NAIELI BONATTO

Estudo funcional do gene *PHLDA1*
(*Pleckstrin Homology-like Domain, Family A, Member 1*) em células
epiteliais de mama, MCF10A

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

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria
Aparecida Nagai

São Paulo

2016

NAIELI BONATTO

Estudo funcional do gene *PHLDA1*
(*Pleckstrin Homology-like Domain, Family A, Member 1*) em células
epiteliais de mama, MCF10A

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

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria
Aparecida Nagai

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

Bonatto, Naieli

Estudo funcional do gene *PHLDA1* (*Pleckstrin Homology-like Domain, Family A, Member 1*) em células epiteliais de mama, MCF10A / Naieli Bonatto. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientadora: Maria Aparecida Nagai.

Descritores: 1.PHLDA1 2.Genes supressores de tumor 3.Neoplasias da mama
4.Invasividade neoplásica 5.Biomarcadores

USP/FM/DBD-350/16

AGRADECIMENTOS

É com imenso prazer que eu faço meus agradecimentos a todos aqueles que de uma maneira ou de outra contribuíram para a concretização deste trabalho.

À Profa Dra Maria Aparecida Nagai. Obrigada, Dra Nagai, pela oportunidade oferecida de desenvolver este trabalho em seu grupo e pela orientação. Foi uma jornada que ofereceu muitos desafios, resultando em uma experiência enriquecedora, profissionalmente e pessoalmente.

A todo grupo do Laboratório de Genética Molecular, Carolina, Flávia, Lourival, Maira, Maria, Renan, Simone e Paulo. Obrigada pelo auxílio profissional, por todo o respeito e carinho com que me acolheram no laboratório.

Obrigada Simone, pela amizade, pelo conhecimento compartilhado e a solicitude em ajudar sempre que possível.

Lourival, muito obrigada pela amizade e companheirismo, por todas as discussões profissionais e filosóficas.

Obrigada, Maria José, pelas inúmeras contribuições e dicas valiosas dadas ao meu trabalho. *Muchas gracias* pelo companheirismo, amizade e pelo imenso apoio emocional.

Aos meus pais, Antônio e Fátima e à minha avó, Adele. Obrigada, por permitirem a realização dos meus sonhos, por todas as orações e apoio emocional. Seria impossível sem vocês. À minha irmã, Franciele, que sempre se faz presente, mesmo estando tão longe. Obrigada, irmã, por teu apoio e compreensão de sempre às minhas escolhas e obrigada pelo inesgotável suporte emocional e encorajamento.

Minha querida amiga, Natália. Que bom ter partilhado contigo tantas boas coisas e ter tido teu companheirismo para lidar com todos os desafios. Muito obrigada!

À Kely. Que presente de Deus ter tido tua companhia aqui em São Paulo! E que bom contar contigo sempre, mesmo que a geografia nos distancie.

Às amigas Kaline e Thaís. Vocês fazem uma falta imensa no meu dia-a-dia. Obrigada pelo apoio e pelo esforço em manterem-se presentes.

A todos os professores e funcionários do CTO, em especial ao Prof Dr Roger Chammas, pelas contribuições em meu desenvolvimento profissional.

Ao pessoal do Laboratório de Oncologia Experimental, em especial à Carol Cardoso, Silvina Bustos, Renata Saito e Tharcísio Citrangulo Jr e às pesquisadoras Andreia Otake e Luciana Andrade, que em algum momento ofereceram auxílio fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Vetores Virais, em especial à Aline Hunger. Obrigada, “Celine” pela amizade e pelo apoio profissional.

À Angélica, obrigada pela amizade e por me apoiar.

À Cristiane Landim de Lana. Obrigada pela prontidão em auxiliar no que foi preciso.

A todos os colegas e amigos do CTO.

À Secretaria da Pós-Graduação em Oncologia, especialmente à Dona Yara pela prontidão em resolver todos os imprevistos.

À Sandra Dorgan, que me acolheu em São Paulo quando cheguei aqui, com muito carinho e alegria.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido durante a execução do projeto.

Obrigada a todos e obrigada, Deus, por ter permitido a presença de cada um de vocês em minha vida.

"Tudo tem o seu tempo determinado, e
há tempo para todo propósito debaixo do céu."
Eclesiastes 1:3.

RESUMO

Bonatto N. *Estudo funcional do gene PHLDA1 (Pleckstrin Homology-like Domain, Family A, Member 1) em células epiteliais de mama, MCF10A* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

O câncer de mama é a principal causa de morte por câncer entre as mulheres no mundo. Fatores genéticos, comportamentais e ambientais afetam o risco de aparecimento dessa doença e seu desenvolvimento e progressão ocorrem pelo acúmulo de alterações genéticas/epigenéticas que levam a manutenção de sinais proliferativos nas células, fuga dos agentes supressores de crescimento e resistência à morte celular. O gene *PHLDA1* (de *Pleckstrin Homology-Like Domain, Family A, Member 1*) codifica uma proteína de 401 aminoácidos que já foi descrita envolvida em distintos processos biológicos incluindo morte celular e, dessa forma, é frequentemente associada ao câncer. Perda progressiva de *PHLDA1* já foi descrita em melanoma primário e metastático enquanto sua superexpressão foi descrita para tumores intestinais e pancreáticos. Em dados prévios de nosso grupo de pesquisa o gene *PHLDA1* foi encontrado diferencialmente expresso em tumores de mama onde sua ausência estava relacionada com sobrevida livre de doença e sobrevida global reduzidas nas pacientes. Estudos do gene *PHLDA1* em linhagens de mama são escassos e a compreensão de seu papel funcional e de como sua ausência pode estar relacionada com a redução da sobrevida em pacientes com câncer de mama permanecem obscuros. Com o objetivo de compreender a função de *PHLDA1* em células epiteliais de mama, nós investigamos os efeitos da supressão do gene *PHLDA1* em células MCF10A. A redução da expressão foi alcançada a partir de transfecção das células com vetores plasmidiais contendo shRNAs específicos para o transcrito de *PHLDA1* e subsequentemente foram realizados ensaios funcionais. A expressão diminuída de *PHLDA1* foi capaz de induzir acentuadas alterações morfológicas e comportamentais nas células MCF10A, incluindo mudança no padrão de ancoragem célula-célula e reorganização nos filamentos de actina, além de maior taxa de proliferação, migração e invasão das células. Além disso, em condições de baixa ancoragem, as células com expressão reduzida de *PHLDA1* apresentaram mamóferas de formato irregular em comparação às células controle. Em conjunto, nossos resultados mostram que a diminuição da expressão de *PHLDA1* em células MCF10A

está relacionada a um comportamento agressivo e acentuadas alterações morfológicas. Estes dados são consistentes com atividade supressora tumoral de PHLDA1 em células epiteliais de mama.

Descritores: PHLDA1; genes supressores de tumor; neoplasias da mama; invasividade neoplásica; biomarcadores.

