas, o que pode considerá-los mais vulneráveis a mortalidade por câncer no país. O mesmo estudo utilizou dados epidemiológicos do Sistema Único de Saúde (SUS) e os comparou ao longo de 15 anos. Estes resultados nos mostra o aumento significativo de mortalidade relacionada a neoplasia maligna de próstata. O que podemos observar no gráfico publicado por Friestino et al sobre a mortalidade de câncer de próstata no Brasil.⁸

Figura 2 - Coeficiente de mortalidade masculina específicos por neoplasia maligna de próstata, segundo faixa etária e ano de ocorrência, Brasil – 1980 a 2005. Fonte: Friestino, JKO, 2013

Podemos considerar um panorama mundial, que reflete-se no Brasil, visto o aumento da expectativa de vida e o desenvolvimento de políticas públicas com ênfase no diagnóstico precoce. Com este intuito, em 2009 iniciou a implementação da Política Nacional de Atenção Integral da Saúde do Homem que tem entre suas 5 diretrizes o fortalecimento da assistência as doenças prevalentes na população masculina, onde destaca-se o câncer de próstata.⁷ Acredita-se que o único fator de risco bem estabelecido para o desenvolvimento do câncer de próstata seja a idade maior que 65 anos, e isto leva as ações de saúde a focar em estratégias como a prevenção primária e o diagnóstico precoce para a população de risco.⁹

O diagnóstico do câncer de próstata baseia-se em dois critérios: 1 – a dosagem sérica de Antígeno Prostático Específico (PSA) e 2 - o exame clínico retal. Se houver alteração em um deles há indicação de biópsia seguida de ultrassonografia transretal.¹⁰

Um desafio ao diagnóstico é a falta de parâmetros clínicos ou marcadores moleculares que confirmem o comportamento e o potencial metastático do câncer de próstata. Apesar do avanço tecnológico e as poucas contra indicação aos métodos, não alcançou-se a eficácia no diagnóstico, visto que há déficit em determinar exatamente a capacidade da invasão tumoral e seu potencial metastático, características principais que corresponde a sua malignidade.¹¹

1.3 Marcadores Moleculares para Diagnóstico e Tratamento

Substâncias presentes no sangue ou tumor que aparecem ou aumentam suas concentrações e estão ligadas ao surgimento e crescimento de neoplasia maligna, estas macromoléculas denominam-se marcadores tumorais ou marcadores biológicos. Estes indicam a presença de câncer ou seu nível de malignidade e podem ser produzidas pelo tumor ou pelo organismo em resposta ao tumor. Em sua maioria são proteínas ou pequenos fragmentos delas que incluem antígenos de superfície, proteínas plasmáticas, enzimas e hormônios.^{12,13} A utilidade clínica dos marcadores favorecem: a triagem populacional, o diagnóstico dos pacientes sintomáticos, estadiamento clínico, monitorização terapêutica, determinar metástase e principalmente o diagnóstico precoce.^{13,14} Sua mensuração pode ser realizada por meios bioquímicos e imuno-histoquímicos nos tecidos, sangue ou testes genéticos que permitem a pesquisa de genes alterados em neoplasias malignas. Cada marcador tumoral apresenta valores de referência e taxas acima destes valores indicam alteração a ser investigada.^{15,16}

Em 1979, Wang et al identificara o antígeno prostático específico (PSA) , marcador característico de alteração prostática, porém como ferramenta de diagnóstico a dosagem sérica começou a ser utilizada apenas em 1986.¹⁷ Ele se origina das células epiteliais na zona de transição que responde ao nível de PSA e seu nível sérico aumentado está diretamente relacionado ao aumento do volume prostático. Apesar de vários fatores afetarem sua concentração como hiperplasia prostática ou inflamação da próstata, ele ainda é o marcador mais utilizado.¹⁸ Contudo, a alta sensibilidade ao nível de PSA sanguíneo deixa dúvidas quanto a população de risco e atualmente pacientes entre 2,6 e 10 ng/ml estão na faixa de avaliação criteriosa do risco de câncer de próstata, o que os leva a realização de biópsia. Este procedimento invasivo tem pouca especificidade e torna 75% dos pacientes submetidos à biópsia com resultado negativo para neoplasia maligna de próstata.¹⁶ Desta forma Benson et al (1992), sugeriu que fosse avaliado o PSAD como maneira de aumentar a especificidade. O cálculo baseia-se no valor de PSA total dividido pelo volume da próstata com score de corte de 15 ng/ml/cc, e isto aumentaria a especificidade do exame para pacientes com neoplasia maligna e excluiria os casos de hiperplasia. Posteriormente Castro et al sugeriu que o score

mudasse para 0,078 ng/ml/cc e aumentaria a especificidade do exame em 95% dos tumores.¹⁹

Portanto, a descoberta de novos marcadores tumorais pode vir a contribuir para melhor especificidade na detecção precoce sem submeter o paciente a procedimentos invasivos.

1.4 Citocinas como Marcadores de Câncer

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares hidrossolúveis pequenas que são produzidas por diversos tipos celulares o que as diferencia dos hormônios endócrinos, pois exercem seu efeito localmente ou via “célula a célula”. Diferentes tipos de células secretam a mesma citocina e uma única pode agir em diversas células (pleiotropismo), assim como ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas (redundância). Podem ser formadas em cascatas, ou seja, uma citocina estimula uma célula-alvo a produzir mais citocinas, estas se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica.^{20,21} Estas citocinas são produzidas por uma variedade de tecidos e células como astrócitos, fibroblastos entre outros tecidos. Sua multifuncionalidade podem ser descritas pelas diferentes funções das citocinas como ocorre com as IL-6, IL-1 e TNF, que são citocinas produzidas por diferentes tipos celulares. A IL-6 por exemplo foi inicialmente identificada como derivada de células T, colaboravam com células B para formação de anticorpos. Historicamente a IL1, atribuiu-se a participação como fator pirogênico endógeno e TNF como fator indutor de necrose hemorrágica em alguns carcinomas.²² Com características multifuncionais as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e sobrevivência da célula, bem como participam na regulação e na produção e atividade de outras citocinas. Atualmente, estudos comprovam que específicas citocinas, tais como IL-6 participa na atividade do sistema imune, diferenciação e crescimento celular e também em neoplasias malignas e que esta participa de mecanismos anti-apoptóticos e pró-apoptóticos.²³

O processo inflamatório tem um determinante papel no câncer de próstata, apresentam elevada produção de citocinas inflamatórias como IL-8 e IL-6 e são influenciadas por fatores de transcrição como ERG3. Estudos identificaram a hiper-

regulação de ambas citocinas e observaram que ERG3 é hiper-expressa comparada ao tecido normal, o que sugere que fatores transcricionais atuam durante o processo de progressão na neoplasia maligna de próstata.²⁴

1.5 Pander como Nova Citocina

Considerando a existência de uma estrutura secundária altamente conservada entre as citocinas e usando o algoritmo computacional denominado ORF (*Ostensible recognition of folds*), que permite realizar comparações por homologia de estrutura secundária de proteínas, foi identificada uma nova família de potenciais citocinas denominada FAM.^{25,26} Esta família, composta por quatro genes, FAM3A, FAM3B, FAM3C e FAM3D, possui um padrão de distribuição tecidual bastante amplo. Particularmente, o gene FAM3B, localizado no cromossomo 21, especificamente no braço longo do cromossomo, entre as regiões q22.2 e q22.3, como mostrado na figura 3. Expresso de maneira bem acentuada no pâncreas e menos expresso em outros poucos órgãos como próstata, intestino, testículos e cérebro.^{26,27}

Figura 3 - Gene FAM3B e sua localização genômica no cromossomo 21. (Retirado do site Geneloc®, 2015)

Por este motivo, a proteína codificada por este gene foi designada como PANDER (*PANcreatic DERived Factor*). Esta proteína possui 235 aminoácidos, um peptídeo sinal (aminoácidos 1-29) e quatro cisteínas (Cys 61, 69, 91 e 229), as quais são responsáveis pela formação das pontes dissulfeto intermoleculares.^{26,27}

1.6 PANDER no Contexto do Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus é caracterizado pela: (1) Destruição da produção de insulina no pâncreas, especificamente células β (Diabetes Mellitus tipo 1 – DM1), ou (2) caracterizado pelas células apresentarem tolerância a glicose (Diabetes Mellitus tipo 2 – DM2).²⁸ Alteração na função das células β pancreáticas e a redução de sua massa são eventos determinantes na evolução do Diabetes Tipo 2. O processo inflamatório seguido da presença de citocinas como IL-1, IFN- γ , TNF entre outras, desempenham função importante na deterioração dessas células. Estudos revelam que um novo tipo de família de citocinas denominadas PANcreatic DERived Factor (PANDER) sugere ter papel na disfunção das células β e no processo apoptótico.²⁹

Análises de imunohistoquímica confirmaram a presença da proteína PANDER especificamente nas ilhotas de Langerhans, tanto em células- α como em células- β , co-localizando com glucagon e insulina, respectivamente. Também foi mostrado que ocorre perda de viabilidade celular em ilhotas humanas, de rato e camundongo, células- α (linhagem α TC3) e células- β (linhagem β TC3), quando tratadas com a proteína PANDER recombinante. No caso específico das células- β essa queda ocorre de forma tempo-dependente e dose-dependente através do mecanismo de morte celular programada (apoptose) com ativação da caspase-3.³¹ A partir desses resultados, foi sugerida uma ligação do gene *PANDER/FAM3B* com o processo de destruição de células- β , principalmente por mecanismos apoptóticos, e possivelmente, com a patogênese do diabetes tipo 1.^{30,32} No entanto, a cascata de sinalização que leva à apoptose decorrente da ação de PANDER parece ser diferente daquela normalmente ativada por outras citocinas como IL-1 β , IFN- γ e TNF- α . De fato, fatores de transcrição como NF- κ B e STAT1 que são alvos da ação destas citocinas³¹, aparentemente não são ativados por PANDER em células- β .³³ A rede de interações gênicas proposta para explicar a maneira pela qual PANDER induz a morte celular em células- β sugere que a proteína regulatória do ciclo celular p21 e a caspase-3 são duas das suas principais moléculas efetoras.³³

Recentemente, novas abordagens envolvendo a produção de animais transgênicos sem a expressão de PANDER e a descoberta da expressão de PANDER em hepatócitos e células- β pancreáticas, evidenciou a possibilidade de existirem várias funções para o PANDER no contexto do Diabetes Mellitus, não apenas a indução de morte em células- β pancreáticas. Assim, contrariamente ao

esperado, o silenciamento do PANDER prejudicou a função de células- β pancreáticas, modificando a sua sensibilidade a glicose, mesmo sem ter efeitos na produção e secreção global de insulina.³⁴ O mesmo estudo sugere que podem existir outros efeitos de PANDER nos tecidos periféricos, desde uma co-regulação com secreção de insulina^{30,32,35,36} a uma ligação desta citocina com células hepáticas HEPG2 in vitro.³⁷

Para elucidar o papel de PANDER no contexto do Diabetes, Moak SL. et al., (2014), realizou experimentos para avaliar a função do PANDER na homeostase da glicose, especialmente na progressão e desenvolvimento do diabetes tipo 2, assim desenvolveu um modelo animal utilizando camundongo C57 que exibia fenótipo aumentado na regulação da glicemia e sinalização da insulina secretada pelo pâncreas, pois este modelo tinha tolerância á glicose aumentada em jejum. Assim desenvolveram um bom modelo animal para investigar o papel de PANDER na DM2. Os autores sugerem que PANDER interfere no sinal de produção de insulina através da supressão de sinal via Akt mas não interfere na lipogênese, porém pode inibir a gliconeogênese.³⁸

De fato, estudos mais recentes, revelam a expressão de PANDER no fígado, promovendo lipogênese e causando hiperglicemia de jejum em animais manipulados geneticamente para superexpressar PANDER nas células hepáticas.^{39,40} No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais PANDER afetaria a resistência insulina foram muito pouco explorados nestes estudos. Por outro lado, todos estes estudos sugerem que a proteína PANDER pode ter efeitos variados dependendo do contexto biológico, o que reforça a natureza pleiotrópica desta nova citocina.

