Priscilla Ludovico da Silva

**O efeito da prolactina na migração de células de câncer de
mama pela remodelação da actina no citoesqueleto**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Prof. Dr. José Maria Soares Júnior

São Paulo

2016

Priscilla Ludovico da Silva

**O efeito da prolactina na migração de células de câncer de
mama pela remodelação da actina no citoesqueleto**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Prof. Dr. José Maria Soares Júnior

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Priscilla Ludovico da

O efeito da prolactina na migração de células de câncer de mama pela remodelação da actina no citoesqueleto / Priscilla Ludovico da Silva. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: José Maria Soares Júnior.

Descritores: 1.Prolactina 2.Neoplasias da mama 3.Movimento celular
4.Citoesqueleto de actina 5.T47D 6.MCF-7 7.ZR75-1

USP/FM/DBD-301/16

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu marido, Vinícius Cestari do Amaral e à minha filha Laura Ludovico Cestari, pelo companheirismo, amor e paciência que me acompanharam e me deram suporte para vencer as dificuldades. Dedico também aos meus pais, José Francisco Boso da Silva (*In Memoriam*) e Pedrina Maria Ludovico da Silva, meus principais Mestres e maiores exemplos.

“A família é o amor de Deus nos oferecendo
um pouco do Céu aqui na Terra”

Agradecimentos especiais

“O professor medíocre conta. O bom professor explica.
O professor superior demonstra. O grande professor inspira”.

Às minhas grandes inspirações:

Professor Dr. **José Maria Soares Júnior**, meu orientador

Prof. Associado da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Professor Dr. **Edmund Chada Baracat**

Prof. Titular da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Professor Dr. **Tommaso Simoncini**

Prof. Titular de Ginecologia do Departamento de Medicina Experimental e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Pisa – Itália.

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel, pelo seu conhecimento, atenção e didática.

À Dra. Kátia Cândido Carvalho, por sua prontidão e competência na análise deste trabalho.

Ao Professor Dr. Manuel De Jesus Simões, por suas observações que foram de imprescindível valia.

Aos professores da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela minha formação acadêmica e profissional.

Aos funcionários da Faculdade de Medicina de São Paulo e do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

À Dra. Carla Cristina Maganhin, por sua ajuda sempre presente.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Investigação Médica (LIM58).

Aos meus irmãos Lucas Ludovico Martins da Silva e Fernanda Ludovico da Silva, que sempre acreditaram em mim e me incentivaram.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
pela bolsa de pós-graduação concedida.

A Deus. Princípio, meio e fim.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de figuras	xii
Lista de tabelas	xv
Lista de abreviaturas	xvi
Resumo	xviii
<i>Abstract</i>	xx
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 MÉTODOS.....	14
3.1 Cultura celular.....	15
3.2 Tratamento.....	16
3.3 RNAi - Silenciamento com siRNA.....	17
3.4 Migração celular.....	19
3.5 Imunofluorescência.....	20
3.6 <i>Western Blot (immunoblotting)</i>	21
3.7 Análise Estatística.....	23
4 RESULTADOS.....	24
4.1 Efeitos da prolactina na migração de células T47D, MCF7 e ZR75-1 de câncer de mama.....	25
4.2 Efeito da PRL no remodelamento da actina do citoesqueleto.....	29
4.3 Expressão de c-Src e p-c-Src.....	30
4.4 Expressão de FAK, p-FAK.....	32
4.5 Expressão de moesina e p-moesina.....	33
5 DISCUSSÃO.....	35
6 CONCLUSÕES.....	44
7 ANEXOS.....	46
7.1 Anexo 1.....	47
7.2 Anexo 2.....	49
7.3 Anexo 3.....	50
7.4 Anexo 4.....	51
8 REFERÊNCIAS.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Regulação da Prolactina. Adaptado de Soares Jr e Gadelha (2004).....	3
Figura 2 – Teste de dosagens do siRNA e da lipofectamina utilizados nos experimentos.....	19
Figura 3 – Migração de células T47D após tratamento com PRL em diferentes dosagens (ng/ml) por 48h sem a utilização de RNAi (GI = controle; GII = 25ng/ml; GIII = 50ng/ml e GIV = 100ng/ml) e com RNAi (GV = controle; GVI = 25ng/ml; GVII = 50ng/ml e GVIII = 100ng/ml). A seta indica a direção da migração. As linhas pretas superiores indicam a linha de partida e as linhas pretas inferiores indicam a distância média de migração. A distância média da migração foi medida em micrometros (μm). * = $p < 0,05$ em comparação ao demais grupos. Esse procedimento foi realizado em quadriplicata.....	26
Figura 4 - Migração de células MCF-7 após tratamento com PRL em diferentes dosagens (ng/ml) por 48h sem a utilização de RNAi (GI = controle; GII = 25ng/ml; GIII = 50ng/ml e GIV = 100ng/ml) e com RNAi (GV = controle; GVI = 25ng/ml; GVII = 50ng/ml e GVIII = 100ng/ml). A seta indica a direção da migração. As linhas pretas superiores indicam a linha de partida e as linhas pretas inferiores indicam a distância média de migração. A distância média da migração foi medida em micrometros (μm). * = $p < 0,05$ em comparação ao demais grupos. Esse procedimento foi realizado em quadriplicata.....	27
Figura 5 - Migração de células ZR75-1 após tratamento com PRL em diferentes dosagens (ng/ml) por 48h sem a utilização de RNAi (GI = controle; GII = 25ng/ml; GIII = 50ng/ml e GIV = 100ng/ml) e com RNAi (GV = controle; GVI = 25ng/ml; GVII = 50ng/ml e GVIII = 100ng/ml). A	

seta indica a direção da migração. As linhas pretas superiores indicam a linha de partida e as linhas pretas inferiores indicam a distância média de migração. A distância média da migração foi medida em micrometros (μm). * = $p < 0,05$ em comparação ao demais grupos. Esse procedimento foi realizado em quadriplicata..... 28

Figura 6 - Em A, observa-se exemplo da área de mensuração do envoltório protéico, uma por célula (faixa laranja), obtida pelo traçado da linha amarela, representado em B. Em B, observa-se a actina corada com Faloidina ligado a vermelho-Texas após a ministração de diferentes concentrações de PRL (ng/ml). O núcleo foi contrastado com DAPI (coloração azul). Em C, o gráfico apresenta a média de espessura do envoltório protéico celular. A mensuração foi realizada em 50 diferentes células por condição de tratamento, obtendo-se cinco diferentes medidas por célula. Esse experimento foi realizado em triplicata. * $p < 0,05$ em comparação aos grupos I (controle) e GII (25 ng/ml)..... 30

Figura 7 - Expressão de c-Src (A) e p-c-Src (B) após ministração de diferentes doses de PRL (ng/ml) sem a utilização de RNAi (GI = controle; GII = 25ng/ml; GIII = 50ng/ml e GIV = 100ng/ml) e com RNAi (GV = controle; GVI = 25ng/ml; GVII = 50ng/ml e GVIII = 100ng/ml). O *Western blot* mostra a quantidade total de proteínas encontradas nas amostras. Os valores densitométricos foram ajustados para a intensidade de GAPDH e em seguida normalizados com a amostra de controle (GI). Em C, o gráfico mostra a relação entre a expressão das formas não fosforilada (c-Src) e fosforilada (p-c-Src). a, b = $p < 0,05$ em comparação ao demais grupos. O experimento foi realizado em quadriplicata..... 31

Figura 8 - Expressão de FAK (A) e p-FAK (B) após ministração de diferentes doses de PRL (ng/ml) sem a utilização de RNAi (GI = controle); GII = 25ng/ml; GIII = 50ng/ml e GIV = 100ng/ml) e com RNAi para o PRLR (GV = controle; GVI = 25ng/ml; GVII = 50ng/ml e GVIII = 100ng/ml). O *Western blot* mostra a quantidade total de proteínas encontradas nas amostras. Os valores densitométricos foram ajustados para a intensidade de GAPDH e em seguida normalizados com a amostra controle (Con). Em C, o gráfico mostra a relação entre a expressão das formas não fosforilada (FAK) e fosforilada (p-FAK). a, b, c = $p < 0,05$ em comparação ao demais grupos. Esse procedimento foi realizado em quadriplicata..... 33

Figura 9 - Expressão de moesina (A) e p-moesina (B) após ministração de diferentes doses de PRL (ng/ml) sem a utilização de RNAi (GI = controle - con; GII = 25ng/ml; GIII = 50ng/ml e GIV = 100ng/ml) e com RNAi para o PRLR (GV = controle; GVI = 25ng/ml; GVII = 50ng/ml e GVIII = 100ng/ml). O *Western blot* mostra a quantidade total de proteínas encontradas nas amostras. Os valores densitométricos foram ajustados para a intensidade de GAPDH e em seguida normalizados com a amostra controle (Con). Em C, o gráfico mostra a relação entre a expressão das formas não fosforilada (Moesina) e fosforilada (p-Moesina) a, b, c = $p < 0,05$ em comparação ao demais grupos. Esse procedimento foi realizado em quadriplicata..... 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos primários utilizados no trabalho.....	22
Tabela 2 - Anticorpos secundários utilizados no trabalho.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS

BCA	Ácido biocincônico
c-Src	<i>Proto-oncogene-tyrosine-protein-kinase</i>
DMEN	<i>Dulbecco's Modified Eagles's Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dsRNA	<i>Double stranded RNA</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino- 2-phenylindole</i>
DOPA	Dopamina
E2	Estrogênio
ER- α	Receptor Alfa de estrogênio
ERM	<i>Ezrin-radixin-moesin</i>
FAK	Quinase de adesão focal
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GH	Hormônio de crescimento
GHRH	Hormônio liberador do hormônio de crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
hPRLR	Receptor de prolactina humano
JAK	Janus quinase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
miRNA	Micro Ácido ribonucléico
PI3-K	<i>Phosphatidylinositol 3-OH-kinase</i>
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoreto
PRL	Prolactina
PRLR	Receptor de prolactina
PRLR-L	Receptor de prolactina – isoforma longa
PTGS	Silenciamento gênico pós-transcricional
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 medium</i>
RNA	Ácido ribonucléico

RNAi	Ácido ribonucléico interferência
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
SFB	Soro fetal bovino
siRNA	Pequeno Ácido ribonucléico interferência
shRNA	<i>Short hairpin</i> Ácido ribonucléico
Stat	Transdutores de sinal e ativadores da transcrição
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina

Resumo

Silva PL. *O efeito da prolactina na migração de células de câncer de mama pela remodelação da actina no citoesqueleto* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: A prolactina é um hormônio polipeptídico que possui reconhecida ação sistêmica, principalmente no sistema reprodutor. O papel desse hormônio no desenvolvimento e na extensão do câncer de mama ainda é muito debatido. A progressão do câncer de mama em grande parte depende do movimento celular e da capacidade da célula em remodelar seu citoesqueleto de actina. Nesse processo, proteínas envolvidas na migração celular, como moesina, FAK e c-Src, são influenciadas por vários hormônios, incluindo a prolactina. O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da PRL na migração de células T47D, MCF-7 e ZR75-1 de câncer de mama, bem como os mecanismos envolvidos. **MÉTODOS:** As células foram cultivadas em placas de cultura com meio suplementado e divididas em oito grupos diferentes de tratamento: Grupo I (veículo); Grupo II (PRL na concentração de 25 ng/mL); Grupo III (PRL na concentração de 50 ng/mL), Grupo IV (PRL na concentração de 100 ng / mL), Grupo V (RNAi + veículo); Grupo VI (RNAi + PRL na concentração de 25 ng/mL); Grupo VII (RNAi + PRL na concentração de 50 ng/mL) e Grupo VIII (RNAi + PRL na concentração de 100 ng / mL). Nos Grupos de I a IV, a reorganização da actina do citoesqueleto foi analisada por imunofluorescência após 30 minutos do tratamento. Em todos os grupos estudados foram realizadas análise da migração horizontal com auxílio de microscopia de luz e avaliadas as expressões de Moesina, p-Moesina, FAK, p-FAK, c-Src e p-c-Src por Western Blot após 48 horas do tratamento. **RESULTADOS:** As células de câncer de mama expostas à prolactina apresentaram um aumento da expressão de Moesina, p-Moesina, FAK, p-FAK, c-Src e p-c-Src. Essas alterações moleculares estão associadas à reorganização da actina do citoesqueleto e ao aumento da mobilidade das células. **CONCLUSÕES:** Nossos dados sugerem que a prolactina aumenta a migração das células T47D, MFC-7 e ZR75-1 de câncer de mama e remodela a actina do citoesqueleto pela via de sinalização intracelular das proteínas c-Src, FAK e moesina.

Descritores: prolactina; neoplasias da mama; movimento celular; citoesqueleto de actina, T47D; MCF-7; ZR75-1.

Abstract

Silva PL. *Prolactin effects on breast cancer cell migration through actin cytoskeleton remodeling* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016

INTRODUCTION: Prolactin is a polypeptide hormone with a recognized systemic action mainly on reproductive physiology. The role of this hormone on breast cancer development and progression has been debated a lot yet. Breast cancer invasion largely depends on cell movement and on the ability to remodel the actin cytoskeleton. In this process, proteins involved in cell migration, such as moesin, FAK and c-Src, are influenced by a large number of hormones, such as prolactin. The present study was aimed for evaluating the effects of PRL on migration of T47D, MCF-7 and ZR75-1 breast cancer cells as well as the molecular mechanisms in this process. **METHODS:** The cells were cultured in dishes with supplemented medium and were divided in eight different assays: Group I (control); Group II (25ng/ml of prolactin); Group III (50ng/ml of prolactin); Group IV (100ng/ml of prolactin); Group V (RNAi + control); Group VI (RNAi + 25ng/ml of prolactin); Group VII (RNAi + 50ng/ml of prolactin); Group VIII (RNAi + 100ng/ml of prolactin). In Groups I to IV, the actin cytoskeletal reorganization was analyzed by immunofluorescence 30 minutes after the treatment. In all groups, were performed the horizontal migration analysis with light microscopy and evaluated the expression of moesin, p-moesin, FAK, p-FAK, c-Src and p-c-Src by Western blot after 48 hours of treatment. **RESULTS:** Breast cancer cells exposed to prolactin display an elevated moesin, p-moesin, FAK, p-FAK, c-Src and p-c-Src expression. These molecular changes are associated with the reorganization of actin cytoskeleton and increased mobility of cells. **CONCLUSION:** Our data suggest that prolactin enhances the migration of T47D, MFC-7 and ZR75-1 breast cancer cells through the actin cytoskeleton remodeling by intracellular signaling pathway of c-Src, FAK and moesin proteins.

Key Words: prolactin; breast neoplasms; cell movement; actin cytoskeleton; T47D; MCF-7; ZR75-1.

1. Introdução

A prolactina (PRL) foi primeiramente descrita como hormônio produzido na hipófise anterior com ação sobre glândulas mamárias, estimulando sua lactação (Stricker e Grueter, 1928). Posteriormente, verificou-se que esse composto polipeptídico, de 199 aminoácidos e três pontes bissulfídicas, também atua na formação de lóbulo-alveolar dos ductos mamários durante a gravidez, na diferenciação terminal das células epiteliais mamárias e na síntese de componentes do leite (Ormandy *et al.*, 2003).

Atualmente, a ação da PRL é muito mais ampla, age tanto em processos reprodutivos quanto não reprodutivos (Huang e Walker, 2010). Portanto, participa na manutenção do equilíbrio hídrico, na diferenciação celular e na resposta imunológica (Ferraris *et al.*, 2013), bem como, atua na regulação de tecidos relacionados a reprodução, como o ovário e o endométrio (Binart *et al.*, 2007; Khodr *et al.*, 2008).

A síntese e a secreção de PRL ocorrem, principalmente, em células especializadas da adeno-hipófise, chamadas de lactotrofos (Hyslop *et al.*, 2016). Após sua liberação, a PRL alcança células-alvo na periferia e ativa seus receptores na membrana celular. No entanto, há produção desse hormônio em sítios extra pituitários, como a mama, o olho, os linfócitos (Freeman *et al.*, 2000). Independente do sítio de produção, a PRL tem propriedades de fator de crescimento, neurotransmissor, ou imunomodulador autócrino ou parácrino. Assim, a PRL produzida localmente pode agir sobre as células adjacentes (parácrina) ou sobre a própria célula secretora de PRL (autócrina) (Bole-Feysot *et al.*, 1998).

que podem levar a divergências entre os níveis séricos desse hormônio e os achados clínicos (Naliato *et al.*, 2008). No organismo humano o tipo mais ativo de PRL é a “pequena” (monomérica), de aproximadamente 23-kDa, representando cerca de 80% de toda PRL sérica. Existem também as formas “grande” (dimérica ou trimérica), com peso molecular de 48 a 56-kDa, e a “super grande” (macroprolactina), a qual deriva de um complexo antígeno-anticorpo de PRL monomérica e de imunoglobulinas, com peso molecular de 150 a 170-kDa. São descritas ainda a PRL que resulta da glicosilação da forma monomérica (glicosilada, de 25-kDa) e a PRL de 8kDa e/ou 16-kDa que resulta da clivagem da PRL monomérica (Nahas *et al.*, 2006).

Apesar de o papel da PRL na fisiologia da glândula mamária ser bem definido na literatura (Aljazaf *et al.*, 2003; Casey *et al.* 2014; Monasteiro *et al.*, 2014; Raven *et al.*, 2014), os investigadores têm voltado a atenção para a capacidade da PRL contribuir para a gênese e/ou desenvolvimento do câncer de mama (Wei *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2011; Bostanci *et al.*; 2014; Tikk *et al.*; 2014; Tan *et al.*, 2014).

O câncer de mama é uma das neoplasias mais frequentes em medicina, com alta taxa de mortalidade entre mulheres em todo o mundo (Cao *et al.*, 2013). Por muitos anos, a investigação do câncer é focada em encontrar melhores estratégias terapêuticas e novas abordagens moleculares para reduzir a mortalidade. No entanto, apesar de avanços em novas terapias ter aumentado a taxa de sobrevivência, ainda existe elevado índice de mortalidade e morbidade provenientes dessa doença (Barzegar *et al.*, 2015). A complexidade do câncer e sua interação com os mais variados tipos de

hormônios, como a PRL, pode contribuir para seu desenvolvimento e progressão (Fresno-Vara *et al.*, 2001).

Níveis elevados de PRL sérica estão relacionados ao risco elevado de desenvolvimento do câncer mamário, bem como ao pior prognóstico (Tworoger e Hankinson, 2008). Além disso, roedores transgênicos com alta concentração de PRLR no tecido mamário desenvolvem frequentemente mais neoplasias malignas (Rose-Hellekant, 2003). Sabe-se ainda que a PRL é capaz de antagonizar a toxicidade de agentes quimioterápicos, reduzindo a eficácia de alguns tratamentos disponíveis (LaPensee *et al.*, 2009), o piora o prognóstico das mulheres com câncer mamário e permite maior disseminação da doença.

Os efeitos da PRL no câncer de mama são mediados pela interação com seu receptor (PRLR) (Pierce *et al.*, 2001; Binart *et al.*, 2010) que, além de ser observado em cerca de 80% de amostras dessa doença (Bonneterre, 1987), é importante para a sobrevivência e invasão neoplásica (Pierce *et al.*, 2001). Por isso, alguns investigadores acreditam que o PRLR pode ser possível alvo no desenvolvimento de novas terapias contra o câncer de mama (Wei *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2014).

O PRLR é membro da superfamília de receptores do tipo citocina. Esse receptor é expresso principalmente em regiões relacionadas ao metabolismo da reprodução e encontra-se amplamente, distribuído em vários órgãos e tecidos: mamas, ovários, endométrio, hipófise, fígado, córtex adrenal, rins, próstata, testículos, vesícula seminal, intestino, epiderme, ilhotas pancreáticas, pulmões, miocárdio, cérebro, linfócitos e osso (Bole-Feysot *et*

al., 1998). Este fato mostra que a prolactina teria influência em vários sistemas no organismo.

Em humanos, as isoformas mais abundantes são a forma longa (PRLR-L) e as formas curtas 1a e 1b (Clevenger *et al.*, 2009). Essas diferentes isoformas do PRLR diferem no comprimento e na composição do seu domínio citoplasmático, enquanto o domínio extracelular é idêntico em todas as isoformas (Bole-Feysot *et al.*, 1998).

O PRLR localiza-se na superfície da célula e é composto por três domínios: extracelular, transmembrana e intracitoplasmático. A dimerização desse receptor ocorre quando uma molécula de PRL se liga a duas de PRLR, ativando diversas cascatas de sinalização e influenciando uma série de atividades no interior da célula (Goffin e Kelly, 1997).

Dentre as cascatas intracelulares ativadas pelo PRLR encontram-se vias de sinalização oncogênicas, como a JAK2 e a STAT5 (Canbay *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 2002), que podem estimular a proliferação de células cancerígenas e o crescimento tumoral (Goffin *et al.*, 2005). A ativação dessas vias possui papel direto na proliferação, na sobrevivência e na dinâmica do citoesqueleto, influenciando o desenvolvimento e a progressão de tumores mamários (Jacobson *et al.*, 2010).