ABSTRACT

Bonatto N. Functional study of PHLDA1 gene (*Pleckstrin Homology-like Domain, Family A, Member 1*) in breast epithelial cells, MCF10A [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

Breast cancer is the leading cause of cancer death among women worldwide. Genetic, behavioral and environmental factors affect the risk of onset of the disease. Breast cancer development and progression involves the accumulation of genetic/epigenetic changes that lead to maintenance of proliferative signals, evasion of growth suppressors and resistance to cell death. The *PHLDA1* gene (*Pleckstrin Homology-like domain, Family A, member 1*) encodes a 401 amino acids protein that has been described involved in different biological processes including cell death and thus, is often associated with cancer. Progressive loss of PHLDA1 has been described in primary and metastatic melanoma while their overexpression has been reported for intestinal and pancreatic tumors. In previous data from our research group the *PHLDA1* gene was found differentially expressed in breast tumors where its downregulation was related to shorter disease-free survival and overall survival of the patients. Literature regarding PHLDA1 in mammary epithelial cell lines is scarce and the understanding of their functional role and how its downregulation can be related to poor prognosis in breast cancer patients remain unclear. In order to understand the PHLDA1 function in breast epithelial cells, we investigated the effects of downregulation of PHLDA1 in MCF10A cells. The reduced expression was achieved from transfection of cells with plasmid vectors containing shRNAs for the specific transcript of PHLDA1 followed by functional assays. The decreased expression of PHLDA1 was sufficient to induce marked morphological and behavioral changes in MCF10A cells, including changes in cell-to-cell attachment pattern and actin reorganization, increased proliferation, migration and invasion rate of cells. Furthermore, in independent of attachment condition, cells with reduced expression of PHLDA1 formed mammospheres with irregular shape compared to control cells. Taken together, our results showed that the decreased expression of PHLDA1 in MCF10A cells is related to aggressive behavior and marked morphological changes. These data are consistent with tumor suppressor activity for PHLDA1 in breast epithelial cells.

Descriptors: PHLDA1; genes, tumor suppressor; breast neoplasms; neoplasm invasiveness; biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência e mortalidade dos principais tipos de câncer.....	2
Figura 2. Incidência dos principais tipos de câncer no Brasil em mulheres.....	3
Figura 3. Representação esquemática da estrutura modular da proteína PHLDA1 e seus sítios de fosforilação.....	10
Figura 4. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida de pacientes com tumor de mama. .	12
Figura 5. Esquema dos vetores pRS utilizados nas transfecções e as sequências de cada shRNA.	19
Figura 6. Gel de agarose mostrando o perfil de digestão enzimática dos vetores pRS Controle e shRNA.	20
Figura 7. PHLDA1 apresenta variação de expressão proteica em diferentes linhagens de mama.	28
Figura 8. PHLDA1 apresenta variação de expressão transcricional em diferentes linhagens tumorais de mama.	29
Figura 9. Alteração nos níveis proteicos de AURKA frente à hipóxia.	30
Figura 10. Eficiência de knockdown em células MCF10A controle e shPHLDA1.	31
Figura 11. Fotomicrografias de contraste de fase mostrando as diferenças morfológicas das células em confluência (esquerda), subconfluência (meio) e detalhe em maior aumento (direita).....	32
Figura 12. Aumento da proliferação em células MCF10A após diminuição da expressão de PHLDA1.	33
Figura 13. Mamosferas formadas a partir de células MCF10A com expressão reduzida de PHLDA1 exibem formato mais irregular em comparação às células controle.....	34
Figura 14. Mamosferas formadas pelas células MCF10A controle e com reduzida expressão de PHLDA1 em cultura tridimensional.	35
Figura 15. Diminuição da expressão de PHLDA1 aumenta a migração em células MCF10A. A redução de PHLDA1 aumenta significativamente a migração em células MCF10A, avaliada por ensaio de fechamento de ferida.	36
Figura 16. Diminuição da expressão de PHLDA1 promove a invasão em células MCF10A. A invasividade das células MCF10A após redução da expressão de PHLDA1 foi avaliada por ensaio Transwell.	37
Figura 17. A redução de PHLDA1 aumenta a capacidade de células MCF10A em formar colônias.	38
Figura 18. Aspecto das colônias de células MCF10A controle e shPHLDA1 crescidas em ensaio clonogênico.....	39
Figura 19. Células MCF10A controle e shPHLDA1 apresentam distinto padrão de marcação de actina.....	40
Figura 20. Contraste na organização da actina entre células controle e células com expressão diminuída de PHLDA1.	41
Figura 21. A redução de PHLDA1 em células MCF10A não mostrou diferença na sensibilidade ao quimioterápico docetaxel (2nM).....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos ensaios de Western Blot e respectivas diluições .	23
Tabela 2 - Perfil transcricional de PHLDA1 em painel de linhagens tumorais de mama*	
.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION
AURKA	Aurora Quinase A
BSA	Albumina bovina sérica (Bovine Serum Albumin)
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle's Medium
ECM	Matriz extracelular
ER	Receptor de estrógeno
FAK	Quinase de adesão focal
Her2	receptor de fator de crescimento epidermal 2
IGF-1	Fator do crescimento do tipo insulina 1
NF-kB	Fator nuclear do gene “enhancer” do polipeptídeo leve Kappa nas células-B1
PR	Receptor de progesterona
PH	Prolina - Histidina
PHL	Domínio homólogo a plectstrina
PHLDA1	Domínio homólogo à plectstrina, família A, membro 1 (Pleckstrin Homology-like Domain, Family A, Member 1)
PQ	Prolina - Glutamina
QQ	Poli Glutamina
RAS	Homólogo ao oncogene viral de sarcoma de rato
shRNA	<i>short hairpin</i> RNA
TDAG51	gene 51 associado a morte de células T (T-cell Death-Associated Gene 51). Sinônimo de PHLDA1.
TP53	proteína tumoral p53 (<i>tumor protein p53</i>)

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Epidemiologia e Fatores de Risco do Câncer de Mama.....	1
1.2 Arquitetura e Função da Glândula mamária.....	4
1.3 Classificação molecular do câncer de mama.....	6
1.4 PHLDA1: Estrutura e Função.....	9
1.5 PHLDA1 e Câncer de Mama.....	10
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Cultura de células em monocamada	16
3.2 Cultura celular em 3D (Matrigel TM)	17
3.3 Ensaio de hipóxia	17
3.4 Transformação bacteriana e purificação dos vetores de expressão	18
3.5 Transfecção celular.....	20
3.6 Extração proteica	21
3.7 Western Blot.....	22
3.8 Análise da Proliferação Celular.....	23
3.9 Ensaio de migração celular.....	24
3.10 Ensaio de invasão celular	24
3.11 Ensaio de crescimento independente de ancoragem.....	24
3.12 Ensaio Clonogênico.....	25
3.13 Imunofluorescência	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÕES	49
6. REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

O câncer é definido como um grupo de doenças que se caracteriza pelo crescimento e proliferação incontroláveis de células anormais (American Cancer Society 2007). Hanahan e Weinberg (2011) postulam que são oito as características distintivas do câncer: (i) manutenção dos sinais proliferativos; (ii) evasão da supressão de crescimento; (iii) resistência à morte celular; (iv) ativação da imortalidade replicativa; (v) indução da angiogênese; (vi) ativação da invasão e metástase; (vii) reprogramação do metabolismo energético, favorecendo o microambiente tumoral e, (viii) evasão da destruição pelo sistema imune. Paralelo a isso, é importante pontuar a presença de instabilidade genômica e inflamação, as quais promovem múltiplas funções. A ordem em que cada um destes eventos ocorre levando a célula de sua normalidade à malignidade não é clara e, não é claro também, a partir de qual característica distintiva adquirida a célula se torna comprometida com a malignidade.

A etiologia do câncer de mama, assim como de tantos outros tipos de câncer, é complexa e multifatorial. Diversas evidências indicam que o seu desenvolvimento e progressão dependem não somente de características genéticas das células tumorais, mas também de suas interações com o microambiente (Dolberg et al. 1985; Wiseman & Werb 2002; Maffini et al. 2004; Allinen et al. 2004). Sua incidência e mortalidade têm diminuído nos últimos anos como provável resultado de intensos programas de prevenção, de rastreamento através de mamografia, bem como dos progressos nos esquemas de tratamento (Jemal et al. 2008). Apesar disso, o câncer de mama continua sendo a neoplasia mais frequente entre as mulheres em todo o mundo e também a de maior mortalidade (WHO 2013).