1.7 Papel do PANDER na progressão tumoral

Estudos preliminares realizados pelo nosso grupo revelaram que a expressão de PANDER correlaciona-se positivamente com o grau de malignidade e a presença de metástase em tumores de mama e próstata (dados não publicados). Contudo, devido à natureza pleiotrópica das citocinas, é possível que nos tumores, PANDER desempenhe funções diferentes, inclusive opostas, daquelas descritas nas ilhotas de Langerhans, ligadas de certa forma, com mecanismos celulares que levam ao aumento de malignidade, invasividade ou metástases de células tumorais. Dados de

relação estrutura-função, obtidos por mutagênese sítio-dirigida revelaram uma grande similaridade entre as regiões funcionais de PANDER e IL-6. A região entre a Cys₉₁ - Phe₁₅₂ e a segunda ponte de dissulfeto, formada entre Cys₉₁ e Cys₂₂₉ foram identificadas como sendo funcionalmente importantes para a manutenção da toxicidade do PANDER.³² De maneira similar, IL-6 possui duas pontes de dissulfeto, das quais somente a segunda é necessária para a função e possível ligação ao seu receptor.⁴¹ IL-6 é uma citocina pleiotrópica expressa por uma grande variedade de células como macrófagos, linfócitos B, linfócitos T, fibroblastos, células tumorais, etc., e esta desempenha uma variedade de funções, algumas delas antagônicas. Na maioria dos modelos de células tumorais prostáticas, IL-6 atua como um regulador positivo para crescimento, exceto na linhagem LNCaP, onde tem um efeito pró-diferenciação.²³ Já em modelos celulares transformados de mama, IL-6 pode estar relacionada tanto com a indução de apoptose⁴³, quanto com a ativação de mecanismos anti-apoptóticos.^{44,45} Outros estudos sugerem, inclusive, haver o envolvimento desta citocina no próprio processo metastático.^{45,46,47} Além do mais, outras citocinas pertencentes à superfamília da IL-6, como LIF, OSM e IL-11, compartilham o mesmo domínio gp130 em seus receptores, o que explicaria, pelo menos em parte, a redundância nas funções dessas citocinas⁴⁹ e sugeriria a existência de compartilhamento funcional, também ao nível de receptores, com PANDER, cujo receptor ainda não foi identificado.

Por outro lado, a análise da região 21q22.3 do cromossomo 21 revela a localização de *FAM3B* entre dois genes, *TMPRSS2* e *ERG*, que recentemente foram associados à tumorigênese de câncer de próstata.⁵⁰ Verificou-se que rearranjos cromossômicos envolvendo *TMPRSS2* e os genes da família de fatores de transcrição ETS, como *ERG* e *ETV1*, ocorrem na maioria das amostras de câncer de próstata. Por meio de uma fusão gênica, estes genes passam a ser regulados por andrógenos, tal como ocorre com *TMPRSS2*, provocando a sua superexpressão. Adicionalmente, outro gene da família, o *FAM3C* (também conhecido como *ILEI*) está envolvido na progressão tumoral de células epiteliais de mama⁵¹ e carcinoma hepático, promovendo metástase e perda de adesão celular.⁵²

Desta forma, ao ser codificado por um gene localizado em uma região cromossômica suscetível a alterações e rearranjos, e pertencer a uma família de citocinas associadas à transformação maligna, PANDER poderia estar envolvido em

mecanismos que levam à progressão tumoral de células da próstata. PANDER mostrou ser uma citocina estruturalmente muito semelhante à IL-6 e, por isso, seu envolvimento com a carcinogênese e/ou desenvolvimento tumoral e metástase tem sido levantado pelo nosso grupo. Estudos da expressão gênica de PANDER em tecidos tumorais mostraram uma possível correlação de PANDER com a carcinogênese de próstata e com o grau de malignidade dos tumores mamários (dados não publicados). Dessa forma, PANDER poderia ser descrita como uma citocina pleiotrópica, uma vez que um possível papel relacionado ao desenvolvimento de tumores seria antagônico àquele descrito em células- β pancreáticas, onde PANDER se mostrou um indutor de apoptose.^{30,33}

Por um lado, demonstramos que a proteína recombinante rhPANDER tem efeitos proliferativos em forma dose-dependente e aumenta em até 50% a taxa de viabilidade (ou protege de morte celular) quando células DU145 são tratadas com 2 ng/ml de TNF- α . Da mesma forma a proteína sPANDER secretada no meio condicionado, carenciado de soro e sem fatores de crescimento, de células 293T transfectadas transitoriamente com o vetor pcDNA-PANDER, aumentam a viabilidade e diminuem a morte celular, induzida naturalmente, em células DU145 após 24 h de cultura. Possivelmente porque os mecanismos operados por PANDER em células DU145, não envolvam apenas mecanismos de inibição de morte, mas também mecanismos estimuladores de proliferação ou diferenciação. Similares resultados já foram descritos para IL-6, quando comparados tumores de próstata e mama.^{42,43}

Nossos resultados obtidos até agora com a superexpressão de PANDER em células de tumor de próstata da linhagem DU145, parecem confirmar as nossas hipóteses. A curva de crescimento de células DU145-PANDER sugeriu um possível efeito proliferativo induzido pela proteína PANDER, que não foi confirmado pelo ensaio de BrdU (dados não mostrados). Estes dados sugerem que não existiria um efeito proliferativo e que o aumento de massa celular é decorrente de uma inibição de apoptose, que, mesmo em condições favoráveis a proliferação, pode estar acontecendo. Contudo, outros ensaios como detecção Ki67 e timidina marcada, deverão ser realizados para verificarmos estas hipóteses.

O presente trabalho explora os efeitos da superexpressão de PANDER usando as células da linhagem DU145 como modelo de câncer de próstata.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da superexpressão da proteína PANDER/FAM3B na inibição da morte celular e na tumorigenicidade de células de tumor de próstata da linhagem DU145, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Analisar o potencial pró-apoptótico do PANDER mediante ensaios quantitativos de fragmentação de DNA, modificações na membrana plasmática (Anexina V-PI), expressão de proteínas regulatórias da apoptose (Bax, Bcl2, Bcl-XL) e ativação das caspases-3, -8, e -9.
- 2) Avaliar a tumorigenicidade e o crescimento *in vivo*, pela injeção de células PANDER em camundongos imunoincompetentes por via intraperitoneal (dorsal).
- 3) Analisar as mudanças histopatológicas ativadas pela secreção de PANDER nos tumores de próstata, nos ensaios *in vivo*.

3 JUSTIFICATIVA

A partir dos estudos de análise de expressão gênica do PANDER/FAM3B em amostras clínicas de tumores de mama e próstata, propõe-se a hipótese que a nova citocina PANDER tenha funções em células tumorais diferentes das relatadas em células- β pancreáticas. Em síntese, os reportes de outros grupos e os nossos resultados obtidos após três anos de pesquisa, indicam que a proteína PANDER pode funcionar como um agente protetor de morte celular e possível estimulador de migração celular e metástase. Os resultados até o momento (Maciel-Silva, et al., manuscrito em processo de submissão) corroboram esses achados e ressaltam a condição pleiotrópica da proteína PANDER, abrindo a possibilidade, não apenas para um novo cenário na compreensão do papel desta nova citocina no desenvolvimento e progressão tumoral, mas também em vários contextos fisiológicos ainda inexplorados. A consecução dos objetivos propostos neste projeto e a sua futura continuidade irá acrescentar conhecimento a respeito de novas formas de regulação que esta citocina opera em células diferentes de células- β pancreáticas. Além disso, trata-se de validar funcionalmente um novo possível marcador de progressão e metástase de tumores, que, tratando-se de uma proteína secretada, possibilita uma abordagem translacional através do monitoramento da presença de PANDER em pacientes com câncer e a utilização de anticorpos monoclonais anti-PANDER como uma nova alternativa viável e vantajosa para uma futura aplicação terapêutica.

4 MÉTODOS

4.1 Cultura de células

Células da linhagem DU145, derivadas de carcinoma de próstata humano (metástase cerebral) foram manipuladas para superexpressar a proteína PANDER/FAM3B usando um vetor lentiviral (pcSC-SP) contendo o cDNA completo do gene (células DU145-PANDER). As mesmas células transduzidas com o vetor vazio como controle. As células de ambas as linhagens foram cultivadas em meio de cultura RPMI enriquecido com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (ampicilina/estreptomicina). Para induzir morte celular, as culturas foram estimuladas com os seguintes indutores TNF- α + cicloheximida (0,2; 2,0 e 20,0 ng/ml e 1 μ M respectivamente) estaurosporina (0,5 μ M) e carenciamento de soro (0,5% SFB). Posteriormente as culturas foram avaliadas em condições de tempo-dependência (24, 48 e 72 h) e dose-dependência (1:1, 1:10 e 1:100 da concentração de cada indutor). A ocorrência de morte celular foi analisada sob cinco aspectos: 1) viabilidade celular, 2) modificações na membrana plasmática, 3) Fragmentação de DNA ; 4) Análise da expressão genica; e 5) Atividade proteolítica das caspases

4.2 Avaliação da viabilidade celular

As células foram plaqueadas a uma concentração de 2×10^4 células/poço e mantidas em cultura por 24 h. Após a adição de cada um dos indutores de apoptose em cada uma das concentrações referidas e a posterior incubação nos tempos indicados, a sobrevivência celular foi inferida através da análise com MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrasodiumbromide). Quando introduzido nas células na concentração final de 5 μ M, este composto é reduzido a cristais de formazan pelas enzimas respiratórias produzidas na mitocôndria. Ou seja, apenas células metabolicamente ativas podem metabolizar o MTT, o que permite medir indiretamente a viabilidade celular pela quantidade de cristais de formazan produzidos. Após a solubilização destes cristais com DMSO, a leitura da coloração roxa resultante foi feita em espectrofotômetro a 570 nm de comprimento de onda.