Em tumores periféricos, a inibição terapêutica do complexo PRL/PRLR e de sua via de sinalização oncogênica, pode ser feita utilizando antagonistas do PRLR, anticorpos bloqueadores e/ou RNA interferência (RNAi) que possuem potencial terapêutico e bloqueador da ação da PRL (Ferraris *et al.*,

2013). Por essa razão, podemos empregar o RNAi em estudos experimentais para avaliar a via de sinalização da PRL.

O efeito de antagonistas do PRLR na diminuição do crescimento tumoral foi descrito por vários investigadores, mas há dúvida se a inibição da via oncogênica de sinalização do PRLR poderia interferir em outros processos regulados pela PRL, incluindo a apoptose, bem como produção de PRL que é regulada por seu receptor (Llovera *et al.*, 2000; Goffin *et al.*, 2005). Outro problema é que essa terapia molecular aumente a autofagia e morte celular programada em tecido normal (Wen *et al.*, 2014). Portanto, há necessidade do melhor entendimento do sinal celular da PRL e sua relação com modificações no citoesqueleto, bem como a proliferação e apoptose em cultura celular (Tallet *et al.*, 2008). Assim, a ampliação dos conhecimentos sobre o citoesqueleto é importante. Portanto, o emprego de uma substância que possa bloquear sua ação, como RNAi, é essencial para verificar se o sinal celular que influencia as estruturas celulares, realmente vem do complexo PRL/PRLR.

Estudos *in vitro* mostram que o RNAi tem grande ação em bloquear a sinalização intracelular da PRL em células de câncer de mama, como as T47D, MCF-7 e ZR75-1 (Acosta *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2008). O RNAi é poderoso agente que promove o silenciamento gênico pós-transcricional (*post transcription gene silencing* – PTGS), diminuindo a produção do RNA mensageiro (RNAm) do receptor de PRL (Hannon, 2002).

O mecanismo de silenciamento por RNAi compreende uma molécula de fita dupla de RNA (*double stranded RNA* – dsRNA) que após ser conectada

na forma ativa a um complexo intracitoplasmático, silencia uma sequência de nucleotídeos complementar localizada no RNAm-alvo, por degradação do RNAm e inibição da tradução. A classificação dos dsRNAs, de acordo com sua origem e função, é feita em pelo menos três categorias: micro RNAs (miRNA), *short hairpin* RNAs (shRNAs) e pequeno RNA interferência (siRNAs) (Franca *et al.*, 2010). Sabe-se que uma das vias de sinalização celular da PRL poderia alterar o citoesqueleto e propiciar maior mobilidade celular e eventualmente, a saída das células do sítio original, favorecendo a metástase (Flamini *et al.*, 2014).

A migração celular é processo essencial para a manutenção do equilíbrio do organismo, feito principalmente por células sanguíneas do sistema imune. O movimento de uma célula ou grupo de células, de uma área para outra, geralmente em resposta a um sinal químico, está relacionado à reparação de tecidos, diferenciação celular e ao desenvolvimento embrionário. Contudo, esse evento realizado por células que não deveriam ter esta mobilidade, pode trazer problemas ao organismo e propiciar a progressão de várias doenças, como a disseminação de neoplasias malignas (Simoncini *et al.*, 2006).

No câncer, a migração celular é devido à remodelação da actina, tornando-a dinâmica e possibilitando a mobilidade celular. Além disso, há também diminuição da adesão celular à sua matriz (Acconcia *et al.*, 2006). Esse processo conduz a variações morfológicas da membrana celular, como aumento de sua espessura, formação de estruturas especializadas ligadas ao movimento de células, como pseudópodes, ondulações e até vilosidades.

Essas estruturas também podem estar relacionadas à ação de esteroides e da PRL (Pollard e Borisy, 2003).

Em células MCF-7 de câncer de mama, após a ministração de estrogênio (E2), observa-se maior ativação da *Membrane Organizing Extension Spike Protein* (moesina) ligada à actina (Song *et al.*, 2002). O mesmo processo também ocorre em outras células, como as do câncer de endométrio (Flamini *et al.*, 2011) e endoteliais humanas, onde esse hormônio também determina alterações do citoesqueleto, permitindo a migração (Simoncini *et al.*, 2006). Sabe-se ainda que o E2 pode ter influência da PRL nesse processo (Pollard e Borisy, 2003). Contudo, os mecanismos envolvidos ainda não são bem conhecidos.

A PRL atua sinergicamente com o E2 no crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular, inclusive em células de câncer de mama. Essa associação determina rápida formação de estruturas especializadas da membrana plasmática. Por isso, a alteração na arquitetura do citoesqueleto por ativação da moesina poderia ser justificada em parte pela PRL (Song *et al.*, 2002).

A moesina pertence à família *ezrin-radixin-moesin* (ERM) de proteínas de ligação à actina. Quando ativadas, as ERMs induzem a despolimerização e a reorganização da actina em direção a parte externa da membrana da célula, levando a formação de complexos de actina nesta região (Bretscher *et al.*, 1997). Esses complexos ajudam a formação de pontes moleculares entre o citoesqueleto de actina, integrinas e complexos de adesão focal. Essas estruturas são fundamentais para o movimento de células em muitas

circunstâncias, incluindo progressão e migração do câncer de mama. O conjunto de eventos que ocorre na célula com a redistribuição de actina pode ser fundamental para o movimento celular e a invasão da matriz extracelular (Simoncini *et al.*, 2006).

Outra proteína envolvida na adesão, na migração e na invasão celular, passos fundamentais para o desenvolvimento do câncer e metástase, é a Quinase de Adesão Focal (FAK), ou seja, tirosinaquinase não participante da resposta envolvendo o receptor (McLean *et al.*, 2005). Sabe-se que o aumento da expressão de FAK é correlacionado com aumento da mobilidade celular e da proliferação celular (Owens *et al.*, 1995). FAK é ativada por c-Src (*Proto-oncogene-tyrosine-protein-kinase*), tirosinoquinase que recruta FAK para o complexo c-Src. Além disso, a ativação de c-Src é associada com a progressão e maior agressividade tumoral. Nessa via, há evidências que a PRL pode interferir (Irby e Yeatman, 2000).

O recrutamento de intermediários da sinalização como c-Src e FAK são influenciados pela PRL em células neoplásicas da mama. Em geral, a ativação de PI3K (*Phosphatidylinositol 3-OH-kinase*) pela PRL resulta da ligação direta do PRLR ou da ativação de c-Src (Acosta *et al.*, 2003). Esse mecanismo é muito semelhante às ações do Receptor Alfa de estrogênio (ER- α), que modula a actina citoesquelética pelo mesmo mecanismo de sinalização (Sanchez *et al.*, 2011).

A ativação de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e de PI3K é mecanismo estabelecido pela ação estrínica, que pode modular a arquitetura do citoesqueleto em células de câncer de mama. O resultado final

dessa via celular é a interação de actina com as integrinas e FAK, permitindo o movimento da célula no meio extracelular (Fu *et al.*, 2008).

A PRL é capaz de influenciar o crescimento e a diferenciação celular no tecido mamário, bem como reduzir a resposta ao tratamento quimioterápico e piorar o prognóstico das mulheres com câncer mamário (LaPensee *et al.*, 2009). Contudo, sua participação na mobilidade celular e nos mecanismos intracelulares envolvidos ainda é pouca conhecida, principalmente seus efeitos sobre o citoesqueleto. Portanto, o objetivo desse estudo é verificar essa possibilidade, pela análise do movimento horizontal de células de câncer de mama durante a exposição à PRL, bem como pelo estudo de modificações no citoesqueleto e as vias de sinalização envolvidas nesse processo.

2. Objetivos

2.1. Geral

- Avaliar os efeitos moleculares da PRL na migração de células T47D, MCF-7 e ZR75-1 de câncer de mama.

2.2. Específicos

- Analisar a migração horizontal celular;
- Detectar a expressão das proteínas Moesina, p-Moesina, *FAK*, *p-FAK*, c-Src, p-c-Src;
- Verificar a localização intracelular de fibras de Actina e a espessura do envoltório protéico celular.

3. Métodos

Este estudo foi, primariamente, submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPESQ – HCFMUSP). Termo de aprovação número: 488/13 (Anexo 1)

Esta pesquisa foi realizada no laboratório de Biologia Molecular e Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de Pisa sob a supervisão do Professor Tommaso Simoncini, da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Medicina Clínica e Experimental da mesma Instituição e recebeu o termo de aprovação número: 0715/14 (Anexo 2).

3.1 Cultura celular

As células T47D (ATCC®HTB-133™), ZR75-1 (ATCC®CRL-1500™) e MCF-7 (ATCC®HTB-22™) de câncer de mama foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC®, Manassas, VA, USA) e cultivadas pelo método descrito previamente (Ray *et al.*, 2011). Primeiramente, as células foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 2 minutos e transferidas para frascos de cultura.

As linhagens T47D e ZR75-1 foram mantidas no meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute 1640 medium* (1X) (RPMI). As células MCF-7 foram mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagles's Medium* (DMEM). Os meios de cultura foram suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 1,2% de L-glutamina, 1,2% de penicilina, 1,2% de HEPES (2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonicacid), 1,2% de piruvato, 2,4% de

bicarbonato de sódio e 0,24% de insulina a 37°C em ambiente com 5% de CO₂. O RPMI foi comprado da Gibco®, Thermo Fisher (USA) enquanto os outros reagentes foram adquiridos da Sigma® (USA). O crescimento das células foi monitorado diariamente com microscópio invertido de contraste de fase e o meio de cultura trocado a cada 48h. Toda a manipulação ocorreu em capela de fluxo laminar.

Quando as células atingiram a confluência de 70% a 80%, foram coletadas após a ministração de tripsina. Após esse procedimento, o material foi centrifugado, o sobrenadante foi descartado e o restante foi ressuspendido. As células foram contadas em câmara de Neubauer com o auxílio do microscópio óptico e coradas com azul de Trypan. Foram consideradas viáveis quando a contagem foi superior a 80% das células não coradas. Posteriormente, as células foram semeadas em diferentes placas de cultura com seis poços (35mm de diâmetro cada) na concentração de 2×10^4 células/ml, com 2ml de meio, a 37°C em ambiente úmido com 5% de CO₂.

3.2. Tratamento

Antes do tratamento, todas as células foram mantidas por 24h em meio de cultura contendo SFB com carvão ativado para retirada de esteroides. Após esse procedimento, foram mantidas por 8h em meio de cultura sem a suplementação de SFB. Cada linhagem celular foi dividida em oito grupos: GI – veículo; GII – 25ng/ml de PRL; GIII – 50 ng/ml de PRL; GIV – 100 ng/ml de

PRL (Acosta *et al.*, 2003); GV – RNAi + veículo; GVI – RNAi + 25ng/ml de PRL; GVII – RNAi +50 ng/ml de PRL e; GVIII – RNAi + 100 ng/ml de PRL.