1.1 Epidemiologia e Fatores de Risco do Câncer de Mama

Desde 1975, quando se iniciaram os registros populacionais de câncer, o câncer de mama figura entre os cinco tipos de câncer mais comuns e atualmente é o segundo mais comum entre todos os cânceres e o quinto em mortalidade. Entre as mulheres, é o de maior mortalidade e, excetuando-se o câncer de pele não melanoma, o mais incidente (Bray 2013; Cancer Research UK 2016).

Os dados *globais* mais recentes sobre o câncer de mama apontam que em 2012 foram diagnosticados 1.67 milhão de novos casos e houve 522 mil mortes por câncer de mama. Embora as taxas se mostrem variadas entre diferentes países, predomina em ambas as regiões, mais e menos desenvolvidas (WHO 2013). Todavia, a incidência se mostra levemente aumentada para os países em desenvolvimento (883 mil casos) em comparação aos desenvolvidos (794 mil casos) e o mesmo ocorre para a mortalidade: países em desenvolvimento contabilizaram 324 mil mortes por câncer de mama (principal causa de morte entre as mulheres) enquanto países desenvolvidos contabilizaram 198 mil mortes (segunda principal causa de morte por câncer) (Bray 2013). A Figura 1 traz os números relativos à incidência e mortalidade para os principais tipos de câncer entre mulheres, em países desenvolvidos e em desenvolvimento.

Figura 1. Incidência e mortalidade dos principais tipos de câncer. Número de novos casos de câncer (incidência) e mortes (mortalidade) em mulheres, dividido por regiões desenvolvidas e em desenvolvimento, ocorridas no ano de 2012.

Fonte: Adaptado de Ferlay, 2014.

No Brasil os dados mais recentes sobre a incidência do câncer de mama dizem respeito ao ano de 2016, para o qual são previstos 57.960 novos casos. Excetuando-se os casos de câncer de pele não melanoma, é o segundo mais incidente na população geral e o mais incidente entre a população feminina do país (Figura 2) (Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva 2016). As taxas de incidência são mais elevadas na faixa etária acima dos 50 anos, denotando a importância de rastreamento mamográfico neste grupo (INCA - Ministério da Saúde 2012). Com relação à mortalidade, os dados mais recentes fornecidos pelo INCA relatam que em 2013 houve 14.206 mortes devido ao câncer de mama no Brasil (INCA - Ministério da Saúde 2016).

	Localização Primária	Casos	%
Mulheres	Mama feminina	57.960	28,1%
	Cólon e Reto	17.620	8,6%
	Colo do útero	16.340	7,9%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
	Estômago	7.600	3,7%
	Corpo do útero	6.950	3,4%
	Ovário	6.150	3,0%
	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Figura 2. Incidência dos principais tipos de câncer no Brasil em mulheres. Número de novos casos de câncer (incidência) em mulheres previsto para o ano de 2016.
Fonte: Adaptado de INCA, 2016.

O câncer de mama tem etiologia complexa e, essencialmente multifatorial, não possuindo um fator único capaz de sustentar o surgimento da doença. Todavia, fatores de risco relacionados à susceptibilidade são amplamente estabelecidos. O principal deles é a herança genética (Kluttig & Schmidt-Pokrzywniak 2009), afirmação que tem seu mais evidente argumento baseado em estudos de gêmeas, onde a incidência em gêmeas idênticas chega a ser 10 vezes maior em comparação ao risco médio da população (Peto & Mack 2000).

Já foram identificados mais de 15 genes relacionados à susceptibilidade ao câncer de mama, incluindo mutações de alta penetrância encontradas em genes como *TP53* (Masciari et al. 2013) e *PTEN* (Riegert-Johnson et al. 2010) e outras de moderada ou

baixa penetrância, tais como *ATM*, *CHEK2* e *BRIP1* (Ellsworth et al. 2010; Larsen et al. 2014). Mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são amplamente conhecidas por sua alta penetrância que pode conferir risco maior que 80% para mulheres portadoras de mutações em relação àquelas não portadoras (Ford et al. 1998). Todavia, a porcentagem de mulheres que desenvolvem câncer de mama familiar corresponde entre 5 a 10% de todos os casos, indicando a existência de outros genes importantes para o processo de tumorigênese (Oldenburg et al. 2007; Kluttig & Schmidt-Pokrzywniak 2009). Dessa maneira, a maior parte dos casos de câncer de mama é esporádica, tornando a herança familiar um risco secundário em termos de população global.

Nestes casos, excluída a história familiar, uma série de outros fatores não herdáveis são conhecidos. Eles podem ser divididos entre modificáveis/ potencialmente modificáveis (estilo de vida, obesidade, sedentarismo, dieta, tabagismo, ingestão de álcool em excesso e número de gestações a termo) e não modificáveis (idade, exposição hormonal endógena e densidade da mama). De forma eminente, cabe destacar que os principais riscos para o câncer de mama estão intimamente ligados à exposição hormonal endógena e à vida reprodutiva da mulher. Os hormônios que em condições fisiológicas são responsáveis pelo desenvolvimento normal da glândula mamária estão também relacionados à carcinogênese (Briskin & O'Malley 2010). Dessa forma, menarca precoce, menopausa tardia, idade na primeira gestação e número de gestações a termo, sedentarismo, obesidade e consumo de bebidas alcoólicas são elementos que direta ou indiretamente podem estar relacionados com aumento da exposição hormonal (Kluttig & Schmidt-Pokrzywniak 2009; Singletary & Gapstur 2001; Lew et al. 2009; Mcpherson et al. 2000; Danaei et al. 2005).

1.2 Arquitetura e Função da Glândula mamária

A função primária da glândula mamária é nutrir a prole. A classe dos mamíferos é a única a possuir um órgão especializado devotado a esta função (Peaker 2002). O leite materno, além de apresentar riqueza de componentes nutricionais, como gorduras, açúcares e proteínas, possui também uma série de moléculas bioativas protetoras contra infecções e inflamações além de contribuírem para o amadurecimento do sistema imune do lactente, o desenvolvimento dos órgãos e estimulam a colonização intestinal microbótica (Ballard & Morrow 2013).

Estruturalmente, a glândula mamária é um órgão secretor complexo que consiste

de diferentes tipos celulares. Dois epitélios distintos constituem o parênquima da mama, luminal e basal. O epitélio basal é constituído de células mioepiteliais que estão relacionadas com a síntese de matriz extracelular (ECM) e com a liberação do leite materno durante a lactação através da sua contração em resposta a ocitocina (Paguirigan et al. 2006). O epitélio luminal é especializado na secreção de leite e constitui a face luminal dos ductos e alvéolos secretores (Watson & Khaled 2008). Este parênquima está contido em um complexo compartimento estromal que consiste de diversos componentes, como adipócitos, fibroblastos, vasos sanguíneos, células inflamatórias e ECM (Wiseman & Werb 2002). As células do estroma desempenham importante função estrutural, mas mais do que isso, derivam sinais que influenciam no desenvolvimento e diferenciação da mama normal e também são capazes de promover ou inibir a tumorigênese e a progressão tumoral. Estudos em modelos murinos mostram que a morfogênese da mama é afetada sob inibição ou deleção de fatores que regulam a ECM e a superexpressão de determinados fatores, a exemplo de algumas metaloproteinases, estão relacionados à tumorigênese (Wiseman e Werb, 2002).