4.3 Análises de modificações na membrana plasmática

A fosfatidilserina é um fosfolípido localizado na região intracelular da membrana plasmática, que perde a sua assimetria e é externalizado no estágio precoce da apoptose. Esta propriedade é detectada pela ligação específica a Anexina-V (Anex-V) conjugada com FITC. Por outro lado, a integridade da membrana plasmática pode ser avaliada por adição de iodeto de propídeo (PI) que, em condições não-desnaturantes, liga-se apenas ao DNA nuclear de células que apresentam ruptura da membrana citoplasmática (necrose). As células foram plaqueadas em concentração de 5×10^5 células/poço e mantidas em cultura por 24 hs. Após a indução de apoptose, as células foram coletadas por tripsinização, lavadas com PBS duas vezes e concentradas por centrifugação a 500 rpm. Posteriormente, as células foram ressuspensas em tampão de ligação (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, KCl, 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1.8 mM, pH 7,4) contendo Anexina-V conjugada com FITC (1 mg/ml) e incubadas por 15 minutos a 37 °C. A seguir, foi adicionada uma solução de iodeto de propídeo (10 mg/ml em PBS) e as amostras foram transferidas para tubos de leitura de citometria de fluxo (FACS). A proporção de células apoptóticas comparada às células necróticas foi quantificada no citômetro FACScalibur® (BD Biosciences, CA, USA) a 488 nm de excitação e 530 nm de emissão. Assim, células positivas para Anex-V são consideradas apoptóticas, positivas para Anex-V e PI consideram-se necróticas (ou apoptóticas tardias) e negativas para PI e Anex-V são consideradas células viáveis.

4.4 Ensaios de fragmentação nuclear

As células foram plaqueadas, cultivadas e coletadas de maneira similar ao item 4.3. Após a lavagem com PBS, as células foram ressuspensas em tampão de lise (iodeto de propídeo 10 mg/ml, citrato de sódio 0,1 mM e Triton-X 0,1%) e mantidas sob refrigeração a 4 °C e em ausência de luz até o momento da análise. Em condições desnaturantes, o iodeto de propídeo penetra em todas as células. A proporção de núcleos sub-diploides (fragmentados) em relação aos núcleos diploides (em fase G0/G1) indica a porcentagem de células apoptóticas, pois a degradação de DNA é uma etapa chave da morte celular programada. As amostras

foram analisadas no citômetro de fluxo FACScalibur® (BD Biosciences, CA, USA) a 488 nm de excitação e 588 nm de emissão.

4.5 Análise da expressão gênica

A expressão gênica de proteínas associadas à morte celular foi avaliada ao nível de mRNA por RT-PCR quantitativo em tempo real usando oligonucleotídeos (primers) específicos e ao nível de proteína mediante imunodeteção por western blot usando anticorpos específicos (Tabela 2). Nas duas abordagens experimentais foi quantificada a expressão de genes da família Bcl-2 (Bax, Bad, Bcl-2, Bcl-XL), da família IAP (cIAP, XIAP), e da família das caspases (Caspase-3, Caspase-7, Caspase-6, Caspase-8, Caspase-9).

4.5.1 RT-PCR quantitativo em tempo real

Em todos os experimentos que envolveram análise de expressão gênica foram coletadas aproximadamente 1×10^6 células. A extração de RNA total foi realizada pelo método do Trizol® (Invitrogen-Life Technologies, CA, USA) seguindo as especificações e protocolos do fabricante. A síntese do cDNA foi feita pelo método da transcriptase reversa SuperScript® (Invitrogen-Life Technologies, CA, USA) à partir de 2 µg de RNA total e primers oligo dT, seguindo os protocolos descritos pelo fabricante. A expressão gênica foi quantificada por PCR em tempo real (qPCR) usando o sistema Sybr®Green, com primers específicos desenhados pelo programa Primer3 descritos na Tabela 1. O equipamento utilizado para analisar as amostras foi o 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems-Life Technologies, CA, USA). Os experimentos de qPCR foram programados da seguinte maneira: 1 ciclo de desnaturação inicial de 10 minutos a 95 °C, e 40 ciclos de amplificação (30 segundos de desnaturação a 95 °C e 1 minuto de anelamento e extensão a 60 °C). A normalização foi realizada considerando a expressão do gene constitutivo HPRT. Os resultados foram interpretados usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que relaciona a expressão do gene de interesse comparado àquela do gene normalizador (Livak et al., 1995). As variações de expressão foram calculadas em

função a expressão observada nas células transfectadas com o vetor pcDNA vazio ou transduzidas com o vetor pCSC vazio.

4.5.2 *Imunodeteção por western blot*

As proteínas totais das culturas celulares (aproximadamente 2×10^6 células) foram extraídas por lise com detergentes não-denaturantes (10 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% CHAPS, 10% glicerol, 5 mM DTT, 2 mM EDTA e coquetel de inibidores de proteases) e coletadas por centrifugação a 12000 rpm durante 30 min. A quantificação foi feita pelo método de Bradford® (Bio-Rad, CA, USA). A fração protéica contida nos meios de cultura também foi coletada por centrifugação usando filtros Centricon YM-10 (Millipore, MA, USA) e submetida à análise nas mesmas condições. As amostras foram colocadas em tampão de amostra (Tris-HCl 500 mM, pH 6.8, Glicerol 10%, SDS 10%, B-mercaptoetanol e 0.05% de azul de bromofenol) a uma concentração final de 50 µg de proteína total e submetidas à eletroforese em gel de poliácridamida com SDS a 15% de concentração (30% Acrilamida, Tris-HCl 1 M, pH 8.8, 10% SDS, 10% APS e 1% TEMED), com 100 V de tensão elétrica e durante 2 horas. Após disso, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueadas com leite e incubadas com os anticorpos específicos listados na Tabela 2. Depois de ter adicionado a enzima estreptoavidina-peroxidase, as membranas foram reveladas pelo método ECL® (GE Healthcare, USA). A normalização foi realizada, em todos os casos, considerando a expressão da proteína α -tubulina ou β -actina usando anticorpos específicos para estas proteínas.

Tabela 1 - Lista de primers que serão usados para quantificação de expressão gênica

Gene	Primers	
	Sense	Antisense
Bax	CAAGAAGCTGAGCGAGTGTC	GAAGTTGCCGTCTGCAAACA
Bcl-2	CTGGGATGCCTTTGTGGAA	CAGCCAGGAGAAATCAAACAGA
Bcl-X_L	CAGACCCAGTGAGTGAGCAG	CCGGTTGCTCTGAGACATTT
HPRT	GAAGGTCTTGCTCGAGATGTG	TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT
PANDER	CCAAAATCCCTGCTCTTCATG	GCATTCTTGGCATCGTTATTCA

Tabela 2 - Lista de anticorpos que foram usados os ensaios de imunodeteção

Antígeno	Tipo de anticorpo	Procedência	Finalidade	Utilidade
Bax	policlonal rabbit IgG	Cell Signalling	Morte celular	WB, IH, IF
Bcl-2	monoclonal mouse IgG	Cell Signalling	Morte celular	WB, IH, IF
Bid	policlonal rabbit IgG	Cell Signalling	Morte celular	WB, IH, IF
Bcl-XL	policlonal rabbit IgG	Cell Signalling	Morte celular	WB, IH, IF
XIAP	policlonal rabbit IgG	Cell Signalling	Morte celular	WB, IH, IF
Caspase-3	policlonal rabbit IgG	Cell Signalling	Morte celular	WB, IH, IF
Caspase-8	policlonal rabbit IgG	Cell Signalling	Morte celular	WB, IH, IF
Caspase-9	policlonal rabbit IgG	Cell Signalling	Morte celular	WB, IH, IF
β-Tubulina	policlonal rabbit IgG	Santa Cruz	Secundário	WB
rabbit IgG	Bovine anti-rabbit IgG HRP	Santa Cruz	Secundário	WB
mouse IgG	bovine anti-mouse IgG HRP	Santa Cruz	Secundário	WB
goat IgG	bovine anti-goat IgG HRP	Santa Cruz	Secundário	WB

4.6 Medição da atividade das caspases

As caspases são proteases ativadas comumente durante a iniciação e execução da apoptose. A atividade destas enzimas foi mensurada nos extratos de proteínas totais (item 5.3.2.) usando substratos sintéticos específicos para caspase-8 (zIETD-AFC) e caspase-9 (zLEHD-AFC), que são caspases iniciadoras, e para caspase-3, caspase-7 (zDEVD-AMC) e caspase-6 (zVEID-AFC), que são as caspases executoras. Amostras de 100 a 200 μ g de proteínas foram pré-incubadas com tampão de reação (HEPES 100 mM, 10% sucrose, CHAPS 0,1%, DTT 10 mM, pH 7,5) na ausência ou presença de um inibidor específico para cada caspase ou do inibidor geral das caspases zVAD-fmk por 15 min à 37 °C. Posteriormente foram adicionados cada um dos substratos específicos em forma independente, na concentração final de 10 μ M para cada substrato. A liberação dos fluoróforos - ACM ou -AFC, que indica a ocorrência de clivagem, e, portanto, a presença de atividade proteolítica de cada caspase, foi monitorada continuamente por 15 a 30 minutos a 37 °C, em espectrofluorímetro de placa Spectra MAX Gemini XS (Molecular Devices, CA, USA), ajustado em comprimento de excitação de 380/400 nm e emissão de 460/505 nm, segundo a referência (ACM ou AFC respectivamente). A velocidade da reação em unidade de fluorescência/seg foi obtida pelo programa Softmax Pro (Molecular Devices, CA, USA). A atividade proteolítica relativa foi calculada por comparação com a cinética de ativação observada para as proteínas caspase-3, -8 e -9 recombinantes.

4.7 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb/c *nude* imunodeficientes. Esta característica com 6-8 semanas de idade, mantidos a temperatura de 23 °C, umidade de 50% e ciclo claro/escuro de 12/12 horas no Biotério, Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob responsabilidade do Prof. Dr. José Ernesto Belizário. Os animais receberam água e alimentos autoclavados *ad libitum*. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB/USP (CEUA-USP), ao protocolo de experimentação animal nº 036/2013 aprovado em 20.02.2014.

4.8 Inoculação de células tumorais em camundongos imunodeficientes

Para avaliar a tumorigenicidade e crescimento tumoral *in vivo*, células DU145-PANDER e células controle (DU145-pCSC) foram cultivadas durante 48 horas, em ausência de soro fetal bovino. Após a coleta por tripsinização, 3×10^6 células foram ressuspensas, a temperatura de 4 °C, em 200 µl de meio de cultura contendo *Matrigel*® (Life Science, Homi Kapadia, EUA) e injetadas por via intraperitoneal em ambas as regiões dorsolaterais de camundongos machos Balb/c imunodeficientes e células DU145 transfectadas com o vetor vazio foram usadas no grupo controle (n=5). Cada grupo de animais, (N = 5 por cada grupo) foi mantido em observação durante 60 dias, alimentados com ração balanceada e supridos com água *ad libitum*.

