

**IZABELA DANIEL SARDINHA CALDEIRA**

**Papel da nova citocina FAM3B/PANDER na  
progressão tumoral em câncer de mama**

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  
2016

**IZABELA DANIEL SARDINHA CALDEIRA**

**Papel da nova citocina FAM3B/PANDER na  
progressão tumoral em câncer de mama**

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.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Ernesto Belizário

Coorientador: Prof. Dr. Humberto Miguel Garay Malpartida

Versão Corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível na Biblioteca digital de Dissertações e Teses da USP (BDTD).

São Paulo  
2016

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

© reprodução total

Caldeira, Izabela Daniel Sardinha.

Papel da nova citocina FAM3B/PANDER na progressão tumoral em câncer de mama. / Izabela Daniel Sardinha Caldeira. -- São Paulo, 2016.

Orientador: José Ernesto Belizário.

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 FAM3B/PANDER in breast tumor progression.

1. FAM3B/PANDER 2. Neoplasias mamárias 3. Citocina 4. 5. 6.  
I. Belizário, José Ernesto II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
III. Título.

ICB/SBIB092/2016





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](mailto:cep@icb.usp.br)

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **13** nas fls. **15** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Jose Ernesto Belizário**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Avaliação da Atividade Apoptótica da Nova Citocina PANDER-FAM3B em Linhagens Tumerais de Mama*" do qual participam o(s) aluno(s) **Izabela Daniel Sardinha Caldeira** e o pesquisador **Humberto Miguel Garay Malpartida**, 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 **27.03.2014, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 27 de março de 2014.

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

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

Aos meus pais, Eliete e Luiz Roberto e a minha irmã Carla por  
todo amor e apoio incondicional.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por todas as oportunidades e a força necessária para alcançar meus objetivos. Agradeço, por ter me colocado em uma família maravilhosa com amigos e colegas incríveis para me apoiar nos momentos difíceis e compartilhar os momentos felizes.

Agradeço imensamente à minha família, que possibilitou toda essa jornada. A minha mãe Eliete, meu pai Luiz Roberto e minha irmã Carla, que são a razão do meu viver. Aqui o meu sentimento de gratidão, não poderia ser expresso apenas com palavras.

A minha vó Maria e a minha vó e amiga Conceição Luiza, que sempre me incentivou a estudar e que tinha o sonho que eu me tornasse professora. Ao meu avô Manuel, que acompanhou o começo e, quase, o fim deste longo e breve caminho e que foi um grande avô e amigo.

Gostaria de agradecer, especialmente, ao Ricardo por ter me incentivado, inspirado e possibilitado que eu chegasse até aqui, sempre ressaltando e valorizando minhas qualidades, com um olhar muito generoso, amoroso e otimista.

Enorme gratidão, as minhas amigas e companheiras de casa Aline, Bianca, Helena, Talita, Gabriela, Sophia e Lilian. Agradeço a Marília, minha colega de quarto, ouvinte e amiga com quem eu pude compartilhar todo este caminho. Eu não poderia ter construído uma família melhor, meninas.

Ao meu amigo Raphael, por toda amizade, companheirismo e por ter começado esse trabalho comigo.

As minhas amigas e colegas de laboratório Paula e Beatriz Sangiuliano que vivenciaram de perto este percurso. Agradeço também, a Beatriz Viana pelas horas e paciência com o escaneamento das lâminas, assim como Jennifer e Dayble que me ajudaram sempre que necessário.

Obrigada aos meus amigos, queridos, do laboratório da EACH Carla, Gabriel, Jennifer, Beatriz, Fábio, Patrícia, Nathália, Letícia e Raíssa pela ajuda, pelas risadas e todos os momentos felizes. Agradeço imensamente, a todo laboratório da EACH, um ambiente acolhedor, que propõe a reflexão sobre o trabalho, ciência e a amizade de uma forma inovadora. É impossível não se sentir abençoada em um lugar como esse ao lado de pessoas tão especiais.

Agradeço a professora Ana Karenina, pelo suporte dado desde a minha iniciação científica, pelos momentos de reflexão, por todo ensinamento e risadas, também.

Da mesma forma agradeço a professora Viviane, por ter me auxiliado e viabilizado este trabalho desde que entrei no laboratório. Obrigada, por ter compartilhado o seu saber comigo e por estar sempre disposta a ajudar, da forma mais impecável possível. Sou extremamente grata pelo apoio e pelos momentos felizes.

Obrigada a Flávia, pela amizade e por dispende seu tempo nos ajudando e colaborando, sempre que necessário.

A Clarissa Ribeiro Reily Rocha por nos ceder, gentilmente, o vetor lentiviral com a luciferase. Agradeço também, ao Gustavo Satoru, por toda ajuda com o *IVIS*.

Agradeço ao meu orientador, professor Belizário, pelo suporte e pela oportunidade de começar e concluir este trabalho da melhor forma possível.

Finalmente, agradeço infinitamente, ao meu amigo e orientador Miguel, que acompanhou minha evolução, compartilhou as minhas conquistas e me levantou quando foi necessário. Parte de meu amadurecimento como cientista, minha formação e construção deste trabalho seria impossível sem essa relação de amizade, profissionalismo e respeito.



*"Life is pleasant. Death is peaceful. It's the transition that's troublesome."*

*Isaac Asimov*

## RESUMO

CALDEIRA, I. D. S. **Papel da nova citocina FAM3B/PANDER na progressão tumoral em câncer de mama.** 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

FAM3B/PANDER é uma nova proteína tipo citocina pertencente a família *FAM3*. Foram reveladas algumas similaridades estruturais entre o *FAM3B* e citocinas associadas ao câncer, como IL-6 e *FAM3C* indicando que *FAM3B* poderia estar envolvido na progressão tumoral. Considerando que o *FAM3B* é expresso por tumores de mama, este trabalho dedicou-se a elucidar suas possíveis funções, a partir de um modelo de superexpressão na linhagem celular tumoral da mama, MDA-MB-231. A secreção de *FAM3B* foi capaz de conferir proteção à morte celular via, aumento de *Bcl-2* e *Bcl-xL*, assim como diminuição da expressão de *Bax* e atividade de caspase -3. Além disso, observou-se aumento da migração e invasão em células que superexpressam *FAM3B*. Em concordância, houve aumento do peso dos tumores e da expressão de *Bcl-2*, com diminuição de *Bax*, em camundongos inoculados com células MDA-MB-231-FAM3B. Este trabalho revela envolvimento do *FAM3B* na inibição da apoptose e promoção de metástase, via *Bcl-2* e *Bcl-xL* e reforça a hipótese de que o *FAM3B* seja um marcador tumoral em câncer de mama.

**Palavras-chave:** *FAM3B/PANDER*. Neoplasias mamárias. Citocina.

## ABSTRACT

CALDEIRA, I. D. S. **Role of new cytokine FAM3B/PANDER in breast tumor progression**. 2016. 95 p. Masters thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

FAM3B / PANDER is a new cytokine-like protein member of the FAM3 family. It was revealed some evidence supporting the hypothesis that FAM3B could be involved in tumor progression. Whereas the FAM3B is expressed by breast tumors, this work was dedicated to elucidate the effect of FAM3B overexpression in MDA-MB-231 breast tumor cell line. Secretion of FAM3B was able to protect FAM3B-overexpressing cells from apoptosis by the increased expression of Bcl-2 and Bcl-xL as well as decreased expression of Bax and caspase-3 activity. On the other hand, there was an increased cell migration and cell invasion in FAM3B- overexpressing cells. In agreement, an increase tumor weight was observed in mice inoculated with MDA-MB-231-FAM3B cells, with increased Bcl-2 expression and decreased Bax in these tumors. In summary, our study highlights the involvement of FAM3B in inhibiting apoptosis and promoting metastasis mediated by Bcl-2 and Bcl-xL, and supported the hypothesis that FAM3B could be a tumor progression marker in breast cancer.

**Keywords:** *FAM3B/PANDER*. Breast tumors. Cytokine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura – 1 Características adquiridas pelas células tumorais na progressão tumoral.....	25
Figura – 2 Estrutura da mama feminina.....	26
Figura – 3 Localização genômica e estrutura do FAM3B .....	34
Figura – 4 Possíveis funções do FAM3B/PANDER no controle da glicemia .....	38
Figura – 5 Possíveis funções desempenhada pelo FAM3B em tumores.....	39
Figura – 6 Geração da Linhagem MDA-MB-231-FAM3B .....	58
Figura – 7 Análise da viabilidade celular por MTT após tratamento com Indutores de morte.....	59
Figura – 8 Avaliação da fragmentação de DNA após o tratamento com TNF- $\alpha$ ...	61
Figura – 9 Avaliação da fragmentação de DNA após o tratamento com Peróxido de hidrogênio.....	62
Figura – 10 Avaliação da fragmentação de DNA após o tratamento com Estaurosporina.....	64
Figura – 11 Avaliação da fragmentação de DNA modo tempo-dependente após o tratamento com Estaurosporina .....	65
Figura – 12 Análise da expressão gênica de genes anti-apoptóticos da família <i>Bcl-2</i> ao nível de mRNA.....	67
Figura – 13 Análise da expressão gênica dos membros anti-apoptóticos da família <i>Bcl-2</i> ao nível de proteína .....	68
Figura – 14 Quantificação da atividade proteolítica de caspase -3.....	69
Figura – 15 Avaliação da migração celular em células MDA-MB-231-FAM3B ....	71
Figura – 16 Avaliação do crescimento celular em suspensão de agarose .....	72
Figura – 17 Análise do crescimento tumoral de células MDA-MB-231-FAM3B em camundongos imunodeficientes .....	74
Figura – 18 Análise comparativa dos tumores de animais após a eutanásia .....	75
Figura – 19 Análise histopatológica de tumores MDA-MB-231-FAM3B em camundongos imunodeficientes .....	76

Figura – 20 Análise por imunohistoquímica de tumores MDA-MB-231-FAM3B em camundongos imunodeficientes .....	77
Figura – 21 Rede molecular hipotética ativada pelo FAM3B em tumores de mama.....	89

## LISTA DE TABELAS

1 Tabela – 1 <i>Primers</i> utilizados nos experimentos de expressão gênica por qPCR.....	48
2 Tabela – 2 Anticorpos utilizados nos experimentos de expressão gênica por Western blot .....	49

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amônio
Ac-DEVD-AMC	Substrato sintético para caspase -3
Bp	Pares de bases
BrdU	Bromodeoxiuridina (5-bromo-2'-deoxiuridina)
Cdc42	GTPase da família Rho
cDNA	DNA Complementar
CEA	Antígeno cárcino embrionário
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato hidrato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
DU145	Linhagem celular de carcinoma de próstata
ECM	Exame clínico das mamas
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMT	Transição epitélio mesenquimal
FACS	Separação de Células Ativadas por Fluorescência
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HCT116	Linhagem celular de carcinoma colorretal
HCT8	Linhagem celular de adenocarcinoma de cólon
HEPES	Ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1
HS578T	Linhagem celular de carcinoma de mama
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
ILEI	<i>FAM3C</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
LNCaP	Linhagem celular de carcinoma de próstata
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama
MDA-MB-231	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama
mRNA	RNA mensageiro
MTT	3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio
NF-kb	Fator nuclear Kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Reconhecimento Ostensivo de Envelamento

PANDER	<i>PAN</i> creatic <i>DER</i> ived Factor ( <i>FAM3B</i> )
PBS	Tampão fosfato salino
pcDNA	Vetor comercial (Life Technologies, CA. USA)
PI	Iodeto de propídeo
RE	Receptor de estrógeno
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Receptor de progesterona
RPMI	Meio de cultura celular
RT-PCR	PCR em Tempo Real
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
T47D	Linhagem celular de carcinoma ductal de mama
TBST	Tampão de lavagem com tampão salino Tris e Tween 20
TEMED	N, N, N',N'-Tetrametiletilenodiamin.a
TGF- $\alpha$	Fator transformador de crescimento $\alpha$
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TNM	Classificação de tumores malignos
zVAD-FMK	Inibidor específico das caspases



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1 Câncer.....	19
1.2 Glândula Mamária .....	25
1.3 Câncer de mama.....	27
1.4 Marcadores tumorais para o câncer de mama .....	29
1.5 Citocinas e Câncer .....	32
1.6 A descoberta do FAM3B .....	33
1.7 <i>FAM3B</i> e a regulação do metabolismo da glicose .....	34
1.8 <i>FAM3B</i> e a progressão tumoral.....	35
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	40
2.1 Objetivo geral .....	41
2.2 Objetivos específicos .....	41
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	42
<b>4 MÉTODOS</b> .....	44
4. 1 Cultura de células .....	45
4.2 Superexpressão do <i>FAM3B</i> .....	45
4.3 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT.....	46
4.4 Avaliação da fragmentação de DNA .....	47
4.5 Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real .....	47
4.6 Análise da expressão gênica por imunodeteção por Western blot .....	48
4.7 Ensaio de atividade proteolítica de caspase -3 .....	49
4.8 Ensaio de migração celular: cicatrização de feridas.....	50
4.9 Crescimento celular em suspensão de agarose.....	50
4.10 Animais.....	51
<u>4.10.1 Inoculação de células MDA-MB-231 com luciferase via subcutânea em camundongos imunodeficientes.....</u>	51
<u>4.10.2 Avaliação do peso e da massa tumoral dos animais.....</u>	52
<u>4.10.3 Eutanásia dos animais .....</u>	53
4.11 Análise histopatológica e imunohistoquímica do tecido tumoral.....	53

<u>4.11.1 Processamento do material proveniente de tumores</u> .....	53
<u>4.11.2 Coloração com Hematoxilina- Eosina (HE)</u> .....	54
<u>4.11.3 Exposição antigênica</u> .....	54
4.12 Análise estatística .....	55
<b>5 RESULTADOS</b> .....	56
5.1 Superexpressão do <i>FAM3B</i> nas células MDA-MB-231 .....	57
5.2 Superexpressão do <i>FAM3B</i> aumenta a viabilidade celular após tratamento com TNF- $\alpha$ e Estaurosporina .....	57
5.3 Superexpressão de <i>FAM3B</i> diminui as taxas fragmentação de DNA.....	57
5.4 Superexpressão de <i>FAM3B</i> aumenta expressão de genes anti-apoptóticos da família <i>Bcl-2</i> .....	66
5.6 Aumento da migração celular nas células MDA-MB-231- <i>FAM3B</i> .....	70
5.7 Aumento da formação de colônias em células MDA-MB-231- <i>FAM3B</i> ...	70
5.8 <i>FAM3B</i> aumenta o volume e o tamanho dos tumores em camundongos imunodeficientes .....	73
5.9 <i>FAM3B</i> induz alterações morfológicas nos tumores de animais imunodeficientes .....	73
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	78
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	90



## 1.1 Câncer

De acordo com Instituto Nacional do Câncer (INCA), câncer é a definição dada para mais de 100 tipos doenças que apresentam em comum à capacidade das células proliferarem de forma desordenada, invadindo órgãos e tecidos com a possibilidade de se disseminarem para distintas regiões do organismo, mediante um processo denominado de metástase (INCA, 2011).

Atualmente, já há um consenso de que o câncer pode ser considerado uma doença genética, em que o acúmulo de mutações nas células somáticas pode ser a base para o seu desenvolvimento. Avanços na área das biociências permitiram um novo desenho para os mapas genômicos da taxonomia tumoral, que transitou da histologia para os níveis genéticos. Além disso, avanços nos tratamentos, com desenvolvimento de novos fármacos e marcadores moleculares para determinados tipos de tumores, trouxeram progressos na área da oncologia. No entanto, muito ainda resta ser compreendido acerca da biologia tumoral devido à heterogeneidade da doença, responsável por, segundo a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 8,2 milhões de mortes no mundo no ano de 2012. São esperados mais de 20 milhões de novos casos de câncer para 2025 no mundo (ROSENBERG et al., 2011).

A estimativa para 2016 e 2017 é que ocorram, cerca de 600 mil novos casos de câncer no Brasil. Não considerando as neoplasias de pele do tipo não melanoma nos homens, os tumores mais incidentes serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres espera-se, que a incidência maior seja para câncer de mama (28,1%) seguido por intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%). Neste panorama, o perfil epidemiológico brasileiro, assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde o câncer de próstata (61 mil) em homens e de mama (58 mil) nas mulheres serão os mais frequentes (INCA, 2015).

Hanahan e Weinberg (2011) propuseram a existência de certas características essenciais adquiridas pelas células neoplásicas para obterem sucesso na tumorigênese (do latim *tumor* [inchação] e *gênesis* [origem]), a fim de se tornarem invasivas e malignas. Essas condições essenciais incluem: 1) instabilidade genômica e mutações; 2) evasão dos sinais supressores do crescimento; 3) sinalização sustentada para proliferação; 4) capacidade

replicativa ilimitada (imortalização); 5) desregulação energética da célula; 6) resistência à morte celular; 7) capacidade de escape da vigilância do sistema imune; 8) promoção da inflamação; 9) indução de angiogênese e 10) capacidade de invadir e de formar metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Ao longo da progressão tumoral, as células sofrem alterações no seu genoma, apresentando defeitos no sistema de reparo do DNA e promovendo a expansão e perpetuação de clones mutados que vão continuar realizando o ciclo celular. Pode-se dizer que os genes tumorais, dividem-se em oncogenes, os quais liberam os freios da proliferação celular e genes supressores de tumor, que seriam em condições normais os “guardiões do genoma” (Ex. *P53*). É possível afirmar, que o sucesso da progressão tumoral é obtido através de expansões clonais desencadeadas por genótipos mutantes. Todavia, também é preciso mencionar a importância dos fenótipos hereditários, como a inativação dos genes supressores de tumor, adquiridos por meio de mecanismos epigenéticos como modificações nas histonas e metilação do DNA, que afetam a regulação da expressão gênica, através de expansões clonais que não necessariamente são resultantes de mudanças provenientes de mutações (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Outra característica importante adquirida pelas células tumorais é a sua capacidade de promover a proliferação celular sustentada, através de variados mecanismos. Células tumorais podem produzir seus próprios ligantes de fator de crescimento ou dentro do tumor associado ao estroma, podem estimular células normais a suprir o tumor com fatores de crescimento. Também possuem a capacidade de aumentar a expressão de proteínas receptoras, tornando-se hiper-responsivas a quantidades limitantes de fatores de crescimento. Os tumores podem, ainda, alterar a estrutura de moléculas receptoras, permitindo ativação mitogênica independente do ligante. Células tumorais também conseguem driblar os sinais supressores do crescimento, principalmente, devido à perda de função de genes supressores de tumor, como o gene *P53* e *Rb*, os quais controlariam os circuitos de proliferação, senescência e apoptose, o que perpetua a proliferação celular desordenada (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Após sucessivos ciclos de crescimento e divisão celular, normalmente, as células são encaminhadas para a senescência, estado considerado

irreversível, em que apesar da viabilidade não há mais replicação celular. Outra possibilidade é a de que, as células que conseguem evadir da senescência, entrem em um estado de crise, sendo então encaminhadas à morte. Entretanto, em algumas ocasiões as células podem superar esses destinos e exibir um potencial replicativo ilimitado sem evidências de senescência ou crise, em um fenômeno denominado imortalização. Há evidências, de que células tumorais sejam imortais por manter a expressão funcional da telomerase, uma transcriptase reversa, que adiciona segmentos repetidos de telômeros ao fim do DNA telomérico. Sendo assim, muitas células neoplásicas também adquirem a capacidade de evadir mais uma barreira natural ao desenvolvimento de tumores, ampliando seu potencial de replicação (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Adicionalmente, em meio à replicação desordenada observada nos tumores há um ajuste no metabolismo energético, necessário ao crescimento e divisão das células tumorais, em que mesmo na presença de oxigênio estas reprogramam sua produção de energia, limitando seu metabolismo energético, em grande parte para a glicólise, o que resulta em um estado chamado de “glicólise aeróbica”. Isso é possível, pela regulação positiva de transportadores de glicose como o GLUT1, que aumentam a importação de glicose para o citoplasma e via abastecimento desta via glicolítica, através de oncogenes como Ras e Myc, assim como genes supressores de tumor como a P53. Outra condição que favorece este estado é a hipóxia, comum aos tumores, que colabora com a regulação positiva dos transportadores de glicose e muitas enzimas da via glicolítica. Juntas a via Ras e a hipóxia, aumentam os níveis de fatores de transcrição como HIF1 $\alpha$  e HIF2 $\alpha$ , que estimulam a glicólise. De acordo com algumas hipóteses o aumento da glicólise, permite o desvio dos intermediários glicolíticos em várias vias biossintéticas como as que geram aminoácidos e nucleosídeos, facilitando assim a síntese de macromoléculas e organelas necessárias à geração de novas células (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Todavia, além da proliferação celular desordenada e de mudanças metabólicas que favoreçam o tumor, as células tumorais também adquirem a capacidade de driblar importantes mecanismos de morte celular por apoptose que seriam uma das frentes de impedimento da progressão de tumores.

Apoptose ou morte celular programada compreende duas vias principais, chamadas de extrínseca, a qual envolve ativação de receptores de morte da família dos RTNF, com conseqüente ativação de caspases (cisteínas aspartato proteases) iniciadoras e executoras e a via denominada de intrínseca, que compreende, principalmente, a permeabilização mitocondrial através de proteínas pró-apoptóticas, como Bax e Bak da família Bcl-2. O gene *Bcl-2* foi identificado como uma translocação cromossômica, t (14;18) identificada com o linfoma folicular de célula B. Os primeiros estudos envolvendo *Bcl-2* dedicaram-se a elucidar suas possíveis funções na apoptose (CLEARY; SMITH; SKALAR, 1986; HOCKENBERRY et al., 1990). A família de proteínas Bcl-2, em vertebrados, é composta por proteínas globulares que contém  $\alpha$ -hélices e que apresentam homologia para ao menos um domínio (BH). Vaux L. D. (1988), revelou que os efeitos da superexpressão de *Bcl-2* em *C. elegans*, promovia redução nas taxas de morte celular por apoptose. Atualmente, já é consenso que essas proteínas exercem efeitos cruciais na via intrínseca ou mitocondrial da apoptose e, nesse contexto, são divididas entre aquelas ditas anti-apoptóticas (*Bcl-2*, *Bcl-xL* e *Mcl-1*) e as consideradas pró-apoptóticas (*Bax*, *Bak* e proteínas BH3 como, *Bad*, *Bid* e *Bik*) (CHIPUK et al., 2010; YOULE ; STRASSER, 2008).

O equilíbrio entre os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 (*Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Bcl-w*, *Mcl-1*, *Bcl2A1*, *Bcl-b*) e os membros pró-apoptóticos (*Bax*, *Bak*, *Bok*, *Bid*, *Bad*, *Noxa*, *Puma*, *Hrk*), são determinantes na apoptose. Frequentemente, observam-se alterações na regulação de genes da família *Bcl-2* em tumores, em que o aumento na expressão dos membros anti-apoptóticos conferem vantagens na sobrevivência, ao passo que também há diminuição da expressão de genes pró-apoptóticos (HANAHAN; WEINBERG, 2011; JUIN et al., 2013). Neste contexto, também é importante mencionar que, mutações na P53 que seria um dos sensores que induziriam a morte via aumento da expressão de *Puma* e *Noxa*, está comumente mutada em muitos tumores devido a anormalidades cromossômicas, o que reforça ainda mais as vias de evasão à morte (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Outra questão recentemente abordada por Hanahan e Weinberg (2011) são as funções do sistema imunológico no âmbito da progressão de tumores. Tem sido demonstrado, que de alguma forma tumores sólidos obtém seu

sucesso na progressão tumoral através do escape dos mecanismos de vigilância do sistema imune. Foi apontada uma relação positiva entre o aumento de muitos tumores em animais mediante deficiência de algumas células de defesa como os linfócitos T citotóxicos CD8+ citotóxicos (CTLs), células T auxiliares CD4+ (Th1) e células *Natural Killers* (NKs). Além disso, há evidências de que, em alguns casos, pacientes transplantados submetidos à terapia imunossupressora, possam desenvolver tumores advindos do doador livre da doença, sugerindo que um sistema imune deficiente poderia fazer com que células anteriormente dormentes, resultassem em células aptas a originar tumores. Ademais, tumores podem secretar TGF- $\beta$  (fator imunossupressor), que pode inibir as ações das NKs e dos CTLs. Acredita-se que uma vantagem importante adquirida pelas células neoplásicas para formar tumores humanos é sua capacidade de evadir dos mecanismos imunológicos de defesa e que condições que levem a debilitação desse sistema imune, possam contribuir diretamente com a formação do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Contudo, além de evadir da imunidade, sabe-se atualmente, que processos inflamatórios crônicos também podem estar associados com a progressão tumoral. Evidências suportam o fato, de que células do sistema imunológico, envolvidas nas respostas inflamatórias, estejam associadas aos tumores, funcionando como efectoras de muitas das ações tumorais. Acredita-se na existência de funções antagônicas desempenhadas pelo sistema imune, em que hora fornece proteção contra agentes infecciosos, e que hora suporta processos patológicos como a progressão tumoral, por meio da inflamação sustentada, que provê ao microambiente tumoral moléculas bioativas, incluindo fatores de crescimento, fatores de sobrevivência e angiogênicos, que contribuem com a chamada transição epitélio-mesenquimal (EMT) (HANAHAN; WEINBERG, 2011). EMT pode ser definida, de uma forma geral, como o processo, pelo qual células tumorais epiteliais passam a adquirir fenótipos mesenquimais, com perda de E-caderina e ganho de vimentina, tendo um incremento na sua motilidade e capacidade de invasão celular, o que favorece sua disseminação e promoção de metástase. Acredita-se que a EMT, seja resultado da interação das células tumorais com as células normais e do estroma associados, mediado por fatores autócrinos e parácrinos. Muitas vias de sinalização estão envolvidas na indução e manutenção da EMT como o



fator nuclear – KB (NF-KB) Sinal transdutor e ativador de transcrição -3 (STAT-3), Fator indutor de hipóxia 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ), dentre outros. No entanto, sabe-se que O resultado final, da via de sinalização da EMT, que ocorre em carcinomas, é a expressão e ativação funcional de fatores de transcrição como Twist, Snail, Slug, Zinc Finger E-box-binding homeobox 1 (Zeb1) e Zeb2 (MARAUCCI; STASSI G; MARIA, 2016).