Ao longo da vida da mulher, a mama sofre constantes mudanças no tamanho, forma e função, associada com o crescimento, reprodução e regressão pós-menopausa (Russo et al. 2001). O ciclo completo de diferenciação da mama só ocorre durante o trimestre final da primeira gestação quando os alvéolos se tornam distendidos e a secreção de leite sobrevém, configuração essa que se mantém durante todo o período de amamentação, seguida de involução no período pós-lactação até uma configuração de involução intensa que inicia na pré-menopausa e progressivamente a mama regride até a pós-menopausa, onde apresenta uma configuração morfológica semelhante e indistinguível à da mulher nulípara (Russo et al. 2001; Russo et al. 2005).

Dessa maneira, a glândula mamária é um órgão que está sujeito a um contínuo remodelamento durante toda a vida reprodutiva da mulher. Essa dinâmica tecidual, todavia, também acaba tornando a mama um alvo predisposto ao surgimento do câncer.

O desenvolvimento tumoral da mama é comumente postulado como um processo de múltiplos passos, pouco compreendidos e delimitados. Mesmo que sua biologia claramente não obedeça a uma regra sequencial, o termo “história natural do câncer de mama” é frequentemente utilizado sendo representativo dessa tentativa de traçar o contínuo desde o surgimento à evolução da doença, e assim, auxiliar na predição de dados como sobrevida dos pacientes, orientar ações preventivas levando a diagnósticos precoces e precisos que permitam aplicar o tratamento adequado nas fases iniciais da

lesão e tratar lesões pré-neoplásicas (Koifman 2002). Nesse sentido, a biologia do câncer de mama pode ser descrita como uma progressão que inicia com hiperplasia intraductal seguida de hiperplasia intraductal com atipia, carcinoma in situ e carcinoma invasivo, culminando em um câncer de mama metastático (Beckmann et al. 1997; Tlsty et al. 2004). Todavia, modelos lineares de progressão do câncer de mama simplificam e não consideram a real complexidade da doença sendo, portanto, mais úteis como ferramenta didática para compreensão do curso natural da doença do que retratos fidedignos da gênese e progressão tumoral.

1.3 Classificação molecular do câncer de mama

A noção de que o câncer de mama não é uma única doença, mas sim um conjunto de doenças que compartilha um sítio comum é bem estabelecida. Este conjunto de doenças apresenta claras diferenças na morfologia, histopatologia, incidência, genética e resposta terapêutica. Do ponto de vista clínico e histopatológico, determinadas características são utilizadas como fatores que auxiliam na definição do esquema terapêutico mais adequado a ser utilizado. Entre estes, os mais utilizados são o tamanho tumoral, a idade da paciente, o comprometimento linfonodal e o grau histopatológico (que diz respeito a quanto o tecido tumoral se assemelha ao tecido de origem). Além destes, alguns marcadores utilizados possuem valor preditivo além de valor prognóstico: o status para os receptores de estrógeno e progesterona (ER/PR) e para o receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico, Her2 (Cianfrocca & Goldstein 2004; Andre & Puztai 2006).

Na prática clínica, o status dos receptores ER, PR e Her2+ é comumente acessado através do uso de técnicas de imunohistoquímica, embora é sabido que esta técnica varia grandemente dentro e entre laboratórios (Rhodes et al. 2000). O uso de tecnologias de larga escala para avaliar a expressão gênica é capaz de oferecer de forma rápida mensuramentos globais da transcrição de mRNA. Estudos realizados a partir destas ferramentas têm aumentado o entendimento sobre a biologia e heterogeneidade do câncer de mama.

O primeiro estudo a analisar as diferenças no padrão de expressão gênica em câncer de mama foi realizado por Perou e colaboradores no ano de 2000 e permanece até hoje como um dos mais influentes (Perou et al. 2000). Inicialmente, eles definiram um conjunto de genes intrínsecos, diferencialmente expressos entre uma série de

amostras de tumores de mama que foram então submetidos à *clusterização* hierárquica, o que permitiu reunir os tumores por similaridade na expressão gênica. Esta *clusterização* resultou em quatro subtipos distintos: Luminal (expressando citoqueratinas luminais 8 e 18, ER+); Basal (expressando citoqueratinas 5 e 17, ER+); Her2+ (de *Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2*, composto principalmente por tumores com *HER2* amplificado); e, Normal-like. Diversos estudos subsequentes foram e vêm sendo conduzidos com o intuito de melhor compreender a diversidade na expressão gênica e sua relevância (Sørli et al. 2001; Sørli et al. 2003; Hu et al. 2006; Prat et al. 2010; The Cancer Genome Atlas Network 2012; Curtis et al. 2012). Destes estudos, cinco subtipos intrínsecos têm se mostrado amplamente reprodutíveis: Luminal A, Luminal B, Basal, Her2+, e normal-like. A biologia destes subtipos embora complexa, estabelece as bases para a melhor compreensão do curso clínico da doença. Um sexto subtipo, denominado *Claudin low* também é reconhecido em publicações recentes (Prat et al. 2010; Sabatier et al. 2014).

Os subtipos luminais são positivos para receptor de estrógeno, apresentam expressão de GATA3, Ciclina D1 e das citoqueratinas luminais 8 e 18 e podem ser distinguidos pelo marcador de proliferação Ki67. Tumores do tipo Luminal A tem baixo grau histológico e um prognóstico relativamente bom enquanto tumores tipo Luminal B têm grau histológico mais alto, pior curso da doença e maior propensão à recidiva em relação ao Luminal A. Em relação aos demais subtipos, Luminal B têm um prognóstico intermediário. O subtipo Luminal A apresenta maior expressão de genes relacionados ao receptor de estrógeno e o subtipo Luminal B apresenta maior expressão de genes relacionados à proliferação e ciclo celular, a exemplo do Ki67 (Sørli et al. 2001; Fu & Jeffrey 2007; The Cancer Genome Atlas Network 2012). Pacientes do tipo Luminal A possuem uma taxa de sobrevida de 70% e Luminal B de 54,4% em 10 anos (Kennecke et al. 2010).

O subtipo Her2+ é composto por tumores que apresentam alto índice de expressão do receptor ERBB2 (Her2) resultante, em sua maioria, de amplificação do cluster localizado no cromossomo 17q12, que compreende o gene *ERBB2*. A maioria dos tumores Her2+ é negativa para ER. São tumores de alto grau histológico, de alto índice proliferativo e comumente metastáticos. Conferem mau prognóstico e taxa de sobrevida de 48,1% em 10 anos (Kennecke et al. 2010). A sobrevida média após recidiva é menor que um ano. Apesar do mau prognóstico, pacientes do subtipo Her2+ podem se beneficiar de terapia alvo dirigida com Trastuzumab, um anticorpo monoclonal que

especificamente bloqueia o receptor ERBB2 (Sørli et al. 2003; Sotiriou et al. 2003; Hu et al. 2006; Sotiriou & Pusztai 2009).

O subtipo Basal é composto por tumores que possuem baixa expressão ou são (frequentemente) negativos para a expressão dos receptores ER, PR e Her2. Quando negativo para a expressão destes marcadores, os tumores do subtipo basal são chamados de triplo-negativos. Apresenta expressão de citoqueratinas 5 e 17 e frequentes mutações foram descritas tanto em *BRC1* quanto em *TP53* (Sørli et al. 2001; Sørli et al. 2003). Tumores deste subtipo não possuem alvo terapêutico definido e apresentam mau prognóstico. A taxa de sobrevida é de 62,6% após 10 anos para os pacientes com tumores do subtipo Basal não triplo negativos. Para aqueles que possuem tumores do tipo Basal triplo negativo, a sobrevida é de 52,6% (Kennecke et al. 2010).