4.9 Avaliação do peso e da massa tumoral dos animais

É preconizada a mínima manipulação dos animais em experimentos, sendo que ocorreu apenas duas vezes por semana para a higienização das gaiolas de policarbonato, verificação do peso e medidas de tumores existentes. O peso corporal foi monitorado uma vez por semana, manteve o padrão de pesá-los no período da tarde, visando o menor nível de desconforto para os animais utilizados no estudo. Para verificar a massa corporal os animais foram transportados para uma capela

higienizada anteriormente e assim aberta a gaiola, cada animal foi retirado da sua gaiola na sequência segundo sua marcação realizada no início da pesquisa e colocada em uma balança de precisão. Este procedimento foi realizado pelo mesmo pesquisador e no total foram mensurados 6 vezes (inclusive o dia do sacrifício). O peso foi considerado quando este animal se movimentou o menos possível sem interferência do pesquisador, afim de minimizar o stresse causado pela manipulação. Em busca de diminuir o contágio por patógenos externos todos os materiais usados para a pesagem eram descartáveis e/ou esterilizados. Assim como a sequência da pesagem se realizou primeiro com o grupo controle, após a mensuração, todos os materiais eram trocados para subsequente pesagem com o grupo PANDER com o intuito de minimizar qualquer infecção cruzada, ou que pudesse levar novos patógenos aos animais utilizados. Visto que animais imunoincompetentes são susceptíveis aos patógenos existentes no meio.

A mensuração da massa tumoral ocorreu a partir da visualização de massa subcutânea no animal. O volume do tumor foi calculado, através da medida dos diâmetros (com paquímetro), segundo a descrição da literatura⁶, pela fórmula $[V(\text{cm}^3) = (4\pi/3) \cdot a^2 \cdot (b/2)]$; onde a é o menor diâmetro e b é o maior diâmetro. O nível de crescimento de massa tumoral, em porcentagem, foi calculado utilizando a fórmula $(1-T/C) \times 100$, onde T é o volume do tumor do grupo controle e C o volume do grupo DU145-PANDER.

O estresse animal referente ao desenvolvimento do tumor também e assim com a dor foram dados avaliados durante toda a etapa do projeto em especial nas manipulações, onde ocorreu a verificação da perda de peso e desidratação, postura encurvada, isolamento e resposta à manipulação.

4.10 Eutanásia dos animais

A eutanásia foi realizada de acordo com o protocolo autorizado pelo o Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB-USP e ocorreu em abril de 2013, após 28 dias da inoculação das células DU145-PANDER e células controle (DU145-pCSC). O profissional envolvido no procedimento de eutanásia recebeu treinamento e está devidamente qualificado para realizar tal procedimento. Para isto anestesiou os animais com *Ketamina*[®] (Pfizer, SP-Brasil), 0,2 mg via intraperitoneal e após efeito

da droga realizou o deslocamento cervical. Além da observação e pesagem, as amostras de tumor, e outros órgãos como fígado, cérebro e pulmão, foram coletados, pesados e armazenados em freezer a -70 °C, para posteriores análises moleculares e bioquímicas.

4.11 Análise histopatológica e imuno-histoquímica dos tumores

4.11.1 Processamento do material proveniente de tumores

Após a dissecação, foi feita a inclusão dos fragmentos tumorais em blocos de parafina. Inicialmente foram fixados em um cassete e imersos no paraformol a 4% por 24 horas. Após esse procedimento lavou-se com PBS e iniciou-se a inclusão dos tecidos, deixando o material em álcool concentrado a 70%, 80%, 90% e três vezes no álcool 100%, utilizando-se o mesmo tempo de pausa de 50 minutos. Para garantir a fixação da parafina no material, foi utilizado o processo de Diafanização. O material foi imerso em xilol durante duas horas e posteriormente mantido na parafina durante 12 horas dentro de uma estufa a 37 °C, seguidas por uma nova imersão na parafina durante 2 horas. Por último, as peças foram emblocadas em moldes para fixá-las. Após a secagem os blocos com as peças de tecido e parafina foram imersos em água e colocados na geladeira por mais 1 hora. Posteriormente foram realizados os cortes histológicos de 4 µm cortado usando um micrótomo e levados para o banho-maria em temperatura média de 60 °C. Para a realização da coloração, os cortes foram previamente desparafinizados em estufa a 60 °C por uma hora.

4.11.2 Análise histopatológica: coloração com Hematoxilina- Eosina (HE)

Para completar a etapa de desparafinização, as lâminas foram imersas em xilol três vezes por dez minutos cada uma. Também foram imersas em álcool com concentrações de 100%, 95% e 70% durante três minutos cada e lavado em água corrente, por três minutos. As peças foram coradas por imersão em hematoxilina por três minutos, lavadas em água corrente, imersas

em eosina por dez segundos, passadas rapidamente em água corrente e em álcool com concentrações de 95% e duas vezes em 100%, por dois minutos cada. Após esse procedimento, foram imersos por dois minutos em xilol e lavadas. Utilizou-se a capela para a fixação da coloração com lamínulas acomodadas sobre a lâmina com o auxílio de Permount e foram avaliadas no microscópio óptico para identificação de possíveis mudanças estruturais em ambos os grupos.

4.11.3 Ensaios de Imuno-histoquímica

Os tecidos foram submetidos a cortes, assentados e fixados em lâminas silanizadas. O procedimento foi iniciado com a desparafinização dos cortes através da imersão dos mesmos em solução de xilol por duas vezes por trinta minutos cada, depois foram submetidos a etanol-xilol (1 : 1), etanol a 100%, 95%, 70% dez minutos cada e por último foram imerso em água destilada por dez minutos.

As lâminas foram lavadas três vezes em PBS, cinco minutos cada. O bloqueio da peroxidase endógena foi efetivado usando uma solução de água oxigenada a 3% diluída em PBS por quinze minutos em ambiente escuro. Em seguida realizamos duas lavagens em solução de PBS a 10%, por cinco minutos cada, após a lavagem foram permeabilizados com triton à 0,1%, por dez minutos. Para diminuir as possíveis reações inespecíficas, os cortes foram bloqueados com soro fetal bovino a 10% por uma hora em uma solução que continha o detergente Triton-X e PBS. Após o bloqueio, os anticorpos primários anti-Caspase-3 ativa, anti-Bax, anti-Bcl-2 e anti-PANDER, foram diluídos em PBS + 0,1% de triton-X usando duas diluições diferentes (1 : 100 e 1 : 30) e incubados overnight a 4 °C em uma câmara úmida. Na sequência, os cortes foram lavados em PBS, três vezes por cinco minutos cada, para tirar o excesso de anticorpo. Em seguida os cortes foram incubados com anticorpo secundário por uma hora, a seguir foram lavados cinco vezes em solução de PBS + 0,1% de triton-X por cinco minutos cada. A identificação dos tecidos marcados com os anticorpos secundários foi realizada através da reação enzimática com o cromógeno diamino benzidina (DAB), que produz um pigmento marrom quando em contato com a enzima peroxidase ligada ao anticorpo secundário (HRP). A incubação com DAB foi feita na ausência de luz, em temperatura ambiente, por aproximadamente vinte minutos. Para parar a ação do DAB as lâminas foram

lavadas rapidamente em água destilada e deixadas por vinte e quatro horas para realizar a diafanização.

Para melhor visualização das marcações da imuno-histoquímica, foi realizada coloração de fundo com Cresil, onde foram hidratadas mergulhando-as em etanol com concentrações de 70%, 95% e 100% por cinco minutos, em xilol por cinco minutos por duas vezes, depois em etanol em concentrações de 100%, 95% e 70% por cinco minutos e finalizadas em água destilada por vinte minutos. Na fase da coloração, os cortes foram mergulhados em Cresil por uma hora, em seguida, mergulhados rapidamente em água destilada para remoção do excesso de corante e também para promover diferenciação. O procedimento foi finalizado no processo de desidratação com etanol à 70%, 95% e 100% por em aproximadamente sete segundos cada e em xilol por três minutos cada. Após as secagens das lâminas, foram montadas em capela com PermOUNT e analisadas em microscopia óptica.

4.12 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística realizada com auxílio do programa computacional GraphPad Prism versão 4.0 (GraphPad Software, Inc, CA, USA). Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. A diferença estatística entre as médias foi inferida pelos teste t de Student e pelo teste two-way (ANOVA) seguido do pós-teste de Bonferroni. Para as análises de correlação entre duas variáveis empregou-se o teste de Pearson. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 PANDER/FAM3B confere resistência à morte celular em células de tumor de próstata DU145

5.1.1 *Análise da viabilidade celular*

Através dos ensaios de viabilidade celular usando MTT, foi possível verificar que a superexpressão da proteína PANDER em células DU145 atenua a morte celular induzida por três indutores diferentes de apoptose: 1) Fator de necrose tumoral (TNF- α) uma citocina ativadora de receptores de morte celular na membrana plasmática; 2) estaurosporina (STS), um inibidor de quinases de amplo espectro e 3) carenciamento de soro (0,5% SFB) que diminui drasticamente a disponibilidade de fatores de crescimento (Fig. 4A-B- C). Não foram observados efeitos anti-apoptóticos após tratamento das células com Etoposideo e Camptotecina, ambas drogas antitumorais, inibidoras das DNA topoisomerasas e bloqueadoras do ciclo celular nas fases G2 e S, respectivamente (dados não mostrados)

O efeito protetor da proteína PANDER após tratamento com TNF- α (2 ng/ml) parece ser tempo-dependente, permitindo a sobrevivência e viabilidade do dobro das células (42,2%) quando comparadas ao controle (22,1%), após 24 horas de tratamento (Fig. 4A). De maneira similar, a tempo-dependência na proteção também foi evidente em culturas tratadas com estaurosporina (1 μ M), atingindo níveis de sobrevivência similares aos observados com TNF- α , em células que superexpressam PANDER (28,9%) em comparação ao controle (14,2%) após 24 horas de cultura (Fig. 4B). No entanto, esta proteção é menor quando a morte celular é induzida pela ausência de fatores de crescimento, conferindo uma vantagem, nas células que superexpressam PANDER, não maior que 15% (91,6 vs 75,1% do controle) e 13% (85,5 vs 72,4 do controle) após carenciamento de soro por 12 e 24 horas, respectivamente (Fig. 4C).

Esta resposta pode ser colocada desde a perspectiva de que o PANDER não tem efeito anti-apoptótico quando a morte é induzida pela via intrínseca, após a

parada no ciclo celular ou ativação dos mecanismos apoptóticos mediados pela p53.^{53,54}

Figura 4 - Análise da viabilidade celular por MTT. Células DU145-PANDER e DU145-controle foram tratadas com (A) meio carenciado de soro (0,5% SFB) (B) TNF- α (2 ng/ml) + cicloheximida (5 μ M) e (C) Estaurosporina (1 μ M) e durante 4, 12 e 24 h. A viabilidade celular foi inferida por análise com MTT. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão e as diferenças foram inferidas pelo teste *Two way ANOVA* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$)

5.1.2 Avaliação da fragmentação nuclear

A fragmentação de DNA é um indicador confiável da ocorrência de apoptose. Sendo assim, células DU145 foram tratadas com doses diferentes de TNF- α (0,2, 2 e 20 ng/ml) durante 24 horas e analisadas por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo, para avaliar a fragmentação nuclear, através da incorporação de iodeto de propídeo (PI) que serve como marcador de DNA.