Outra característica adquirida por uma célula tumoral é a sua capacidade de formar novos vasos sanguíneos, processo designado de angiogênese. Assim como os tecidos normais, a formação de novos vasos pela célula tumoral visa promover suprimento como nutrientes e oxigênio e eliminação de produtos advindos do seu metabolismo. O fator, indutor, mais conhecido envolvido na neovascularização tumoral é o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), cuja expressão gênica pode ser regulada via sinalização por oncogenes (Ex. *Ras* e *Myc*) e/ou através de hipóxia. O produto da estimulação de indutores angiogênicos gera vasos ramificados, largos e distorcidos com pontos de micro hemorragias e ciclos de proliferação e apoptose anormal das células endoteliais, os quais vão então beneficiar o chamado microambiente tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Atualmente, sabe-se que uma das características mais importantes adquiridas pelas células tumorais é a sua capacidade de invadir e formar metástase. Neste processo, especula-se que muitas moléculas de adesão e até mesmo, de migração estejam envolvidas na invasão de tecidos distantes, daqueles de origem das células neoplásicas. Nesta perspectiva uma das moléculas mais bem estudadas é a E-caderina, que já foi demonstrada como pouco expressa em tumores mais agressivos, enquanto que a N-caderina, presente na organogênese na migração de neurônios e células mesenquimais, foi identificada como superexpressa em muitos carcinomas invasivos. Assim como estas moléculas, muitos membros de famílias de proteínas de adesão e migração estão envolvidos em um processo, que resumidamente, envolve uma primeira etapa de invasão local de um determinado tecido, com consequente entrada das células tumorais em vasos sanguíneos e linfáticos (capacidade de “intravasamento”), onde conseguem migrar dentro deste sistema, até o escape do lúmen destes vasos para o parênquima de outros tecidos (capacidade de “extravasamento”), no qual formam pequenos nódulos de metástases, ou

micrometástases, alcançando a última etapa que é a de colonização de tecidos distantes (HANAHAN; WEINBERG, 2011).



**Figura 1 - Características adquiridas pelas células tumorais na progressão tumoral.**  
 Fonte: Adaptado de Hanahan; Weinberg (2011).

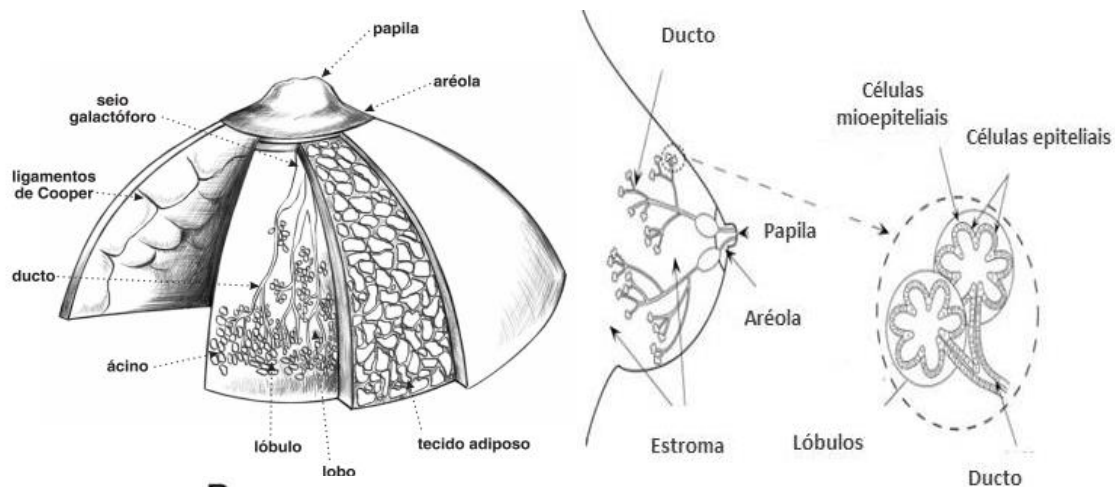
## 1.2 Glândula mamária

A glândula mamária humana é formada por um sistema ducto-lobular ramificado, com estroma de tecido conectivo e adiposo altamente vascularizados (HONDERMARCK, 2003; JUIN et al., 2013). Nesta perspectiva, a mama contém os chamados ductos mamários, os quais são as estruturas responsáveis por drenar o tecido e transportar leite durante o período de lactação. Estes ductos estão interligados com os lóbulos, os quais contêm os alvéolos, cujas células secretoras, podem se diferenciar em células produtoras de leite (lactócitos). No aleitamento, o leite secretado pelas células alveolares, vai dos lóbulos para os ductos, onde é conduzido até os mamilos ou papilas. Lóbulos e ductos são revestidos pelas células mioepiteliais na parte externa e pelas células chamadas de luminais, na região interna (Figura 2). Este sistema ducto-lobular é envolvido pelo estroma, o qual contém vasos sanguíneos e linfáticos, fibroblastos, adipócitos, células do sistema imune, fibras nervosas e

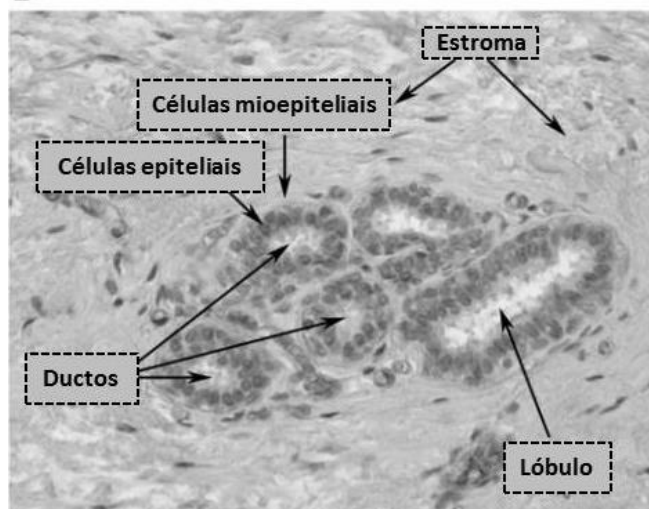
as células mensequimais, responsáveis pela sinalização hormonal que ocorre na glândula (MACHADO, 2010; RIBEIRO, 2013).

A drenagem linfática na mama acontece através de plexos superficiais e profundos e mais de 95% desta drenagem ocorre por meio dos linfonodos axilares, com os restantes através dos linfonodos internos mamários. Os nódulos axilares são numericamente variados e divididos em três níveis, baseados na sua relação com músculo peitoral menor (INCA, 2002; MACHADO, 2010).

**A**



**B**



**Figura 2 - Estrutura da mama feminina.**

Nota: Esquema anatômico (A) e corte histológico da glândula mamária humana (B).

Fonte: Adaptado de Hondermarck (2003). Brasil. Ministério da Saúde: Falando sobre Câncer de mama; 2012.

### 1.3 Câncer de mama

O câncer de mama pode ser definido como um conjunto de várias doenças, que apresentam ampla variabilidade clínica em relação aos seus distintos comportamentos biológicos, morfologia e composição celular (HONDERMARCK, 2003; JUIN et al., 2013). A OMS estima que por ano ocorram mais de 1.050.000 novos casos no mundo, o que faz este tipo de neoplasia ser considerado o mais comum entre as mulheres. No Brasil, foram estimados 57.960 novos casos de câncer de mama, para o ano de 2016, com um risco de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2015).

Atualmente, no Brasil, o câncer de mama é considerado o tumor que mais mata a população feminina e apesar da taxa de sobrevivência ter aumentado nas nações desenvolvidas, a neoplasia da mama ainda é apontada como a segunda causa de morte por tumores estando atrás somente, do câncer de pulmão (INCA, 2015).

Estima-se que mais de 80% dos tumores de mama tenham o sítio de origem primária localizado nos epitélios dos ductos mamários e assim, as primeiras lesões evidentes são as denominadas hiperplasias intraductais *in situ*, quando as células neoplásicas estão delimitadas por uma membrana basal íntegra, ou invasivos, quando as células tumorais ultrapassam a membrana basal e entram em contato com o estroma mamário, podendo invadir órgãos e tecidos (MACHADO, 2010; RIBEIRO, 2013).

Os fatores de risco mais conhecidos para o desenvolvimento do câncer de mama são: o envelhecimento, o histórico de vida reprodutiva e familiar de câncer, o consumo de álcool, a exposição à radiação ionizante, o sedentarismo, o ganho excessivo de peso e a elevada razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama (alta densidade do tecido mamário). O histórico familiar aumenta de duas a três vezes o risco para o desenvolvimento desses tumores, os quais nestes casos mutações em genes como o *BRCA -1* e *-2* aumentam consideravelmente o risco (INCA, 2015a).

O exame clínico das mamas (ECM) e a mamografia são os métodos de rastreamento de rotina da atenção integral à saúde da mulher. É preconizado que o ECM seja realizado anualmente, a partir dos 40 anos de idade para todas as mulheres, e que além do ECM na faixa dos 50 e 69 anos, a mamografia seja feita, a cada dois anos. A recomendação para as mulheres de

40 a 49 anos é a realização do exame clínico e a mamografia, apenas em caso de alterações no ECM, pois segundo muitos estudos e a OMS, a sensibilidade da mamografia em mulheres jovens, pré-menopausa, é menor devido a maior densidade mamária (INCA, 2015b).

O diagnóstico do câncer de mama é realizado a partir da confirmação, obtida através do exame histopatológico da lesão suspeita. A biópsia do linfonodo sentinela, o primeiro linfonodo em uma bacia linfática que recebe o fluxo direto do tumor primário, é utilizada para determinação da extensão do tumor. Após o diagnóstico o estadiamento da doença, realizado a partir do exame físico e de dados de imagem, segundo o padrão Internacional de Classificação de Tumores Malignos (TNM), o qual colabora com o planejamento do tratamento e com o prognóstico, além de auxiliar na avaliação dos resultados com a terapia instituída, facilitar o intercâmbio de informações entre os centros de tratamento e contribuir para as pesquisas sobre o câncer. Este estadiamento considera o tamanho do tumor, e no caso do câncer de mama, características dos linfonodos regionais (axilares, infraclaviculares, mamários internos, supraclaviculares) e a presença ou ausência de focos de metástases à distância (pulmonar, medula óssea, pleural hepática, peritoneal, cerebral, supra-renal, linfonodal, pele, outras). Esta classificação é adotada para os carcinomas, de mama feminina e masculina (INCA, 2004).

Nos homens, apesar da menor quantidade de tecido glandular também é possível, embora raro, a ocorrência de tumores de mama. Sabe-se, que homens negros apresentam tumores maiores, com maior presença de nódulos positivos e menor expressão de receptores hormonais. Além da incidência, as principais diferenças entre homens e mulheres são as características raciais e as relacionadas à distribuição da idade. Contudo, tanto o rastreamento quanto o diagnóstico, são os mesmos adotados para ambos os sexos (ANDERSON et al., 2004; PADRON-MONEDERO et al., 2015).

Progressos no campo da terapêutica e nas técnicas cirúrgicas reduziram consideravelmente as cirurgias radicais. O emprego da quimioterapia neoadjuvante em tumores de mama, que no passado eram considerados inoperáveis, trouxe outras perspectivas dando a estes casos a chance de uma cirurgia, em prol da cura da doença. Em estágios avançados a quimioterapia pré-operatória (neoadjuvante), também propiciou o emprego das cirurgias

conservadoras, melhorando a qualidade de vida de muitos pacientes. Além da terapia neoadjuvante, desde a década de 1970 a quimioterapia adjuvante (quimioterapia pós-cirúrgica) também é empregada, sendo considerado um dos fatores que melhoram a sobrevida e o tempo de vida livre do câncer (SLEDGE et al., 2014).

Avanços na biologia molecular têm sido um dos responsáveis pelo surgimento de novas opções terapêuticas, que visam tratamentos personalizados e com melhores resultados, propiciando o emprego de quimioterapias e cirurgias menos agressivas e mais efetivas (SLEDGE et al., 2014).

O Projeto Genoma Humano trouxe para o cenário do câncer de mama a identificação dos subtipos moleculares, que diferenciam os possíveis cursos clínicos da doença. Os perfis moleculares procuram elucidar, por exemplo, distintos padrões de metástase e tipos de sensibilidade a agentes terapêuticos específicos fornecendo informações, que podem direcionar condutas na clínica. Por outro lado, apesar dos prováveis benefícios, esta é uma tecnologia que ainda necessita ser aprimorada e que, não é financeiramente acessível a uma grande parcela dos pacientes (SLEDGE et al., 2014).

Portanto, considerando a heterogeneidade dos tumores de mama muito ainda resta ser compreendido, a fim de se aprimorar as estratégias preventivas, de tratamento e, especialmente, de rastreamento em mulheres jovens, em que a mamografia parece não ser um método tão efetivo. A ciência deve continuar provendo mais conhecimentos e elaborando tecnologias que possam combater o câncer de mama, assim como as descobertas devem caminhar rumo a disponibilidade para todos aqueles que precisarem.

#### 1.4 Marcadores tumorais para o câncer de mama

Marcadores tumorais (marcadores biológicos ou biomarcadores) são substâncias presentes no sangue ou em outros líquidos do organismo, que podem ser encontrados e produzidos primariamente pelo tumor, ou secundariamente pelo paciente em resposta a presença deste tumor. Os marcadores tumorais podem ser utilizados tanto para finalidades prognósticas, quanto diagnósticas, sendo úteis para predizer o comportamento de tumores

com ampla variabilidade clínica, como é o caso do câncer de mama (EINSENBURG; KOIFMAN, 2001).

Em meados da década de 1970 o uso das tecnologias para analisar a expressão gênica permitiu a identificação da expressão de receptores para hormônios esteroides (estrógeno e progesterona), que foram na ocasião considerados biomarcadores de prognóstico crítico, pois ainda não se contava com a terapia adequada para tratar tumores de mama responsivos a hormônios. Posteriormente, surgiu a terapia anti-estrógeno com o Tamoxifeno<sup>®</sup>, que alterou o curso da doença, dando início a uma nova fase no campo de diagnóstico e tratamento. Após a descoberta dos receptores hormonais envolvidos na progressão do câncer de mama, muitos biomarcadores já foram identificados (INCA 2002, 2015).

Contudo, em meio à ampla variedade de marcadores tumorais, os mais consolidados em termos de validação clínica e indicados pelos Comitês de Consenso Oncológico para pesquisa de rotina, em caso de câncer de mama, ainda são os de receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e o *HER2* (*c-erbB-2*). Detectados, por imunohistoquímica, estes dois marcadores são úteis para obtenção de informações prognósticas e preditivas recomendadas, pela OMS (EINSENBURG; KOIFMAN, 2001, SLEDGE et al., 2014).

O gene *c-erbB-2* ou *HER-2* amplificado em carcinomas de mama, está associado ao aumento da atividade metastática das células tumorais que o expressam. Todavia, como foi mencionado, o emprego do anticorpo monoclonal anti-HER2 (Herceptin<sup>®</sup>) para tratar tumores, em que o gene está mais expresso, melhorou consideravelmente o prognóstico desses pacientes (EINSENBURG; KOIFMAN, 2001).

Além disso, outro marcador de grande importância é o gene *BRCA* do tipo -1 e -2, também relevante para o prognóstico de câncer de ovário. Mais de vinte e cinco anos se passaram que o *BRCA1* foi identificado, em 1990, no cromossomo 17q21, e cerca de vinte e um, desde que o *BRCA2* foi mapeado no cromossomo 13q12,3, no qual estes genes foram considerados como genes supressores de tumor associados a uma parcela importante dos tumores mamários de cunho hereditário (MACHADO, 2010; RANDALL, POTHURI, 2016; SLEDGE et al., 2014). O *BRCA1* e *BRCA2* estão envolvidos no reparo do DNA, durante a recombinação homóloga e envolvidos em diversas funções

celulares distintas como ativação e regulação transcricional e o controle da proliferação e diferenciação celular. As mutações nos *BRCAs* podem ocorrer tanto em homens, quanto em mulheres e os riscos estimados para os portadores de mutações são de 57% para aqueles no *BRCA-1* e 49% para o *BRCA-2* (CHEN; PARMIGIANI, 2007). Em relação às possíveis condutas, em casos de rastreamento positivos, as opções, ainda se restringem à vigilância, a quimioterapia preventiva e ao emprego de cirurgias radicais (MACHADO, 2010).

Os tumores de mama considerados potencialmente mais agressivos, são os tumores negativos para os marcadores *HER2*, Receptor de Estrógeno (RE) e Receptor de Progesterona (RP). Esses tumores, também chamados de triplo-negativos, mostram-se mais incidentes em pacientes com mutações no gene *BRCA1* e naqueles com ancestralidade africana (EINSENBURG; KOIFMAN, 2001).

Atualmente esforços, para caracterizar melhor os subtipos tumorais da mama e de se identificar marcadores biológicos tão efetivos quanto o *ER2* e os receptores hormonais, têm sido dedicados para o desenvolvimento de tecnologias que consigam captar anormalidades na metilação do DNA, expressão de microRNA (miRNA) e de proteínas envolvidas nas bases moleculares das diferentes entidades desta doença. O chamado perfil molecular baseia-se nesta busca individualizada por anormalidades a nível molecular, específicas entre indivíduos e doença, que é promissora no âmbito da classificação de risco, prognóstico, diagnóstico e tratamento (KOBOLDT et al., 2012). O emprego de testes como esses poderia poupar pacientes de quimioterapia adjuvante em casos de estágio inicial, com receptor hormonal positivo e linfonodos axilares livres do tumor, caso o teste demonstre baixo risco de recorrência (VAN'T VEER et al., 2002).

Sendo assim, a identificação de novos marcadores tumorais e os diferentes tipos da doença definidos por eles, mostram-se cada vez mais necessários no âmbito do diagnóstico, tratamento e prognóstico no câncer de mama.



### 1.5 Citocinas e câncer

Citocinas são moléculas extracelulares de natureza proteica e hidrossolúvel, sintetizadas por diferentes tipos celulares, as quais desempenham funções importantes na regulação de diversos processos biológicos. As citocinas podem atuar regulando o crescimento e ativação celular; quimiotaxia; imunidade e inflamação; reparo tecidual na fibrose e na morfogênese; produção e função de outras citocinas. As citocinas têm propriedades pleiotrópicas, uma vez que moléculas análogas secretadas por diferentes tipos celulares podem ter ações distintas, em diferentes locais do organismo. Além disso, citocinas também são redundantes em suas atividades, pois ações semelhantes podem ser mediadas por citocinas diferentes (KUMAR et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2011).

A produção das citocinas não acontece somente nas células imunocompetentes, uma vez que sua síntese também pode ocorrer em diferentes tipos celulares e teciduais, possuindo assim múltiplas funções no organismo. A interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), são apontados como algumas dessas citocinas consideradas multifuncionais (AKIRA et al., 1990).

Inicialmente, a IL-6 foi descrita como um fator derivado de células T, que atuava sobre as células B ativas, a fim de induzir o processo final de maturação das células formadoras de anticorpos. Historicamente a IL-1 foi identificada como um fator estimulador de timócitos e linfócitos e o TNF- $\alpha$  como um fator citotóxico em células tumorais, sendo subseqüentemente também elucidadas suas funções nas demais respostas imunes (AKIRA et al., 1990).

Contudo, já se sabe que algumas citocinas como a própria IL-6 além de ser expressa por linfócitos, também é encontrada em células tumorais. Foi demonstrado que em algumas linhagens celulares de tumores de próstata, a IL-6 pode estar tanto relacionada com mecanismos anti-apoptóticos, quanto pró-apoptóticos, além de atuar como um fator estimulador do crescimento celular. Em células da linhagem LNCaP, esta citocina teria um efeito pró-diferenciação (AKIRA et al., 1990; BROCKE-HEIDRICH et al., 2004).

A secreção de IL-6 já é considerada importante para processos de proliferação e/ou mecanismos de sobrevivência para muitos tipos de tumores, como os tumores de mama. Foi identificado, que a IL-6 parece influenciar no

aumento da proliferação celular em linhagens de células tumorais da mama como a MCF-7. Além disso, considerando que a inflamação tem funções importantes na progressão tumoral, neste contexto, a IL-6 ativaria vias cruciais para a inflamação em tumores, em que a ativação da cascata de sinalização dependente de Janus kinase (JAK) e dos transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STATS), é mediada pela IL-6 (SAGLAM et al., 2015).

Em conclusão, inúmeros são os estudos que relacionam as variadas funções das citocinas devido à natureza pleiotrópica dessas moléculas e destacam, principalmente em relação a IL-6, suas prováveis atuações distintas no contexto das células tumorais e suas possíveis aplicações clínicas.

### 1.6 A descoberta do *FAM3B*

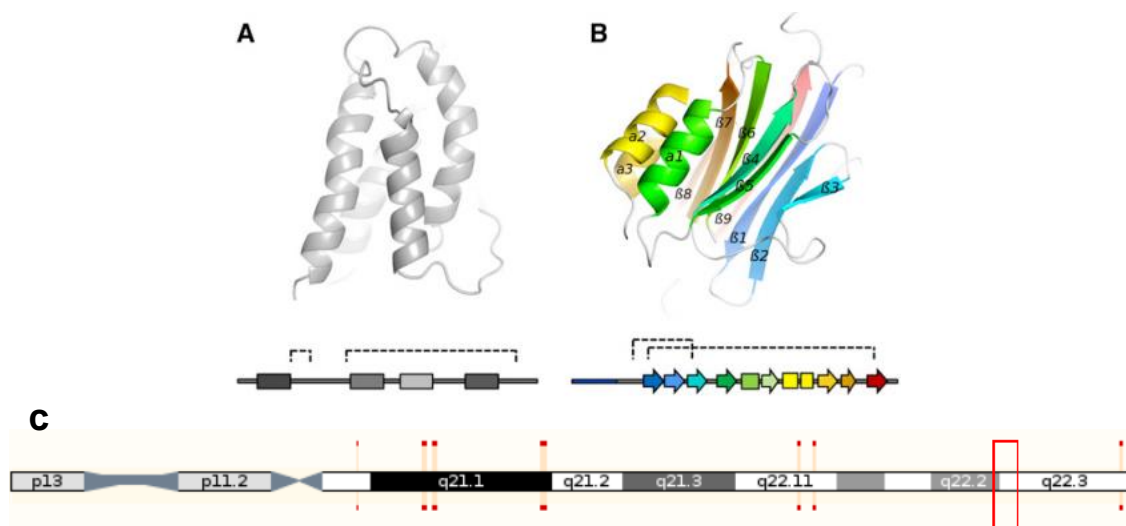
Considerando que as citocinas podem exercer diferentes funções biológicas e que sua estrutura secundária é altamente conservada através da evolução, Zhu e colaboradores desenvolveram em 2002, um algoritmo computacional para identificação de novas sequências de proteínas que poderiam ter uma estrutura secundária comum a todas as citocinas, denominado Reconhecedor Ostensivo de Enovelamento (ORF). Essa metodologia permitiu a identificação de uma nova família de proteínas “tipo citocinas”, designada como família *FAM3*, composta pelos genes *FAM3A*, *FAM3B*, *FAM3C* e *FAM3D* (ZHU et al., 2002).