Após a ministração de PRL, os grupos de I a IV foram monitorados em 30 min para a realização da imunofluorescência e em 48h para migração e *Western Blot* (Fu *et al.*, 2008). Os grupos de V a VIII foram monitorados em 48h para posterior procedimento de *Western Blot* e análise da migração horizontal.

As doses de PRL (proteína recombinante humana, Abnova, Taiwan) seguiram estudo realizado por Acosta *et al.* (2003).

3.3. RNAi - Silenciamento com siRNA

No processo inicial da transfecção para silenciamento do PRLR foi utilizado o RNA interferência pequeno (siRNA) para hPRLR (PRLR humano) (sc-106337 Santa Cruz, USA) com a sequência: (5'->3') senso GGGCUAUAGCAUGGUGACCTt e antisenso GGUCACCAUGCUAUAGCCCtt (Life Technologies®, USA). Como controle negativo, foi utilizado o siRNA-A controle (sc-37007) (Santa Cruz, USA), sendo um siRNA sem conexão com nenhum gene específico das células empregadas.

Para a transfecção do siRNA, as células foram semeadas em placas para cultura com seis poços com meio de cultura suplementado com 10% de SFB sem antibiótico em confluência de 70-80%. Depois de 12h, as células foram transfectadas com o siRNA usando a Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

O siRNA foi diluído em 100 µl do meio Opti-MEM (Life Technologies®, USA) para atingir uma concentração final de 30 nM quando adicionados às células, enquanto 6 µl de Lipofectamina foram diluídos em 100 µl do meio Opti-MEM. Ambas as soluções foram misturadas cuidadosamente e, após 5 minutos, as duas soluções foram combinadas e incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o complexo de transfecção foi adicionado aos 2 ml de meio de cultura, produzindo um volume final de 2,2 mL. A transfecção ocorreu por 6h, quando novo meio foi adicionado às células. Após esse procedimento, as células transfectadas foram incubadas por 72h a 37°C em ambiente úmido com 5% de CO₂. A eficiência da transfecção foi monitorada por *Western Blot*. Em geral, é esperado que o silenciamento ocorra após 48h do início do experimento.

De acordo com as instruções do fabricante, foram testadas as dosagens tanto do siRNA quanto da lipofectamina. Após o monitoramento por *Western Blot*, foi encontrada a dosagem utilizada nos experimentos com siRNA. A eficácia do silenciamento do PRLR foi observada com a utilização de 75 pmol de SiRNA e 6µl de lipofectamina após 48h (Fig. 2).

Fig. 2 - Teste de dosagens do siRNA e da lipofectamina utilizados nos experimentos.

3.4. Migração celular

A migração celular foi avaliada por meio de raspagem com lâmina de aço, como descrito por Simoncini *et al.* (2006). A lâmina foi pressionada no poço de plástico para marcar a linha de partida e com isso, as células foram retiradas de um lado da linha. Após esse procedimento, foram realizadas duas lavagens com PBS para remover as células soltas e 2 ml de RPMI contendo SFB privado de esteroides foram adicionados. Um inibidor seletivo da síntese de DNA que não inibe a síntese de RNA, (*Cytosine β-D-arabinofuranoside hydrochloride*, Sigma-Aldrich) (10μM), foi usado 1h antes da ministração de PRL para prevenir a proliferação celular. A migração foi monitorada por 48h e

a cada 12h novo meio de cultura e o tratamento foram substituídos. As células foram fotografadas digitalmente por uma câmera de alta resolução DP70 (Olympus) e a distância de migração, a partir da linha delimitada, foi medida com microscopia de contraste de fase (Olympus BX41). Esse experimento foi realizado em quadriplicata.

3.5. Imunofluorescência

O cultivo celular foi realizado em placas de culturas com poço contendo lamínula autoclavada. Depois de 30 minutos de exposição à PRL, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos e permeabilizadas com Triton 0,1% por 30 minutos. Em seguida, foi realizado o bloqueio com soro bovino fetal a 3% por 30 minutos. As células foram então incubadas com anticorpo ligado a Vermelho-Texas contra Faloidina (Sigma-Aldrich, Gillingham, England) (1: 40) por 20 minutos. O núcleo foi contrastado com DAPI (4',6-diamidino- 2-phenylindole) (Sigma-Aldrich) a 300nM por 5 minutos. Entre cada incubação foram feitas três lavagens com Triton 0,5%. As lâminas de vidro foram montadas com meio de montagem *Vectashield* (Vector Labs, USA) sobre as superfícies contendo células. Todo o procedimento foi realizado em temperatura ambiente e na ausência de luz.

As amostras foram examinadas utilizando microscópio de fluorescência Olympus BX41 e gravadas por uma câmera digital de alta resolução DP70 (Olympus). As imagens adquiridas foram processadas com o programa Adobe Photoshop CS5.1 e convertidas para escala de cinza. Foram

analisadas, em 50 células por condição, uma distância de 40 pixels, que percorria o espaço extracelular, toda a espessura da membrana celular e o espaço intracelular. Cinco medidas foram realizadas em cada célula. A espessura da membrana (μm) foi avaliada utilizando o programa de análise de imagens ImageJ (*National Institute of Health – NIH, USA*). Esse procedimento foi realizado em triplicata.

3.6. Western Blot (immunoblotting)

Após o tratamento, o meio de cultura das células foi removido, os poços foram lavados 2 vezes com PBS 1X frio e colocados sobre gelo. O lisado celular foi colhido com 100 mM NaCl, 1.0% Triton X-100, 50 mM Tris-HCL pH 7.5 e 0,1 mg/mL de fenil metil sulfonil fluoreto (PMSF), um inibidor de proteases, e as amostras foram estocadas a -80°C até serem utilizadas para o procedimento *Western Blot*.

Foi tomada uma amostra de cada ensaio e realizada a quantificação por meio do método do ácido biocincônico (*BCA Protein Assay Reagent Kit – Pierce*). Após obter a quantificação das amostras, foi utilizada a mesma quantidade de proteínas totais nos grupos estudados, para posteriormente ocorrer a análise da porcentagem em que cada proteína de interesse se apresenta dentro dessas proteínas totais.

A fração proteica dos lisados celulares foi separada por eletroforese vertical em gel de acrilamida/bisacrilamida a 10%, utilizando condições estabelecidas previamente (Laemmli, 1970). Após a eletroforese, as proteínas

foram transferidas para membranas de nitrocelulose e as reações de *Western Blot* foram feitas (Towbin et al., 1979).

Os anticorpos primários (Tabela 1) foram incubados por 2h em temperatura ambiente, sob agitação.

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados no trabalho

Anticorpo	Código	Marca	Diluição
PRLR	ID5618	Abnova, Taiwan	1:750
Moesina	SC6410	Santa Cruz, USA	1:200
p-moesina	SC12895	Santa Cruz, USA	1:150
FAK	SC271195	Santa Cruz, USA	1:200
p-FAK	SC11765-R	Santa Cruz, USA	1:500
c-Src	SC5266	Santa Cruz, USA	1:200
p-c-Src	SC166860	Santa Cruz, USA	1:150
GAPDH	SC59540	Santa Cruz, USA	1:200

As membranas foram lavadas com TBS (*tris-buffered saline*) três vezes por cinco minutos. Em seguida foram incubadas com os anticorpos secundários (Tabela 2), em agitação, por 2h e em temperatura ambiente.

Tabela 2: Anticorpos secundários utilizados no trabalho

Anticorpo	Código	Marca	Diluição	Secundário para
Anti-Coelho	SC2357	Santa Cruz, USA	1:3000	PRLR
Anti-Cabra	SC2768	Santa Cruz, USA	1:3000	Moesina, p-moesina e GAPDH
Anti-Camundongo	SC2005	Santa Cruz, USA	1:3500	FAK, p-FAK, c-Src e p-c-Src

A detecção do sinal foi realizada pelo método de quimioluminescência e foi registrada com um sistema de imagem digital quantitativa (*Quantity One*, BioRad, Hercules, CA, USA), o que permitiu a avaliação da saturação. A análise densitométrica das bandas foi quantificada por meio da intensidade de pixels com o auxílio do software *ImageJ* (software de domínio público desenvolvido por Wayne Rasband, NIMH, NIH, USA).

3.7. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de *Kruskal-Wallis*, e complementados com o teste do *post-hoc* de *Dunn*. Em todos os testes, fixou-se em 0,05 ou 5% ($\alpha \leq 0,05$) o nível de rejeição da hipótese de nulidade. As análises foram efetuadas empregando-se o programa *GraphPad Prism6*. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão da média, tanto nas figuras quanto no texto.

4. Resultados

4.1. Efeitos da prolactina na migração de células T47D, MCF7 e ZR75-1 de câncer de mama

Após 48h da ministração de PRL, células T47D (Fig. 3), MCF7 (Fig. 4) e ZR75-1 (Fig. 5), nos grupos GIII (PRL-50ng/ml) e GIV (PRL-100ng/ml) responderam com maior média (μm) de distância de migração em comparação aos outros grupos (GI e GII, $p < 0,05$). Por outro lado, observamos diminuição da distância percorrida pelas células quando utilizamos o RNAi para o PRLR, independente da ministração e/ou dosagem de PRL.

Fig. 3 - Migração de células T47D após tratamento com PRL em diferentes dosagens (ng/ml) por 48h sem a utilização de RNAi (GI = controle; GII = 25ng/ml; GIII = 50ng/ml e GIV = 100ng/ml) e com RNAi (GV = controle; GVI = 25ng/ml; GVII = 50ng/ml e GVIII = 100ng/ml). A seta indica a direção da migração. As linhas pretas superiores indicam a linha de partida e as linhas pretas inferiores indicam a distância média de migração. A distância média da migração foi medida em micrometros (μm). * = $p < 0,05$ em comparação ao demais grupos. Esse procedimento foi realizado em quadriplicata.

Fig. 4 - Migração de células MCF-7 após tratamento com PRL em diferentes dosagens (ng/ml) por 48h sem a utilização de RNAi (GI = controle; GII = 25ng/ml; GIII = 50ng/ml e GIV = 100ng/ml) e com RNAi (GV = controle; GVI = 25ng/ml; GVII = 50ng/ml e GVIII = 100ng/ml). A seta indica a direção da migração. As linhas pretas superiores indicam a linha de partida e as linhas pretas inferiores indicam a distância média de migração. A distância média da migração foi medida em micrometros (μm). * = $p < 0,05$ em comparação ao demais grupos. Esse procedimento foi realizado em quadriplicata.