O subtipo *Normal-like* é composto por tumores que aparecem nos clusters agrupados junto do tecido normal da mama, o que é sugestivo de contaminação com amostras de tecido normal. Por este motivo, o subtipo *Normal-like* é mais frequentemente considerado artefato e ignorado (Sotiriou & Pusztai 2009).

Embora as análises em larga escala do perfil de expressão de tumores sejam capazes de revelar subgrupos que se assemelham e possuem particularidades que os caracterizam e distinguem, estudos mostram que grande heterogeneidade na expressão gênica é encontrada dentro de um mesmo subtipo. Disto surge a hipótese de que a plasticidade e heterogeneidade clínica observada entre pacientes é proveniente principalmente de diferenças dentro de um mesmo subtipo e não entre os principais subtipos. Os tumores Luminais A/B, por exemplo, embora sejam os subtipos de melhor prognóstico, são os que apresentam a maior heterogeneidade com relação à expressão gênica (The Cancer Genome Atlas Network 2012).

Dessa forma, talvez o maior desafio no entendimento da biologia do câncer de mama, na escolha de tratamento e na determinação do prognóstico das pacientes esteja numa distinção mais adequada dos subtipos do câncer de mama, capaz de superar a heterogeneidade encontrada de forma eficiente e reprodutível. Entre a ampla gama de possíveis marcadores que vêm sendo descritos e que podem auxiliar nesta problemática, o gene *PHLDA1*, estudado por nosso grupo de pesquisa, tem se mostrado relevante como um possível novo marcador de prognóstico, visto que a sua ausência nos tumores de mama analisados por nosso grupo e confirmado por outros estudos (Oberst et al. 2008; Johnson et al. 2011), está relacionada com redução de sobrevida livre de doença e sobrevida global das pacientes (Nagai et al. 2007; Marchiori et al. 2008).

1.4 PHLDA1: Estrutura e Função

O gene *PHLDA1* humano (de *Pleckstrin Homology-Like Domain, Family A, Member 1*) foi mapeado por análise de radiação híbrida no cromossomo 12q15, por Kuske e Johnson (2000). Possui dois éxons, dos quais apenas um é codificante, e apresenta um íntron (Frank et al. 1999). Quatro anos antes de seu mapeamento, seu produto gênico, a proteína PHLDA1, havia sido descrita em um trabalho conduzido por Park e colaboradores (1996), como necessária para a expressão do receptor Fas no processo de apoptose induzido por ativação em um hibridoma de células T murinas. Inicialmente, pelo papel aparente na regulação da apoptose, recebeu a denominação de TDAG51, de *T-cell Death-Associated Gene 51*.

Estruturalmente, a proteína PHLDA1 possui 401 aminoácidos e pertence à família de proteínas com domínio homólogo à plecstrina (PHL), por conter um domínio PHL entre os aminoácidos 150 a 283. Esse domínio é interrompido por uma sequência rica em glutamina (QQ) e é seguida de uma região rica em repetições prolina/glutamina (PQ) e prolina/histidina (PH) na região carboxi-terminal (Frank et al. 1999; Nagai 2012). Domínios do tipo PHL são compostos de 100 a 120 resíduos de aminoácidos conservados evolutivamente, encontrados em uma série de proteínas eucarióticas (Lemmon et al. 2002) sendo também descritos em procariotos (Xu et al. 2010). Como revisado por Scheffzek e Welti (Scheffzek & Welti 2012), estes módulos são conhecidos há mais de 20 anos e estão relacionados com interações proteína-proteína, na sinalização intracelular e organização do citoesqueleto. Além disso, três sítios canônicos de ligação de proteínas são reconhecidos em sua estrutura os quais podem acomodar lipídeos fosfatidilinositol, hélices de poli-prolina e peptídeos fosfotirosina. Domínios ricos em PQ, PH e QQ são também bastante conservados entre diversas proteínas eucarióticas e estão relacionados com regulação transcricional (Gomes et al. 1999). Adicionalmente, proteínas com repetições do tipo QQ estão relacionadas, embora funcionalmente de forma ainda pouco esclarecida, com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Williamson 1994; Butland et al. 2007; Shao & Diamond 2007). Oberg e colaboradores (2004) mencionam a existência de um sítio putativo de fosforilação na serina-293 de PHLDA1 para a proteína PKC e Johnson e colaboradores (2011) propõem que a serina-98 de PHLDA1 seja um alvo direto de fosforilação pela proteína Aurora quinase A (AURKA). Neef e colaboradores (2002) descreveram a presença putativa de um sinal de localização nuclear, sugerindo que a proteína pode ser

translocada para o núcleo em determinadas condições. A figura 3 traz um esquema que ilustra a estrutura de PHLDA1.

Figura 3. Representação esquemática da estrutura modular da proteína PHLDA1 e seus sítios de fosforilação. PHL, domínio homólogo à plecstrina que se estende do resíduo 150 ao 283; QQ, sequência rica em poli-glutamina; PQ, região rica em prolina-glutamina; e PH região rica em prolina-histidina. Sítios putativos de fosforilação são indicados por setas pretas.
Fonte: Adaptado de Nagai, 2012.

A função do gene *PHLDA1* parece variar de acordo com o tipo e contexto celulares. Alguns estudos sugerem uma relação com morte celular por apoptose (Park et al. 1996; Neef et al. 2002; Hossain et al. 2003; Hayashida et al. 2006; Gomes et al. 1999) e função antiproliferativa (Oberst et al. 2008), enquanto outros apontam o oposto ou ausência de relação (Toyoshima et al. 2004; Oberg et al. 2004). Estudos indicam que estresse externo, como aquele provocado por choque térmico, pode induzir a expressão de PHLDA1 (Hossain et al. 2003; Hayashida et al. 2006) e que essa expressão pode ser modulada por IGF-1 (fator de crescimento 1 tipo insulina) (Toyoshima et al. 2004) e pela via ERK (quinase regulada por estímulos extracelulares) (Oberst et al. 2008). Camundongos nocautes para PHLDA1 desenvolvidos por Rho et al (2001), eram saudáveis e não exibiam anormalidades no desenvolvimento. Em 2013, Basseri e colaboradores encontraram que a ausência de PHLDA1 estava relacionada com resistência a insulina, esteatose hepática e obesidade em camundongos nocautes para PHLDA1 (Basseri et al. 2013).

Adicionalmente, PHLDA1 vem crescentemente sendo investigado como um marcador de células tronco folicular em uma série de estudos (Ohya et al. 2006; Sellheyer & Nelson 2011; Yeh et al. 2012; Sellheyer & Krah 2011; Sellheyer et al. 2012; Battistella et al. 2014).

1.5 PHLDA1 e Câncer de Mama

A relação de PHLDA1 com câncer já foi descrita em diferentes tipos tumorais,

incluindo câncer de mama (Nagai et al. 2007; Marchiori et al. 2008; Oberst et al. 2008; Johnson et al. 2011; Li et al. 2014; Kastrati et al. 2014; Moad et al. 2013; Nagai 2016), melanoma (Neef et al. 2002), câncer de pulmão (Joo et al. 2007), câncer colorretal (Chiu 2005), câncer renal (Tavares et al. 2008) e carcinoma oral (Coutinho-Camillo et al. 2013).

Em células de mama HME16C transformadas por mutantes domínio efetores de Ras foi encontrada expressão aumentada de PHLDA1 induzida pela ativação de ERK. Em crescimento independente de ancoragem, supressão de PHLDA1 promoveu aumento na proliferação sugestivo de que PHLDA1 se opõe a transformação mediada por ERK (Oberst et al. 2008).