A partir de análises feitas por *Northern blot* foi comprovado que os membros da família *FAM3*, possuem ampla distribuição tecidual e que, o *FAM3B* possui uma expressão acentuada no tecido pancreático, sendo em menor escala também expresso em órgãos como próstata, testículos, intestino e cérebro (ZHU et al., 2002).

O gene *FAM3B* humano, localizado na região 21q22 do cromossomo 21, contém 8 éxons que se estendem ao longo de 40 kilobases (Figura 3C) e codifica uma proteína que contém 235 aminoácidos, um peptídeo sinal (aminoácidos 1-29) e quatro cisteínas conservadas (Cys 61, 69, 91, 229) responsáveis pela formação das pontes dissulfeto intermoleculares. A estrutura secundária predita do *FAM3B* apontava a existência de quatro alfa hélices ligadas por duas pontes dissulfeto (Figura 3A), o que reforçou, por muito tempo, sua similaridade funcional com outras citocinas (YANG et al., 2005a).

No entanto estudos recentes da estrutura 3D, obtidas por difração de raios X, resolveu a existência de duas folhas- $\beta$  ligadas por duas  $\alpha$ -hélices, mantendo as duas pontes dissulfeto (Figura 3B). Esta estrutura conservada em todos os membros da família FAM3, é particularmente similar ao FAM3C/ILEI. Os dados estruturais disponíveis, indicam que o FAM3B e FAM3C podem apresentar uma nova classe estrutural de citocinas, com um modo diferente de ação em relação a estrutura de quatro  $\alpha$ -hélices, tradicional entre a maioria das citocinas (JOHANSSON et al., 2013).

O FAM3B humano compartilha 78% da sua identidade a nível de aminoácidos e 4 cisteínas conservadas com camundongos. Devido ao fato de ser altamente expresso no pâncreas, o *FAM3B* foi denominado de PANDER (*PAN*creatic *DER*ived Factor) e os primeiros estudos a respeito desta proteína foram voltados para suas possíveis funções no pâncreas endócrino (YANG et al., 2005a; ZHU et al., 2002).



**Figura 3 - Localização genômica e estrutura do FAM3B.** Estrutura secundária predita do FAM3B, com 4  $\alpha$ -hélices e duas pontes dissulfeto (YANG et al., 2005) (A). Estrutura resolvida do FAM3B a uma resolução de 2,3 Å (JOHANSSON et al., 2013) mostrando as pontes dissulfeto por linhas tracejadas (B). Esquemas mostrando a localização genômica do FAM3B na região *Down* (21q22), cromossomo retirado do site *Genecards*® (C).

### 1.7 *FAM3B* e a regulação do metabolismo da glicose

Foi revelado que o *FAM3B* é altamente expresso no pâncreas endócrino, mais especificamente nas Ilhotas de Langerhans, onde já se sabe, através de experimentos feitos com nifedipina (inibidor dos canais de cálcio do tipo L) ser um fator co-secretado com a insulina, através de mecanismos  $\text{Ca}^{+2}$

dependentes (YANG et al., 2005b). Estes achados conduziram os primeiros estudos a elucidar as possíveis ações do *FAM3B* no controle da glicemia.

Inicialmente, o *FAM3B* foi relacionado a patogênese do diabetes tipo I (WANG; GUAN; YANG, 2010; YANG et al., 2005a), doença de origem autoimune, caracterizada pela apoptose das células  $\beta$  pancreáticas com diminuição gradativa da produção de insulina, por depleção destas células secretoras (CAO et al., 2003). Foi revelado que o aumento da expressão de *FAM3B*, relacionava-se positivamente com elevação das taxas de apoptose das células  $\beta$ , por uma via não canônica, ou seja, distinta daquela usualmente ativada por citocinas e com possível envolvimento de clivagem de caspase -3 e da proteína regulatória do ciclo celular, p21 (EIZIRIK; MANDRUP-POULSEN, 2001).

Contudo, estudos mais recentes também revelaram expressão do *FAM3B* nas membranas de células hepáticas, o que sugere que o fígado possa ser um alvo distal importante para as ações do *FAM3B* no controle glicêmico (WILSON et al., 2010; WILSON; ROBERT-COOPERMAN; BURKHARDT, 2011). Dados *in vivo*, com camundongos C57BL/6, sugerem que o *FAM3B*, em condições fisiopatológicas promova o aumento da produção de glicose hepática e resistência seletiva à insulina, quadro chave no diabetes do tipo II, sendo responsável pela dislipidemia e hiperinsulinemia observados no desenvolvimento da doença (SHARI et al., 2014).

Portanto, elucidar as funções do *FAM3B* e identificar o seu receptor parece ser promissor, no âmbito das doenças metabólicas, como o diabetes. Recentes descobertas, a respeito de suas ações hepáticas, sugerem que ações talvez ainda mais importantes sejam exercidas por esta proteína no diabetes do tipo II.

### 1.8 *FAM3B* e a progressão tumoral

Considerando o pleiotropismo das citocinas e a multifuncionalidade do *FAM3B*, sugere-se que esta proteína tipo citocina também poderia estar envolvida na progressão tumoral. Os possíveis fatores que sustentam esta hipótese são: 1) existência de similaridades entre o *FAM3B* e outras citocinas relacionadas ao câncer de mama (IL-6, por exemplo), 2) localização cromossômica do gene *FAM3B*; 3) similaridade estrutural no nível 3-D com

outro membro da família, o *FAM3C/ILEI*, considerado um fator de promoção de malignidade, no processo EMT; 4) alguns estudos já reportados sobre o papel do gene *FAM3B* no crescimento tumoral e na metástase em tumores de próstata e cólon, respectivamente.

Yang et al., (2005a) demonstraram, através de mutagênese sítio-dirigida, que existem similaridades entre as regiões funcionais do *FAM3B* e a da IL-6. De acordo com análises realizadas, a região entre a Cys<sub>91</sub> - Phe<sub>152</sub> e a segunda ponte dissulfeto, formada entre Cys<sub>91</sub> - Cys<sub>229</sub> foram localidades pontuais identificadas como funcionalmente importantes para as ações tóxicas desempenhadas pelo *FAM3B*. De maneira similar o papel das quatro cisteínas conservadas no *FAM3B*, necessárias para realização de sua atividade biológica, também tem a mesma função no caso da IL-6 humana (YANG et al., 2005a).

Além destes dados análises da região 21q22 do cromossomo 21 revelaram que o *FAM3B* está localizado em uma região altamente suscetível a rearranjos cromossômicos, ou seja, uma região de alta instabilidade genética, que envolve o gene *TMPRSS2* e genes da família de fatores de transcrição ETS, como o *ERG* e *ETV1*, frequentemente alterados em amostras de câncer de próstata (KURZOCK, 2001; ROBERT-COOPERMAN et al., 2010).

Como já apontado, outro membro da família *FAM3*, o *FAM3C* (também chamado de *ILEI*) parece estar relacionado com a EMT, um processo central na progressão do câncer, que confere aos tumores um fenótipo metastático, com perda de E-caderina e ganho de vimentina, correlacionado com invasões locais e formação de metástase. Johansson et al., (2013) demonstraram que ambas as moléculas (*FAM3B/PANDER* e *FAM3C/ILEI*) compartilham uma ampla área de superfície conservada e que podem, supostamente, interagir com uma classe semelhante de ligantes os quais, no entanto, ainda não foram encontrados. Infere-se que todos os membros da família *FAM3* sejam proteínas secretadas, entretanto já tem sido reportado que possa haver populações citoplasmáticas das proteínas *FAM3B* e *FAM3C* e a respeito desta suposição Waerner et al., (2006) aponta que, a expressão anormal de *FAM3C/ILEI*, ou seja, a expressão citoplasmática e não vesicular dessa proteína esteja associada com EMT em câncer de cólon, como fator preditivo de metástase e com mau prognóstico em câncer de mama humano.

Além disso, a superexpressão de uma variante do mRNA do *FAM3B*, denominado de *FAM3B-258*, em células de carcinoma de cólon (HCT116), resultou em perdas das conexões célula-célula com aumento da taxa de migração e invasão celular, amplificação da expressão de *Slug* e *Snail* (inibidores transcricionais de E-caderina) com indução de Cdc42 (GTPase da família Rho), o que possivelmente conferiria um fenótipo mais invasivo a essas células (LI et al., 2012).

Em adição, o silenciamento de *FAM3B* por RNA de interferência, foi capaz de induzir apoptose em células HCT8 (linhagem celular de carcinoma de cólon), provavelmente via fosforilação da proteína p53 com retroalimentação negativa de mdm2, um dos principais inibidores, da p53. Estes dados reforçam a hipótese de que o *FAM3B* seria uma proteína anti-apoptótica, que conferiria proteção às células tumorais (MOU et al., 2012).

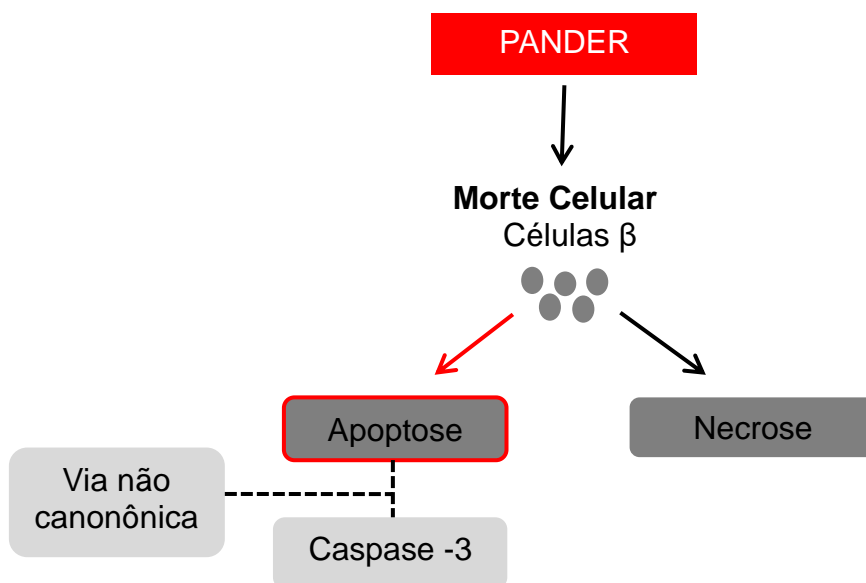
Contudo, também existem evidências da relação inversa entre a expressão de *FAM3B* e o desenvolvimento tumoral. Um estudo realizado por Shiiba et al., (2012) com carcinoma oral de células escamosas, sugeriu que a baixa expressão do *FAM3B* (*Down regulation*), estaria associada com mau prognóstico em pacientes portadores deste tipo de tumor (SHIIBA et al., 2012) contrariando todos os outros dados com modelos de superexpressão e até mesmo, os com modelos de RNA de interferência que indicaram que o silenciamento de *FAM3B* resultaria em maior número de morte das células tumorais (LI et al., 2012; MOU H. et al., 2012).

Finalmente, os nossos estudos revelaram que o aumento da expressão do *FAM3B* correlaciona-se positivamente com o grau de malignidade e a presença de metástases em pacientes com tumores de próstata. Por outro lado, ensaios realizados com a linhagem celular tumoral de próstata DU145 mostraram que a superexpressão de *FAM3B* teria um efeito protetor da morte celular, aparentemente, mediado por um aumento da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 em comparação da proteína pró-apoptótica Bax e com a diminuição expressiva da atividade proteolítica da caspase -3 (MACIEL-SILVA, 2015).

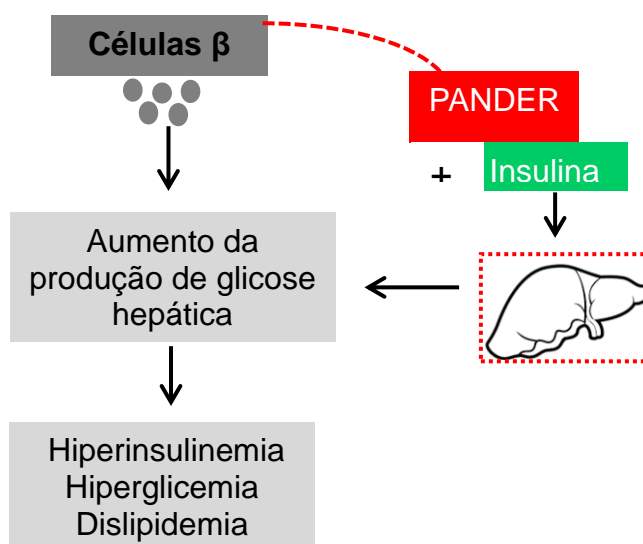
Em síntese, o *FAM3B* parece estar envolvido em diversas etapas da progressão tumoral, restando desvendar as vias metabólicas ativadas para mediar seus efeitos no desenvolvimento de tumores. Contudo, é possível que

as ações do *FAM3B* sejam distintas entre os diferentes tipos e subtipos de neoplasias, considerando o caráter pleiotrópico desta nova citocina. Sendo assim, este trabalho direcionou-se a avaliar o envolvimento desta proteína na progressão tumoral de câncer de mama, explorando a princípio a evasão da morte celular e, posteriormente, a capacidade de invadir e de formar metástase.

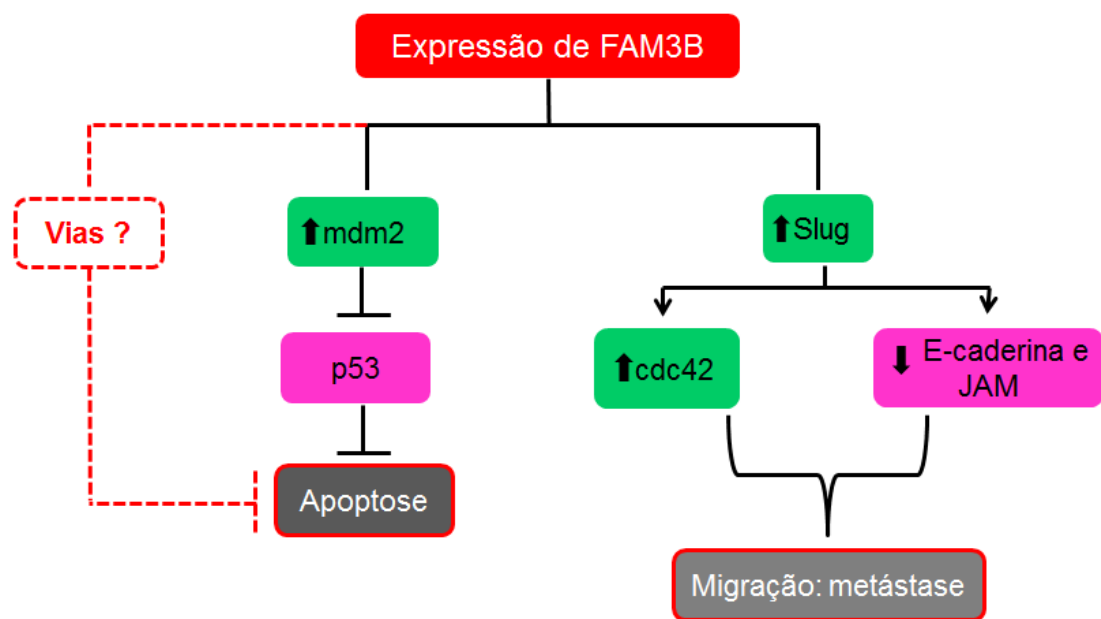
#### A. FAM3B/PANDER no Diabetes do tipo I.



#### B. FAM3B/PANDER no Diabetes do tipo II.



**Figura 4 - Possíveis funções do *FAM3B/PANDER* no controle da glicemia.** No diabetes do tipo I *FAM3B/PANDER* é capaz de induzir apoptose das células  $\beta$  pancreáticas, através de via não canônica (A). No diabetes do tipo II *FAM3B/PANDER* promove resistência seletiva à insulina, aumentando a produção de glicose hepática e desencadeando, como consequência, um quadro de hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperlipidemia (B).



**Figura 5 – Possíveis funções desempenhadas pelo *FAM3B* em tumores.** Expressão de *FAM3B* poderia induzir apoptose, por meio de mdm2 principal inibidor transcricional da p53, além da possibilidade do envolvimento de vias ainda, não conhecidas. *FAM3B* também poderia induzir aumento de Slug que, conseqüentemente, levaria a diminuição da expressão de moléculas de adesão celular como JAM e E-caderina, além de induzir cdc42 GTPase da família Rho, levando ao aumento das taxas de migração celular e, portanto, de metástase. Fonte: Adaptado Li Z. et al., (2013). Mou H. et al., (2012).





## 2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da superexpressão do FAM3B na progressão tumoral, usando a linhagem celular de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

## 2.2 Objetivos específicos

- Analisar o potencial anti-apoptótico da proteína *FAM3B*, por meio de ensaios de mensuração da morte celular por MTT e ensaios quantitativos de fragmentação de DNA;
- Elucidar as vias metabólicas, possivelmente ativadas pelo *FAM3B* na proteção à morte celular em células MDA-MB-231, através da detecção da atividade proteolítica de caspases e da expressão de genes envolvidos na apoptose;
- Avaliar o potencial invasivo da superexpressão do *FAM3B*, na linhagem MDA-MB-231, através da quantificação da taxa de migração celular *in vitro*;
- Avaliar tumorigenicidade e capacidade de invasão celular via inoculação de células MDA-MB-231-FAM3B em camundongos imunodeficientes da linhagem Balb/c *nude*;
- Analisar as modificações histopatológicas ativadas pela secreção de FAM3B nos tecidos tumorais de mama, provenientes dos camundongos.



O câncer de mama é considerado uma doença heterogênea, com diferentes subtipos tumorais, os quais conferem uma ampla variabilidade clínica para esses tumores. Devido a essa heterogeneidade, sabe-se hoje da importância da identificação de novos marcadores biológicos, que possibilitem a elaboração de métodos diagnósticos, prognósticos e de tratamento mais eficazes.

Avanços na biologia molecular têm propiciado a identificação de novos marcadores tumorais e, apesar do longo percurso até a validação e aplicação clínica, esta identificação permite que sejam desenvolvidas novas abordagens para o tratamento da doença. Os biomarcadores para o câncer de mama propiciaram o surgimento do chamado “perfil molecular” que colabora com as escolhas terapêuticas, terapia adjuvante e com o prognóstico para diferentes tipos de neoplasias. Adicionalmente dentro da perspectiva do perfil molecular, a proteína FAM3B emerge como um novo potencial marcador tumoral que vem sendo avaliado em diversos modelos que estudam o câncer (EINSENBURG, 2001; MACHADO, 2010).

Dados provenientes do nosso laboratório com as células DU145, evidências científicas de outros grupos com células HCT8 e HCT116, apontam o possível envolvimento da proteína secretada FAM3B na progressão de tumores (MACIEL-SILVA, 2015; MOU H. et al., 2012) .

Portanto, considerando a importância da descoberta de novos alvos terapêuticos derivados de proteínas secretadas de baixo peso molecular, a consecução dos objetivos propostos neste trabalho irá auxiliar na possível validação futura de um novo marcador de progressão tumoral.



#### 4.1 Cultura de células

Para todos os experimentos usamos células da linhagem MDA-MB-231 derivadas de adenocarcinoma de mama e obtidas de sítios metastáticos de efusão pleural, da glândula mamária de uma mulher caucasiana de 51 anos. Segundo Brinkley et al., (1980), essas células foram removidas de um foco de metástase nos pulmões em dezessete de outubro de 1973. A paciente já havia sido submetida a uma mastectomia no quadrante tumoral, em 1969. Além disso, também foi realizada ooforectomia, tratamento com Adriamicina, ciclofosfamida e Metotrexato, cinco dias antes das células serem obtidas para a cultura (BRINKLEY et al., 1980).

Com morfologia epitelial e propriedades aderentes, essas células expressam o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator transformante do crescimento- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) e o oncogene *WNT7B*. No entanto, não apresentam expressão de receptores hormonais, como estrógeno e progesterona e não apresentam amplificação do gene *HER2*, sendo designadas, portanto, como triplo-negativas. São capazes de formar adenocarcinoma grau III em camundongos Balb/c *nude*.

As células foram mantidas em cultura usando meio de cultura RPMI 1640 (Gibco<sup>®</sup>) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) com adição de 1% do antibiótico penicilina/estreptomicina (*Sigma*<sup>®</sup>) em atmosfera úmida de CO<sub>2</sub> (5%) em estufa aquecida a 37 °C.

#### 4.2 Superexpressão do *FAM3B*

O cDNA completo que codifica o gene *FAM3B* humano (710 bp) foi amplificado por RT-PCR a partir de RNA de Ilhotas de Langerhans, como descrito anteriormente (MACIEL-SILVA, 2015). Este cDNA do *FAM3B* foi clonado no vetor comercial pcDNA 3.1 (Life Technologies, CA. USA) usando T4 DNA ligase nos sítios de restrição *EcoR1* e *BamH1*. Para realizar os ensaios de superexpressão, 2 x 10<sup>5</sup> células MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 3 cm de diâmetro (P6), contendo meio de cultura RPMI 1640 (sem soro e sem antibióticos) e deixadas em crescimento até atingir uma confluência de 60-80%. Posteriormente foi adicionada à cultura uma mistura contendo os plasmídeos

pcDNA e pcDNA-*FAM3B* (em concentrações de 0,6–0,8 µg / mL) e 40 µL de Lipofectamina Plus®(Life Technologies, CA. USA). A seleção clonal foi feita usando o antibiótico *Geneticin*® (G418) (1 - 100 µg / mL) durante 15 dias e, desta forma, foram obtidas as células MDA-MB-231 que superexpressam o *FAM3B*. Células transfectadas com do vetor vazio denominadas MDA-MB-231-controle foram usadas como controle.

#### 4.3 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT

As células foram plaqueadas a uma concentração de  $2 \times 10^4$  células/poço, em placas de 96 poços. Cada placa recebeu os seguintes tratamentos nos tempos:

- 1) TNF- $\alpha$  citocina indutora da apoptose, via ativação de receptores de morte, com Cicloheximida (1 µg / mL), inibidor da síntese proteica. Concentrações: 1 ng / mL, 5 ng / mL e 10 ng / mL, com incubação por 24h;
- 2) Estaurosporina, agente inibidor da proteína quinase C (TAMAOKI et al., 1986), nas seguintes concentrações: 0,01 µM; 0,1 µM; 0,5 µM; 1 µM; 3 µM e 10 µM com incubação de 24 h e 48 h;
- 3) Peróxido de hidrogênio, indutor de morte celular via ativação de caspases e fragmentação de DNA, além de promover danos por estresse oxidativo no DNA (TAN S-N.; SIM S-P.; KHOO, 2016) nas concentrações de 0,01 e 0,005%, com incubação de 24 h.

A sobrevivência celular foi inferida através da análise com MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio). Este composto, quando introduzido nas células na concentração final de 5 µM, é reduzido a cristais de *formazan* pelas enzimas respiratórias produzidas na mitocôndria. Apenas células metabolicamente viáveis podem metabolizar o MTT, o que permite medir indiretamente a viabilidade celular pela quantidade de cristais de *formazan* produzidos. Mediante a solubilização destes cristais com Dimetilsulfóxido (DMSO), a leitura da coloração roxa resultante foi feita em espectrofotômetro a 570 nm de comprimento de onda.

#### 4.4 Avaliação da fragmentação de DNA

As células foram plaqueadas em uma concentração de  $3 \times 10^5$  células/poço e mantidas em cultura por um período de 24 h. Placas de 6 poços (P6), contendo células MDA-MB-231-FAM3B e células controle receberam os seguintes tratamentos, nos tempos de incubação:

- 1) TNF- $\alpha$  (+Cicloheximida) na concentração de 1 ng / mL, por 24 h;
- 2) Peróxido de hidrogênio nas diluições: 0,01% e 0,005%, por 24 h;
- 3) Estaurosporina nas concentrações: 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 20  $\mu$ M.

Neste caso, placas contendo células MDA-MB-231-FAM3B e placas com o grupo MDA-MB-231-controle, foram incubadas nos tempos: 6 h, 24 h e 48 h para análises de dose e tempo-dependência.