Fig. 5 - Migração de células ZR75-1 após tratamento com PRL em diferentes dosagens (ng/ml) por 48h sem a utilização de RNAi (GI = controle; GII = 25ng/ml; GIII = 50ng/ml e GIV = 100ng/ml) e com RNAi (GV = controle; GVI = 25ng/ml; GVII = 50ng/ml e GVIII = 100ng/ml). A seta indica a direção da migração. As linhas pretas superiores indicam a linha de partida e as linhas pretas inferiores indicam a distância média de migração. A distância média da migração foi medida em micrometros (μm). * = $p < 0,05$ em comparação ao demais grupos. Esse procedimento foi realizado em quaduplicata.

4.2. Efeito da PRL no remodelamento da actina no citoesqueleto

A adição de PRL nas concentrações de 50 ng/ml (GIII) e 100 ng/ml (GIV) também resultou em maior reorganização da actina (aumento da intensidade da coloração), com remodelação dos microfilamentos em direção a parte mais externa da membrana celular e aumento da espessura do envoltório proteico celular quando comparado a GI e GII.

A exposição à PRL foi associada à formação de estruturas de membrana especializadas ligadas ao movimento celular, como pseudópodes e ondulações na membrana (Fig. 6 B, setas brancas). A mudança ocorrida na espessura do envoltório proteico celular também teve relação com a concentração de PRL ministrada, ou seja, maior nos grupos III e IV do que nos grupos I e II. A análise morfológica por imunofluorescência evidenciou que as células tratadas com 50ng/ml (GIII) e 100ng/ml (GIV) de PRL apresentaram maior espessura dessa estrutura em comparação aos GI e GII ($p<0,001$) (Fig. 6 C).

Fig. 6 - Em A, observa-se exemplo da área de mensuração do envoltório protéico, uma por célula (faixa laranja), obtida pelo traçado da linha amarela, representado em B. Em B, observa-se a actina corada com Faloidina ligado a vermelho-Texas após a ministração de diferentes concentrações de PRL (ng/ml). O núcleo foi contrastado com DAPI (coloração azul). Em C, o gráfico apresenta a média de espessura do envoltório protéico celular. A mensuração foi realizada em 50 diferentes células por condição de tratamento, obtendo-se cinco diferentes medidas por célula. Esse experimento foi realizado em triplicata. * $p < 0,05$ em comparação aos grupos I (controle) e GII (25 ng/ml).

4.3. Expressão de c-Src e p-c-Src

O tratamento com PRL nos grupos GIII (PRL-50ng/ml) e GIV (PRL-100ng/ml) aumentou a expressão de c-Src (Fig. 7 A) e p-c-Src (Fig. 7 B)

em relação aos grupos I e II. Houve diminuição significativa da intensidade das bandas após o silenciamento do PRLR (GV ao GVIII).

Fig. 7 - Expressão de c-Src (A) e p-c-Src (B) após ministração de diferentes doses de PRL (ng/ml) sem a utilização de RNAi (GI = controle; GII = 25ng/ml; GIII = 50ng/ml e GIV = 100ng/ml) e com RNAi (GV = controle; GVI = 25ng/ml; GVII = 50ng/ml e GVIII = 100ng/ml). O *Western blot* mostra a quantidade total de proteínas encontradas nas amostras. Os valores densitométricos foram ajustados para a intensidade de GAPDH e em seguida normalizados com a amostra de controle (GI). Em C, o gráfico mostra a relação entre a expressão das formas não fosforilada (c-Src) e fosforilada (p-c-Src). a, b = $p < 0,05$ em comparação ao demais grupos. O experimento foi realizado em quadruplicata.

4.4. Expressão de FAK e p-FAK

As expressões de FAK e p-FAK foram maiores em todos os ensaios onde a PRL foi ministrada (GII - 25ng/ml, GIII - 50ng/ml e GIV - 100ng/ml) em comparação ao GI (controle) ($p < 0,05$). Após o emprego do silenciamento do PRLR (GV ao GVIII), houve diminuição da intensidade das bandas (Fig. 8 A-C).

Fig. 8 - Expressão de FAK (A) e p-FAK (B) após ministração de diferentes doses de PRL (ng/ml) sem a utilização de RNAi (GI = controle); GII = 25ng/ml; GIII = 50ng/ml e GIV = 100ng/ml) e com RNAi para o PRLR (GV = controle; GVI = 25ng/ml; GVII = 50ng/ml e GVIII = 100ng/ml). O *Western blot* mostra a quantidade total de proteínas encontradas nas amostras. Os valores densitométricos foram ajustados para a intensidade de GAPDH e em seguida normalizados com a amostra controle (Con). Em C, o gráfico mostra a relação entre a expressão das formas não fosforilada (FAK) e fosforilada (p-FAK). a, b, c = $p < 0,05$ em comparação ao demais grupos. Esse procedimento foi realizado em quadruplicata.

4.5. Expressão de moesina e p-moesina

A expressão de moesina foi maior em todos os ensaios submetidos à PRL ($p < 0,05$). Quanto a p-moesina, os grupos III e IV tiveram as maiores intensidades de bandas em comparação ao GI (Con) e GII ($p < 0,05$). O RNAi para PRLR diminuiu as expressões nos grupos V ao VIII (Fig. 9).

Fig. 9 - Expressão de moesina (A) e p-moesina (B) após ministração de diferentes doses de PRL (ng/ml) sem a utilização de RNAi (GI = controle - con; GII = 25ng/ml; GIII = 50ng/ml e GIV = 100ng/ml) e com RNAi para o PRLR (GV = controle; GVI = 25ng/ml; GVII = 50ng/ml e GVIII = 100ng/ml). O *Western blot* mostra a quantidade total de proteínas encontradas nas amostras. Os valores densitométricos foram ajustados para a intensidade de GAPDH e em seguida normalizados com a amostra controle (Con). Em C, o gráfico mostra a relação entre a expressão das formas não fosforilada (Moesina) e fosforilada (p-Moesina) a, b, c = $p < 0,05$ em comparação ao demais grupos. Esse procedimento foi realizado em quadruplicata.

5. Discussão

A migração celular do sítio tumoral a tecidos a distância é ainda um enigma para muitos investigadores. Entretanto, sabe-se que esse processo pode piorar a resposta ao tratamento do câncer, bem como o prognóstico do paciente (Fontanella *et al.*, 2015; Parsa *et al.*, 2016). Portanto, compreender os mecanismos que estão envolvidos nesse processo é de suma importância. Em nosso estudo, observamos que a PRL aumentou a migração de células T47D, MCF-7 e ZR75-1 de câncer de mama pela mudança estrutural no citoesqueleto e pelo aumento da expressão de proteínas relacionadas com a mobilidade celular, como c-Src, moesina e FAK. Este fenômeno pode ser a grande contribuição do nosso estudo para entender a migração celular estimulada pela PRL.

Salienta-se que essas alterações das proteínas no citoesqueleto ocorreram após ativação do complexo PRL/PRLR que foi completamente bloqueado pelo emprego do RNA interferência (Ferraris *et al.*, 2013). Além disso, outros investigadores sugerem que a resposta de sinalização intracelular que possa estar envolvida com a mobilização celular, possa ter a participação de vias oncogênicas, como a JAK2 e a STAT5 (Canbay *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 2002), que podem estimular a proliferação de células cancerígenas e o crescimento tumoral (Goffin *et al.*, 2005). A ativação dessas vias possui papel direto na proliferação, na sobrevivência e na dinâmica do citoesqueleto, influenciando o desenvolvimento e progressão de tumores mamários (Jacobson *et al.*, 2010).

A mobilidade celular depende da habilidade da célula em remodelar sua membrana plasmática e formar estruturas como ondulações (*ruffles*) e

pseudópodes, que permitem a adesão a outras proteínas extracelulares e/ou outras células, favorecendo a migração celular (Giretti *et al.*, 2014). Nesse processo, as proteínas que se ligam à actina são solicitadas para realizar a despolimerização e reorganização dos microfilamentos de actina na membrana celular. Algumas quinases (FAKs) são posteriormente solicitadas a formar complexos de adesão focal, estruturas compostas de actina e vinculina, que medeiam a firme adesão à matriz extracelular (Flamini *et al.*, 2011). Esses controladores são regulados por c-Src, que formam complexos de sinalização de várias proteínas com receptores de membrana e é regulada por um número de hormônios (Sanchez *et al.*, 2011), incluindo a prolactina.

Salienta-se também que outro sistema semelhante ao nosso estudo foi feito empregando a ativação do complexo estrogênio/ ER α em células endoteliais humanas, que culminou no incremento da migração celular (Simoncini *et al.* 2006).

A mobilização das células determinada pelo estrogênio também envolve outros mecanismos, como a cascata da tirosina quinase e MAP (*Mitogen Activated Protein*) quinase (Giretti e Simoncini, 2008). Estes mecanismos podem também ser ativados pela prolactina pela ação da proteína JAK (Das e Vonderhaar, 1996; Sato *et al.*, 2013). Além disso, alguns autores sugerem que os dois hormônios poderiam ter ação sinérgica, o que incrementaria a migração celular (Oladimeji *et al.*, 2016).

Além da ativação da cascata intracelular da PRL, este hormônio poderia ainda estar diretamente associado a efeitos na matriz extracelular (MEC) do tecido neoplásico mamário. Em análise tridimensional do colágeno

tipo I, observou-se que células T47D responderam com aumento da densidade da MEC após estímulo da PRL (Barcus *et al.*, 2015). Além disso, o câncer em estágio avançado pode progredir com o depósito de colágeno fibrilar no tecido conjuntivo próximo ao tumor (desmoplasia) (Alowami *et al.*, 2003). Nesse contexto, a PRL pode induzir a reorganização do colágeno, aumentando a incidência de fibras orientadas radialmente, modificando a rigidez do tecido (Conklin *et al.*, 2011). O aumento da rigidez mecânica da MEC ativa cascatas de sinalização FAK e quinases da família Src, que por sua vez estimulam a mobilidade celular e a capacidade de invasão tecidual (Butcher *et al.*, 2009). Apesar de não ter sido avaliado, esse mecanismo também pode estar influenciando a mobilidade celular em nosso estudo.

Em células T47D, quinases da família Src acionadas pela PRL produzem sinais pró-tumorigênicos que induzem proliferação e movimento celular. Apesar da JAK2/STAT5 ser a via intracelular mais importante na ação da PRL, a sinalização de quinases da família Src pode ativar vários mecanismos envolvidos na proliferação do câncer de mama (Piazza *et al.*, 2009).