Pode ser verificada a indução de morte celular por TNF- α em forma dose-dependente, inferida pela porcentagem de núcleos sub-diplóides (fragmentados) marcados com PI e observados nos histogramas gerados pela análise citométrica (Fig. 11B-C). Em todas as doses observa-se uma diminuição da fragmentação de DNA em células DU145-PANDER em relação a células DU145-pCSC, sendo mais clara em doses menores e índices moderados de morte celular induzida por TNF- α . Este efeito protetor mediado pela proteína PANDER pode diminuir até ~30% a taxa de fragmentação nuclear (20% vs 30% do controle) em células DU145, quando a morte celular é induzida durante 24 horas por uma dose de 0,2 ng/ml de TNF- α (Fig. 5C).

Este efeito pode ser confirmado pela análise microscópica de fluorescência usando um filtro de excitação de 580 nm, em células tratadas com PI em condições não denaturantes (10 mg/ml em PBS). Nestas condições o PI penetra seletivamente nas células que perderam a integridade da membrana plasmática e pode ser usado para inferir morte celular global. Em todas as doses de TNF- α pode ser observado uma menor proporção de núcleos vermelhos em células DU145-PANDER quando comparadas ao controle (Fig. 5A).

5.1.3 Avaliação das modificações na membrana plasmática

Para confirmar os dados obtidos pela análise da atividade mitocondrial e fragmentação de DNA, foi avaliada a externalização da fosfatidilserina (apoptose precoce) detectada pela ligação específica a Anexina-V (Anex-V) conjugada com

FITC e a perda de integridade da membrana plasmática (apoptose tardia ou necrose) analisada pela incorporação de PI em condições não-denaturantes.

Em concordância com os dados obtidos pela análise de fragmentação de DNA, observou-se uma dose-dependência na indução de morte celular por TNF- α avaliada pela somatória das porcentagens de ligação total de Anex-V à membrana plasmática de células apoptóticas e a incorporação de PI ao DNA nuclear, ambas evidenciadas nos quadrantes inferior e superior direitos do dot plot gerado pela citometria de fluxo, respectivamente (Fig. 6A-B). Da mesma forma, a porcentagem de células Anex-V-positivas é menor em células DU145-PANDER quando comparadas ao controle, e a proteção maior também é observada em doses menores de TNF- α . Esta diminuição de morte celular mediada pelo PANDER atinge ~30% em células tratadas com 0,2 (38% vs 54% do controle) e 2 ng/ml. (58% vs 81% do controle) de TNF- α durante 24 horas (Fig. 6A). Por outro lado, não houve uma proteção exclusiva de apoptose na dose de 0,2 ng/ml (Fig. 4 B), sugerindo que outras formas de morte também estariam sendo inibidas pela ação da proteína PANDER em células DU145.

A análise por microscopia de fluorescência a 530 nm de comprimento de onda, evidenciou uma menor presença de células verdes (FITC-positivas) em células DU145-PANDER, confirmando que a proteína PANDER tem um efeito anti-apoptótico em células DU145 tratadas com TNF- α . (Fig. 4A)

Na morte celular induzida por TNF- α que foi a mais explorada – podemos observar que PANDER tem um efeito anti-apoptótico, principalmente, desde que a fragmentação nuclear e a externalização de fosfatidilserina, marcadores clássicos e mais bem descritos da apoptose, são significativamente inibidos em forma dose e tempo-dependente (Fig.5 e 6).

Figura 5 - Análise da fragmentação nuclear em células DU145-PANDER após tratamento com TNF- α . As células foram plaqueadas em concentração de 5×10^5 células/poço e tratadas com TNF- α nas concentrações 0,2 ng/ml, 2 ng/ml e 20 ng/ml. A proporção de núcleos sub-diplóides (fragmentados) em relação aos núcleos diplóides (em fase G0/G1) foi quantificada no citômetro a 488 nm de excitação e 530 nm de emissão. As diferenças estatísticas para cada ponto foram inferidas pelo *Teste t de Student* (* $p < 0,05$ ** $p < 0,001$)

Figura 6 - Avaliação das modificações na membrana plasmática. As células foram plaqueadas em concentração de 5×10^5 células/poço e tratadas com TNF- α nas concentrações 0,2 ng/ml, 2 ng/ml e 20 ng/ml. A proporção de células apoptóticas, positivas para anexina-V, comparada às células necróticas, positivas para anexina-V e PI, foi quantificada no citômetro a 488 nm de excitação e 530 nm de emissão. As diferenças estatísticas para cada ponto foram inferidas pelo *Teste t de Student* (* $p < 0,05$ ** $p < 0,001$)

Na figura 6 mostra-se a avaliação das modificações na membrana plasmática após tratarmos com TNF- α , nas concentrações de 0,2 ng/ml, 2 ng/ml e 20 ng/ml. Observa-se na letra (A) Dot plot representativos de cada um dos tratamentos com TNF- α . A porcentagem de células Anex-V-positivas é menor em células DU145-PANDER quando comparadas ao controle, e a proteção maior também é observada em doses menores de TNF- α , (B) Gráficos representativos da média de três experimento independentes realizados em triplicata. A diminuição de morte celular mediada pelo PANDER atinge ~30% em células tratadas com 0,2 (38% vs 54% do controle) e 2 ng/ml. (58% vs 81% do controle) de TNF- α durante 24 horas.

No entanto, os níveis de proteção medidos em ambos os ensaios (~30%) não são os mesmos aos obtidos com as proteínas rhPANDER e sPANDER. Isto poderia ser explicado por três hipóteses: 1) outros mecanismos de morte (i.e necrose) podem também ser inibidos por PANDER; 2) no modelo de superexpressão onde o efeito é autócrino, alguns elementos intra ou extracelulares, não observados no tratamento exógeno, podem estar influenciando 3) possíveis mudanças e/ou variações nas técnicas empregadas pode estar subestimando esta taxa de inibição. Contudo, a partir destes resultados, podemos afirmar que PANDER, de fato, atenua a morte celular induzida por TNF- α em células DU145 de tumor de próstata.

5.2 PANDER/FAM3B modifica expressão gênica de proteínas associadas a apoptose

Outra forma de demonstrar o envolvimento da proteína PANDER na morte celular foi a quantificação da expressão de genes pró e anti-apoptóticos da família Bcl-2 usando a técnica de qPCR e western blot. Células DU145-PANDER evidenciaram um significativo aumento na expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (7B) e Bcl- χ_L (7C) em 4,8 e 1,9 vezes respectivamente, assim como uma diminuição da expressão da proteína pro-apoptótica Bax (7D) ao nível de mRNA. Considerando que o balanço entre estes genes pró- e anti-apoptóticos influencia o direcionamento da célula para a morte programada ou a sobrevivência em condições de estresse⁵⁵, a razão da expressão dos genes entre si foi calculada. Assim, as razões da expressão dos genes Bcl-2/Bax e Bcl- χ_L /Bax foram 8,7 vezes maior e 5 vezes maior em células DU145-PANDER, respectivamente, quando comparadas ao controle (dados não mostrados). Os genes pró-apoptóticos PUMA e Bad, assim

como o gene antiapoptótico XIAP também foram testados, porém nenhuma diferença significativa de expressão entre ambos os grupos foi observada (dados não mostrados).

Estas observações foram confirmadas ao nível de proteína, pela técnica de western blot, verificando-se um aumento significativo de Bcl-2 (6,2 vezes), e Bcl-XL (4,5 vezes) em células DU145-PANDER, quando comparadas ao controle. A diminuição discreta de Bax também pode ser observada em células que superexpressam PANDER (Fig.7 E-F). Estes resultados demonstram que os efeitos anti-apoptóticos da proteína PANDER podem estar sendo mediados pela regulação da expressão de proteínas pro- e anti-apoptóticas da família da Bcl-2.

5.3 PANDER/FAM3B altera a atividade proteolítica das caspases

As caspases são enzimas-chave na progressão a morte celular programada. Varias enzimas importantes na manutenção da viabilidade celular são sistematicamente clivadas pelas caspases após a indução de apoptose.³⁵ Nós analisamos a ativação das caspases caspase-8 e -9, iniciadoras da cascata de sinalização pela via intrínseca e extrínseca, respectivamente, e medimos a atividade da caspase-3, principal executora da clivagem de numerosos substratos durante a morte celular programada⁵⁵. As caspases reconhecem tetrapeptídeos nas proteínas-alvo, com um aspartato na posição S1, amplamente conservado. Estas enzimas são ativadas pela formação de dímeros e tetrâmeros, compostos por unidades maiores e menores, resultantes da clivagem entre si. A nossa análise de atividade foi realizada através da medição fluorimétrica de clivagem de substratos sintéticos específicos e por meio da detecção das sub-unidades menores na imunodetecção por western blot.

Em condições de sobrevivência (Fig. 8B, 0 h), a atividade de caspase-3 é discreta mais significativamente menor em células DU145-PANDER quando comparadas com células controle. Após indução de morte celular com 10 ng/ml de TNF- α + cicloheximida, a atividade proteolítica aumenta em todas as culturas, de forma progressiva e crescente, porém continua sendo significativamente menor em células que expressam PANDER, em todos os tempos analisados (Fig. 8A-B). Por outro lado, em condições de sobrevivência, as atividades das caspases 8 e 9 não

são significativamente diferentes nas culturas de células DU145-PANDER, e uma diminuição da atividade proteolítica de maneira significativa só pode ser evidenciada após 48 h de tratamento com TNF- α (Fig. 8D-E, 0 h). Infelizmente, este resultado não pode ser confirmado para a caspase-8, devido a problemas técnicos no western blot. Já para as caspases 3 e 9 é possível observar um desaparecimento das bandas correspondentes as pró-formas (formas inativas) e as sub-unidades menores (formas clivadas e ativas) ao longo do tempo. No entanto, em todos os casos as bandas são menos intensas em células que superexpressam PANDER, o que sustenta a hipótese que esta proteína atenua a morte celular em células DU145.

5.4 PANDER/FAM3B estimula o crescimento tumoral em camundongos imunodeficientes

Ao longo de quase 60 dias de experimentação o crescimento tumoral foi observado e o volume do tumor foi avaliado em cada coleta. Observamos um maior crescimento dos tumores nos animais do grupo PANDER quando comparados ao grupo controle (Fig.9 C). O intervalo de medição do volume dos tumores foi semanal, e após a 7ª semana a diferença entre os grupos PANDER e controle foi estatisticamente significativa (0.8074 ± 0.1868 vs 0.2178 ± 0.05158 cm³, $p = 0,006$).

Na medição feita após a eutanásia, a diferença entre o volume dos tumores foi mais acentuada (2.116 ± 0.4054 vs 0.4794 ± 0.09950 cm³, $p = 0,0014$). A massa tumoral foi determinada usando balança de precisão e verificou-se a diferença significativa entre a massa dos tumores do grupo PANDER e o grupo controle (1.362 ± 0.3576 vs 0.3788 ± 0.07961 , $p = 0,013$) em concordância com os dados de volume tumoral observado ao longo dos experimentos (Fig. 10B). Quando estes valores foram normalizados considerando os pesos do grupo PANDER expressos em vezes do controle, as diferenças observadas entre os grupos foram mantidas (3.595 ± 0.9433 vs 1.086 ± 0.2067 , $p = 0,0112$) (Fig. 10C).