Após a incubação as células foram coletadas por tripsinização, lavadas 2 vezes com Tampão fosfato salino (PBS) e submetidas a centrifugação a 500 rpm por 5 min. Após a lavagem com PBS, as células foram ressuspensas em tampão de lise (10 mg/mL de iodeto de propídeo, 0,1 mM de citrato de sódio e 0,1% de Triton-X) e analisadas. Em condições desnaturantes, o iodeto de propídeo penetra em todas as células, marcando os núcleos subdiploides. A proporção de núcleos subdiploides (fragmentados) em relação aos núcleos diploides (em fase G<sub>0</sub> /G<sub>1</sub>) 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 Guava easyCyte™ a 488 nm de excitação e 588 nm de emissão.

#### 4.5 Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real (qPCR)

Para realização da análise de expressão gênica foram coletadas aproximadamente  $1 \times 10^6$  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*) a partir de 2  $\mu$ g 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 *Primer 3* 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 min. a 95 °C, e 40 ciclos de amplificação (30 segundos de desnaturação a 95 °C e 1 min. 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.

Tabela 1 - *Primers* utilizados nos experimentos de expressão gênica por qPCR

Gene	Primers	
	Sense	Antisense
<b>Bax</b>	CAAGAAGCTGAGCGAGTGTC	GAAGTTGCCGTCTGCAAACA
<b>Bcl-2</b>	CTGGGATGCCTTTGTGGAA	CAGCCAGGAGAAATCAAACAGA
<b>Bcl-X<sub>L</sub></b>	CAGACCCAGTGAGTGAGCAG	CCGGTTGCTCTGAGACATTT
<b>HPRT</b>	GAAGGTCTTGCTCGAGATGTG	TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT
<b>PANDER</b>	CCAAAATCCCTGCTCTTCATG	GCATTCTTGGCATCGTTATTCA

#### 4.6 Análise da expressão gênica por imunodeteção por Western blot

As proteínas totais das células foram extraídas por lise com detergentes não-desnaturantes (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). As amostras foram colocadas em tampão de amostra (500 mM pH 6.8 Tris-HCl, 10% Glicerol, 10% SDS, 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 poliacrilamida com SDS a 12% de concentração (30% Acrilamida, 1M pH 8.8 Tris- HCl, 10% SDS, 10% APS e 1% TEMED), com 100 V de tensão elétrica e durante 2 h. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueadas com leite e incubadas com os anticorpos primários para a proteína

*FAM3B*, e as demais proteínas (Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bak). Após lavagens com tampão de lavagem (TBST) foi feita a incubação com os anticorpos secundários Anti-IgG de camundongo e anti-IgG de coelho por 1h. A revelação foi feita usando a enzima estreptavidina-peroxidase pelo método ECL® (*GE Healthcare, USA*). A normalização foi realizada, em todos os casos, considerando a expressão das proteínas  $\beta$ -actina e  $\beta$ -tubulina.

Tabela 2 - Anticorpos utilizados nos experimentos de expressão gênica por Western blot

<b>Antígeno</b>	<b>Tipo de anticorpo</b>	<b>Procedência</b>	<b>Finalidade</b>	<b>Utilidade</b>
<b>Bax</b>	policlonal rabbit IgG	Cell Signalling	Morte celular	WB, IH, IF
<b>Bcl-2</b>	monoclonal mouse IgG	Cell Signalling	Morte celular	WB, IH, IF
<b>Bcl-XL</b>	policlonal rabbit IgG	Cell Signalling	Morte celular	WB, IH, IF
<b><math>\beta</math>-Tubulina</b>	policlonal rabbit IgG	Santa Cruz	Secundário	WB
<b>rabbit IgG</b>	Bovine anti-rabbit IgG HRP	Santa Cruz	Secundário	WB
<b>mouse IgG</b>	bovine anti-mouse IgG HRP	Santa Cruz	Secundário	WB
<b>goat IgG</b>	bovine anti-goat IgG HRP	Santa Cruz	Secundário	WB

#### 4.7 Ensaio de atividade proteolítica de caspase -3

As caspases são proteases ativadas comumente durante a iniciação e execução da apoptose e sua atividade pode ser detectada mediante a clivagem de substratos sintéticos fluorescentes. As proteínas totais foram extraídas em tampão de lise com detergentes não-desnaturantes (50 mM HEPES, 0,5 mM NaCl, 0,1% CHAPS, 10% sacarose, 10 mM DTT e inibidores de proteases) e quantificadas pelo método de *Bradford*® (*Bio-Rad*). A atividade desta enzima foi mensurada nestes extratos, contendo 50  $\mu$ g de proteína total como mínimo, por técnicas de fluorimetria. Foi usado o substrato sintético específico, Ac-DEVD-AMC (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methyl coumarin) para caspase-3, que é a principal caspase executora. Em todos os ensaios foi usado o inibidor específico das caspase zVAD-FMK como controle de especificidade de cada reação. As medições foram feitas usando um espectrômetro de placa Biotek® (Winooski, VT, USA), ajustados nos comprimentos de onda de 380 nm (excitação) e 460 nm (emissão), em que foi medida a cinética enzimática e calculada a velocidade máxima de reação ( $V_{Max}$ ). Os resultados foram expressos em RFU/min/ $\mu$ g de proteína total.

#### 4.8 Ensaio de migração celular: cicatrização de feridas

O ensaio de Cicatrização de Feridas é um método simples, que de certa forma mimetiza o processo de migração celular observado *in vivo*. Este ensaio baseia-se na realização de uma lacuna ou risca em uma monocamada de células confluentes, que resulta na migração das células ao redor da lacuna, a fim de fechar a abertura realizada para o reestabelecimento de novos contatos célula-célula. As etapas deste método compreendem imagens capturadas no início do experimento (realização da lacuna na monocamada celular) e em intervalos entre a migração das células, até o fechamento da abertura. A comparação das imagens permite inferir a taxa de migração celular (KRAMER et al., 2013).

Neste ensaio, as células subconfluentes em crescimento foram ressuspensas, lavadas duas vezes com PBS e coletadas por tripsinização. Após serem coletadas,  $5 \times 10^5$  células da linhagem MDA-MB-231-FAM3B e Controle, foram plaqueadas em placas de 6 poços, já contendo meio de cultura completo (RPMI 1640, 10% SFB e antibiótico), onde foram incubadas a 37 °C, para adesão celular. Após obtenção de uma monocamada confluyente destas células, foi realizada uma lacuna nas respectivas placas, usando uma pipeta do tipo p200. Posteriormente à realização da risca, as placas foram lavadas para remoção do debris celular resultante e, após esta etapa, foi instituído o carenciamento de soro. Foram capturadas imagens nos tempos: 0, 24, 48 e 72 h. Estas imagens foram capturadas no microscópio *Zeiss Axio* e analisadas quantitativamente, através do *software TScratch*, disponível em: <http://cse-lab.ethz.ch/software/> (GEBÄCK et al., 2009).

#### 4.9 Crescimento celular em suspensão de agarose

Uma das formas prever a capacidade de indução de tumores, ou seja, o potencial de invasão de tipos celulares, *in vitro*, é através do ensaio em suspensão de agarose, o qual demonstra a capacidade de crescimento em meio semi-sólido (agarose) (BOROWICZ et al., 2014).

As células, neste ensaio, foram plaqueadas em triplicatas na densidade de  $5 \times 10^3$  células/poço em placas com 6 poços. Foi preparado RPMI 2 x

concentrado (estéril) e duas soluções de agarose (agarose 1,2% em água bidestilada e agarose 0,6% em água bidestilada), que foram derretidas e mantidas em banho a 45 °C com o RPMI (2 x) e SFB (BOROWICZ et al., 2014).

A agarose a 1,2% (0,75 mL) foi misturada com meio RPMI 1640 2 X (0,5 mL). Após a solidificação da primeira mistura na placa, foram plaqueadas 5 x 10<sup>3</sup> células/poço em uma solução de agarose 0,6% (0,75 mL) com meio 2 X (0,75 mL). As placas foram incubadas na estufa à 5% CO<sub>2</sub>/ar e 37 °C e ao final de 4 semanas as colônias foram coradas com cristal violeta, contadas e o crescimento foi quantificado, com base na contagem do número de colônias desenvolvidas em relação ao número de células plaqueadas.

#### 4.9.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas 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 h 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 registrado sob nº13 nas fls 15 do livro 03 para uso de animais em experimentação aprovado em 27.03.2014, com validade de quatro anos.

##### 4.10.1 Inoculação de células MDA-MB-231 com luciferase via subcutânea em camundongos imunodeficientes

Para avaliar o crescimento tumoral *in vivo* e a formação de possíveis focos de metástase espontânea, células MDA-231FAM3B e células Controle foram cultivadas durante 48 h, em ausência de soro fetal bovino. Para utilização da técnica de visualização dos tumores por imagens, através da bioluminescência no equipamento *IVIS Spectrum* do Centro de Facilidades para Pesquisa (CEFAP), foi inserida a proteína luciferase usando o vetor

lentiviral, pLV-CMV-SV40, gentilmente cedida pela Dra. Clarissa Ribeiro Reily Rocha, pós doutoranda, do laboratório de Reparo Celular do departamento de Microbiologia (ICB – USP). Para expressão da luciferase,  $1 \times 10^6$  células MDA-MB-231-FAM3B e Controle foram incubadas por 1 h com 500 uL da mistura de luciferase com o vetor lentiviral ( $1 \times 10^7$  unidades de infecção). Após a coleta as células foram ressuspendidas, a temperatura de 4 °C, em 200 µl de meio de cultura contendo *Matrigel*<sup>®</sup> (Life Science, Homi Kapadia, EUA) e foram injetadas por via subcutânea em ambas as regiões da glândula mamária de camundongos fêmeas imunodeficientes Balb/c *nude*. Ambos os grupos (FAM3B e controle, n=3) foram mantidos em observação durante 45 dias, alimentados com ração balanceada e supridos com água *ad libitum* como previamente descrito na literatura (PRICE, 2014).

#### 4.10.2 Avaliação do peso e da massa tumoral dos animais

É preconizada a mínima manipulação dos animais em experimentos por estar razão, realizou-se apenas duas vezes por semana a higienização das gaiolas de policarbonato, verificação do peso e medidas de tumores existentes. O peso corporal foi monitorado uma vez por semana durante o período da tarde, visando o menor nível de desconforto para os animais. Para verificar a massa corporal os animais foram transportados para uma capela higienizada anteriormente e assim que aberta a gaiola, cada animal foi retirado da sua gaiola na sequência segundo sua marcação e colocada em uma balança de precisão. Este procedimento foi realizado pelo mesmo pesquisador e no total foram mensurados seis vezes no período de 45 dias. O peso foi considerado o valor marcado no momento quando o animal menos se movimentou, sem interferência do pesquisador, a fim de minimizar o estresse causado pela manipulação. Em busca de diminuir o contágio por patógenos externos todos os materiais usados para a pesagem eram descartáveis e/ou esterilizados.

A mensuração da massa tumoral ocorreu a partir da visualização de massa subcutânea no animal. O volume do tumor foi medido usando um paquímetro manual e calculado através da medida dos diâmetros, segundo o método de Caliper, pela fórmula  $[V(\text{mm}^3) = (\pi/6 (\text{peso} \times \text{largura}^2)]$  (STEINER et al., 2007). 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 MDA-MB-231FAM3B.

O desconforto e a dor do animal referente ao desenvolvimento do tumor 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.

#### 4.10.3 Eutanásia dos animais

A eutanásia foi realizada de acordo com os protocolos autorizados pelo o Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB-USP e ocorreu, após 45 dias da inoculação das células MDA-231 FAM3B e células controle (MDA-231). 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 imunohistoquímica do tecido tumoral

#### 4.11.1 Processamento do material proveniente de tumores

Após a dissecação, foi feita a fixação em 10% de formaldeído tamponado (pH 7,5) dos fragmentos tumorais em blocos de parafina. 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. O material foi imerso em xilol durante duas h e posteriormente mantido na parafina durante 12 h dentro de uma estufa a 37 °C, seguidas por uma nova imersão na parafina durante 2 h. 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 h. 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 1 h.

#### 4.11.2 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 Exposição antigênica

Após a desparafinização as lâminas foram colocadas em álcool absoluto 100% por 5 minutos (2 vezes), álcool 96% por 3 minutos (2 vezes), e por 5 minutos água destilada. Na etapa seguinte, as lâminas foram hidratadas com solução *wash buffer*. Para exposição dos epítomos as lâminas foram colocadas em panela a vapor imersas em tampão citrato (2,1 g de ácido cítrico monohidratado dissolvido em 1000 mL de água destilada, ajustando o pH 6,0 com NaOH), por 30 minutos.

As reações de imunohistoquímica foram realizadas pelo método imunoperoxidase com o “kit” *Envision Peroxidase System HRP (horseradish-peroxidase)*, (Dako, Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Após recuperação antigênica, as lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente por 30 a 40 minutos seguido do bloqueio da peroxidase

endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em álcool metílico, por 30 minutos.

O bloqueio inespecífico foi realizado com soro não imune de cavalo (Vector, Califórnia, EUA), na diluição de 1:70 em tampão *wash buffer* com 1% de albumina sérica bovina, por 30 minutos. O excesso da solução de bloqueio foi retirado e as lâminas incubadas com o anticorpo primário anti-Bcl-2, anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA), com 1% de BSA em *wash buffer* e *overnight*, 4 °C, em câmara úmida. Em seguida os cortes foram incubados com, anticorpos secundários, *Envision System-HRP* (Dako, Califórnia, EUA) durante 30 minutos. O substrato cromogênico utilizado foi o 3-*Amino-9-Ethyl-Carbazol* (AEC) por 15 minutos. As células que expressam as proteínas apresentam cor vermelha acastanhada.

Após a revelação, os cortes foram contra-corados com Hemalumbre de Harris. Todas as lâminas foram finalizadas com gelatina (DAKO Glycergel® - (Dako Glostrup, Dinamarca).

#### 4.12 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística realizada com o 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 significância estatística entre as médias foi inferida pelo teste *t* de *Student* e *Two-way ANOVA*. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de  $p < 0,05$ .





### 5.1 Superexpressão do *FAM3B* nas células MDA-MB-231

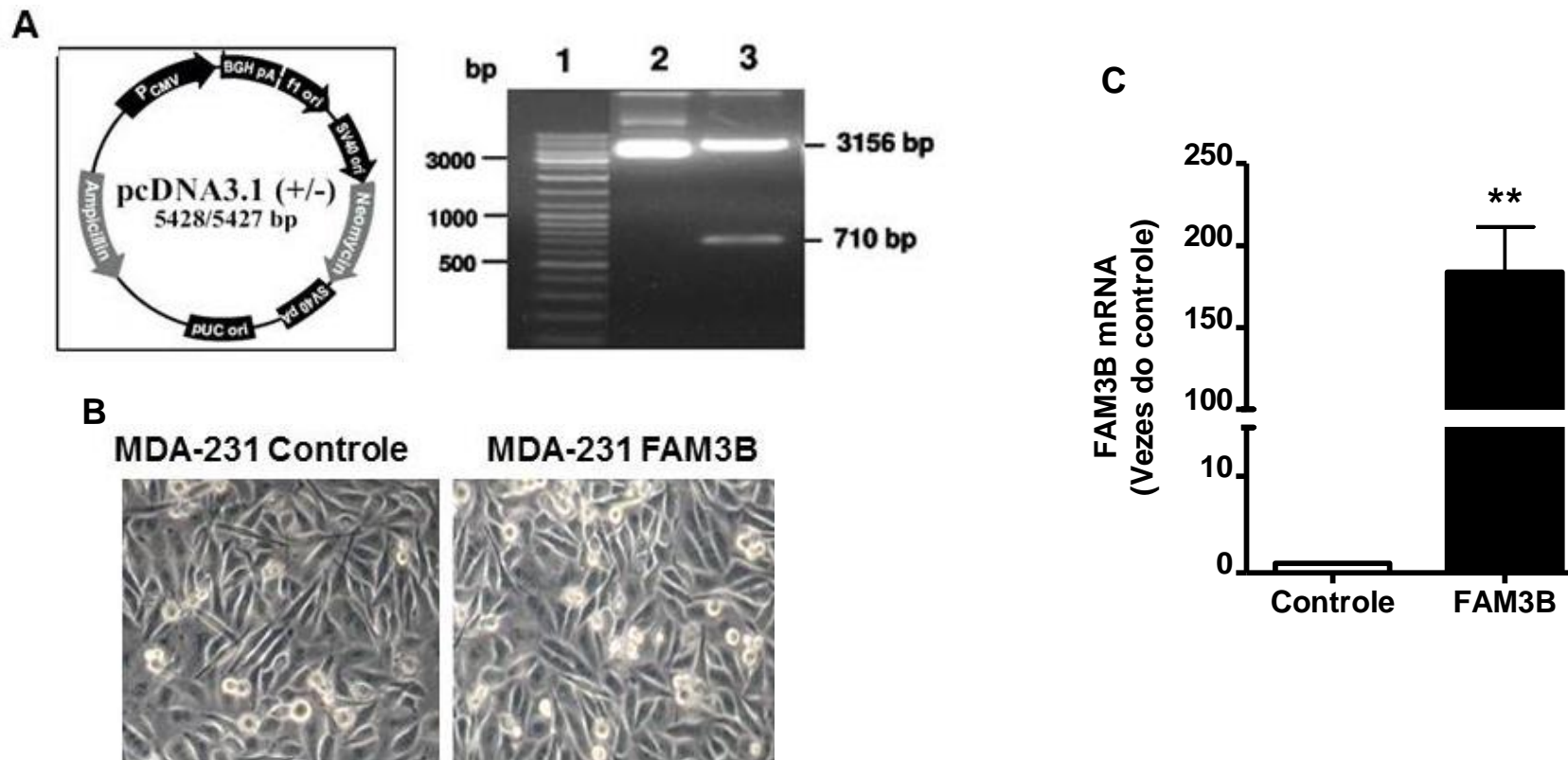
Após a transfecção e seleção, as células MDA-MB-231 pcDNA (Controle) e MDA-MB-231-FAM3B não mostraram diferenças morfológicas evidentes quando observadas ao microscópio (Figura 6B). Na análise por PCR quantitativo (qPCR), após a segunda passagem das células transfectadas, foi observado um aumento ~200 vezes na expressão gênica ao nível de mRNA nas células MDA-MB-231FAM3B, em relação as células controle transfectadas com o vetor vazio (Figura 6C).

### 5.2 Superexpressão do FAM3B aumenta viabilidade celular após tratamento com TNF- $\alpha$ e Estaurosporina

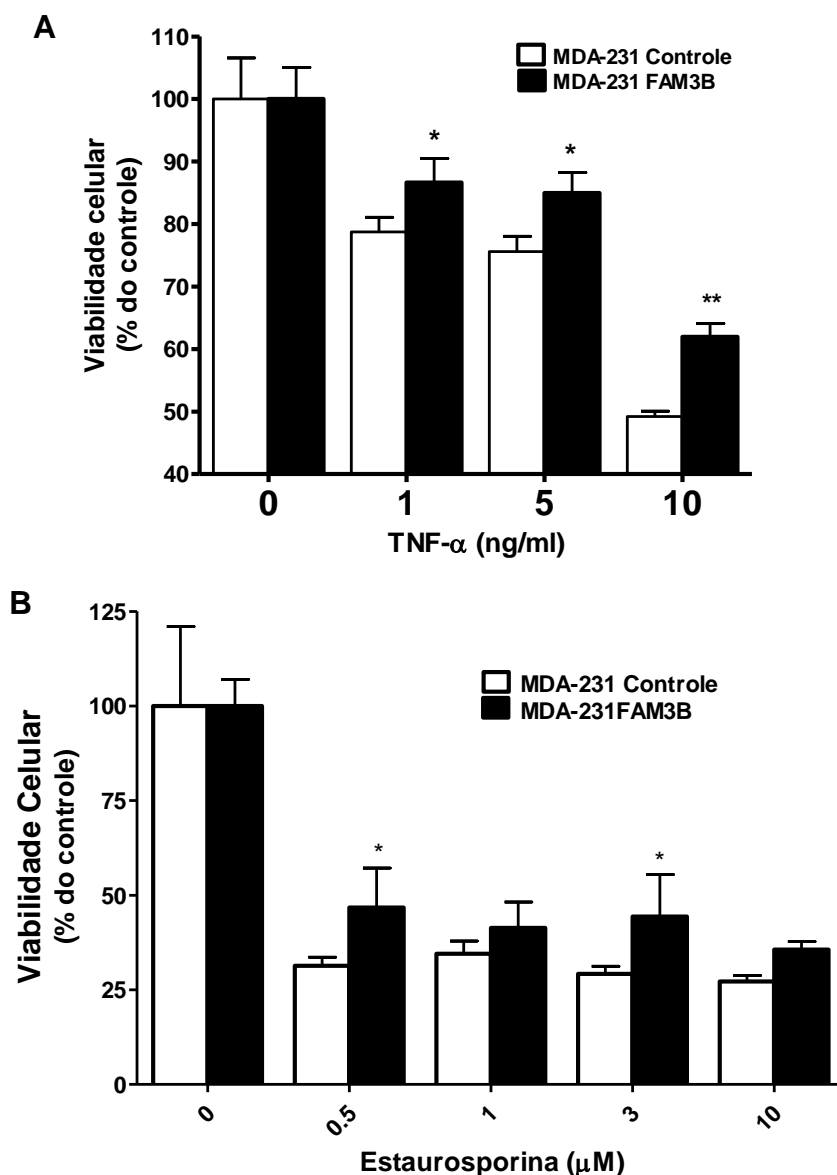
Através dos ensaios de viabilidade celular com MTT, foi possível verificar que a superexpressão da proteína FAM3B em células MDA-MB-231, é capaz de atenuar a morte celular induzida por TNF- $\alpha$ , em diferentes concentrações de TNF- $\alpha$  (1 ng / mL, 5 ng / mL e 10 ng / mL) + Cicloheximida (1  $\mu$ g / mL) (Figura 7A). Da mesma forma, foi observado que mediante a superexpressão do *FAM3B*, houve uma maior viabilidade celular nas células MDA-MB-231, após tratamento com o indutor de morte Estaurosporina, em diferentes concentrações (0,01  $\mu$ M; 0,1  $\mu$ M; 0,5  $\mu$ M; 1,0  $\mu$ M; 3  $\mu$ M; 10  $\mu$ M), por 24h (Figura 7B). Este efeito protetor da proteína observado nas células MDA-MB-231-FAM3B parece ser dose-dependente, em que houve um aumento significativo da viabilidade celular, em comparação ao controle.

### 5.3 Superexpressão de *FAM3B* diminui as taxas fragmentação de DNA

Considerando que a fragmentação de DNA, inferida através da taxa de núcleos subdiploides, é um bom indicador de apoptose, as análises foram feitas com as células MDA-MB-231-FAM3B e Controle, através da incorporação de iodeto de propídeo (PI), utilizado como marcador de DNA. Com este ensaio foi verificada indução da morte celular, por meio da porcentagem de núcleos subdiploides (fragmentados) marcados com PI.



**Figura 6 - Geração da Linhagem MDA-MB-231-FAM3B.** O cDNA completo do FAM3B (710 bp) foi clonado no vetor pcDNA (A). Análise em microscópio de luz visível a 200X de aumento das células MDA-MB-231 transfectadas com o vetor vazio (pcDNA-controle) e com o vetor contendo o cDNA do FAM3B (pcDNA-FAM3B) (B). A expressão de FAM3B em células MDA-MB-231 foi analisada por qPCR e normalizada pela expressão do gene HPRT (C). Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste t *Student*. \*\*  $p < 0,005$  versus controle.