Regulação positiva da expressão de PHLDA1 foi também descrita na indução de autofagia e de apoptose em células de carcinoma mamário T-47D. Estes efeitos foram diminuídos após silenciamento de PHLDA1 indicando regulação do processo autofágico e apoptótico por PHLDA1 nestas células (Moad et al. 2013). Li e colaboradores (2014) encontraram expressão diminuída de PHLDA1 na linhagem mamária SKBR3 (Her2+) onde a superexpressão de PHLDA1 promoveu a regulação negativa da proliferação e motilidade celulares. Estas células eram também mais sensíveis ao tratamento com lapatinib (um inibidor dos receptores EGFR e ERBB2).

Kastrati e colaboradores (2014) descreveram que a expressão de PHLDA1 é regulada através de um *crosstalk* entre ER, NFκB e miR-181. Adicionalmente, os autores relataram que a expressão de PHLDA1 encontrava-se aumentada e é requerida para o crescimento em suspensão para a linhagem de câncer de mama MCF7 (ER+) onde correlacionou-se a expressão de PHLDA1 com propriedades do tipo célula tronco.

Adicionalmente, em um trabalho conduzido por nosso grupo de pesquisa, utilizando cerca de 700 amostras de tumores de mama, PHLDA1 foi encontrado diferencialmente expresso e sua negatividade foi forte fator de mau prognóstico com taxas de sobrevida global em 5 anos de 52,7% para aquelas pacientes com tumores negativos para PHLDA1 e de 74,8% para aquelas que apresentavam tumores positivos (Figura 4). Análise multivariada mostrou que a expressão de PHLDA1 era um fator prognóstico independente de sobrevida global em câncer de mama mesmo após ajuste para estadió clínico e status linfonodal (Nagai et al. 2007). Em estudo posterior, a regulação de PHLDA1 via ER foi avaliada frente à exposição ao 17β-estradiol, em células de câncer de mama MCF7. Neste trabalho, a adição de 17β-estradiol aumentou a expressão dos transcritos de PHLDA1 em mais de duas vezes. Além disso, foram

encontrados sítios putativos de ligação a estrógenos na região promotora de PHLDA1 (Marchiori et al. 2008).

Figura 4. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida de pacientes com tumor de mama. Sobrevida global (A) e sobrevida livre de doença (B) para pacientes com tumor de mama estratificadas de acordo com a expressão proteica de PHLDA1. C, sobrevida global das pacientes estratificadas de acordo com a expressão proteica de PHLDA1 e com o status para o ER.

Fonte: Nagai et al (2007).

A terapia clínica tradicional do câncer de mama foca na identificação do regime mais efetivo para as pacientes baseando-se principalmente no tamanho e grau tumoral, no estado de invasão de linfonodos e no status para os receptores ER/PR e Her2 (Gown 2009). É uma abordagem que tem o objetivo de beneficiar a maioria dos pacientes, mas não identifica regimes que possam ser mais benéficos para determinadas pacientes embora não sejam para outras (Andre & Pusztai 2006). Possibilitam, de fato, fazer distinção entre tumores de alto e baixo risco, mas ignoram uma série de pacientes que se encontram em categorias intermediárias. Além disso, mesmo entre o grupo de baixo risco, estima-se que 15% destas pacientes irão recorrer e morrer de doença metastática.

Paradoxalmente, dentro do grupo de alto risco, cerca de 15% das pacientes tem um curso clínico favorável (Gown 2009). Dessa forma, apesar da efetividade do tratamento para determinadas pacientes, uma parcela importante possui um benefício questionável dos esquemas terapêuticos oferecidos. Além disso, mulheres que poderiam ser curadas com tratamento local (cirurgia e radioterapia) são submetidas à sobre-tratamento e sofrem dos efeitos colaterais tóxicos da quimioterapia desnecessária (Weigelt et al. 2005) que pode incluir, entre outros efeitos, neuropatia, infertilidade, doenças cardiovasculares, depressão, disfunção sexual, osteoporose, dor e problemas cognitivos (Ewertz & Jensen 2011).

Os estudos citados anteriormente mostram alterações na regulação da expressão de PHLDA1 em diferentes tipos tumorais e contextos, além de seu potencial como marcador prognóstico no câncer de mama. Com base no exposto, formulamos a hipótese central desta tese, de que o gene *PHLDA1* tem propriedades supressoras tumorais em câncer de mama e que o desbalanço em sua regulação está envolvido com a tumorigênese e manutenção da malignidade tumoral. Todavia, ainda não foi determinado se esse desbalanço na regulação de PHLDA1 possa ser responsável pela iniciação e/ou progressão da doença ou se resulta de desestabilização cromossômica durante a proliferação neoplásica, não tendo papel funcional nesses processos. Neste sentido, acreditamos que a relação de PHLDA1 com a transformação epitelial mamária e tumorigênese pode ser melhor compreendida se o desequilíbrio aparece como um evento individual em células mamárias não-tumorais, ajudando a evitar qualquer viés em relação as características moleculares profundamente distintas das linhagens celulares tumorais.

Sistemas *in vitro* de cultura celular são amplamente utilizados na pesquisa do câncer de mama e fazem uso de uma arquitetura simplificada da fisiologia normal. A linhagem celular epitelial mamária humana MCF10A é um modelo de grande credibilidade e amplamente utilizado para estudo da mama normal. Células MCF10A são derivadas do tecido mamário de doença fibrocística humana de uma mulher de 36 anos de idade, que não tinha câncer nem história familiar de câncer (Soule et al. 1990). Notavelmente, a linhagem MCF10A é derivada da linhagem MCF10, que é a única linhagem diploide e contém apenas uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 3 (Tait et al. 1990). Além disso, MCF10A tornou-se espontaneamente imortalizada, sem infecção viral, transfecção celular de oncogene ou exposição a agentes cancerígenos ou radiação, preservando uma variedade de características celulares que

imitam células epiteliais mamárias normais em cultura (Soule et al. 1990; Russo et al. 1996; Russo & Russo 2004; Russo 2014).

Frente a isso, o objetivo deste trabalho foi explorar o papel funcional de PHLDA1 em células epiteliais de mama, MCF10A, a partir da redução da expressão de PHLDA1 nestas células.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar o papel funcional do gene *PHLDA1* na linhagem epitelial de mama normal, MCF10A, através da análise do efeito da supressão do gene *PHLDA1* na morfologia e comportamento destas células. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- Determinar o perfil de expressão de *PHLDA1* em diferentes linhagens de mama, normais e tumorais.
- Analisar os efeitos da diminuição da expressão de *PHLDA1* no comportamento das células MCF10A, através de análises de proliferação, migração e invasão;
- Analisar os efeitos da redução da expressão de *PHLDA1* na morfologia das células MCF10A;
- Avaliar o efeito da expressão diminuída de *PHLDA1* na resposta à indução de morte celular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de células em monocamada

A linhagem celular epitelial normal de mama MCF10A, a linhagem MCF7 (derivada de adenocarcinoma ductal de mama, subtipo molecular Luminal A) e a linhagem MDA-MB-231 (derivada de adenocarcinoma de mama, subtipo molecular Basal, invasiva, ER-) foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (Rockville, MD - USA). A linhagem SKBR3 (derivada de adenocarcinoma de mama, subtipo Her2+) foi gentilmente cedida pela Dra Anamaria Aranha Camargo (Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo, Brasil). A linhagem Hb4a (epitelial normal da mama) e C5.2 (clone da linhagem Hb4a transfectada para superexpressão de Her2) foram gentilmente cedidas pelo Dr Michael O'Hare (Instituto Ludwig for Cancer Research, Londres, UK). As linhagens fazem parte do banco de células do Laboratório de Genética Molecular do Câncer da FMUSP.