Estes dados revelam pela primeira vez a relação direta entre a expressão do PANDER/FAM3B e o crescimento tumoral em experimentos *in vivo*. Considerando os nossos dados *in vitro*³¹, este crescimento pode ser induzido pela inibição da morte celular programada, como resultado da superexpressão de proteínas anti-apoptóticas da família das Bcl-2^{31,32} e inibição da atividade das caspases.

Figura 7 - Expressão de genes pró e antiapoptóticos. O RNA de 10^6 células DU145-PANDER foi extraído e a síntese do cDNA foi feita pelo método da transcriptase reversa. A expressão gênica foi quantificada por PCR em tempo real (qPCR) para os genes (A) PANDER, (B) Bcl-2 (C) Bcl-XL e (D) Bax em comparação ao controle, usando o gene HPRT como normalizador. As proteínas totais de de 10^6 células DU145-PANDER foram separadas por SDS-PAGE e analisadas por western blot (E) usando anticorpos anti-PANDER, anti Bcl-2, anti-Bax, anti Bcl-XL e anti β-actina. Os níveis de expressão relatidade cada proteína foram quantificados por densitometria (F) em relação à expressão de β-actina. As diferenças estatísticas para cada ponto foram inferidas pelo Teste t de Student (* $p < 0,05$ ** $p < 0,001$)

Figura 8 - Atividade proteolítica das caspases. Células DU145-PANDER foram tratadas com 10ng/ml de TNF- α + cicloheximida durante cada um dos tempos indicados. A atividade proteolítica da caspase-3 (A-B), caspase-9 (C-D) e caspase-8 (E) foi medida por western blot (painel direito) e por ensaios flourimétricos usando substratos sintéticos (painel esquerdo). Neste último, foram expressos como média $\pm$ erro padrão e as diferenças foram inferidas pelo teste *Two way ANOVA* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$)

5.5 PANDER/FAM3B induz mudanças morfológicas nos tumores em animais imunodeficientes

A análise histopatológica pela técnica de (HE) não revelou grandes diferenças morfológicas entre os tumores induzidos por células DU145-PANDER e células DU-145-controle (Fig. 11). As características morfológicas das células que compõem a massa tumoral são muito similares às observadas pelas células DU-145 em cultura. No entanto, tumores DU145PANDER têm, aparentemente, uma maior quantidade de vasos sanguíneos, como apontado com setas na Fig, 11 (painel superior), característica relevante para sugerir uma possível associação com mudanças funcionais que levem a estas células de tumor de próstata a induzir angiogênese (formação de novos vasos), e, portanto, serem mais metastáticas. A indução de metástase pela expressão de PANDER/FAM3B já foi observada em células de tumor de colon.³⁴ Nossos resultados apontam para uma função similar desta citocina em tumores de próstata e precisam ser explorados posteriormente.

Na análise da expressão genica por imunoistoquímica, usamos anticorpos para detectar 4 proteínas diferentes, porém obtivemos resultados satisfatórios apenas para a proteína PANDER. Apesar da marcação pouco expressiva (Fig. 9), podemos observar uma quantidade maior de células PANDER-positivas nos tumores que cresceram nos animais inoculados com células DU145-PANDER que superexpressam a proteína PANDER (Fig. 12, painel superior), confirmando os dados de expressão genica obtidos previamente nas células em cultura, usando PCR em tempo real e imunodeteção por Western blot. No entanto, nas células DU145-controle também foi possível observar algumas células marcadas positivamente, confirmando que existe uma expressão endógena desta citocina nesta linhagem de células tumorais de próstata (Fig.12, painel médio). Considerando os resultados negativos, a detecção das outras moléculas relacionadas a morte celular (caspase-3, Bax e Bcl-2) pode ser continuada usando os mesmos anticorpos por técnicas de imunofluorescência.

A **B**

Figura 9 - Análise do crescimento tumoral de células DU145-PANDER em camundongos imunodeficientes. (A) Foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb/c nude imunodeficientes, com 6-8 semanas de idade, mantidos a temperatura de 23 °C, umidade de 50% e ciclo claro/escuro de 12/12 horas. (B) 1×10^6 células DU145-PANDER foram misturadas com Matrigel® e inoculadas na região dorsal de camundongos imunodeficientes (n=5) e células DU145 transfectadas com o vetor vazio foram usadas no grupo controle (n=6). (C) O crescimento tumoral foi avaliado durante 60 dias e o volume do tumor foi inferido em cada coleta. As diferenças estatísticas para cada ponto foram inferidas pelo *Teste t de Student* (* $p < 0,05$ ** $p < 0,001$).

Figura 10 - Análise comparativa dos tumores após eutanásia dos animais. (A) Fotografias representativas dos animais antes de ser sacrificados usando a técnica de deslocamento cervical. (B) Todos os tumores foram coletados e a determinação da massa tumoral dos animais foi feita após pesagem em balança de precisão. (C) A massa tumoral relativa foi inferida considerando os pesos do grupo PANDER expressos em vezes do controle. As diferenças estatísticas para cada ponto foram inferidas pelo *Teste t de Student* (* $p < 0,05$ ** $p < 0,005$)

Figura 11 - Análise histopatológica de tumores DU145-PANDER em camundongos imunodeficientes. Imagens representativas de cortes histológicos de tumores dissecados de camundongos imunodeficientes inoculados com células tumorais DU145-PANDER e DU145-controle após coloração com hematoxilina-eosina (HE). A presença de regiões correspondentes a vasos sanguíneos é destacada por setas (Escala: 50 mm a direita e 10 mm a esquerda)

Figura 12 - Análise por imunohistoquímica de tumores DU145-PANDER em camundongos imunodeficientes. Imagens representativas de cortes histológicos de tumores dissecados de camundongos imunoincompetentes inoculados com células tumorais DU145-PANDER e DU145-controle após ensaios de imunodeteção usando o anticorpo anti;PANDER (1:100). A revelação foi feita pela reação com DAB e a coloração de fundo foi obtida com adição de Cresil. Células não incubadas com o anticorpo primário foram usadas como controle negativo. As imagens foram capturadas a um aumento de 100X (esq) e 400X (dir) usando um microscópio invertido.

5.6 A expressão de PANDER/FAM3B se correlaciona positivamente com o tamanho dos tumores

A análise de expressão genica usando PCR em tempo real mostrou um aumento significativo (~ 9 vezes) da expressão do gene PANDER (Fig. 13A) nas células DU145-PANDER quando comparadas com as células controle (9.092 ± 3.5 vs 30.8920 ± 0.2164 , $p = 0,0325$). Da mesma forma observamos um aumento de ~ 5 vezes na expressão de Bcl-2 (Fig. 13B) nas células DU145-PANDER quando comparadas com as células controle (7.980 ± 2.351 vs 1.670 ± 1.160 , $p = 0,0369$). Estes resultados são concordantes com os dados das análises de expressão genica feitas com as células em cultura, porem em menor intensidade.

Com o intuito de estabelecer uma possível relação entre os dados de expressão genica e o tamanho dos tumores, aplicamos o teste de correlação de Pearson. Interessantemente observamos uma correlação positiva forte muito significativa entre a massa dos tumores e a expressão genica de PANDER ($r = 0,9187$, $p = 0.0037$). (Fig. 13C). No entanto, estes resultados precisam ser confirmados ao nível de proteína, tanto nos tumores como no sangue dos animais. Não foi observada a mesma relação quando comparado a massa dos tumores e a expressão de Bcl-2.

Figura 13 - Análise de expressão genica por PCR quantitativo de tumores DU145-PANDER em camundongos imunodeficientes. A expressão dos genes PANDER e Bcl-2 no nível de RNAm foi analisada em tumores dissecados de camundongos inoculados com células tumorais DU145-PANDER. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão. As diferenças estatísticas para cada ponto foram inferidas pelo Teste t de Student (** $p < 0,05$ *** $p < 0,0005$) (C) Os dados de expressão gênica de PANDER foram relacionados com a massa dos tumores usando o teste de correlação de Pearson. (* $p < 0,05$)

6 DISCUSSÃO

A descoberta da existência de uma estrutura secundária altamente conservada entre as citocinas e usando o algoritmo computacional denominado ORF (*Ostensible recognition of folds*), por homologia de estrutura secundária de proteínas, foi identificada uma nova família de potenciais citocinas denominada FAM3.³ Quatro membros foram descritos: FAM3A, FAM3B, FAM3C e FAM3D. Nosso estudo interessou-se pelo papel de FAM3B (*Pancreatic derived factor*, PANDER), um dos membros desta família, que foi inicialmente encontrado em células pancreáticas⁴ e associado à morte de células pancreáticas^{27,30}, ao controle da glicemia e os efeitos metabólicos da insulina.^{32,38} Posteriormente, estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram seu envolvimento no metabolismo e regulação da glucose^{33,34,35} e lipogênese hepática.^{37,39,40} Estudos *in vivo* de Moak SL. et al., (2014), buscaram elucidar seu papel na patogênese do DM2, e confirmar se ele é responsável pelo disparo inicial da doença ou está envolvido na progressão da mesma. PANDER tem sido analisado no contexto da sensibilidade a glucose no pâncreas e consequentemente na homeostasia da glucose. Diferentes pesquisas acontecem simultaneamente para descobrir a função da proteína PANDER no contexto do DM2, e se confirmado poderá ser um alvo terapêutico para o melhor controle da patologia. O que representaria um avanço no manejo da doença, visto que segundo a Federação Internacional do Diabetes a patologia afeta atualmente 400 milhões de pessoas no mundo e o Ministério da Saúde no Brasil, afirma que temos no país 14 milhões de portadores de DM com 500 casos novos a cada dia.^{61,62} Membros da família FAM3 compartilham de homologia em sua estrutura entre 31,6 – 53,3%. Entre humanos e ratos, FAM3B, ambos apresentam em sua estrutura 235 aminoácidos, com similaridade de 78% com 4 cisteínas conservadas, o que nos sugere ser um bom modelo de estudo *in vivo* para descobrirmos a função da proteína PANDER no contextos das patologias que afetam os homens.²⁶

Como confirmado no Banco de Dados de Proteínas Humanas, FAM3B é expresso em tecidos normais e em carcinomas, e seu amplo padrão de expressão pode exercer função conservativa em diferentes tecidos.^{56,60} Estudo realizado pelo grupo de Mou H. et al., (2012) na Academia de Ciências Chinesa, confirmaram a expressão de PANDER em diferentes tecidos, quando o grupo avaliou primeiro a

expressão de PANDER/FAM3B em células de camundongos (cólon, intestino, pulmão, fígado e linhagem celular, além de câncer de colon humano e carcinoma hepatocelular).⁵⁶