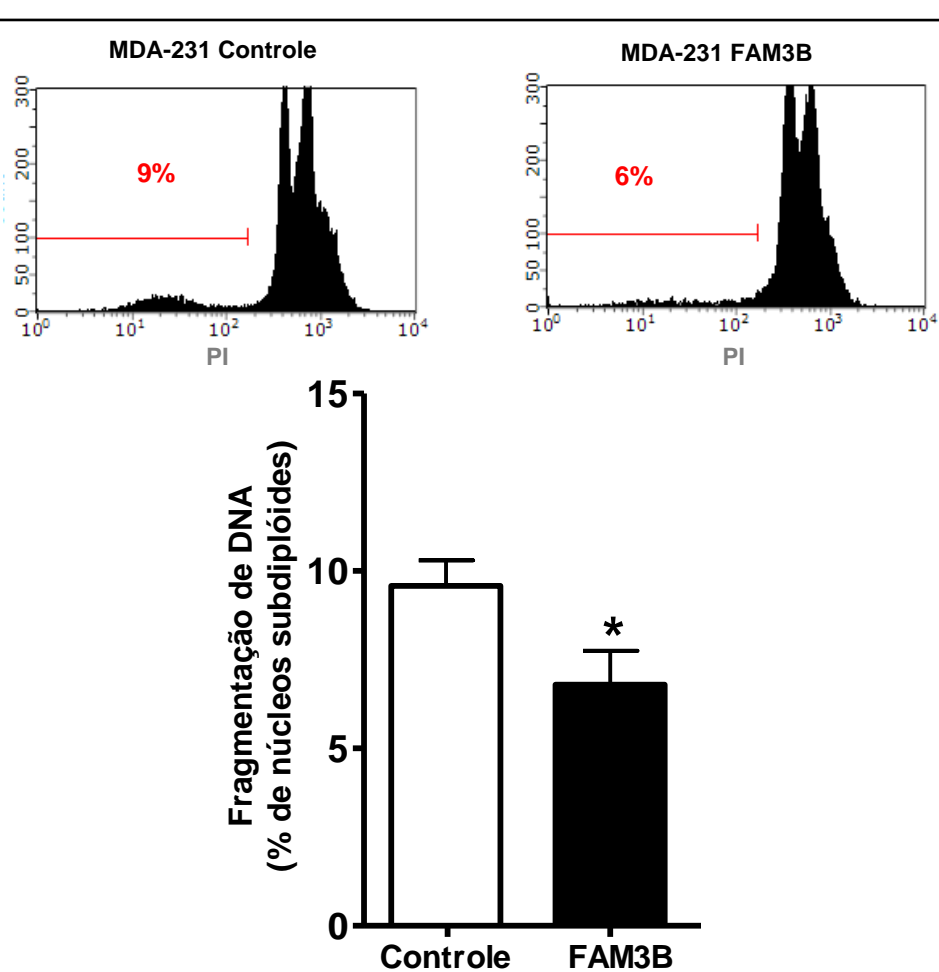
**Figura 7 - Análise da viabilidade celular por MTT após tratamento com Indutores de morte.** Células MDA-MB-231-FAM3B e MDA-MB-231-controle foram plaqueadas a uma concentração de  $2 \times 10^4$  célula/poço em placas de 96 poços. Células foram tratadas com TNF- $\alpha$  (1 ng/mL, 5 ng/mL e 10 ng/mL) + Cicloheximida (1  $\mu$ g / mL) (A) e Estaurosporina (0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M e 10  $\mu$ M) (B), com incubação por 24 h. Foi possível observar que o FAM3B foi capaz de aumentar a viabilidade em diferentes tempos e doses de tratamento com os indutores de morte. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 570 nm de comprimento de onda. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste *two-way ANOVA*. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ .

Após tratamento com 1 ng / mL de TNF- $\alpha$  + Cicloheximida (1  $\mu$ g / mL) foi observado uma taxa menor de fragmentação de DNA nas células MDA-MB-231FAM3B, em relação às células controle, com uma diferença de cerca de 9,5% vs 6,7% de núcleos fragmentados entre os grupos (Figura 8).

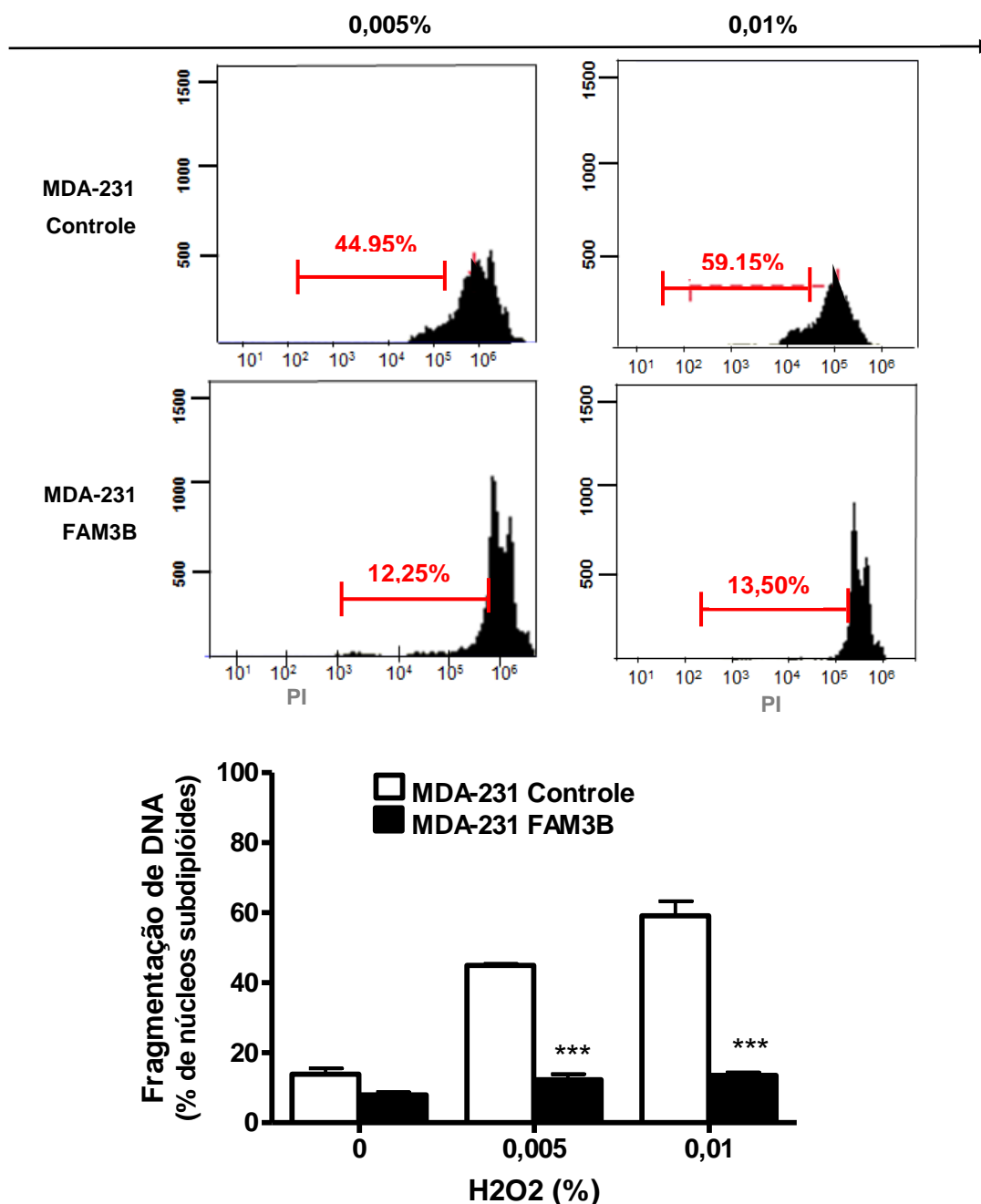
No tratamento com Peróxido de hidrogênio, na diluição de 0,005%, por 24h, observou-se uma taxa de 44,5% no grupo controle vs 12,25% núcleos fragmentados no grupo FAM3B; na diluição de 0,01% 59,1% núcleos fragmentados no controle vs 13,5% nas células com superexpressão do FAM3B (Figura 9).

No tratamento com Estaurosporina durante 24 h, houve uma redução, um pouco mais discreta, mas significativa de 17,67% no grupo controle vs 15,39% na dose de 2,5  $\mu$ M nas células MDA-MB-231-FAM3B; 25,82% vs 17,75% na concentração de 5  $\mu$ M; na concentração de 10  $\mu$ M 36,61% vs 23,51%; na dose de 20  $\mu$ M, 48,77% vs 40,36% de núcleos fragmentados (Figura 10A). Em 48 h, após o tratamento com Estaurosporina, houve uma redução nas taxas de núcleos subdiploides, nas células MDA-MB-231-FAM3B, com 24,86 vs 17,62 na concentração de 2,5  $\mu$ M; de 35,11% vs 26,02% na concentração de 5  $\mu$ M; de 47,56 vs 40,62 na dose de 10  $\mu$ M e de 80,92% vs 67,65% na dose 20  $\mu$ M (Figura 10B).

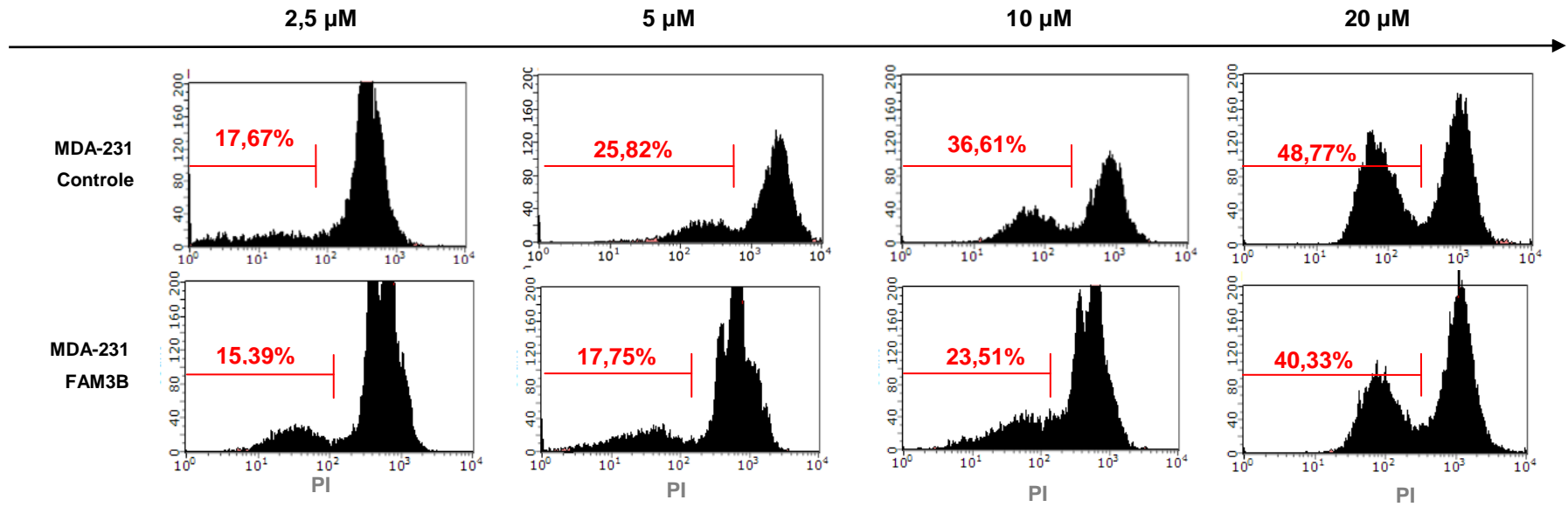
Nas análises de tempo-dependência, da mesma forma, foi possível observar uma menor porcentagem de núcleos subdiploides, quando a morte celular foi induzida com Estaurosporina nos tempos de 24 h e 48 h em todas as concentrações do indutor, nas células MDA-MB-231-FAM3B, com os valores entre as células controle e as células com superexpressão de FAM3B de: na dose de 2,5  $\mu$ M foi possível observar (Controle vs FAM3B) 6,66 vs 9 em 6 h, em 24 h 17,65 vs 15,34 e de 24,65 vs 17,97, em 48 h (Figura 11A); na dose de 5  $\mu$ M 7,39 vs 12,58 em 6 h, 26,45 vs 18,5 em 24 h, 35,16 vs 26,06 em 48 h (Figura 10B); na concentração de 10  $\mu$ M, observou-se 8,14 vs 12,07 em 6 h, 35,16 vs 24,07 em 24 h e 44,55 vs 40,42 em 48 h de núcleos fragmentados (Figura 10C).



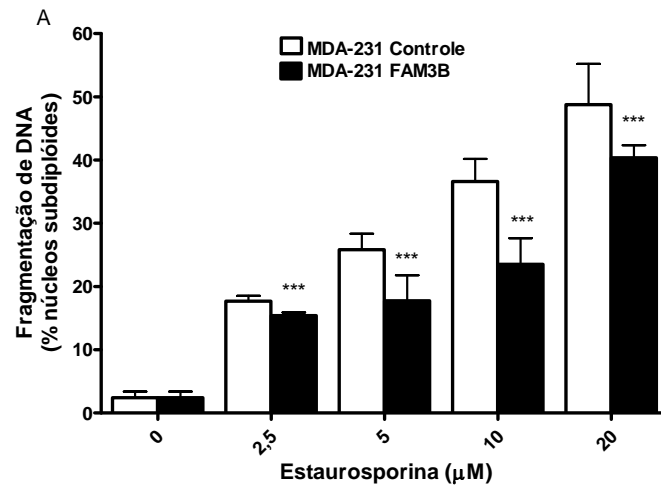
**Figura 8 - Avaliação da fragmentação de DNA após tratamento com TNF- $\alpha$ .** Células MDA-MB-231-FAM3B e MDA-MB-231-controle foram plaqueadas na concentração de  $3 \times 10^5$  células/poço e tratadas com 1 ng / mL de TNF- $\alpha$  + Cicloheximida. Após 24 h as células foram tripsinizadas e detectadas com PI em condições não desnaturantes. Como observado, após 24 h as células superexpressando o *FAM3B* tiveram uma redução de aproximadamente nas taxas de núcleos subdiploides em relação ao controle. As amostras foram analisadas no citômetro de Guava easyCyte™. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student. \*  $p < 0,05$ .



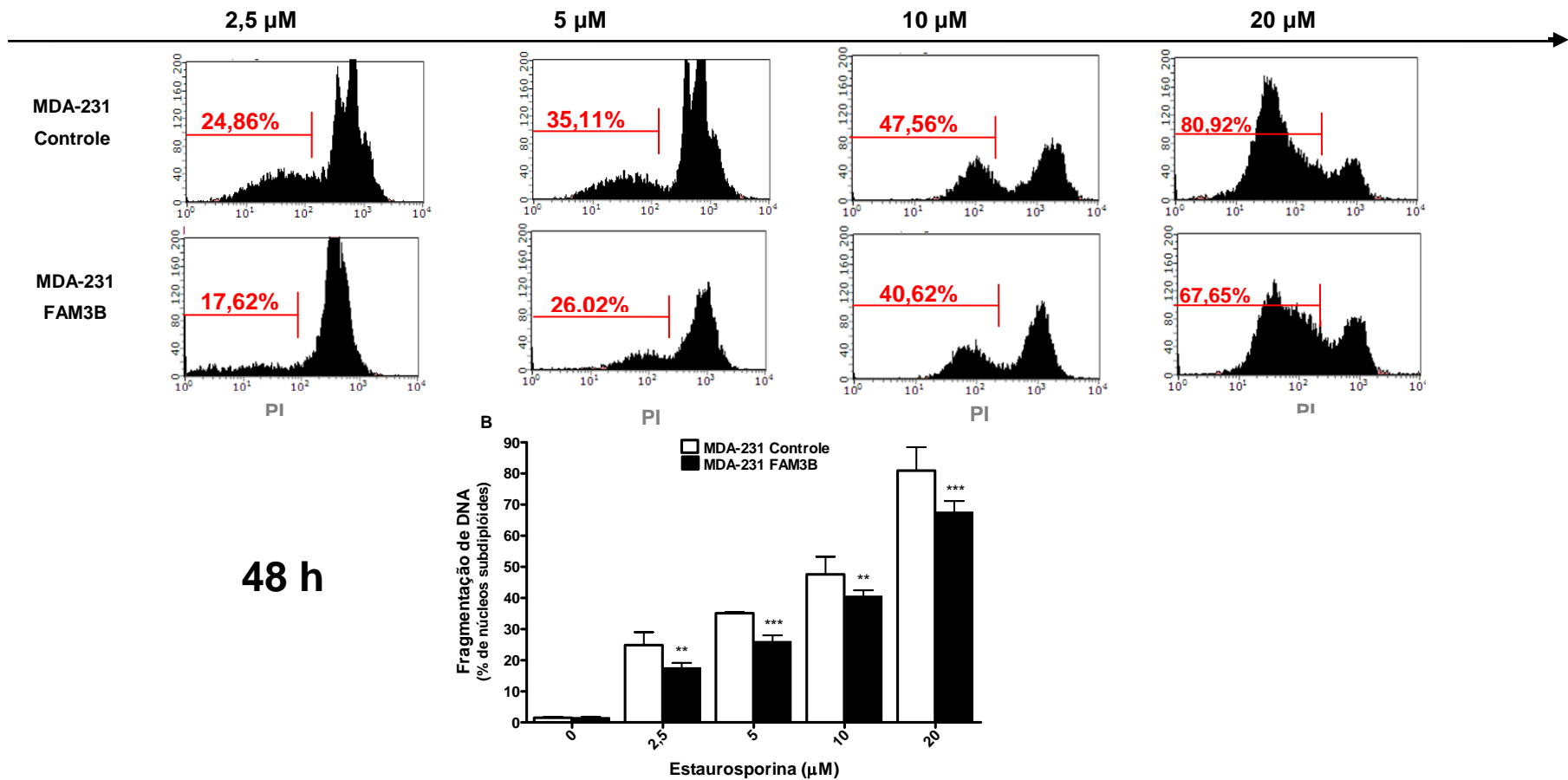
**Figura 9 - Avaliação da fragmentação de DNA após tratamento com Peróxido de hidrogênio.** As Células MDA-MB-231-FAM3B e MDA-MB-231-controle foram plaqueadas na concentração de  $3 \times 10^5$  células/poço e tratadas com 0,01% e 0,005% de Peróxido de hidrogênio. Após 24 h as células foram tripsinizadas e detectadas com PI em condições não desnaturantes. Como observado, após 24 h as células superexpressando o FAM3B tiveram menores taxas de núcleos subdiploides, em relação às células controle. As amostras foram analisadas no citômetro Guava easyCyte™. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste *two-way ANOVA*. \*\*\* $p < 0,0005$ .



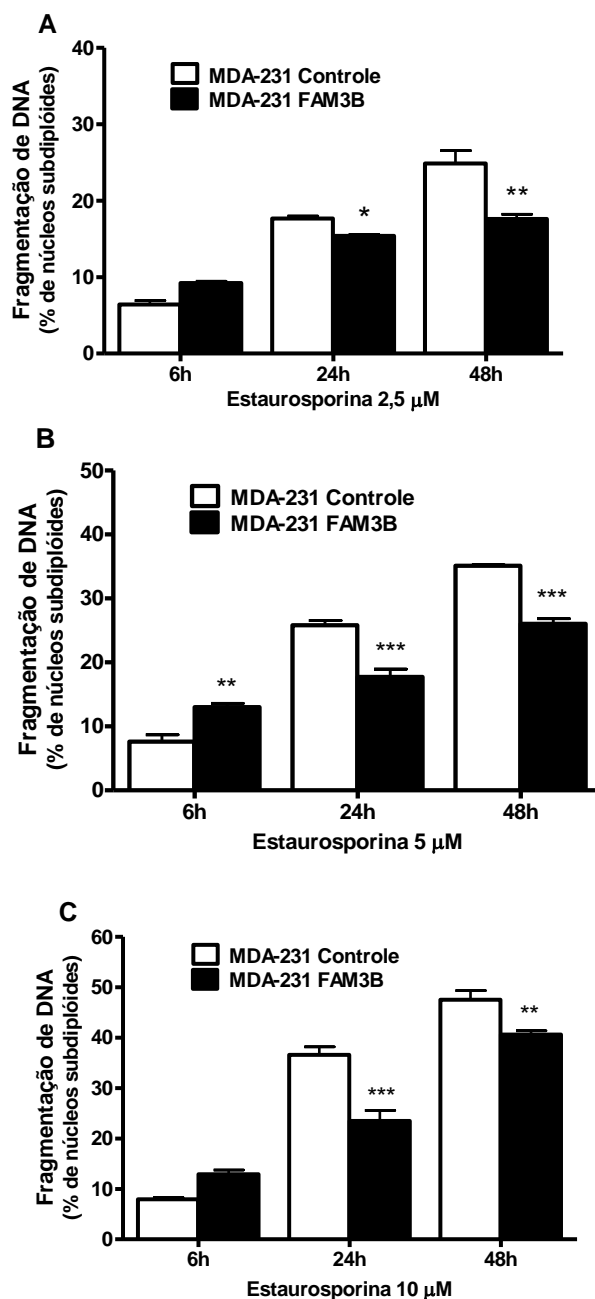
24 h







**Figura 10 - Avaliação dose-dependente da fragmentação de DNA após tratamento com Estaursporina.** As Células MDA-MB-231-FAM3B e MDA-MB-231-controle foram plaqueadas na concentração de  $3 \times 10^5$  células/poço e tratadas com 2,5 μM, 5 μM, 10 μM e 20 μM de Estaursporina. Após 24 h e 48 h as células foram tripsinizadas e detectadas com PI em condições não desnaturantes. Como observado, após 24 h e 48 h as células superexpressando o FAM3B tiveram menores taxas de núcleos subdiploides, em relação às células controle (A, B). As amostras foram analisadas no citômetro Guava easyCyte™. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste *two-way ANOVA*. \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$ .



**Figura 11 - Avaliação da fragmentação de DNA modo tempo-dependente após tratamento com Estaurosporina.** Células MDA-MB-231-FAM3B e MDA-MB-231-controle foram tratadas com diferentes doses de Estaurosporina (2,5 μM, 5 μM e 10 μM) em diferentes tempos (6 h, 24 h e 48 h). Após os tempos indicados as células foram tripsinizadas e detectadas com PI em condições não desnaturantes. Após 24 h e 48 h, observou-se uma redução nos núcleos subdiploides, nas células com superexpressão de FAM3B em um modo tempo-dependente. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo *Guava easyCyte™*. Os resultados são expressos como média ± erro padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste *two-way ANOVA*. \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$ .

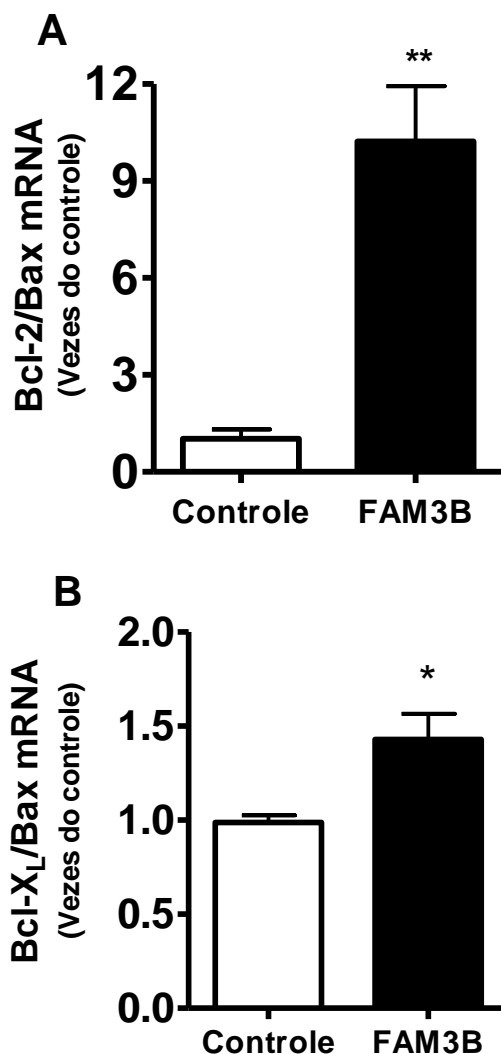
#### 5.4 Superexpressão de FAM3B aumenta expressão de genes anti-apoptóticos da família *Bcl-2*

A quantificação da expressão de genes da família *Bcl-2* (*Bax*, *Bcl-2*, *Bcl-xL*), feita através de PCR em tempo real, permitiu verificar que a superexpressão do *FAM3B* em células MDA-MB-231 é acompanhada pelo aumento da razão de expressão dos membros anti-apoptóticos *Bcl-2* e *Bcl-xL* (aumento de aproximadamente 10 e 1,5 vezes respectivamente), quando comparado com a proteína pró-apoptótica *Bax* (Figura 12A-B).