A maior densidade da MEC estimulada pela PRL leva a progressão principalmente do câncer de mama tipo ER α positivo (ER α +). Nesse tipo de câncer, a modificação do alinhamento das fibras colágenas (que se tornam mais perpendiculares na superfície da célula) é fator preditivo de sua agressividade (Barcus *et al.*, 2013) que também é alvo da prolactina (Barcus *et al.*, 2015). Possivelmente, a PRL pode ter uma ação sinérgica ao estrogênio na MEC (Oladimeji *et al.*, 2016).

Cerca de 75% dos cânceres de mama expressam ER α , fazendo desse receptor alvo primário na terapia anticâncer. No entanto, aproximadamente 25% das terapias ER α -alvo possuem maus prognósticos (Anderson, Katki, Rosenberg, 2011). Mudanças na MEC e o *crosstalk* PRLR-ER podem ter grande relevância nessa incidência (Barcus *et al.*, 2015). A PRL pode ser considerada como fator de risco para a metástase do câncer de mama, uma vez que o PRLR é expresso na maioria dos cânceres ER α + (Tworoger *et al.*, 2013).

Os ensaios com as maiores taxas de migração também apresentaram expressão elevada de c-Src. Essa proteína, quando estimulada pela PRL, leva a ativação de FAK, uma importante tirosina-quinase, não-receptora, que recruta quinases da família Src e modula o ciclo de renovação celular. A ativação pode acontecer na região da membrana plasmática ou próximo dela (Thamilselvan *et al.*, 2007). FAK também é uma importante proteína de sinalização que agrega sinais de integrinas para filamentos de actina durante a migração celular (Mitra, Hanson, Schlaepfer, 2005).

O mecanismo da FAK pode ser iniciado por múltiplos fatores e de diferentes formas (McLean *et al.*, 2005). A fosforilação dessa proteína na região Tyr397 induz a formação de complexos focais de adesão (Thamilselvan *et al.*, 2007; Kolli-Bouhafset *et al.*, 2014), participando da remodelação da MEC (Schlaepfer; Mitra, 2004). O aumento da expressão da FAK também é correlacionado com maior migração, capacidade de invasão e proliferação do câncer de mama (Schlaepfer e Mitra, 2004; Chan *et al.*, 2009). O recrutamento da FAK pela c-Src, devido ao estímulo hormonal, é etapa-chave no movimento

celular (Acosta *et al.*, 2003). Nossos resultados mostram que as maiores taxas de migração celular correspondem a elevadas expressões de FAK e p-FAK, possivelmente por conta desse tipo de recrutamento. Chan *et al.* (2009) demonstraram que a supressão de FAK é associada a diminuição da mobilidade e da capacidade metastática em células de câncer de mama. Essas alterações moleculares estão associadas à reorganização de microfilamentos de actina do citoesqueleto e ao aumento da mobilidade celular.

Apesar da influência do complexo PRL-PRLR na ativação de quinases da família Src ser estudado em diferentes linhagens celulares, como hepatócitos, linfócitos de rato (Nb2 e W53), e até mesmo em células epiteliais mamárias de rato (HC11) (Fresno-Vara *et al.* 2001; Acosta *et al.*, 2003), pouco se sabe sobre sua correlação com a expressão das subunidades Src em células T47D, MCF-7 e ZR75-1 de câncer de mama que foram empregadas em nosso estudo.

Observamos que a PRL está associada com maior atividade de moesina e p-moesina. Nos ensaios onde as células migraram mais, houve maior expressão dessas proteínas. Entre as muitas quinases controladas por c-Src em células de câncer de mama, a moesina é mediador-chave da remodelação do citoesqueleto e membrana celular, pois quando ativada, despolimeriza e remodela a actina em direção a parte externa da membrana plasmática (Pollard e Borisy, 2003). Esse processo interfere na morfologia da matriz extracelular (MEC) e permite a formação de integrinas e complexos

focais de adesão, que aumentam a mobilidade celular e o grau de metástase do tecido (McLean *et al.*, 2005).

A moesina é colocada como reguladora chave da metástase em cânceres agressivos. O complexo moesina e p-moesina contribui para invasão (Flamini *et al.*, 2014), transformação epitelial e progressão do câncer de mama (Giretti *et al.*, 2008). Nosso estudo mostrou que a prolactina determina alteração desta proteína.

O silenciamento da resposta celular pelo emprego do RNA interferência bloqueou o efeito da PRL na migração celular e nas expressões proteicas de FAK, p-FAK, moesina, p-moesina, c-Src e p-c-Src, sugerindo que a ação da PRL ocorreu pela ativação de seu receptor. O estudo realizado por Wei *et al.* (2008) observou que o silenciamento do gene hPRLR por RNAi inibiu a proliferação de células T47D de câncer de mama, o que sugere especificidade do RNAi nesse tipo de célula.

Testes em modelos experimentais, por exemplo, tem mostrado efetividade no silenciamento de genes críticos para a viabilidade, proliferação e disseminação de células tumorais, como o PRLR (Aagaard e Rossi, 2007). Nos últimos anos, o RNAi tem se apresentado como instrumento valioso para o silenciamento da expressão do gene alvo e bloquear sua ação. Na prática clínica, alguns investigadores sugerem o emprego do RNAi no desenvolvimento de nova terapia genética do câncer (Fuchs e Borkhardt, 2007).

A influência do PRLR no desenvolvimento do câncer de mama já foi bem descrita em alguns estudos (Barcus *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015,

O’Leary, Shea, Schuler, 2015). Sabe-se ainda que a mobilidade de células cancerígenas pode ser proporcional a quantidade de transcrito desse receptor (Maus *et al.*, 1999). No entanto, o mecanismo envolvido nessa atividade ainda não era totalmente conhecido (Naderi, 2015). Assim, nosso estudo mostra que a PRL pode reorganizar a actina e o citoesqueleto.

Estudos mostraram que muitos tumores da mama humanos possuem elevados níveis de PRLR circundante do que o tecido mamário normal. Além disso, aproximadamente 80% dos tipos de câncer de mama expressam PRLR (Touraine *et al.*, 1998; Gill *et al.*, 2001, Pierce, Chen, Chen, 2001; Vaclavicek *et al.*, 2006). Este fato sugere que a PRL poderia estar envolvida no processo de carcinogênese.

A compreensão dos meios pelos quais a PRL controla a interação entre a célula cancerígena e o ambiente extracelular é de suma importância biológica e clínica. O conhecimento da migração celular e o rearranjo após a exposição a PRL pode propiciar o desenvolvimento de novas terapias no tratamento do câncer mamário.

O nosso modelo experimental foi baseado nos experimentos de Simoncini *et al.* (2006), que avaliaram os mecanismos da migração celular pela disposição das fibras de actina (reorganização) e a espessura total do envoltório protéico celular por meio de imunofluorescência. Esta técnica já foi reproduzida por outros investigadores nos tipos de células empregadas em nosso estudo (Giretti *et al.*, 2008; Giretti *et al.*, 2014). Contudo, a grande limitação do estudo é que os resultados são *in vitro* e nem sempre se repetem *in vivo*. Portanto, experimentos em humanos serão necessários.

Finalmente, nossos dados sugerem que a prolactina aumenta a migração das células T47D, MFC-7 e ZR75-1 de câncer de mama e remodela a actina do citoesqueleto pela via de sinalização intracelular das proteínas c-Src, FAK e moesina. Contudo, há a necessidade de continuar os estudos com o emprego de outras substâncias oncoestáticas para antagonizar o efeito da PRL na mobilização celular e que poderão ser úteis na prática clínica.

6. Conclusões

Os dados do presente estudo permitem-nos concluir que:

- 1) A PRL aumentou a migração das células T47D, MCF-7 e ZR75-1 de câncer de mama por meio de mudança estrutural no citoesqueleto e estímulo da síntese de proteínas relacionadas com a mobilidade celular;
- 2) A PRL aumentou a expressão das proteínas Moesina, p-Moesina, *FAK*, *p-FAK*, *c-Src*, *p-c-Src*, relacionadas com a mobilidade celular;
- 3) A PRL promoveu remodelação da actina no citoesqueleto, bem como aumentou a espessura do envoltório protéico das células de câncer de mama, alterações necessárias para o movimento celular.

7. Anexos

7.1 Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10/12/2013, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 488/13 intitulado: **“EFEITOS DA HIPERPROLACTINEMIA INDUZIDA PELA METOCLOPRAMIDA NA EXPRESSÃO PROTÉICA E GRAU DE METILAÇÃO DA PROLACTINA E DE SEUS RECEPTORES NA ADRENAL DE CAMUNDONGAS”** que utilizará 49 animais da espécie *mus musculus*, apresentado pelo Departamento de OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: José Maria Soares Júnior

Pesquisador (a) Executante: Priscilla Ludovico da Silva Cestari

CEP-FMUSP, 11 de Dezembro de 2013.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

São Paulo, 30 de abril de 2015.

A/C Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP

Informamos que no método do projeto de pesquisa intitulado:
**"EFEITOS DA HIPERPROLACTINEMIA INDUZIDA PELA
METOCLOPRAMIDA NA EXPRESSÃO PROTÉICA E GRAU DE
METILAÇÃO DA PROLACTINA E DE SEUS RECEPTORES NA ADRENAL
DE CAMUNDONGAS"** aprovado na sessão de 10/12/2013 sob Protocolo
numero **488/13** foi acrescentado cultura celular.

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. José Maria Soares Júnior (orientador)

Pesquisadora Executante: Priscilla Ludovico da Silva Cestari

7.2 Anexo 2 – Aprovação do Comitê de Ética na Itália.

APPROVAL

The Department of Clinical and Experimental Medicine - Division of Obstetrics and Gynecology, APPROVED the research protocol n°0715/14, entitled: "Effects of prolactin on migration of T47D breast cancer cell".

Researcher: Priscilla Ludovico da Silva

Prof. Tommaso Simoncini

tommaso.simoncini@med.unipi.it
Mobile +39.335.8046161
Phone +39.050.993523

Department of Clinical and Experimental Medicine
Division of Obstetrics and Gynecology
Via Roma 67, 56126, Pisa, Italy
University of Pisa

7.3 Anexo 3 – Publicação da tese.

US National Library of Medicine
 National Institutes of Health

Format: Abstract ▾
 Send to ▾

Front Endocrinol (Lausanne). 2015 Dec 17;6:186. doi: 10.3389/fendo.2015.00186. eCollection 2015.

Prolactin Promotes Breast Cancer Cell Migration through Actin Cytoskeleton Remodeling.

da Silva PL¹, do Amaral VC², Gabrielli V³, Montt Guevara MM³, Mannella P³, Baracat EC⁴, Soares-Jr JM⁴, Simoncini T³.