O nosso trabalho visa identificar o papel desta proteína, pela primeira vez, no processo de crescimento e invasividade no câncer de próstata. Estudos mostraram em laboratório, a expressão de PANDER/FAM3B em amostras de RNAm de pacientes com carcinoma de próstata e linhagens tumorais como PC-3, DU145 e LnCAP, (dados não mostrados), sugerindo o seu envolvimento na progressão tumoral. Para explorar esta hipótese, usamos o modelo de superexpressão de PANDER/FAM3B em células da linhagem DU145, realizando vários ensaios *in vitro*. Os resultados obtidos com estes ensaios apontaram que a superexpressão de PANDER favorece a sua sobrevivência das células tumorais por mecanismos que ativam a inibição da morte celular induzida por vários fatores. Baseados nos presentes dados, podemos distinguir duas diferentes vias para a apoptose, a primeira via extrínseca é determinada por (Fas ligante, TNF ou TRAIL) com os receptores de morte (Fas, TNF receptor ou DR4/DR5), que leva ao recrutamento de caspase-8 que auto se ativa e uma vez ativada, desencadeia a ativação de caspase 3 e 7, e culmina na morte celular, ou na clivagem de BID induzindo Bax/Bak em sua ativação que ativam a via intrínseca da apoptose, como a proteína BH-3, que tal como BID, PUMA e NOXA, ativam Bax(Bcl-2 associado a X)e/ou Bak (antagonista de Bcl-2), que permeabiliza a mitocôndria e inicia o lançamento extra núcleo de Citocromo c que permite a ação de Apaf-1 e a formação de apoptossomo que recrutam e ativam caspase-9 via e consequentemente ativam caspase-3 e caspase-7 por via intrínseca levando a morte celular.⁵⁶

Nossos experimentos mostram que há inibição da morte celular mediada por TNF- α , sendo dose e tempo-dependente, envolvendo o aumento da expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-X_L e Bcl-2 e inibição das caspases -3, -8 e -9 (Fig 4 - 8). Dados que sugerem o efeito protetor de PANDER/FAM3B ao diminuir a transcrição de genes atuantes na apoptose. Estes dados são confirmados pelo trabalho realizado por Mou H. et al., (2013), quando os pesquisadores avaliaram a expressão em diferentes tecidos e fizeram o RNA de interferência de PANDER/FAM3B. Ao observarem o aumento da expressão de Bcl-2 e da expressão de caspase-8. Dados confirmados por citometria de fluxo e western blot que ao

silenciar FAM3B, há aumento da expressão de genes pró-apoptóticos (Caspase 3, caspase 9, Bcl-2 e PARP clivados. Contudo, nossos experimentos mostram que ao utilizarmos o gene superexpresso há uma discreta diminuição da atividade de caspase 3, 8 e 9 como mostrado na figura 8. Este dados nos sugere a confirmação de que quando silencia o gene ele atuam de maneira positiva para a apoptose por via extrínseca e ao superexpressarmos, os dados demonstram na linhagem DU-145 uma diminuição discreta da atividade apoptótica por esta via. A pesquisa de Mou H. et al., (2012), corroboram com estudo realizados pelo grupo até o momento, onde a superexpressão do gene favorece a transcrição de genes anti-apoptóticos que estão envolvidos na perda do controle celular, características de neoplasias malignas.

Considerando os nossos dados *in vitro*, podemos supor que este aumento da massa tumoral seja consequência de uma inibição da morte celular mediada pelo PANDER, mas do que um aumento da proliferação celular, desde que nossos dados usando ensaios de marcação por Brdu não indicaram um aumento da síntese de ácidos nucleicos em células DU145-PANDER quando comparadas ao controle. Esta hipótese se sustenta em estudos recentemente publicados os quais apontam que uma diminuição da expressão de PANDER/FAM3B aumenta a ocorrência de morte celular programada em células de carcinoma de cólon, mediada pela ativação da via da proteína p53, inibição da expressão de Bcl-2 e ativação da via proteolítica das caspases.⁵⁶

Apesar de termos questionado a ativação da via intrínseca, a inibição da ativação de caspase-9 poderia ser explicada pela ativação indireta da via intrínseca via da proteína pro-apoptótica Bid, que é clivada por caspase-8 durante a morte celular induzida por via extrínseca.⁵⁵ No entanto, a participação caspase-8 (caspase iniciadora) não foi claramente observada, sugerindo que a inibição da atividade de caspase-3 poderia usar vias alternativas que não envolvem a via extrínseca clássica de indução de apoptose. Contudo, para confirmarmos esta hipótese precisamos explorar a ativação da proteína Bid no contexto da indução de morte celular induzida por TNF- α e superexpressão de PANDER em células de tumor de próstata.

A clivagem da proteína Bid por caspase-8 leva a sua migração a mitocôndria, aonde ativa a proteína Bax e dispara a via intrínseca da apoptose. Esta via também pode ser ativada diretamente pela proteína p53, mediante bloqueio do ciclo celular. Os nossos experimentos mostraram que, apesar do PANDER/FAM3B ser uma

proteína secretada, pode inibir a via intrínseca por mecanismos que provavelmente passem pela inibição de caspase-8, que foi demonstrada, ou ativação da p53 que ainda não foi explorada. Em cultura de células DU145, a superexpressão de PANDER leva a uma diminuição da expressão de Bax e aumento de Bcl-2 e Bcl-XL, ao nível de mRNA e proteína. Como observado na Fig. 7, a relação na proporção entre Bcl-2/Bax foi calculada como sendo 8,7 vezes maior em células DU145-PANDER e a razão Bcl-XL/Bax foi 1,5 vezes maior, quando comparadas ao controle.

Ensaio de inibição específica usando peptídeos inibitórios ou RNA de interferência poderão, sem dúvida, acrescentar elementos que definam o grau de importância que tem estas proteínas nos mecanismos de proteção celular ativados por PANDER. De fato, há aumento da expressão ao nível de mRNA de Bcl-2 e o aumento da relação Bcl-2/Bax, e em menor grau a relação de Bcl-XL /Bax, em células DU145 que superexpressam PANDER.

A regulação negativa dos mecanismos de morte celular adiciona mais elementos em favor da nossa hipótese que o PANDER participa positivamente no desenvolvimento e/ou progressão tumoral, criando mecanismos de proteção a morte e favorecendo a sobrevivência celular, contrariamente ao papel que citocina cumpre em células- β pancreáticas. Contudo, nossos dados verificam que PANDER tem um efeito antiapoptótico, de forma coerente com o achado de Mou H. et al., (2012), que verificou estes efeitos em células tumorais de várias origens, o qual é mediado pela ativação da via intrínseca da apoptose com participação de Bax, Bcl-2 e Bcl-XL. Porém, algumas limitações principalmente em relação à diversidade (apenas uma linhagem celular) e à complexidade (uso de apenas modelos celulares e *in vitro*) dos modelos biológicos utilizados, não permitiria fazer generalizações sobre os efeitos e o papel do PANDER no desenvolvimento e progressão do câncer de próstata. Por isso, os estudos *in vivo* foram fundamentais para testar esta hipótese.⁵⁶ Assim, estes efeitos precisam ser dimensionados nos tumores desenvolvidos nos animais, para confirmar que o aumento de massa tumoral se deve, de fato, a ativação da via anti-apoptótica intrínseca mediada pela família das Bcl-2.

No entanto, FAM3B é capaz de induzir apoptose em células pancreáticas e células de neuroblastoma^{30,6,7} Burkhardt. et al., (2006) refere que FAM3B induz a baixa transcrição de ciclina dependente de quinase (CDKN1A) com ativação de

caspase-3 e sugere os mecanismos moleculares precisam ser confirmados através de estudos como realizados pelo nosso grupo.³³

Ao verificarmos as alterações morfológicas através da análise de HE não foi observada grande diferenças morfológicas, porém, pode-se observar um aumento do número de vasos sanguíneos, o que sugere um aumento da angiogênese em células DU145-PANDER (Fig.11). Sabemos que a angiogênese (crescimento de novos vasos) é importante para a ocorrência de metástase. Assim, os novos vasos auxiliam na distribuição de oxigênio e nutrientes que favorecem o crescimento tumoral, tais como a desregulação do metabolismo do meio e sua disseminação/metástase e na remoção de produtos residuais.^{68,69} Apesar de que, no presente estudo, avaliarmos a expressão de genes que conferem resistência a morte celular, o aumento de vasos sanguíneos permite sugerir que a superexpressão de PANDER em células inoculadas no camundongos C57 poderia estar ligado ao aumento do potencial metastático e de agressividade dos tumores.

Esta característica morfológica sugere que o PANDER contribua para a progressão tumoral, não apenas mediante o aumento da massa tumoral por inibição da apoptose, mas também mediante a promoção da angiogênese e metástase. Esta hipótese se sustenta num estudo recente onde foi reportado que células de câncer de colorretal que superexpressavam uma forma não secretada de PANDER (denominada FAM3B-258), aumentaram o potencial de migração e invasividade *in vitro* e *in vivo*. Um mecanismo sugerido para este efeito pro-metastático do PANDER envolve uma diminuição das moléculas de adesão *E-caderina* e *JAM* mediada pela ativação do fator de crescimento *Slug*.⁵⁷ A perda da expressão de *E-caderina*, tais como *Snail1* e *Slug*, e outros fatores como *ZEB-1*, *SIP-1*, *E12/E47* sugerem desempenhar papel importante na promoção do desenvolvimento tumoral. Assim como *TGF* parece ter participação na iniciação da metástase.⁵⁹ Nos próximos passos do trabalho, estas moléculas podem ser alvo de estudo no nosso modelo de câncer de próstata.

Apesar de existirem algumas controvérsias, os trabalhos de caracterização da nova citocina PANDER/FAM3B no contexto do câncer, realizados por nosso grupo (cujo artigo encontra-se em processo de submissão) e outros grupos, apontam que se trata de uma molécula importante na progressão tumoral, cujos mecanismos de ação, no entanto, precisam ser mais bem explicados. Inicialmente, estes efeitos

parecem ser bastante diferentes aos relatados em células- β pancreáticas, fígado e tecido adiposo, porém, não podem ser descartadas possíveis relações e conexões, inclusive de causa-efeito.

Assim, nosso trabalho permite concluir até o momento que um novo biomarcador para o diagnóstico e acompanhamento de neoplasia prostática está em fase de confirmação. E permitirá uma eficácia no acompanhamento da saúde do homem, assim como o diagnóstico precoce sem expor o paciente a procedimentos invasivos sem necessidade.

Em síntese, o nosso trabalho permite concluir que: 1), a superexpressão de PANDER/FAM3B em células DU145 induz o aumento da massa tumoral *in vivo*, em concordância com os nossos resultados obtidos *in vitro*; e 2) algumas mudanças morfológicas podem ser observadas nas células que superexpressam PANDER, associadas a um aumento do número de vasos sanguíneos, sugerindo possíveis associações da expressão desta proteína com a indução de angiogênese e metástase em células tumorais de próstata.