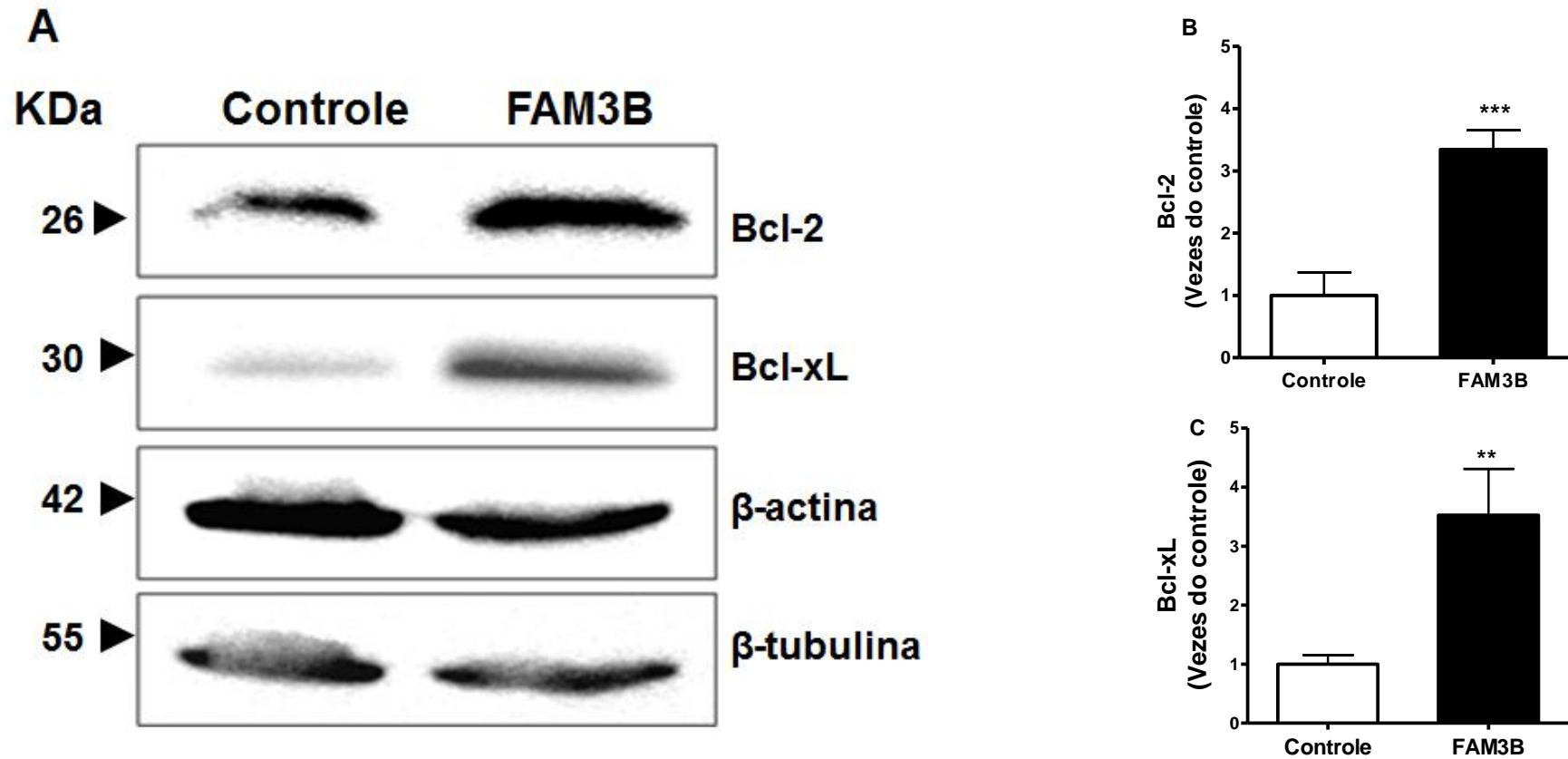
Estes resultados foram verificados ao nível de proteína pela técnica de Western blot, em que confirmamos o efeito da superexpressão do *FAM3B* no aumento da expressão das proteínas *Bcl-2* (Figura 13B) e *Bcl-xL* (Figura 13C) em 2 vezes, aproximadamente, quando comparadas a células controle. Todavia, não foi possível detectar a presença da proteína *Bax* devido, provavelmente, a perda de especificidade do anticorpo.

#### 5.5 Atividade proteolítica de caspase -3 é menor em células MDA-MB-231-FAM3B

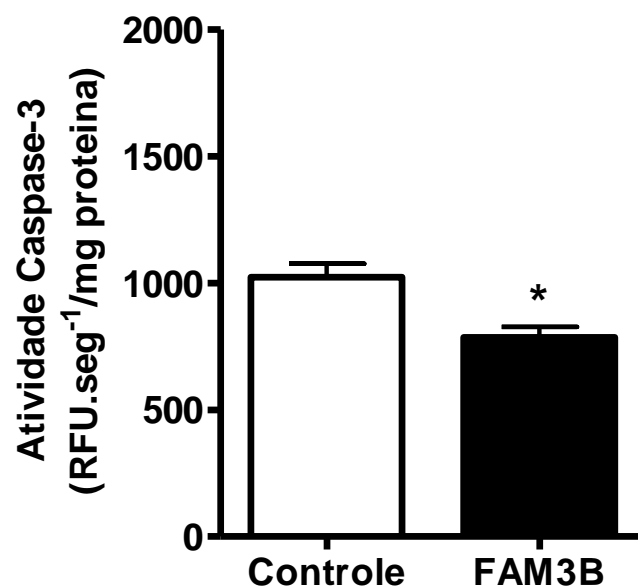
Com o intuito de confirmar o envolvimento da via proteolítica das caspases nos mecanismos de inibição de morte celular ativados pela proteína *FAM3B* realizamos a medição da atividade proteolítica da caspase-3, a principal caspase executora, em ensaios de proteólise *in vitro*. Como observado, na Figura 14, a velocidade de clivagem do substrato sintético DEVD-AMC é menor em células MDA-MB-231-FAM3B, apontando que uma possível inibição da atividade das caspases seria mediada pela ação exógena desta citocina.



**Figura 12 - Análise da expressão gênica de genes anti-apoptóticos da família *Bcl-2* ao nível de mRNA.** Foram coletadas aproximadamente  $1 \times 10^6$  das células MDA-MB-231-FAM3B e controle. A extração de RNA total foi realizada pelo método Trizol® (*Invitrogen-Life Technologies, CA, USA*) e a expressão gênica foi quantificada por RT-PCR usando o sistema Sybr®Green. Como observado, a superexpressão de *FAM3B* acompanha aumento na expressão de *Bcl-2* em relação à *Bax* ao nível de mRNA (A). A relação da expressão de *Bcl-xL* vs *Bax* foi maior nas células com superexpressão de *FAM3B* em relação ao grupo controle (B). Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student. \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ .



**Figura 13 - Análise da expressão gênica dos membros anti-apoptóticos da família *Bcl-2* ao nível de proteína.** As proteínas totais das células MDA-MB-231-FAM3B e controle foram extraídas por lise com detergentes não-desnaturantes e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS. Em seguida, foram transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueadas com leite e incubadas com os anticorpos primários para Bcl-2, Bcl-xL,  $\beta$ -actina e  $\beta$ -tubulina. A revelação foi feita usando a enzima estreptavidina-peroxidase pelo método quimioluminescente. A normalização da expressão de Bcl-2 e Bcl-xL foi realizada, em todos os casos, considerando a expressão das proteínas  $\beta$ -actina e  $\beta$ -tubulina. Como observado, houve um aumento na expressão de Bcl-2 (A) e Bcl-xL (B) nas células com superexpressão de FAM3B, em relação ao grupo controle. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste t de *Student*. \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$



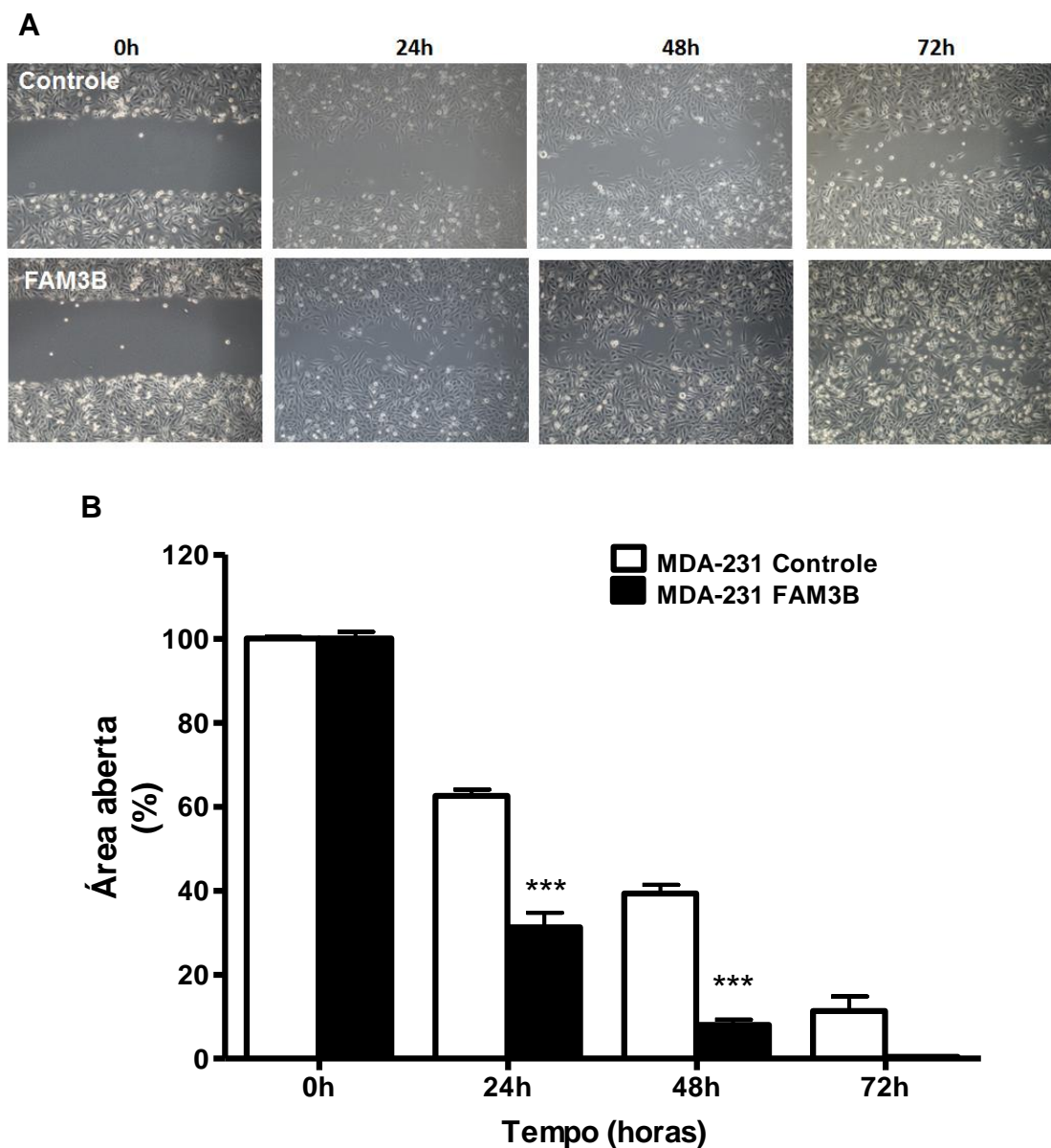
**Figura 14 - Quantificação da atividade proteolítica de caspase-3.** As proteínas totais das células MDA-MB-231-FAM3B e controle foram extraídas em tampão de lise e quantificadas pelo método de Bradford. A atividade de caspase-3 foi medida pela clivagem do substrato fluorimétrico sintético zDEVD-AMC em espectrômetro de placa. Foi identificada uma redução na atividade proteolítica da caspase -3 em células MDA-MB-231-FAM3B em relação as células controle. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste t de *Student*. \*  $p < 0,05$ .

## 5.6 Aumento da migração celular nas células MDA-MB-231-FAM3B

Para mimetizar o processo de migração celular observado *in vivo*,  $5 \times 10^5$  células MDA-MB-231-FAM3B e MDA-MB-231-controle foram plaqueadas em placas de 6 poços. Após a realização de uma lacuna, na monocamada de células confluentes, foi observado uma redução da área aberta de, aproximadamente, 68% nas células MDA-MB-231-FAM3B vs 37% nas células Controle, em 24h; uma redução do espaço de 92% nas células superexpressando o FAM3B vs 60% no grupo controle, após 48h; um fechamento quase que completo nas células MDA-MB-231-FAM3B, com 99% de redução da lacuna vs 88% nas células Controle, depois de 72h. Foi possível observar, uma redução de cerca de 30% do espaço aberto, mediante a superexpressão do FAM3B, em 24h e 48h, sugerindo uma maior taxa de migração celular mediada pelas ações deste gene (Figura 15A-B).

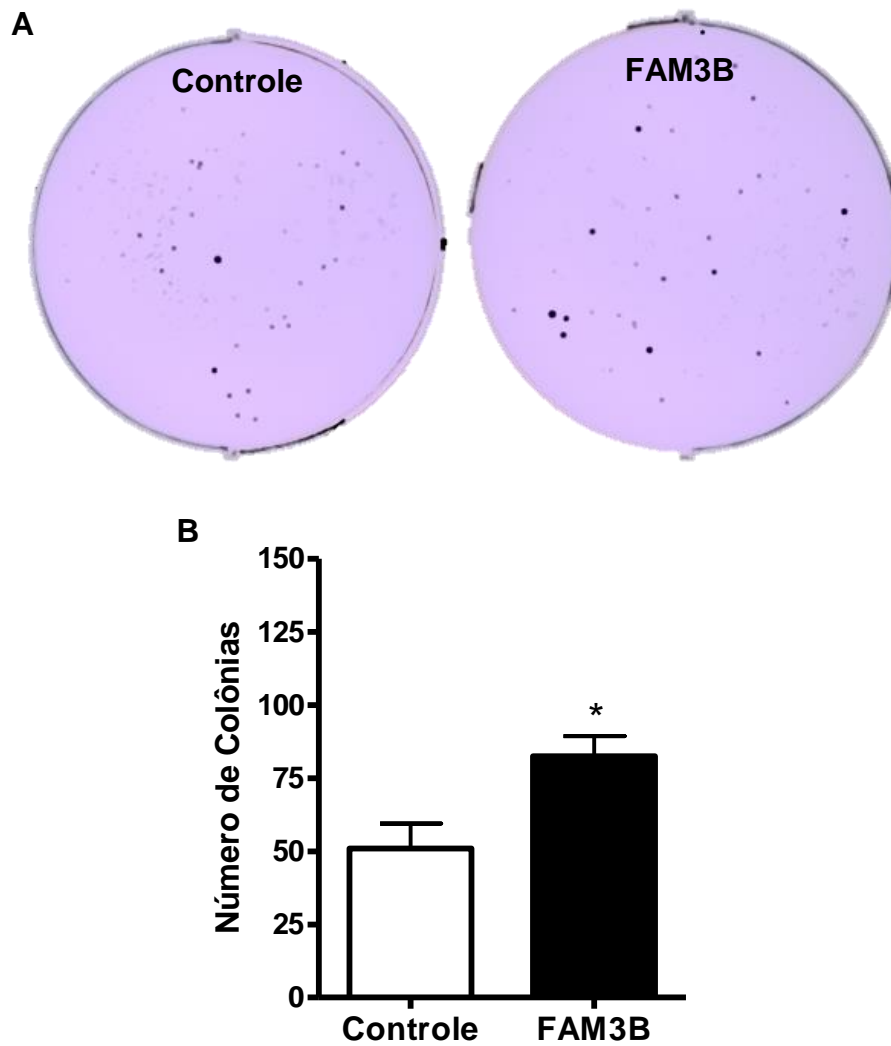
## 5.7 Aumento da formação de colônias em células MDA-MB-231-FAM3B

Após preparar duas soluções de agarose (1,2% e 0,6%),  $5 \times 10^3$  células MDA-MB-231-FAM3B e Controle foram plaqueadas em triplicatas. Ao final de 4 semanas, foi possível observar 30 colônias nas células MDA-MB-231-controle vs 50 colônias nas células MDA-MB-231-FAM3B, o que sugere um possível aumento do potencial invasivo, conferido pela superexpressão do FAM3B (Figura 16A-B).



**Figura 15 - Avaliação da migração celular em células MDA-MB-231-FAM3B.** Células MDA-MB-231-FAM3B e MDA-MB-231-controle foram plaqueadas em uma densidade  $5 \times 10^5$  células/poço. Após 24 h foi realizada uma lacuna na camada subconfluentes de células. Como observado (A-B), as células com superexpressão do FAM3B, possivelmente migraram mais em prol do fechamento da lacuna, em relação às células controle nos tempos indicados (0 h, 24 h, 48 h, 72 h). Resultados obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste *two-way ANOVA*. \*\*\*  $p < 0,001$ .





**Figura 16 - Avaliação do crescimento celular em suspensão de agarose.** Células MDA-MB-231-FAM3B e controle na densidade de  $3 \times 10^3$  células por poço foram plaqueadas em triplicatas em placas de 6 poços. Após quatro semanas as colônias foram coradas com cristal violeta e contadas (A). Foi observado maior número de colônias nas células com superexpressão do FAM3B, em relação às células Controle, com 50 vs 30 colônias, respectivamente (A-B). Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student. \*  $p < 0,05$ .

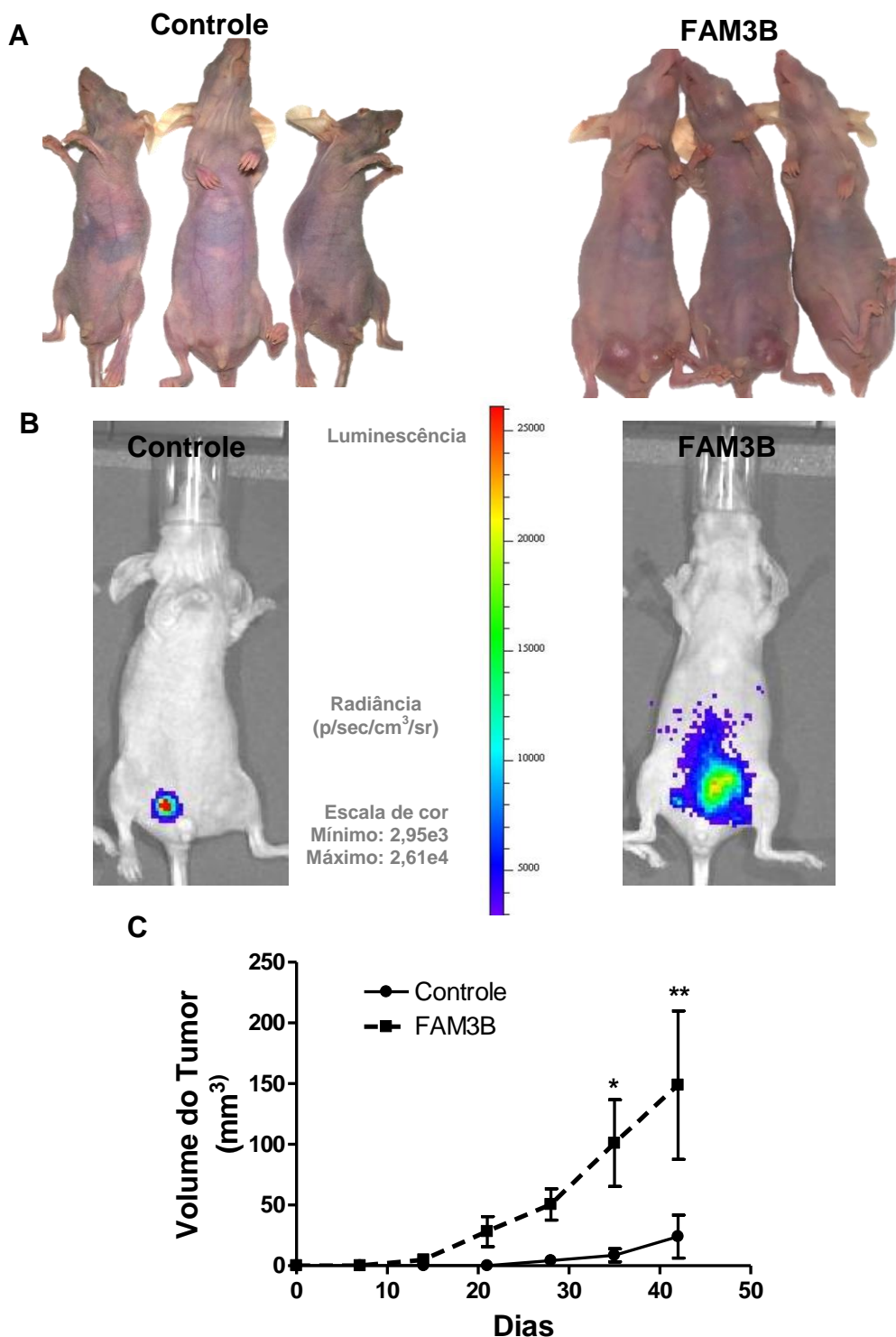
### 5.8 FAM3B aumenta o volume e o tamanho dos tumores em camundongos imunodeficientes

Foi possível observar após 30 dias da inoculação das células MDA-MB-231-FAM3B, um aumento significativo de cerca de 90% do volume tumoral no grupo FAM3B, em relação ao grupo dos animais com as células controle (Figura 17A-C). Além da massa tumoral visível, foi possível observar através das imagens obtidas no *IVIS Spectrum* do CEFAP, a provável extensão tumoral maior nas fêmeas contendo as células MDA-MB-231-FAM3B, sugerindo um aumento da invasividade conferida pelo *FAM3B* (Figura 17B). Da mesma forma, o tamanho do tumor no dia da eutanásia dos animais, também foi maior no grupo FAM3B, sendo que foi possível observar tumores distantes do local de origem, em que as células foram inoculadas (glândula mamária), o que permite a especulação de que é possível ocorrer um incremento da atividade metastática, mediado pelas ações do *FAM3B* (Figura 18A-B).

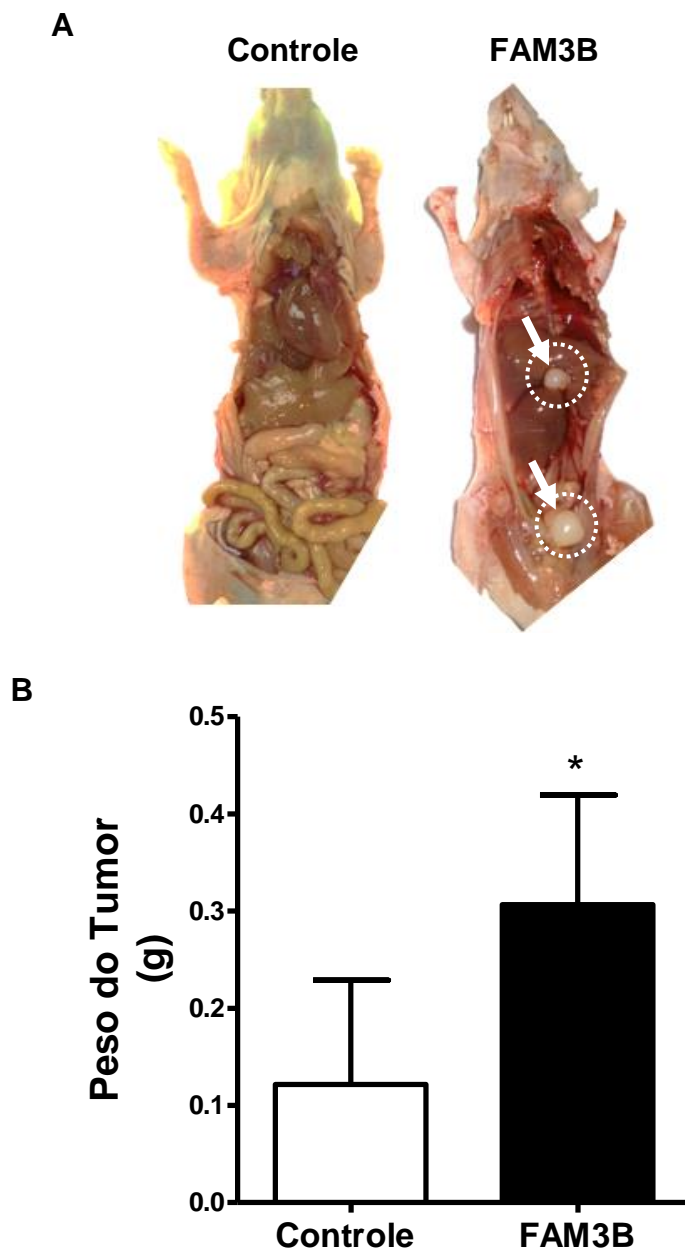
### 5.9 FAM3B induz alterações morfológicas nos tumores de animais imunodeficientes

A análise histopatológica pela técnica de HE revelou algumas alterações morfológicas, nos tumores induzidos pelas células MDA-MB-231-FAM3B, com um provável aumento da densidade celular e aumento do número de vasos sanguíneos (Figura 19).