Author information

¹Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Pisa, Pisa, Italy; Laboratory of Structural and Molecular Gynecology (LIM58), Discipline of Gynecology, Department of Obstetrics and Gynecology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

²Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Pisa, Pisa, Italy; Health Sciences Institute (ICS), Paulista University, São Paulo, Brazil.

³Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Pisa, Pisa, Italy.

⁴Laboratory of Structural and Molecular Gynecology (LIM58), Discipline of Gynecology, Department of Obstetrics and Gynecology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Abstract

The role of prolactin on breast cancer development and progression is debated. Breast cancer progression largely depends on cell movement and on the ability to remodel the actin cytoskeleton. In this process, actin-binding proteins are requested to achieve fibrillar actin de-polymerization and relocation at the cell membrane. Kinases such as focal adhesion kinase (FAK) are later required to form actin/vinculin-enriched structures called focal adhesion complexes, which mediate firm adhesion to the extracellular matrix. These controllers are regulated by c-Src, which forms multiprotein signaling complexes with membrane receptors and is regulated by a number of hormones, including -prolactin. We here show that breast cancer cells exposed to prolactin display an elevated c-Src expression and phosphorylation. In parallel, increased moesin and FAK expression and phosphorylation are found. These molecular changes are associated to relocation to the plasma membrane of cytoskeletal actin fibers and to increased horizontal cell movement. In conclusion, prolactin regulates actin remodeling and enhances breast cancer cell movement. This finding broadens the understanding of prolactin actions on breast cancer cells, highlighting new pathways that may be relevant to on breast cancer progression.

KEYWORDS: MCF-7; T47D; ZR75-1; actin cytoskeleton; breast cancer; cell migration; prolactin

PMID: [26733941](#) PMCID: [PMC4681777](#) DOI: [10.3389/fendo.2015.00186](#)

[PubMed] [Free PMC Article](#)

7.4 Anexo 4 - Expressão do PRLR após tratamento com diferentes dosagens de PRL e RNAi

Fig.10 - O gráfico representa a expressão do PRLR após tratamento com diferentes dosagens de PRL e RNAi. Os valores de densitometria foram ajustados para GAPDH e normalizados com o controle. * $p < 0.05$ em comparação aos demais grupos. Esse procedimento foi realizado quatro vezes.

8. Referências

Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(2-3):75-86.

Acconcia F, Barnes CJ, Kumar R. Estrogen and tamoxifen induce cytoskeletal remodeling and migration in endometrial cancer cells. *Endocrinology.* 2006;147(3):1203-12.

Acosta JJ, Muñoz RM, González L, Subtil-Rodríguez A, Dominguez-Caceres MA, García-Martínez JM, Calcabrini A, Lazaro-Trueba I, Martín-Pérez J. Src mediates prolactin dependent proliferation of T47D and MCF7 cells via the activation of adhesion kinase/Erk1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Mol Endocrinol.* 2003; 17 (11):2268-82

Aljazaïf K, Hale TW, Ilett KF, Hartmann PE, Mitoulas LR, Kristensen JH, Hackett LP. Pseudoephedrine: effects on milk production in women and estimation of infant exposure via breastmilk. *Br J Clin Pharmacol.* 2003;56(1):18-24.

Alowami S, Troup S, Al-Haddad S, Kirkpatrick I, Watson PH. Mammographic density is related to stroma and stromal proteoglycan expression. *Breast Cancer Res.* 2003;5(5):129-35.

Anderson WF, Katki HA, Rosenberg PS. Incidence of breast cancer in the United States: current and future trends. *J Natl Cancer Inst.* 2011; 103(18):1397-402.

Barati MT, Scherzer J, Wu R, Rane MJ, Klein JB. Cytoskeletal rearrangement and Src and PI-3K-dependent Akt activation controls GABABR – mediated chemotaxis. *Cell Signal* (2015) 6:1178–85.

Barcus CE, Keely PJ, Eliceiri KW, Schuler LA. Stiff collagen matrices increase tumorigenic prolactin signalling in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2013; 288 (18): 12722-32.

Barcus CE, Holt EC, Keely PJ, Eliceiri KW, Schuler LA. Dense Collagen-I Matrices Enhance Pro-Tumorigenic Estrogen-Prolactin Crosstalk in MCF-7 and T47D Breast Cancer Cells. *PLoS One*. 2015; 10(1).

Barzegar E, Fouladdel S, Movahhed TK, Atashpour S, Ghahremani MH, Ostad SN, Azizi E. Effects of berberine on proliferation, cell cycle distribution and apoptosis of human breast cancer T47D and MCF7 cell lines. *Iran J Basic Med Sci*. 2015; 18(4):334-42.

Binart N, Bachelot A, Bouilly J. Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21(6):362-8.

Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*. 1998;19(3):225-68.

Bonneterre J, Peyrat JP, Beuscart R, Lefebvre J, Demaille A. Prognostic significance of prolactin receptors in human breast cancer. *Cancer Res.* 1987;47(17):4724-8.

Bostanci Z, Alam S, Soybel DI, Kelleher SL. Prolactin receptor attenuation induces zinc pool redistribution through ZnT2 and decreases invasion in MDA-MB-453 breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 2014;321(2):190-200.

Bretscher A, Reczek D, Berryman M. Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures. *J Cell Sci.* 1997;110 (24):3011-8.

Butcher DT, Alliston T, Weaver VM. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(2):108-22.

Canbay E, Norman M, Kilic E, Goffin V, Zachary I. Prolactin stimulates the JAK2 and focal adhesion kinase pathways in human breast carcinoma T47-D cells. *Biochem J.* 1997;324 (1):231-6.

Cao H, Yang Zh, Jiang G. Expression and clinical significance of activating transcription factor 3 in human breast cancer. *Iran J Basic Med Sci.* 2013; 16:1151- 4.

Casey TM, Crodian J, Erickson E, Kuropatwinski KK, Gleiberman AS, Antoch MP. Tissue-Specific Changes in Molecular Clocks During the Transition from Pregnancy to Lactation in Mice. *BiolReprod.* 2014; 23.

Chan KT, Cortesio CL, Huttenlocher A. FAK alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. *J Cell Biol.* 2009;185(2):357-70.

Clevenger, CV, Gadd, SL, Zheng, J. New mechanisms for PRLr action in breast cancer. *Trends Endocrinol. Metab.* 2009;20:223–29.

Conklin MW, Eickhoff JC, Riching KM, Pehlke CA, Eliceiri KW, Provenzano PP, FriedlA, KeelyPJ. Aligned collagen is prognostic signature for survival in human breast carcinoma. *Am J Pathol.* 2011; 178 (3):1221-32.

Das R, Vonderhaar BK. Involvement of SHC, GRB2, SOS and RAS in prolactin signal transduction in mammary epithelial cells. *Oncogene.* 1996;13(6):1139-45.

Fang L, Shanqu L, Ping G, Ting H, Xi W, Ke D, Min L, Junxia W, Huizhong Z. Gene therapy with RNAi targeting UHRF1 driven by tumor-specific promoter inhibits tumor growth and enhances the sensitivity of chemotherapeutic drug in breast cancer in vitro and in vivo. *Cancer Chemo ther Pharmacol.* 2012;69(4):1079-87.

Ferraris J, Bernichtein S, Pisera D, Goffin V. Use of prolactin receptor antagonist to better understand prolactin regulation of pituitary homeostasis. *Neuroendocrinology*.2013;98(3):171-9.

Flamini MI, Gauna GV, Sottile ML, Nadin BS, Sanchez AM, Vargas-Roig LM. Retinoic acid reduces migration of human breast cancer cells: role of retinoic acid receptor beta. *J. Cell. Mol.* 2014; 8(6): 1113-23.

Flamini MI, Sanchez AM, Genazzani AR, Simoncini T. Estrogen regulates endometrial cell cytoskeletal remodeling and motility via focal adhesion kinase. *Fertil Steril*. 2011;95(2):722-6.

Fontanella C, Fanotto V, Rihawi K, Aprile G, Puglisi F. Skeletal metastases from breast cancer: pathogenesis of bone tropism and treatment strategy. *Clin Exp Metastasis*. 2015;32(8):819-33.

Franca NR, Mesquita-Junior D, Lima AB, Pucci FVC, Andrade LEC, Silva NP. Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. *Rev Bras Reumatol*. 2010; 50(6):695-709.

Freeman ME, La Kanyicska BE, Lerant A, Nagy JR. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews*. 2000; 80 (4): 1523-1631.

Fresno-Vara JA, Dominguez Caceres MA, Silva A, Martin-Perez J. Src family kinases are required for prolactin induction of cell proliferation. *Mol Biol Cell*. 2001; 12:2171–83.

Fu XD, Flamini M, Sanchez AM, Goglia L, Giretti MS, Genazzani AR, Simoncini T. Progesterone regulates endothelial actin cytoskeleton and cell movement via the actin-binding protein moesin. *Mol Hum Reprod*. 2008; 14(4):225-34.

Fuchs U, Borkhardt A. The application of siRNA technology to cancer biology discovery. *Adv Cancer Res*. 2007;96:75-102.

Gill S, Peston D, Vonderhaar BK, Shousha S. Expression of prolactin receptors in normal, benign, and malignant breast tissue: an immunohistological study. *J Clin Pathol*. 2001;54(12):956-60.

Giretti MS, Fu XD, De Rosa G, Sarotto I, Baldacci C, Garibaldi S, Mannella P, Biglia N, Sismondi P, Genazzani AR, Simoncini T. Extra-nuclear signalling of estrogen receptor to breast cancer cytoskeletal remodelling, migration and invasion. *PLoS One*. 2008;3(5): e2238.

Giretti MS, Montt Guevara MM, Cecchi E, Mannella P, Palla G, Bernacchi G, Di Bello S, Genazzani AR, Genazzani AD, Simoncini T. Effects of estetrol on

migration and invasion in T47-D breast cancer cells through actin cytoskeleton. Front Endocrinol. 2014; 5:80.

Giretti MS, Simoncini T. Rapid regulatory actions of sex steroids on cell movement through the actin cytoskeleton. Steroids. 2008;73(9-10):895-900.

Goffin V, Bernichtein S, Touraine P, Kelly PA. Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists. Endocr Rev. 2005;26(3):400-22.

Goffin V, Kelly PA. The prolactin growth hormone receptor family: structure/function relationships. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 1997; 2: 7-17.

Hannon GJ. RNA interference. Nature. 2002; 418(6894): 244-51. Review.

Huang KT, Walker AM. Long term increased expression of the short form 1b prolactin receptor in PC-3 human prostate cancer cells decreases cell growth and migration, and causes multiple changes in gene expression consistent with reduced invasive capacity Prostate.2010; 70(1):37-47.