REFERÊNCIAS

1. Sudhakar A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. Cancer Sci Ther. 2009 Dec 1;1(2):1-4.
2. Teixeira LA. De Doença desconhecida a problema de saúde pública: o INCA e o controle do Câncer no Brasil - Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2007. 172 p.
3. Mukherjee S. O Imperador de Todos os Males: Uma Biografia do Câncer. São Paulo: Companhia das Letras; 2012. 640 págs.
4. The History of Cancer/ American Cancer Society – 2014 [Internet]. June [cited 2015 June 08] ; Disponível em: [Internet]. 1999 June [cited 2015 June 08];43(3):177-185. Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002048-pdf.pdf>
5. Carvalho-Salles AB. Tajara EH. Fatores hormonais e genéticos na próstata normal e neoplásica. Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia [Internet]. 1999 June [cited 2015 July 12] ; 43(3): 177-185. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27301999000300003&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27301999000300003>
6. Siegel RP. et al. Cancer Treatment and survivorship statistics. Cancer Journal Clinical. 2012;62(4):220-41.
7. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa de câncer de próstata no Brasil (internet). Julho 2014 (citado 08 Junho 2015). Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultadoscomentarios.asp>

8. Friestino, JKO. Mortalidade por câncer de próstata no Brasil: Contexto Histórico e Perspectiva. *Revista Baiana de Saúde Pública*. 2013; 37(3): 688-701.
9. Ministério da Saúde. Política nacional de atenção integral à Saúde do Homem. Coordenação Nacional de Saúde do Homem. Portaria GM/MS nº1944, de 27 de agosto de 2009.
10. Johansson JE, Andren O, Andersson SO, et al. Natural History of Early, localized prostate cancer. *Journal American Medical Association*. 2004;291(22):27130-9.
11. Leite KRM, Moraes DR, Reis ST, et al. MicroRNA 100: a context dependent miRNA in prostate cancer. *Clinics*. 2013;68(6):797-802.
12. Silveira L. Câncer Ginecológico: Diagnóstico e Tratamento. Florianópolis: Editora UFSC, 2005. 369 p.
13. Almeida JRC. Farmacêuticos em oncologia: Uma nova realidade. São Paulo: Atheneu. 2004; p. 61-72.
14. Tumor Markers. Cancer Treatment Centers of America. (internet). Acessado em 06 de Junho 2015. Disponível em: <http://www.cancercenter.com/treatments/tumor-markers/>.
15. Tomasich, FDS, Augusto VC, De Almeida LM, Dias LAN, Kato M. Correlação entre os marcadores tumorais CEA e CA 72-4 e a profundidade de invasão no câncer gástrico. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2002;48(1):57-62.
16. Almeida JRC. Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007; 53(3): 305-16.

17. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Investigative urology*. 1979;17(2), 159-63.
18. Nickel JC. Inflammation and benign prostatic hyperplasia. *Urologic Clinics of North America*. 2008;35(1):109-15.
19. Castro HASD, Iared W, Shigueoka DC, Mourão JE, Ajzen S. Contribuição da densidade do PSA para predizer o câncer da próstata em pacientes com valores de PSA entre 2, 6 e 10, 0 ng/ml. *Radiologia Brasileira*. 2011;44:205-9.
20. Kumar S, McDonnell PC, Lehr R, Tierney L, Tzimas M N, Griswold DE, Young PR. Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(14) 10308-14.
21. Blumberg H, Conklin D, Xu W, Grossmann A, Brender T, Carollo S, Chandrasekher YA. Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell*. 2001;104(1):9-19.
22. Akira, SHIZUO, et al. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *The FASEB journal* 4.11.1990; 2860-7.
23. Culig Z, Steiner H, Bartsch G, Hobisch A. Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. *Journal of cellular biochemistry*. 2005;95(3)497-505.
24. Baron VT, et al. Early Growth Response 3 regulates genes of inflammation and directly activates IL6 and IL8 expression in prostate cancer. *British Journal of Cancer*. 2015.
25. Aurora R, Rose GD. Seeking an ancient enzyme in *Methanococcus jannaschii* using ORF, a program based on predicted secondary structure comparisons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(6), 2818-23.

26. Zhu Y, et al. Cloning, expression, and initial characterization of a novel cytokine-like gene family. 2002;Genomics 80.2: 144-1
27. Yang J, Gao Z, Robert CE, Burkhardt BR, Gaweska H, Wagner A, Wolf BA. Structure-function studies of PANDER, an islet specific cytokine inducing cell death of insulin-secreting β cells. Biochemistry. 2005;44(34),11342-52.
28. Padgett LE, Broniowska KA, Hansen PA, Corbett JA, Tse HM. The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. Annals of the New York Academy of Sciences.2013;1281(1):16-35.
29. Wang G, Guan Y, Yang J. Cytokines in the progression of pancreatic β -cell dysfunction. International journal of endocrinology. 2010.
30. Cao X, Gao Z, Robert CE, Greene S, Xu G, Xu W, Wolf BA. Pancreatic-derived factor (FAM3B), a novel islet cytokine, induces apoptosis of insulin-secreting β -cells. Diabetes. 2003;52(9), 2296-303.
31. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death—the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. Diabetologia. 2001;44(12):2115-33.
32. Yang J, Robert CE, Burkhardt BR, Young R A, Wu J, Gao Z, Wolf BA. Mechanisms of glucose-induced secretion of pancreatic-derived factor (PANDER or FAM3B) in pancreatic β -cells. Diabetes.2005; 54(11):3217-28.
33. Burkhardt BR, Greene SR, White P, Wong RK, Brestelli JE, Yang J, Wolf BA.PANDER-induced cell-death genetic networks in islets reveal central role for caspase-3 and cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21). 2006;Gene, 369, 134-41.

34. Robert-Cooperman CE, Carnegie JR, Wilson CG, Yang J, Cook JR, Wu J, Burkhardt BR. Targeted disruption of pancreatic-derived factor (PANDER, FAM3B) impairs pancreatic β -cell function. 2010;Diabetes, 59(9), 2209-18.
35. Burkhardt BR, Cook JR, Young RA, Wolf BA. PDX-1 interaction and regulation of the Pancreatic Derived Factor (PANDER, FAM3B) promoter. Biochimical et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms. 2008;(10):645-51.
36. Carnegie JR, Robert-Cooperman CE, Wu J, Young RA, Wolf BA, Burkhardt BR. Characterization of the expression, localization, and secretion of PANDER in α -cells. Molecular and cellular endocrinology. 2010;325(1): 36-45.
37. Yang J, Wang C, Li J, Burkhardt BR, Robert-Cooperman CE, Wilson C, Wolf BA. PANDER binds to the liver cell membrane and inhibits insulin signaling in HepG2 cells. FEBS letters. 2009;583(18), 3009-15.
38. Moak SL, Dougan GC, MarElia CB, Danse WA, Fernandez AM, Kuehl MN, Burkhardt BR. Enhanced glucose tolerance in pancreatic-derived factor (PANDER) knockout C57BL/6 mice. Disease models & mechanisms. 2014;7(11):1307-15.
39. Li J, Chi Y, Wang C, Wu J, Yang H, Zhang D, Guan Y. Pancreatic-derived factor promotes lipogenesis in the mouse liver: Role of the Forkhead box 1 signaling pathway. Hepatology. 2011;53(6), 1906-16.
40. Wilson CG, Schupp M, Burkhardt BR, Wu J, Young RA, Wolf BA. Liver-specific overexpression of pancreatic-derived factor (PANDER) induces fasting hyperglycemia in mice. Endocrinology. 2010;151(11):5174-84.
41. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. Arthritis Res. 2002;4(Suppl 3): S233-S42.

42. Culig Z, Steiner H, Bartsch G, Hobisch A. Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. *Journal of cellular biochemistry*. 2005;95(3):497-505.
43. Chiu JJ, Sgagias MK, Cowan KH. Interleukin 6 acts as a paracrine growth factor in human mammary carcinoma cell lines. *Clinical cancer research*. 1996;2(1): 215-21.
44. Leu CM, Wong FH, Chang C, Huang SF, Hu CP. Interleukin-6 acts as an antiapoptotic factor in human esophageal carcinoma cells through the activation of both STAT3 and mitogen-activated protein kinase pathways. *Oncogene*. 2003;22(49):7809-18.
45. Brocke-Heidrich K, Kretzschmar AK, Pfeifer G, Henze C, Löffler D, Koczan D, Horn F. Interleukin-6–dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family–independent survival pathway closely associated with Stat3 activation. *Blood*. 2004;103(1): 242-51.
46. Arihiro K, Oda H, Kaneko M, Inai K. Cytokines facilitate chemotactic motility of breast carcinoma cells. *Breast Cancer*. 2007;(3): 221-30.
47. Verhasselt B, Van DJ, Van LN, Put W, Bracke M, De Potter C, Mareel MARCUS. Interleukin-1 is a motility factor for human breast carcinoma cells in vitro: additive effect with interleukin-6. *European journal of cell biology*. 1992;59(2):449-57.
48. Ásgeirsson KS, Ólafsdóttir K, Jónasson JG, Ögmundsdóttir HM. The effects of IL-6 on cell adhesion and e-cadherin expression in breast cancer. *Cytokine*. 1998;10(9):720-8.
49. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*. 1995;86(4):1243-54.

50. Kurzrock R. Cytokine deregulation in cancer. *Biomed Pharmacother.* 2001;55(9-10):543-7.
51. Waerner T, Alacakaptan M, Tamir I, Oberauer R, Gal A, Brabletz T, Beug H. ILEI: a cytokine essential for EMT, tumor formation, and late events in metastasis in epithelial cells. *Cancer cell.* 2006;10(3): 227-39.
52. Lahsnig C, Mikula M, Petz M, Zulehner G, Schneller D, Van ZF, Mikulits W. ILEI requires oncogenic Ras for the epithelial to mesenchymal transition of hepatocytes and liver carcinoma progression. *Oncogene.* 2009;28(5): 638-50.
53. Kiaris H, Chatzistamo I, Trimis G, Frangou-Plemmenou M, Pafiti-Kondi A, Kalofoutis A. Evidence for nonautonomous effect of p53 tumor suppressor in carcinogenesis. *Cancer research.* 2005;65(5):1627-30.
54. Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society Transactions.* 2001;29(6): 684-7.
55. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry.* 1999;68(1),383-424.
56. Mou H, Li Z, Yao P, Zhuo S, Luan W, Deng B, Le Y. Knockdown of FAM3B triggers cell apoptosis through p53-dependent pathway. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2013;45(3), 684-91.
57. Li Z, Mou H, Wang T, Xue J, Deng B, Qian L, Le Y. A non-secretory form of FAM3B promotes invasion and metastasis of human colon cancer cells by upregulating Slug expression. *Cancer Letters.* 2013;328(2):278-84.

58. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *The American Journal of Pathology*. 1993;143(2):401.
59. Medici D, Hay ED, Olsen BR. Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through β -catenin–T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor- β 3. *Molecular biology of the cell*. 2008;19(11):4875-87.
60. The Human Protein Atlas. FAM3B. [Internet]. 2015 Jun. Disponível em :<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000183844FAM3B/cancer>
61. Chondrogiannis G, Kastamoulas M, Kanavaros P, Vartholomatos G, Bai M, Baltogiannis D, Galani V. Cytokine effects on cell viability and death of prostate carcinoma cells. *BioMed Research International*. 2014.