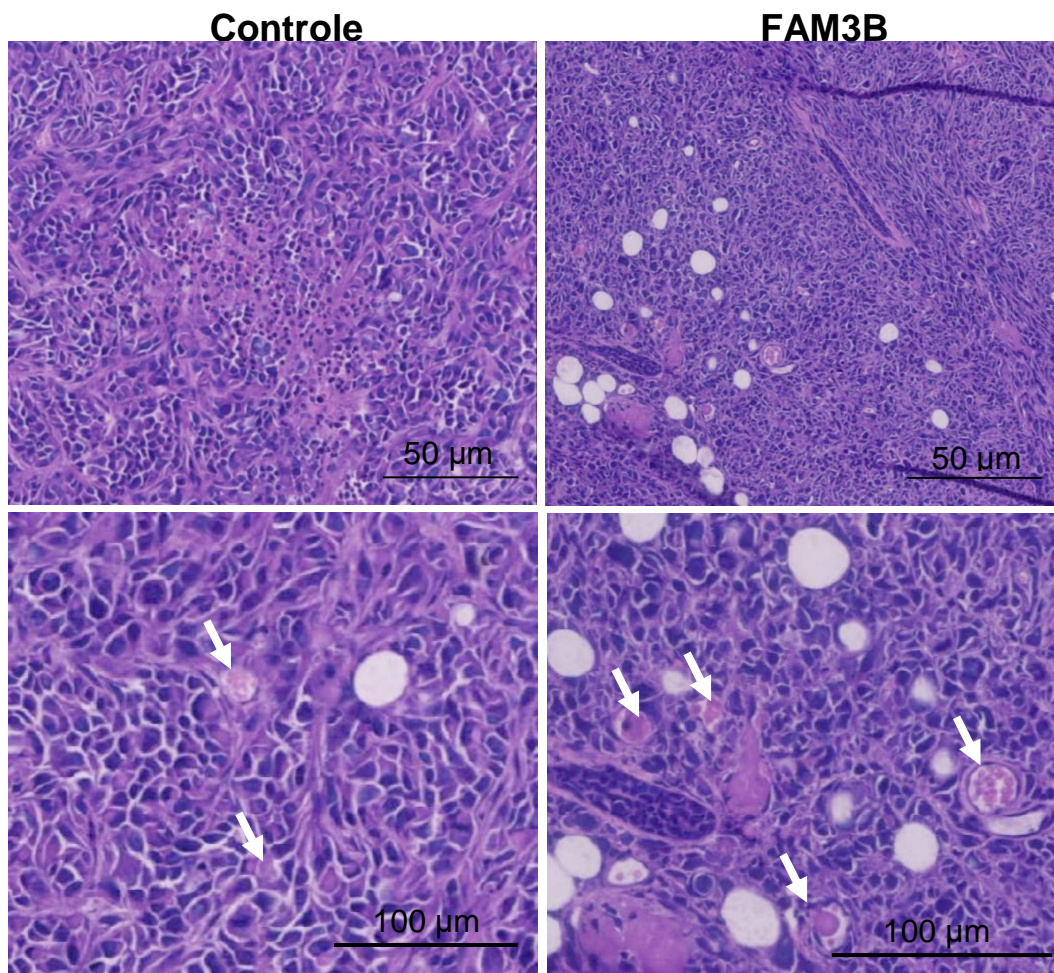
Na análise de expressão gênica por imunohistoquímica, utilizando anticorpos específicos, foi possível detectar aumento da expressão de Bcl-2 e diminuição da expressão de Bax no grupo FAM3B, em relação ao grupo controle (Figura 20 A-B). No entanto, a marcação com anticorpos específicos para Ki 67, não permitiu observar diferenças significativas entre os grupos (Figura 20D).



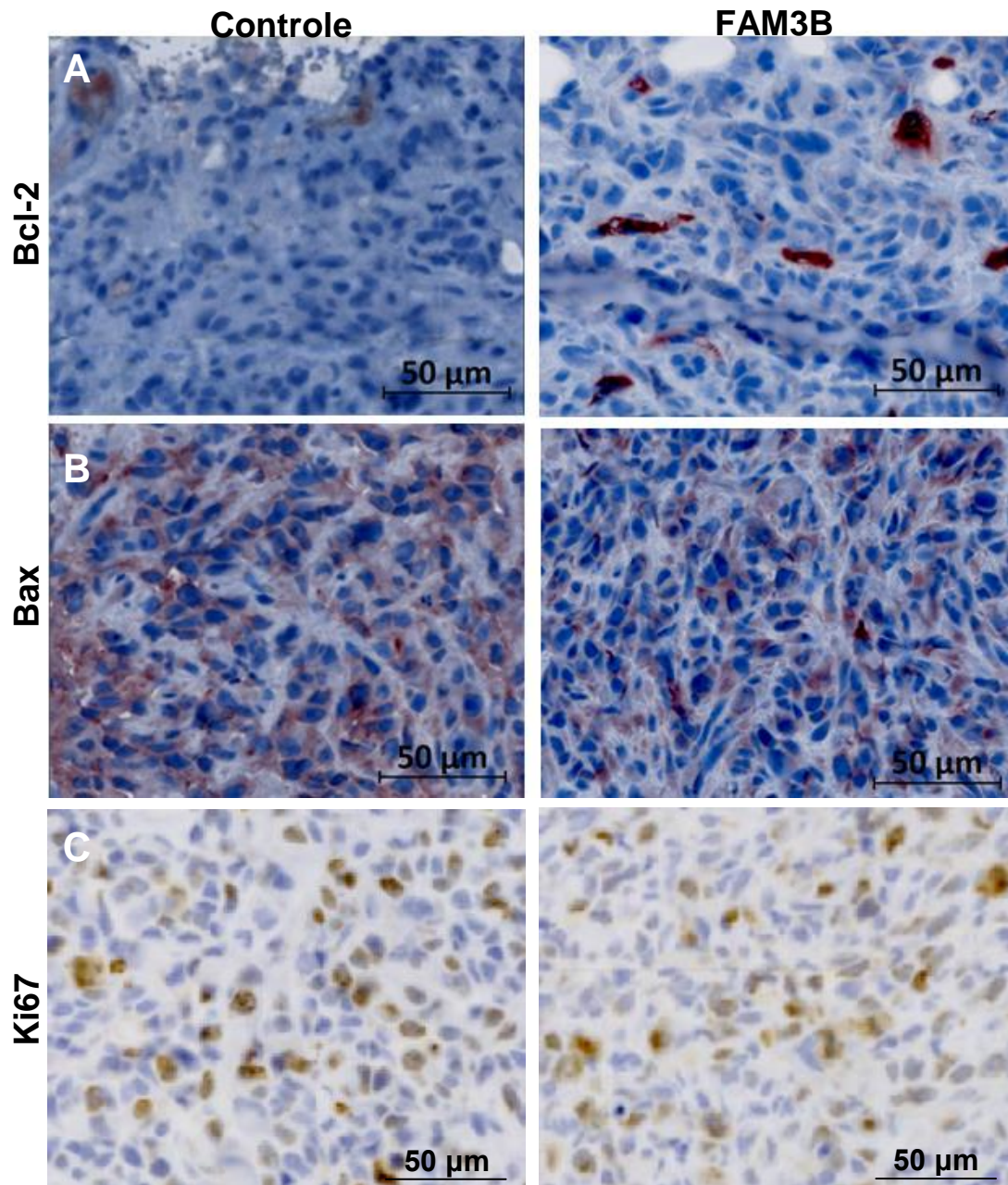
**Figura 17 - Análise do crescimento tumoral de células MDA-MB-231-FAM3B em camundongos imunodeficientes.** Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Balb/c nude, com 6-8 semanas de idade, mantidos a temperatura de 23 °C, umidade 50% e ciclo claro-escuro 12/12 h.  $1 \times 10^6$  células MDA-MB-231-FAM3B com Matrigel® foram inoculadas na glândula mamária (n=3) e células transfectadas com o vetor vazio foram usadas no grupo controle (n=3). Após 30 dias, foi possível observar um aumento significativo de cerca de 90% no volume tumoral, no grupo FAM3B (A, C). Além do tumor externo visível, através de análises por imagem no *IVIS Spectrum*, foi observado um possível aumento da migração celular no grupo FAM3B (B). Resultados obtidos em três experimentos independentes. As diferenças estatísticas para cada um dos pontos foram inferidas através do teste t de *Student*. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ .



**Figura 18 - Análise comparativa dos tumores dos animais após a eutanásia.** Imagem do animal FAM3B, com possíveis focos de metástase, nas proximidades dos ovários e do fígado (A). Após a eutanásia foi verificado aumento do peso tumoral nos animais contendo células MDA-MB-231-FAM3B, em relação ao grupo controle (B). Resultados obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste t de *Student*. \*  $p < 0,05$ .



**Figura 19 - Análise histopatológica de tumores MDA-MB-231-FAM3B em camundongos imunodeficientes.** Imagens representativas de cortes histológicos de tumores dissecados de camundongos imunodeficientes inoculados com células tumorais MDA-MB-231-FAM3B e MDA-MB-231-controle. A coloração com hematoxilina-eosina mostrou alterações morfológicas (i.e. mais vasos sanguíneos) no grupo contendo células com superexpressão de FAM3B. (Escala:100 µm; 50 µm).



**Figura 20 – Análise por imunohistoquímica de tumores MDA-MB-231-FAM3B em camundongos imunodeficientes.** Imagens representativas de cortes histológicos de tumores dissecados de camundongos imunodeficientes inoculados com células tumorais MDA-MB-231-FAM3B e MDA-MB-231-controle. A coloração feita com anticorpos específicos, em cor vermelha acastanhada, confirmou o aumento da expressão de Bcl-2 (A) e diminuição da expressão de Bax (B), nas células com superexpressão de FAM3B, sem diferenças visíveis na expressão de Ki67 entre os grupos (C). Após a revelação, os cortes foram contra-corados com *Hemalumbre de Harris*. (Escala: 50 µm).



FAM3B/PANDER é uma proteína tipo citocina, pertencente a família FAM3, composta por quatro membros (*FAM3A*, *FAM3B*, *FAM3C/ILEI*, *FAM3D*), identificados em 2002. Inicialmente, foi revelada alta expressão do *FAM3B* no pâncreas endócrino, o que resultou em muitos trabalhos dedicados a elucidar suas funções metabólicas na regulação da glicose e seu provável papel na lipogênese (WILSON et al., 2010; ZHU et al., 2002). No entanto, recentemente, tem sido proposto um possível papel do *FAM3B* no contexto do câncer, tanto através da proteção da morte celular em células de carcinoma de cólon (HCT8) e próstata (DU145), assim como ações envolvidas em processos de migração e metástase em células tumorais HCT116 (LI et al., 2013; MOU et al., 2012; MACIEL-SILVA et al., 2015)

Nosso grupo explorou anteriormente as funções desempenhadas pelo *FAM3B* *in vitro* e *in vivo* em células DU145, cujos resultados sugeriram uma ação protetora à morte celular por apoptose conferida pelo *FAM3B* (MACIEL-SILVA, 2015). O trabalho aqui apresentado, por outro lado, dedicou-se a avaliar em um primeiro momento, as possíveis ações do *FAM3B* na morte celular na linhagem tumoral MDA-MB-231, dedicando-se posteriormente à avaliação da migração celular, mediante a superexpressão desta proteína em modelos *in vitro* e *in vivo*.

A partir da transfecção com cDNA completo *FAM3B* inserido no vetor comercial pcDNA, obtivemos células MDA-MB-231-FAM3B e células MDA-MB-231-controle (transfectadas com o vetor vazio e utilizadas como controle dos experimentos). A superexpressão da proteína foi confirmada através de qPCR (Figura 6C).

O efeito da superexpressão do *FAM3B* na morte celular foi avaliado inicialmente por testes de viabilidade (MTT). Após a estimulação com a combinação de TNF- $\alpha$  + Cicloheximida em várias doses, observou-se, um aumento significativo, porém discreto, da viabilidade celular em células com superexpressão de *FAM3B*. Este aumento ficou mais evidente com a dose mais alta (10 ng / mL) sugerindo que a proteção mediada por *FAM3B* pode ser desencadeada em condições mais agudas e que dependem de vias metabólicas mediadas pelos receptores do TNF (TNFR1 ou TNFR2), que são ativadas em doses altas (Figura 7A). Em concordância com estes resultados, após o estímulo com Estaurosporina foi possível observar uma proteção



significativa mediada pelo *FAM3B*, com algumas variações entre as doses (Figura 7B). Em ambos os tratamentos o aumento da viabilidade em células superexpressando o *FAM3B* foi pequeno em relação às células controle, em comparação aos resultados observados com células de tumor de próstata DU145, em que a proteção chegou a ser entorno de 30% (MACIEL-SILVA et al., 2015).

Para confirmarmos estes resultados, usamos ensaios de fragmentação nuclear, considerada uma característica importante da apoptose. A porcentagem de núcleos subdiploides (fragmentados), após os tratamentos com TNF- $\alpha$  (+Cicloheximida), Peróxido de hidrogênio e Estaurosporina, demonstraram uma proteção significativa, mediante a superexpressão do *FAM3B*, nas células MDA-MB-231-*FAM3B* em relação às células controle, em todos os estímulos de morte celular utilizados. A maior proteção observada foi com o Peróxido de Hidrogênio na diluição de 0,01% durante 24 h (Figura 9). Em síntese, foi possível observar tempo e dose-dependência nos tratamentos e diminuição nas taxas de núcleos subdiploides, a partir de 24 h de tratamento com todos os indutores. Todavia, com apenas 6 h de tratamento com Estaurosporina, houve aumento discreto na porcentagem de núcleos subdiploides nas células com superexpressão de *FAM3B* (Figura 11), o qual sugere um efeito agudo (tempo menor que 12 h) do *FAM3B*, que poderia estar determinado pela especificidade de ligação ao seu receptor ou pela ativação de vias metabólicas precoces ou tardias. Estas hipóteses ainda não foram testadas.

Com o objetivo de explorar o impacto da expressão da *FAM3B* na ativação das possíveis vias moleculares associadas a apoptose, foi avaliada a expressão gênica de alguns membros da família *Bcl-2*. Estudos preliminares já haviam mostrado que a inibição do *FAM3B* por RNA de interferência em células HCT8 ou a superexpressão em células DU145, poderia conferir proteção a apoptose em células de tumores de cólon, a partir do envolvimento de genes da família *Bcl-2*, como *Bcl-2*, *Bcl-xL* e *Bax* (MACIEL-SILVA et al., 2015; MOU et al., 2012). Considerando esta mesma possibilidade em tumores de mama, foi avaliado e comparado os níveis de expressão de mRNA e proteína dos genes *Bcl-2*, *Bcl-xL* e *Bax* nas células MDA-MB-231-controle e nas células MDA-MB-*FAM3B*. As análises por ensaio de PCR em tempo real

de transcritos dos RNAm destes genes revelaram que a superexpressão de *FAM3B* em células MDA-MB-231 é acompanhada por um aumento da razão de expressão entre os membros anti-apoptóticos *Bcl-2* (aumento de ~ 10 vezes) e *Bcl-xL* (aumento de ~1,5 vezes) em relação ao gene pró-apoptótico *Bax* (Figura 12A-B). Análises de expressão gênica ao nível de proteína, confirmaram o aumento *Bcl-xL* e *Bcl-2* (aumento de ~2 vezes) (Figura 13A-C). Contudo, não foi possível explorar a expressão de *Bax* nas células MDA-MB-231 em cultura, devido à falta de especificidade do anticorpo nos ensaios de Western blot.

Nossos resultados com MDA-MB-231 verificam o envolvimento de *Bcl-2* e *Bax* e apresentam pela primeira vez a participação de *Bcl-xL*, nas vias ativadas por *FAM3B* para proteger as células de adenocarcinoma de mama da morte celular programada, de maneira similar ao observado em células de adenocarcinoma de cólon HCT8 (MOU et al., 2012) e adenocarcinoma de próstata DU145 (MACIEL-SILVA, 2015). Considerando que o silenciamento de *FAM3B* diminui a fosforilação e aumento da atividade da p53 em células HCT8 de adenocarcinoma de cólon (MOU et al., 2012) é possível supor que também exista uma ligação entre o aumento de *Bcl-2* / diminuição de *Bax* com o bloqueio da expressão e ou atividade de p53 em células MDA-MB-231 que superexpressam *FAM3B*. Resta ainda explorar se esta inibição de p53 é mediada pelo aumento de expressão de MDM2 e se existe uma comunicação específica com a via extrínseca, como observado nas células HCT8. (MOU et al., 2012).

Com o intuito de observar outras vias metabólicas que poderiam ser reprimidas pela expressão da *FAM3B* e assim proteger a células da morte celular, foram realizados experimentos para verificar a atividade proteolítica das caspases, proteases que agem durante a apoptose clivando substratos específicos. Foi mensurada especificamente a atividade proteolítica da caspase -3, principal caspase executora, em ensaio de proteólise *in vitro*, usando substratos sintéticos (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008). Como observado, a velocidade clivagem do substrato ac-DEVD-AMC é menor em células MDA-MB-231-FAM3B, sugerindo que a possível inibição das atividades das caspases seria mediada pela ação exógena do *FAM3B* (Figura 14). Estes resultados se contrapõem aos efeitos observados em células  $\beta$ -pancreáticas

de camundongo ( $\beta$ TC3) onde o tratamento com FAM3B recombinante estimula a atividade de caspase-3 (CAO et al., 2003). No entanto, cabe apontar que este é um efeito de ativação espontânea, sem que exista o estímulo prévio das células com indutores de morte, já observado em células de tumor de próstata DU145 (MACIEL-SILVA et al., 2015), que sugere que o FAM3B possa ativar a expressão de proteínas inibitórias das caspases (XIAP e cIAP, por exemplo) antes de ocorrer o disparo da morte celular programada em células tumorais.

Havendo confirmado o seu efeito protetor, passamos a explorar o papel do FAM3B na migração e invasão celular, condições importantes para a ocorrência de metástase. Como descrito anteriormente, nossos dados com análise de expressão gênica ao nível de mRNA em amostras provenientes de pacientes, revelaram aumento significativo da expressão do *FAM3B* em tumores de próstata e de mama, em relação aos tecidos normais (bordas dos tumores) analisados, assim como a expressão mais elevada desta proteína foi encontrada em tumores em estágios mais avançados nos casos da mama (MACIEL-SILVA et al., 2015). Estes resultados sugerem que o *FAM3B* atue a favor do fenótipo maligno de neoplasias da mama, contribuindo com a capacidade de formar tumores, de invasão celular e com o potencial metastático.

No ensaio de migração por fechamento de Feridas ou *Wound Closure*, foi observado que as células MDA-MB-231-FAM3B, apresentaram um aumento expressivo da taxa de fechamento da área realizada com, aproximadamente, 30% de diminuição da área aberta, em 24 h (Figura 15). Na ausência de soro, as células preencheram quase que totalmente (em alguns a lacuna foi completamente fechada), o espaço que mimetizava uma ferida, além de, morfológicamente, terem adquirido algumas diferenças visíveis ao exame pelo microscópio. É possível que estas células, tenham tido um incremento na sua capacidade migratória, a partir da contratilidade do seu citoesqueleto, com consequente adoção da aparência fusiforme, como mostrado na fotomicrografia. Existe a possibilidade, de que assim como em muitos tumores, as células superexpressando o *FAM3B* apresentem um aumento das suas taxas de migração celular, em um modelo de filopódios ricos em actina e pobres na sua interação com o substrato, em um tipo migratório também conhecido como migração mesenquimal (KRAMER et al., 2013).

Para medir *in vitro* a capacidade de invasão celular, foi realizado o ensaio de crescimento em suspensão de agarose, o qual revelou a formação de mais colônias (50 vs 30) no grupo de células MDA-MB-231-FAM3B, em relação as células controle, sugerindo um possível aumento do potencial invasivo mediado pelo aumento de expressão do FAM3B (Figura 16).

Mas surge a questão: como o FAM3B estaria relacionado à migração, invasão e, portanto, a metástase? Considerando que outro membro da família, o *FAM3C/ILEI*, foi apontado como suficiente e necessário para ocorrência de EMT em muitos tumores (WAERNER et al., 2006) é possível levantar a hipótese, de que o comportamento migratório observado por células MDA-MB-231-FAM3B *in vitro*, esteja diretamente relacionado com o fato do aumento da expressão de FAM3B, que em termos estruturais é muito semelhante com o *FAM3C/ILEI*, e que essa aquisição do fenótipo maligno possa se dar através da indução de EMT (JOHANSSON et al., 2013; WAERNER et al., 2006) .

Sabe-se que o resultado final, da via de sinalização da EMT, que ocorre em carcinomas, é a expressão e ativação funcional de fatores de transcrição como Twist, Snail, Slug, Zinc Finger E-box-binding homeobox (Zeb1 e Zeb2) (MARAUCCI; STASSI; MARIA, 2016). Como anteriormente demonstrado, em células tumorais de adenocarcinoma de cólon a expressão de *FAM3B* é acompanhada do aumento da expressão de Slug, apontado como um dos principais fatores de transcrição envolvidos na EMT. Existem evidências, de que há elevada expressão de Slug em diversos tipos tumorais e de que ele poderia ser um indicador de prognóstico ruim, contribuindo para diminuição da expressão de moléculas de adesão celular como a E-caderina e JAM, por consequência, propiciando metástases para linfonodos circundantes (LI et al., 2013). Neste contexto, cabe ressaltar a aparente conexão existente entre essas vias, visto que existem trabalhos que revelaram que o aumento da secreção de TGF- $\beta$ , leva ao aumento da expressão nos níveis de fatores como Snail e o próprio Slug (MEDICI; HAY; OLSEN, 2008; RUBIO et al., 2001). Como estas moléculas não foram avaliadas neste trabalho seria interessante considerar a verificação da expressão de Snail/Slug, E-caderina e JAM nas próximas etapas.

Após a elaboração desta primeira hipótese, passamos a nos perguntar se haveria alguma relação entre a elevada expressão da proteína anti-

apoptótica Bcl-2 e Bcl-xL. A ideia de que moléculas que influenciam na viabilidade de células tumorais, tanto *in situ*, quanto na circulação ou em órgãos específicos estejam relacionadas, também, com aumento da migração e invasão celular na metástase (SHTIVELMAN, 1997; TAKAOKA et al., 1997; UM H-D, 2015), permitiram outras especulações a respeito das possíveis funções, talvez ainda mais importantes do ponto de vista patológico, exercidas por estas proteínas em tumores de mama. A respeito disso, a associação entre membros da família Bcl-2, notadamente apontados como clássicos agonistas e antagonistas da apoptose, com a regulação de processos importantes na metástase em tumores é discutida desde a década de 1990. Neste contexto, parece que, principalmente, *Bcl-2* e *Bcl-xL* estão relacionados com aumento de metástase em diversos tipos tumorais, independente das vantagens que poderiam ser conferidas via inibição da morte celular (UM H-D, 2015).

A proteína *Bcl-2*, observada 10 vezes mais expressa nas células que superexpressam FAM3B, foi previamente relacionada com processos de migração e aumento da capacidade de invasão celular e metástase, em tumores de mama (DEL BUFALO et al., 1997; JAGER et al., 1997). Del Buffalo et al., (1997) demonstraram que a superexpressão de *Bcl-2* promove maior produção de MMP-2 e MMP-9 (metaloproteinases), enzimas associadas a degradação da matriz extracelular, portanto, importantes no desprendimento das adesões celulares que permitem às células tumorais migrarem e aumentarem sua capacidade de invadir e formar metástases. Aqui não foi verificado o aumento de MMP-2 e MMP-9, mas o ensaio de migração permite inferir que ocorreram alterações morfológicas nas células MDA-MB-231-FAM3B, as quais adquiriram uma aparência mais fusiforme coerente com células que conseguem se desprender da matriz e que estão em processo migratório (Fig. 15).

Além disso, o papel do *Bcl-2* e sua influência nos níveis de metaloproteinases, também foi verificado em células de glioma, em que foram apontadas mudanças na expressão de MMP-3, MMP-12 e, assim, como em dados de linhagens tumorais da mama, MMP-2 e MMP-9 (WICK et al., 1998). Seria interessante em etapas posteriores, verificar a expressão destas enzimas, no modelo de superexpressão do FAM3B, que como foi visto, leva ao aumento de *Bcl-2*.