As células MCF7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco, Gaithersburg, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Gaithersburg, EUA). A linhagem SKBR3 foi cultivada em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2 mM de glutamina. A linhagem Hb4a e C5.2 foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640, suplementadas com 10% de soro fetal bovino, 2mM de glutamina e 5 µg/mL de hidrocortisona e insulina. A linhagem MCF10A foi cultivada na proporção 1:1 dos meios de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*): F12 (*Ham's Nutrient Mixture*) (Invitrogen, Carlsbad, EUA), suplementado com 5% soro de cavalo (GIBCO, Gaithersburg, EUA), hidrocortisona (0,5 µg/ml), insulina (10,0 µg/ml), EGF (0,02 µg/ml) e toxina colérica (0,1 µg/ml). Todos os meios de cultura estavam previamente suplementados com as seguintes concentrações de antibiótico-antimicótico (Gibco, Gaithersburg, EUA): 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de fungizona. Todas as linhagens foram mantidas em estufa (Thermo Electron Corporation, Marietta, EUA) a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂.

3.2 Cultura celular em 3D (Matrigel™)

Para realização da cultura tridimensional, células MCF10A foram cultivadas em monocamada até atingirem 100% de confluência. Em seguida, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 2000 r.p.m. por 2 minutos. O sobrenadante foi aspirado e as células ressuspensas e contadas. O Matrigel (matriz extracelular secretada pela linhagem de sarcoma de camundongo Engelbreth-Holm-Swarm) com fatores de crescimento reduzidos (BD Matrigel™ Matrix - BD Biosciences, Califórnia, EUA) foi liquefeito em banho de gelo a 4°C. Posteriormente, a suspensão de células totalmente dissociadas foi misturada com o meio completo e soro adequados à linhagem MCF10A, descritos anteriormente, com a adição de 4% de Matrigel. Aliquotas de 30 µL de Matrigel foram então adicionadas a cada poço das lâminas de cultura de oito poços (BD, Califórnia, EUA). Em seguida, as lâminas foram colocadas em estufa a 37°C por 15 minutos para solidificação do Matrigel, conforme descrito por Debnath et al (2003). Aliquotas de 400 µL da suspensão de células com 4% de Matrigel contendo 1×10^3 células foram cuidadosamente adicionadas sobre a camada de Matrigel previamente solidificada em cada poço da lâmina de cultura, caracterizando a cultura *on top*. As células foram mantidas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C, com troca de meio a cada dois dias. As imagens foram e o tamanho das mamóferas foram registrados nos tempos de 3, 5 e 7 dias, capturadas com auxílio do software AxionVision (Zeiss).

3.3 Ensaio de hipóxia

A linhagem MCF7 foi mantida nas condições anteriormente descritas, crescida em placas de 6 poços até adquirir confluência adequada para início dos experimentos de hipóxia. Na confluência de 50%, foi adicionado às células o meio completo adequado acrescido de soro fetal bovino na concentração de 0,01%. As células foram então deixadas por 48 e 72 horas em normóxia ou em câmara de hipóxia H35 *Hypoxystation* (Whitley), sob as concentrações fixas de 1% de O₂, 5% de CO₂ e 94% de N₂ a 37°C. Nos tempos definidos, as células foram retiradas e processadas para extração de proteínas.

3.4 Transformação bacteriana e purificação dos vetores de expressão

Bactérias competentes *E.coli* XL1Blue e TOP10 (Stratagene, Cedar Creek, EUA) foram transformadas em meio Luria Bertani-Ágar com ampicilina (100 µg/mL; SIGMA Chemical Corporation, St. Louis, EUA) utilizando o vetor de silenciamento pRS em quatro construções distintas (constructos), cada uma contendo um diferente shRNA específico para o transcrito de PHLDA1, além de um vetor controle (pRS-Controle), adquiridos da *TrueClone Collection* (Origene, Rockville, EUA). A figura 5 traz um esquema da construção do vetor utilizado e a sequência de cada shRNA contida no vetor. Para a transformação química, 50 ng dos vetores foram adicionados em alíquotas de 100 µL de XL1Blue e TOP 10 que ficaram no gelo por 30 minutos. Em seguida, a mistura foi incubada a 42°C por 30 segundos e transferida novamente para o gelo. As bactérias foram colocadas nos tubos contendo 1 mL de meio S.O.C (Invitrogen, Califórnia, EUA) e incubadas a 37 °C sob agitação (180 r.p.m.) por 1 hora. Posteriormente, a mistura de bactérias transformadas foi plaqueada em meio LB-Ágar a 37°C por 16 horas. As colônias de bactérias isoladas que receberam os constructos, ou seja, que eram resistentes à ampicilina, foram selecionadas para o pré-inóculo. Para cada constructo o pré-inóculo foi feito a partir de uma única colônia de bactéria em 2mL de meio LB contendo ampicilina durante 8 horas sob agitação de 200 r.p.m. a 37°C. Posteriormente, o volume deste pré-inóculo foi adicionado em 100mL de meio LB na presença de ampicilina por 16 h sob agitação (200 r.p.m. a 37 °C) para crescimento bacteriano e posterior purificação dos vetores de expressão. Os vetores foram extraídos utilizando-se o kit *Plasmid MIDI kit* Quiagen (Quiagen, Valencia, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, a extração e purificação são baseadas na lise da parede bacteriana sob condições alcalinas (NaOH-SDS) na presença de RNase A, que digere o RNA liberado da bactéria. O lisado é posteriormente neutralizado com Acetato de Potássio ácido que precipita o SDS juntamente com as proteínas denaturadas, DNA cromossômico e os *debris* celulares. Em seguida, o lisado é transferido para as unidades de filtração para a ligação do DNA plasmidial (carregado negativamente) na resina de sílica (grupos DEAE carregados positivamente). As lavagens com o tampão com concentrações medianas de sal eliminam todos os contaminantes (RNA, proteína, *debris* celulares). A eluição do DNA plasmidial ocorre na presença de altas concentrações de sal. Este, por sua vez, é eliminado através da precipitação com isopropanol à temperatura ambiente. Depois de centrifugado (9000

r.p.m. por 20 minutos), o precipitado de DNA é lavado com Etanol 70% para remoção dos resíduos de sal. O DNA plasmidial é seco e redissolvido em água livre de RNase DNase (Invitrogen, Grand Island, EUA) para posterior análise da qualidade em gel de agarose 1% e quantificação espectrofotométrica a 260 nm.

Sequência nucleotídica de cada shRNA	Código do fabricante
CAGATGGTGCAGTACAAGAATCGTCAGGC	TR310451A / TI341797
GGCAAGTACATGTACTTCACTGTGGTGAT	TR310451B / TI341798
CCGCAGCACCTCCAACCTCTGCCTGAAAGG	TR310451C / TI341799
GAGGATGCTGGAGAGTAGCGGCTGCAAAG	TR310451D / TI341800

Figura 5. Esquema dos vetores pRS utilizados nas transfecções e as sequências de cada shRNA. Os vetores foram adquiridos da empresa Origene.

Fonte: Adaptado de *origene.org*

Para avaliação dos vetores purificados foi realizada digestão enzimática com enzima de restrição (Figura 6). Os vetores pRS possuem 1 sítio de digestão para a enzima EcoRI. A reação com essa enzima deve linearizar os vetores. Adicionalmente, os vetores pRS possuem também um sítio de digestão pela enzima BamHI que é destruído na inserção dos shPHLDA1. Desta forma, a digestão contendo as duas enzimas deve ser capaz de liberar um inserto no vetor controle (que possui os dois sítios intactos) e apenas linearizar os vetores shPHLDA1, que possuem apenas sítio para EcoRI.