Hyslop CM, Tsai S, Shrivastava V, Santamaria P, Huang C. Prolactin as an Adjunct for Type 1 Diabetes Immunotherapy. Endocrinology. 2016;157(1):150-65

Irby RB, Yeatman TJ. Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene*. 2000; 19: 5636–42.

Jacobson EM, Hugo ER, Tuttle TR, Papoian R, Ben-Jonathan N. Unexploited therapies in breast and prostate cancer: blockade of the prolactin receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 2010 Nov;21(11):691-8.

Khodr CE, Clark SM, Hurley DL, Phelps CJ. Long-term, homologous prolactin, administered through ectopic pituitary grafts, induces hypothalamic dopamine neuron differentiation in adult Snell dwarf mice. *Endocrinology*. 2008; 149(4):2010-18.

Kolli-Bouhafs K, Sick E, Noulet F, Gies JP, De Mey J, Rondé1. FAK competes for Src to promote migration against invasion in melanoma cells. *Cell Death Dis*. 2014;5: e1379.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.

LaPensee EW, Schwemberger SJ, LaPensee CR, Bahassi el M, Afton SE, Ben-Jonathan N. Prolactin confers resistance against cisplatin in breast cancer cells by activating glutathione-S-transferase. *Carcinogenesis*. 2009; 30(8):1298-304.

Llovera M, Pichard C, Bernichtein S, Jeay S, Touraine P, Kelly PA, Goffin V. Human prolactin (hPRL) antagonists inhibit hPRL-activated signaling pathways involved in breast cancer cell proliferation. *Oncogene*. 2000; 19(41):4695-705.

Maus MV, Reilly SC, Clevenger CV. Prolactin as a chemoattractant for human breast carcinoma. *Endocrinology*. 1999; 11:5447–50.

McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, Frame MC. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat RevCancer*. 2005; 5(7): 505-15.

Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesionkinase: in command and control of cellmotility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(1):56-68.

Monasterio N, Vergara E, Morales T. Hormonal influences on neuroimmune responses in the CNS of females. *Front Integr Neurosci*. 2014; 17(7):110.

Naderi A. Prolactin-induced protein in breast cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2015; 846 :189–200.

Nahas EAP, Nahas-Neto J, Pontes A, Duas R, Fernandes CE. Estados hiperprolactinêmicos – inter-relação com o psiquismo. *Rev. Psiq. Clín*. 2006; 33(2):68-73.

Naliato EC, Violante AH, Caldas D, Farias ML, Bussade I, Lamounier Filho A, Loureiro CR, Fontes R, Schrank Y, Loures T, Colao A. Bone density in women with prolactinoma treated with dopamine agonists. *Pituitary*. 2008;11(1):21-8.

Oladimeji P, Skerl R, Rusch C, Diakonova M. Synergistic Activation of ER α by Estrogen and Prolactin in Breast Cancer Cells Requires Tyrosyl Phosphorylation of PAK1. *Cancer Res*. 2016;76(9):2600-11.

O'Leary KA, Shea MP, Schuler LA. Modeling prolactin actions in breast cancer in vivo: insights from the NRL-PRL mouse. *Adv Exp Med Biol*. 2015; 846:201–20.

Ormandy CJ, Naylor M, Harris J, Robertson F, Horseman ND, Lindeman GJ, Visvader J, Kelly PA. Investigation of the transcriptional changes underlying functional defects in the mammary glands of prolactin receptor knockout mice. *Recent Prog Horm Res*. 2003;58:297-323. Review.

Owens LV, Xu L, Craven RJ, Dent GA, Weiner TM, Kornberg L, Liu ET, Cance WG. Overexpression of the Focal Adhesion Kinase (p125FAK) in Invasive Human Tumors. *Cancer Res*. 1995; 55: 2752–5.

Parsa Y, Mirmalek SA, Kani FE, Aidun A, Salimi-Tabatabaee SA, Yadollah-Damavandi S, Jangholi E, Parsa T, Shahverdi E. A Review of the Clinical Implications of Breast Cancer Biology. *Electron Physician*. 2016;8(5):2416-24.

Peirce SK, Chen WY, Chen WY. Quantification of prolactin receptor mRNA in multiple human tissues and cancer cell lines by real time RT-PCR. *J Endocrinol*. 2001;1(1):1-4.

Piazza TM, Lu JC, Carver KC, Schuler LA. SRC family kinases accelerate prolactin receptor internalization, modulating trafficking and signaling in breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2009; 23(2):202-12.

Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003;112(4):453-65.

Raven LA, Cocks BG, Goddard ME, Pryce JE, Hayes BJ. Genetic variants in mammary development, prolactin signalling and involution pathways explain considerable variation in bovine milk production and milk composition. *Genet Sel Evol*. 2014; 46(1):29.

Ray S, Fry MJ, Darbe PD. Enhanced sensitivity to rapamycin following long-term oestrogen deprivation in MCF-7, T-47-D and ZR-75-1 human breast cancer cells. *J Endocrinol*. 2011; 208:21–9.

Rose-Hellekant TA¹, Arendt LM, Schroeder MD, Gilchrist K, Sandgren EP, Schuler LA. Prolactin induces ER alpha-positive and ER alpha-negative mammary cancer in transgenic mice. *Oncogene*. 2003;22(30):4664-74.

Sanchez AM, Flamini MI, Zullino S, Gopal S, Genazzani AR, Simoncini T. Estrogen receptor- α promotes endothelial cell motility through focal adhesion kinase. *Mol Hum Reprod*. 2011;17(4):219-26.

Sato T, Tran TH, Peck AR, Liu C, Ertel A, Lin J, Neilson LM, Rui H. Global profiling of prolactin-modulated transcripts in breast cancer in vivo. *Mol Cancer*. 2013; 12:59.

Schlaepfer DD, Mitra SK. Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr Opin Genet Dev*. 2004; 1:92–101.

Simoncini T, Scorticati C, Mannella P, Fadiel A, Giretti MS, Fu XD, et al. Estrogen receptor alpha interacts with Galpha13 to drive actin remodeling and endothelial cell migration via the RhoA/Rho kinase/moesin pathway. *Mol Endocrinol*. 2006;20(8):1756-71.

Soares-Jr, Gadelha M. Fisiologia da prolactina. Laboratórios Pfizer Ltda [online]. São Paulo: 2004. Disponível em: http://segmentofarma.com.br/arquivos/Fisiologia%20%prolactina_P3UGK.pdf Acesso em 11/02/2016

Song RX, McPherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, et al. Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ER alpha-Shc association and Shc pathway activation. *MolEndocrinol*. 2002;16(1):116-27.

Stricker P, Grueter R. Action du lobe antérieur de l'hypophyse sur la montée laiteuse. *CR Soc Biol*. 1928; 99: 1978-80.

Tallet E, Rouet V, Jomain JB, Kelly PA, Bernichtein S, Goffin V. Rational design of competitive prolactin/growth hormone receptor antagonists. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2008;13(1):105-17.

Tan D, Chen KE, Khoo T, Walker AM. Prolactin increases survival and migration of ovarian cancer cells: importance of prolactin receptor type and therapeutic potential of S179D and G129R receptor antagonists. *Cancer Lett*. 2011;310(1):101-8.

Tan D, Tang P, Huang J, Zhang J, Zhou W, Walker AM. Expression of a constitutively active prolactin receptor causes histone trimethylation of the p53 gene in breast cancer. *Chin Med J (Engl)*. 2014;127(6):1077-83.

Thamilselvan V, Craig DH, Basson MD. FAK association with multiple signal proteins mediates pressure-induced colon cancer cell adhesion via a Src-dependent PI3K/Akt pathway. *FASEB J*. 2007; 8:1730–41.

Tikk K, Sookthai D, Johnson T, Rinaldi S, Romieu I, Tjonneland A, Olsen A, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Baglietto L, Boeing H, Trichopoulou A, Lagiou P, Trichopoulos D, Palli D, Pala V, Tumino R, Rosso S, Panico S, Agudo A, Menéndez V, Sánchez MJ, Amiano P, Castaño JM, Ardanaz E, Bueno-de-Mesquita HB, Monninkhof E, Onland-Moret C, Andersson A, Sund M, Weiderpass E, Khaw KT, Key TJ, Travis RC, Gunter MJ, Riboli E, Dossus L, Kaaks R. Circulating prolactin and breast cancer risk among pre- and postmenopausal women in the EPIC cohort. *Ann Oncol.* 2014; 25(7):1422-8.

Touraine P, Martini JF, Zafrani B, Durand JC, Labaille F, Malet C, Nicolas A, Trivin C, Postel-Vinay MC, Kuttann F, Kelly PA. Increased expression of prolactin receptor gene assessed by quantitative polymerase chain reaction in human breast tumors versus normal breast tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(2):667-74.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76(9):4350-4.

Tworoger SS, Hankinson SE. Prolactin and breast cancer etiology: an epidemiologic perspective. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2008;13(1):41-53.

Twooroger SS, Eliassen AH, Zhang X, Qian J, Sluss PM, Rosner BA, Hankinson SE. A 20-year prospective study of plasma prolactin as a risk marker of breast cancer development. *Cancer Res.* 2013; 73(15):4810-9.

Vaclavicek A, Hemminki K, Bartram CR, Wagner K, Wappenschmidt B, Meindl A, Schmutzler RK, Klaes R, Untch M, Burwinkel B, Försti A. Association of prolactin and its receptor gene regions with familial breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(4):1513-9.

Wei Q, Lu Y, Pan M, Shu Y, Cao X. Gene silencing of hPRLR mRNA by RNA interference in human breast cancer cells. *Mol Med Rep.* 2008;1(4):479-83.

Wen Y, Zand B, Ozpolat B, Szczepanski MJ, Lu C, Yuca E, Carroll AR, Alpay N, Bartholomeusz C, Tekedereli I, Kang Y, Rupaimoole R, Pecot CV, Dalton HJ, Hernandez A, Lokshin A, Lutgendorf SK, Liu J, Hittelman WN, Chen WY, Lopez-Berestein G, Szajnik M, Ueno NT, Coleman RL, Sood AK. Antagonism of tumoral prolactin receptor promotes autophagy-related cell death. *Cell Rep.* 2014;7(2):488-500.

Xie J, LeBaron MJ, Nevalainen MT, Rui H. Role of tyrosine kinase Jak2 in prolactin-induced differentiation and growth of mammary epithelial cells. *The journal of biological chemistry.* 2002; 277(16):14020–30.

Zhang C, Cherifi I, Nygaard M, Haxholm GW, Bogorad RL, Bernadet M, et al. Residue 146 regulates prolactin receptor folding, basal activity and ligand-responsiveness: potential implications in breast tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2015; 401:173–88.