De forma semelhante, em relação ao potencial em promover aumento da invasão celular e metástase o *Bcl-xL*, ~ 1,5 vezes mais expresso mediante superexpressão de FAM3B, também já foi associado à indução de metástases. Em células tumorais da mama do tipo luminal (MCF-7 RE +) e basal (HCC1954 HER2 +) e em células tumorais neuroendócrinas pancreáticas (panNET), assim como em modelos animais, foi reportado que, o *Bcl-xL* nuclear e não citoplasmático ou mitocondrial, parece ser capaz de promover a secreção de TGF- $\beta$ , fator que induziria inibição da adesão celular com degradação da matriz extracelular, indução de imunossupressão e angiogênese. Foi sugerido, que o *Bcl-xL*, parece contribuir de forma autócrina e parácrina, com a metástase, levando as células à EMT. Além disso, foi verificado que a superexpressão de *Bcl-xL*, ou a utilização de mutantes com problemas na oligomerização de *Bax* e *Bak*, não alterava as taxas de apoptose, quando esta era induzida. Os modelos de superexpressão de *Bcl-xL* revelaram aumento da invasividade de células de glioma e tumorais da mama, promovendo aumento da invasão local do estroma e de metástases nodais, em neoplasias mamárias (RUBIO et al., 2001). Em células tumorais de pulmão o aumento *Bcl-xL* foi associado à EMT, enquanto que a diminuição da sua expressão pareceu promover redução das taxas de migração em células de carcinoma colorretal (ESPAÑA et al., 2004; KOEHLER, 2013).

A partir dos nossos dados *in vitro* seria plausível supor, que o FAM3B esteja associado (direta ou indiretamente) a EMT em células de tumor de mama e, por consequência, promoveria aumento da migração, invasão e metástase, via, principalmente, aumento de *Bcl-2* e *Bcl-xL*. Adicionalmente, é possível que o aumento da expressão de *Bcl-xL*, que parece ser uma das moléculas envolvidas nas vias ativadas pelo FAM3B para promover o avanço na progressão tumoral, favoreça o aumento dos níveis de TGF- $\beta$  e que nesta lógica, induziria o aumento de Slug, paralelo ao possível aumento da ação de enzimas de degradação da matriz extracelular, relacionadas também com o *Bcl-2*.

Para confirmar os efeitos observados *in vitro* foram avaliados, *in vivo*, a capacidade de formar tumores e, a eventual, indução de metástase espontânea mediada pelas ações do FAM3B, em camundongos fêmeas imunodeficientes da linhagem Balb/c *nude*. A partir destes ensaios, em

concordância com os dados *in vitro*, foi possível verificar que o volume tumoral, acompanhado semanalmente, nos animais que receberam as células MDA-MB-231 na glândula mamária eram significativamente maiores no grupo que continham as células MDA-B-231-FAM3B (Figura 18). De fato, foi possível inferir que estes tumores adquiriram vantagens que permitiram o aumento da massa tumoral, no entanto, não foi possível predizer, a priori, se ocorreu um mecanismo de resistência à morte celular, aumento da proliferação ou ambos os efeitos. As análises das imagens dos animais portadores de células MDA-MB-231-FAM3B e de tumores MDA-MB-231-controle marcadas com luciferase reveladas no tomógrafo *IVIS Spectrum*, nos permitiram concluir que, aparentemente, houve um aumento do comportamento migratório das células, da mesma forma como foi observado no ensaio de migração *in vitro* (Figura 17). Após o exame visual dos órgãos dos animais, foram encontradas duas massas tumorais distantes do sítio do tumor primário, fortalecendo a hipótese, de que talvez o FAM3B possa aumentar a capacidade migratória, invasiva e, sendo assim, a capacidade metastática de tumores (Figura 18).

Mediante análises morfológicas, através da coloração com HE, foi possível inferir que houve um aumento da densidade celular, nos tecidos tumorais dos animais com células MDA-MB-231-FAM3B, através da redução dos espaços intercelulares, indicando a possibilidade do aumento da massa celular. Também foi possível observar um maior número de vasos sanguíneos, que sugerem angiogênese, no grupo com FAM3B (Figura 19), como já tinha sido observado nos tumores de próstata (MACIEL-SILVA, 2015). Especula-se, que a capacidade de formar novos vasos sanguíneos, reforçada pela expressão de FAM3B, seja mais uma possível vantagem conferida pela expressão desta proteína às células tumorais da mama, uma vez que promove o aumento do fluxo de oxigênio e nutrientes ao tumor em expansão (HANAHAN; WEINBERG, 2011). É possível, que o aumento da angiogênese, via FAM3B, ocorra através da expressão de *Bcl-2* que já foi associado ao aumento de fatores como VEGF, tanto *in vitro*, quanto *in vivo* em camundongos C57BL/6 (BIROCCIO et al., 2000). Além disso, análises de Imunohistoquímica, de tecidos tumorais provenientes dos camundongos, confirmaram os resultados obtidos *in vitro*, uma vez que foi possível observar aumento da expressão de *Bcl-2* e menor expressão de *Bax*, nos tumores de

células com superexpressão do FAM3B, reforçando, o importante papel destes genes, via FAM3B (Figura 20).

O conjunto de dados apresentados, até aqui, assim como os dados obtidos por outros grupos e as referências na literatura, nos permite elaborar uma rede molecular hipotética de interação entre as diversas vias metabólicas ativadas - direta ou indiretamente pelo FAM3B - em tumores de mama. Em primeiro lugar, é possível supor que a superexpressão de *FAM3B*, ao induzir o aumento da expressão de *Bcl-2* e *Bcl-xL* interfira, por um lado, nas vias clássicas de indução de apoptose, inibindo a via intrínseca via Bax, p53 e MDM2, e por outro lado, bloqueando a atividade proteolítica das caspases. O aumento do potencial celular migratório e invasivo pode estar relacionado a duas possibilidades. A primeira delas depende da ação de metaloproteinases e a secreção de fatores como TGF- $\beta$ , que juntos causam um aumento na angiogênese induzida pelo aumento da expressão de VEGF. Em paralelo, ou sinergicamente a este fenômeno, é possível especular que o *FAM3B* seja capaz de induzir EMT, levando ao aumento da malignidade, de forma independente. De acordo com o que foi visto em células de carcinoma de cólon, isso resultaria devido ao aumento de fatores de transcrição, como Slug e Snail e, conseqüentemente, aumento de moléculas, como cdc42, e diminuição de moléculas de adesão como E-caderina e JAM (LI Z. et al., 2013; MEDICI; HAY; OLSEN, 2008; RUBIO et al., 2001).

Em conjunto, nossos resultados sugerem que FAM3B pode atuar como um potencial marcador molecular para a progressão maligna de tumores de mama, mas a confirmação das vias moleculares envolvidas ainda precisa ser esclarecida. No futuro, ensaios de inibição específica usando peptídeos inibitórios ou RNA de interferência poderiam auxiliar a elucidar os mecanismos ativados pelo FAM3B para conferir proteção à morte celular e a indução do aumento da migração e a capacidade de invasão celular. Da mesma forma, seria interessante realizar ensaios de zimografia para verificar a expressão de MMP-2 e MMP-9, além da expressão de moléculas envolvidas na EMT como, principalmente, o Slug relacionado anteriormente com a expressão de FAM3B em tumores de cólon (LI et al., 2013).

Em síntese, a partir dos dados obtidos *in vitro* e *in vivo*, é possível concluirmos que:

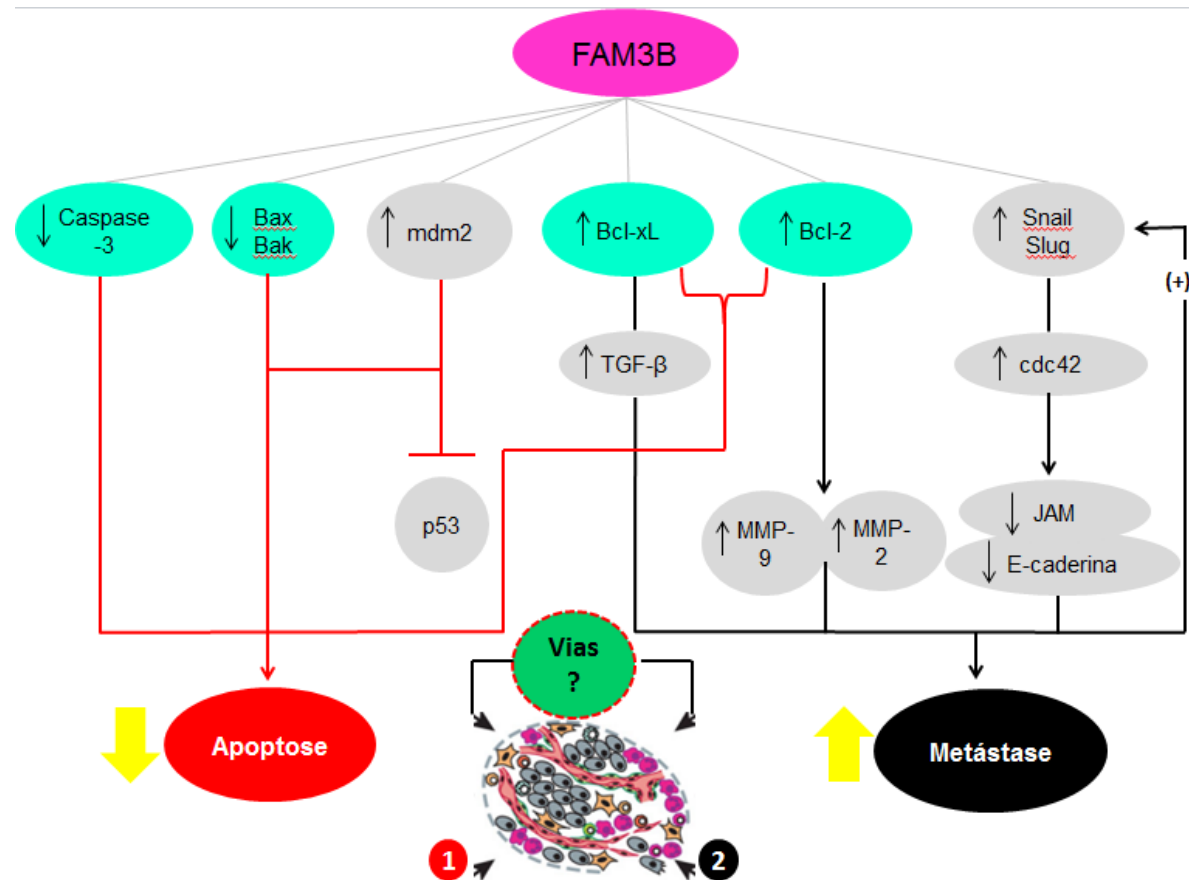


1) A expressão da *FAM3B* promove redução nas taxas de morte celular induzida por agentes citotóxicos, o que pode ser explicado pelo aumento das moléculas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL, e a diminuição da atividade proteolítica de caspase -3;

2) *FAM3B* promove um aumento das taxas de invasão e migração celulares observados *in vitro*, sugerindo envolvimento com a indução de metástase e promoção da malignidade dos tumores de mama

3) *FAM3B* induz aumento da massa tumoral concomitantemente com aumento do número de vasos sanguíneos e poder migratório e metastático das células tumorais.

As evidências aqui apresentadas sugerem que esta nova proteína citocina pode ser um importante biomarcador, de crescimento tumoral e indução de metástase e angiogênese em tumores de mama.



**Figura 21- Rede molecular hipotética ativada pelo FAM3B em tumores de mama.** De acordo com MOU et al., (2012), a expressão de FAM3B, é capaz de aumentar a expressão do principal inibidor da p53, mdm2, o que promoveria inibição da apoptose, em tumores. Além disso, como foi verificado neste trabalho que a inibição da apoptose, mediante a superexpressão de FAM3B, parece ocorrer, principalmente, via aumento da expressão de Bcl-xL e Bcl-2, com diminuição da expressão de Bax e da atividade proteolítica da caspase -3. No âmbito do aumento da migração celular, capacidade de invasão e metástase, dados de Li et al., (2013), sugeriram que a expressão de FAM3B, poderia levar ao aumento da expressão de Slug/Snail, o que resultaria em diminuição de E-caderina e JAM, com conseqüente, perda da adesão celular e aumento da capacidade de invadir e formar metástases. De acordo com Rubio et al., (2001), o aumento da expressão de Bcl-xL, pode promover a secreção de TGF- $\beta$ , o qual por sua vez, poderia aumentar os níveis de fatores de transcrição como Snail e Slug. Segundo Del Bufalo et al., (1997), o aumento da expressão de Bcl-2 é capaz de promover maior produção de MMP-2 e MMP-9, que levam a degradação de componentes da matriz extracelular. A partir destas e outras evidências, é razoável supor que o aumento de Bcl-2 e Bcl-xL a partir da superexpressão de FAM3B, juntamente com os dados *in vitro* e *in vivo*, sejam, em partes, um dos mecanismos pelos quais o FAM3B parece, também, levar ao aumento da capacidade de migração e invasão em tumores de mama, que em última instância, levaria a metástase.

## REFERÊNCIAS\*

AKIRA S. et al. Biology of multifunctional cytokines: IL6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB Journal*, v. 4, n. 11, p. 2860-2867, 1990.

ANDERSON W. F. et al. Is male breast cancer similar or different than female breast cancer? *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 83, n. 1, p. 77-86, 2004.

BIROCCIO A. et al. Bcl-2 overexpression and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression and *in vivo* angiogenesis in a breast carcinoma line. *Faseb Journal*, v. 14, n. 5, p. 652-660, 2000.

BOROWICZ S., et al. The soft agar colony formation assay. *The Journal of Visualized Experiments*, v. 92, p. 1- 6, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. ABC do Câncer: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer. Rio de Janeiro: 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: 2015a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Diretrizes para Detecção Precoce do Câncer de Mama no Brasil. Rio de Janeiro: 2015b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Falando sobre Câncer de mama. Rio de Janeiro: 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. TNM: Classificação de Tumores Malignos. 6ª Edição. União Internacional Contra o Câncer. Rio de Janeiro: 2004.

BRINKLEY B. R. et al. Variations in cell form and cytoskeleton in human breast carcinoma cell *in Vitro*. *Cancer Research*, v. 40, n. 9, p. 3118-3129, 1980.

BROCKE-HEIDRICH et al. 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*, v. 103, n. 1, p. 242-251, 2004.

CAO X. et al. Pancreatic-Derived Factor (*FAM3B*), a novel islet cytokine, induces apoptosis of insulin-secreting  $\beta$ -cells. *Diabetes*, v. 52, n. 9, p. 2296-2302, 2003.

CHEN S.; PARMIGIANI G. Meta-Analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *Journal of Clinical Oncology*, v. 25, n. 11, p. 1329-1333, 2007.

---

\* De acordo com:

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

CHIPUK J. E. et al. The BCL-2 family reunion. *Molecular Cell Journal*, v. 37, n. 3, p. 299-310, 2010.

CLEARY M. L.; SMITH S. D.; SKALAR J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl and a hybrid Bcl-2/immunoglobulin transcription resulting from the t(14;18) translocation. *Cell*, v. 47, p. 19-28, 1986.

DEL BUFALO D. et al. Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line. *Faseb Journal*, v. 11, n. 12, p. 947-953, 1997.

EINSENER A. L. A.; KOIFMAN S. Câncer de mama: marcadores tumorais. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 47, n. 4, p. 377-388, 2001.

EIZIRIK D. L.; MANDRUP-POULSEN T. A choice of death the signal transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia*, v. 44, n. 12, p. 2115-2133, 2001.

ESPAÑA L. et al. Overexpression of Bcl-xL in human breast cancer cells enhances organ-selective lymph node metastasis. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 87, n. 1, p. 33-44, 2004.

GEBÄCK T. et al. TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *Biotechniques*, v. 4, n. 46, p. 265-274, 2009.

Genomic View for FAM3B gene. Disponível em: <[http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FAM3B#genomic\\_location](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FAM3B#genomic_location)>. Acesso em: 20 abr. 2016.

HANAHAHAN D.; WEINBERG R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HONDERMARCK H. Breast cancer: when proteomics challenges biological complexity. *Molecular and Cellular Proteomics* 2,5, v. 2, n. 5 p. 281-291, 2003.

HOCKENBERRY D. et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, v. 348, n. 6299, p. 334-336, 1990.

JAGER R. et al. Overexpression of Bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-myc-induced tumorigenesis of the mammary gland in transgenic mice. *Oncogene*, v. 15, n. 15, p. 1787-1795, 1997.

JOHANSSON P. et al. FAM3B PANDER and FAM3C ILEI represent a distinct class of signaling molecules with a non-cytokine-like fold. *CELL PRESS*, v. 21, n. 2, p. 1-8, 2013.

JUIN P.; et al. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nature Reviews Cancer*, v. 13, n. 7, p. 455-465, 2013.

KOBOLDT D. C. et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, v. 490, n. 7418, p. 61-70, 2012.

KOEHLER B. C. et al. Beyond cell death – antiapoptotic Bcl-2 proteins regulate migration and invasion of colorectal cancer cells in vitro. *Plos One Journal*, v. 8, n. 10, p. 1-12, 2013.

KRAMER N. et al. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research*, v. 752, n. 1, p. 10-24, 2013.

KUMAR S. et al. Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 14, p. 10308-10314, 2000.

KURZROK R. Cytokine dysregulation in cancer. *Biomed Pharmacother*, v. 55, n. 9, p. 543-547, 2001.

LI Z. et al. A non-secretory form of *FAM3B* promotes invasion and metastasis of human colon cancer cells by upregulating Slug expression. *Cancer Letters*, v. 28, n. 2, p. 1-7, 2013.

LIVAK K. J. The oligonucleotides with fluorescent dyes at ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and applications*, v. 4, p. 357-362, 1995.

MACHADO V. A. **Desenvolvimento de Instrumentos epidemiológicos para pesquisa de câncer de mama hereditário**. 2010. 172 f. Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/Dissertacao\\_Victor\\_Machado.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/Dissertacao_Victor_Machado.pdf)>. Acesso em: 20 jun.2015.

MACIEL-SILVA P. **Papel da nova citocina PANDER/FAM3B na tumorigenicidade e invasividade de células tumorais de próstata da linhagem DU145**. 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42136/tde-09122015-072602/pt-br.php>>. Acesso em: 02 jan. 2016.

MARAUCCI F.; STASSI G.; MARIA R. D. Opinion: epithelial-mesenchymal transition: a new target in anticancer drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.15, p. 311-325, 2016.

MEDICI D.; HAY D.E.; OLSEN B. R. Snail and Slug promote Epithelial-Mesenchymal Transition through  $\beta$ -Catenin-T-Cell Factor-4-dependent Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$ 3. *Molecular Biology of the Cell*, v. 19, n. 11, p. 4875-4887, 2008.

MOU H. et al. Knockdown of FAM3B triggers cell apoptosis through p53-dependent pathway. *The International Journal of Biochemistry*, v. 45, n. 3, p. 684-691, 2012.

OLIVEIRA C. B. et al. Citocinas e dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

PEDRON-MONODERO A. et al. Smoking and survival in male breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 153, n. 3, p. 679-687, 2015.

PRICE J. E. Spontaneous and experimental metastasis models: *nude* mice. *Methods in Molecular Biology*, v. 1070, p. 223-233, 2014.

RANDALL L. M.; POTHURI B. The genetic prediction of risk for gynecologic cancer. *Gynecologic Oncology*, v. 141, p. 10-16, 2016.

RIBEIRO E. M. S. F. Análise proteômica em tecido mamário não tumoral Contralateral. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2013. Disponível em: < <http://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/31592>>. Acesso em: 20 jun. 2015.

ROBERT-COOPERMAN C. E. et al. Targeted disruption of Pancreatic-Derived Factor (PANDER, *FAM3B*) impairs pancreatic  $\beta$ -Cell Function. *Diabetes*, v. 59, n. 9, p. 2209-2217, 2010.

ROSEBNBERG A. S.; LAWRENCE T. S.; DEVITA V. T. DeVita, Hellman and Rosenberg's *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 9th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.

RUBIO N. et al. Metastatic behavior of human breast carcinomas overexpressing the Bcl-xL gene: A Role in Dormancy and Organospecificity. *Laboratory Investigation*, v. 81, n. 5, p. 725-734, 2001.

SAGLAM O. et al. IL-6 originated from breast cancer tissue derived mesenchymal stroma cells may contribute to carcinogenesis. *Tumor Biology*, v. 36, p. 5667-5677, 2015.

SHARI L. et al. Enhanced glucose tolerance in pancreatic-derived factor (PANDER) knockout C57BL/6 mice. *Disease Models & Mechanisms*, v. 7, p. 1307-1315, 2014.

SHIIBA M. et al. Down-regulated expression of family with sequence similarity 3, member B (*FAM3B*), in oral squamous cell carcinoma. *Oral Science International*, v. 9, n. 1, p. 9-16, 2012.

SHTIVELMAN E. A link between metastasis and resistance to apoptosis of variant small cell lung carcinoma. *Oncogene*, v. 14, n. 18, p. 2167-2173, 1997.

SLEDGE G. W. et al. Past, present and future challenges in breast cancer treatment. *Journal of Clinical Oncology*, v. 32, n. 19, p. 1-8, 2014.

STEINER P., et al. Tumor growth inhibition with cetuximab and chemotherapy in non small cell lung cancer xenografts expressing wild-type and mutated epidermal growth factor receptor and mutated epidermal growth factor receptor. *Clinical Cancer Research*, v. 13, n. 5, p. 1540-1551, 2007.

TAKAOKA A. et al. Anti-cell death activity promotes pulmonary metastasis of melanoma cells. *Oncogene*, v. 14, n. 24, p. 2971-2977, 1997.

TAMAOKI T. et al. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>++</sup> dependent protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 135, n.2, p. 397-402, 1986.

TAN S-N.; SIM S-P.; KHOO S. B. A., 2Tan et al. Potential role of oxidative stress-induced apoptosis in mediating chromosomal rearrangements in nasopharyngeal carcinoma. *Cell & Bioscience*, v. 6, n. 35, p. 1-16, 2016

TAYLOR R. C.; CULLEN S. P.; MARTIN S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Cell Biology*, V. 9. N. 3, P. 231-241, 2008.

UM H-D. Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species. *Oncotarget*, v. 7, n. 5, p. 5193-5203, 2015.

VAN'T VEER L.J. et al. Gene expression. Profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Letters to Nature*, v. 45, p. 530-536, 2002.

VAUX L. D.; CORY S.; ADAMS J. M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, v. 335, n. 6189, p. 440-442, 1988.

WAERNER T. et al. ILEI: a cytokine essential for EMT, tumor formation, and late events in metastasis in epithelial cells. *Cancer Cell*, v. 10, n. 3, p. 227-239, 2006.

WANG C.; GUAN Y.; YANG J. Cytokines in the Progression of Pancreatic  $\beta$ -Cell Dysfunction. *International Journal of Endocrinology*, p. 1-10, 2010.

WICK W. et al. BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. *FEBS Letters*, v. 440, n. 3, p. 419-424, 1998.

WILSON C. G. et al. Liver-specific overexpression of pancreatic-derived fasting hyperglycemia in mice factor (PANDER) Induces Fasting Hyperglycemia in Mice. *Endocrinology*, v. 151, n. 11, p. 5174-5184, 2010.

WILSON C. G.; ROBERT-COOPERMAN C. E.; BURKHARDT B. R. . PANcreatic-DERived factor: novel hormone PANDERing to glucose regulation. FEBS Letters, v. 7, p. 2137-2143, 2011.

YANG J et al. Mechanisms of glucose-induced secretion of Pandreatic-Derived Factor (PANDER or FAM3B) in pancreatic  $\beta$ -cells. Diabetes, v. 54, n. 11, p. 3217-3228, 2005b.

YANG J. et al. Structure-function studies of PANDER, an islet specific cytokine inducing cell death of insulin-secreting  $\beta$ -cells. Biochemistry, v. 44, n. 34, p. 11342-11352, 2005a.

YOULE R. J.; STRASSER A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nature Reviews, v. 9, n. 1, p. 47-59, 2008.

ZHU Y. et al. Cloning, expression, and initial characterization of a novel cytokine like gene family. Genomics, v. 80, n. 2, p. 144-150, 2002.