Figura 6. Gel de agarose mostrando o perfil de digestão enzimática dos vetores pRS Controle e shRNA. A inserção de cada shRNA-PHLDA1 no vetor destrói um sítio de restrição para a enzima BamHI. O vetor pRS Controle possui um sítio para BamHI intacto, sua digestão deve liberar um fragmento de cerca de 333 bp (seta preta). Canaleta 1: padrão de 1Kb (Invitrogen); 2: vetor intacto, não digerido; 3: digestão com a enzima EcoRI (NEB); 4: digestão com as enzimas Bam HI e EcoRI; 5: digestão com a enzima Bam HI (NEB).

3.5 Transfecção celular

Para supressão do gene PHLDA1, os 4 constructos (vetor pRS contendo shRNA-PHLDA1) e o vetor controle foram submetidos a transfecção com o uso do reagente FUGENE HD[®] (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. As células foram cultivadas em placas de 6 poços e após atingirem confluência de 80% a transfecção foi realizada com razão de 1µg : 3µl (DNA plasmidial : FuGENE): 2,5 µg de DNA plasmidial e 7,5 µL de FuGENE HD foram misturados a 125 µL de meio OPTI-MEM (Life Technologies) e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. O meio foi aspirado das células e 2 mL de meio suplementado, sem antibiótico e contendo 5% de soro de cavalo, foi reposto a cada poço da placa. Toda a reação de transfecção foi adicionada ao novo meio. As células foram incubadas por 48 horas a uma temperatura de 37 °C e uma atmosfera com 5% de CO₂ e a eficiência de transfecção foi checada através de uma transfecção paralela com vetor contendo GFP (pcDNA-GFP), por meio

de contagem das células emitindo fluorescência verde, no microscópio de fluorescência (EVOS, Thermo Fischer Scientific). Populações policlonais de células transfectadas (subclones) foram selecionadas com Puomicina 0, 7µg/ml a partir de 48 horas após transfecção. Após a seleção, os subclones gerados foram mantidos em meio completo com Puomicina na concentração de 0,5µg/ml. A eficiência de silenciamento foi avaliada por Western Blot. Dois subclones foram escolhidos para a realização dos ensaios funcionais, nomeados shPHLDA1 #1 e #2.

3.6 Extração proteica

Para extração de proteínas totais, as células foram primeiramente, lavadas por duas vezes com PBS e então incubadas com solução de tripsina-EDTA a 37°C para desadesão da monocamada de células. Este conteúdo foi transferido para tubo cônico de 15 mL e centrifugado por 2 minutos a 2000 r.p.m. a temperatura ambiente. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante foi ressuspensão em volume adequado de tampão de lise gelado previamente preparado (50 mM de pirofosfato de sódio, 50 mM de fosfato de sódio, 5 mM de cloreto de sódio, 5 mM de EDTA dissódico, 5 mM de EGTA, 10 mM de HEPES, 0,5 % de Triton-X100, 2 mM de Ortovanadato de sódio, 1 mM de PMSF e 2 mM de inibidores de proteases (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, EUA). Esta solução ficou em gelo durante 20 minutos sendo agitada a cada 5 minutos com auxílio de vortex, para completa lise das células. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 13.000 r.p.m. a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante, correspondente ao extrato proteico, foi transferido para um novo tubo e a concentração protéica determinada através do método de Bradford (Pierce, Rockford, EUA). Este método de quantificação do extrato proteico utiliza uma curva padrão com diluições seriadas de BSA (componente do Coomassie Plus – The Better Bradford AssayTM Kit, Pierce, Rockford, EUA) nas concentrações de 0,0 a 2 mg/mL. O extrato protéico foi diluído 10 vezes em H₂O (livre de DNase/RNase). Em uma placa de 96 poços, foram pipetados 5 µL das diluições de BSA bem como 5 µL dos extratos protéicos diluídos a serem quantificados. A seguir, foram adicionados 295 µL do Coomassie Plus – The Better Bradford AssayTM Kit (Pierce, Rockford, EUA) em cada poço e a placa foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. A leitura foi realizada no Biotrak II Plate Reader (Amersham Biosciences, Cambridge, Inglaterra) à 595 nm. Os valores

das absorvâncias foram plotados em um gráfico no Microsoft® Office Excel® 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, EUA) onde as absorvâncias da curva padrão serviram como referência para a quantificação dos extratos protéicos.

3.7 Western Blot

Trinta microgramas do extrato proteico foram aliquotadas em tubos de 1,5 ml aos quais adicionou-se o tampão Laemmli 6,0 X (7,5 % Tris 2 M pH 6,8; 0,5% SDS; 5% azul de bromofenol; 26% glicerol; 16,5% de 2-mercaptoetanol) no volume apropriado para se obter uma concentração final de 1X. A seguir, as amostras foram aquecidas a 95°C durante 5 minutos e aplicadas em gel SDS-PAGE para eletroforese.

Para a realização da eletroforese foram preparados géis SDS-PAGE: um gel de separação 10% (375,0 mM Tris-HCl, pH 8,8; o volume adequado de acrilamida 40%/Bis-acrilamida 37,5:1; 0,1% SDS; 0,045% APS; 0,5 µL/mL TEMED) para a separação das proteínas e, sobre este, um gel de empilhamento 4% (125,0 mM Tris-HCl, pH 6,8; o volume adequado de 40% acrilamida/Bis-acrilamida 3,75:1; 0,1% SDS; 0,05% APS; 1 µL/mL TEMED). O tampão de corrida utilizado foi o Tris-Glicina (3,0 g/L Tris Base; 14,5 g/L Glicina) contendo 0,1% de SDS e o marcador de referência de peso molecular utilizado foi o Precision Plus Protein™ Kaleidoscope (BioRad, EUA). A corrida eletroforética iniciou-se a 70 V por 30 minutos ou até que as amostras passassem pelo gel de empilhamento, e continuou a 100 V por 1 hora e 20 minutos. Terminada a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Pierce, Rockford, EUA) utilizando-se o *Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell* (BioRad, EUA) e o tampão de transferência Tris-Glicina (5,8 g/L Tris Base; 2,9 g/L Glicina) contendo 20% de metanol e 0,0375% de SDS. A transferência foi realizada sob uma corrente elétrica de 15 V por 50 minutos. A seguir, a membrana foi incubada, sob agitação, em solução de leite em pó desnatado 5% ou BSA 3% (diluídos em tampão TBS-t: 2,42 g/L Tris Base; 8 g/L NaCl; 0,1% Tween 20) durante 1 h à temperatura ambiente ou por 15h a 4°C para bloqueio dos sítios inespecíficos. A seguir, a membrana foi incubada, sob agitação, por 1 – 2 horas a temperatura ambiente, ou por 16 horas a 4°C com o anticorpo primário diluído na solução de TBT-t e leite em pó desnatado 5% (ou BSA 3%). Passado o período de incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada por quatro vezes de 5 minutos a temperatura ambiente, sob agitação, com tampão TBS-t e por uma vez de 10 minutos com tampão TBS (2,42 g/L Tris Base; 8,0

g/L NaCl) e incubada, sob agitação, por 1 hora a temperatura ambiente, com o anticorpo secundário também diluído na solução de leite em pó desnatado 5% ou BSA 3%. Após esta incubação a membrana foi novamente lavada por quatro vezes de 5 minutos a temperatura ambiente, sob agitação, com TBS-t e uma vez de 10 minutos com TBS. A detecção das proteínas foi realizada por reação quimioluminescente utilizando-se o ECL Western Blotting Detection Reagents (GE healthcare, Buckinghamshire, UK), de acordo com as recomendações do fabricante. As imagens foram captadas através da câmara CCD ImageQuant LAS 4000 (GE healthcare, Buckinghamshire, UK). As diluições de anticorpos primários e secundários utilizados nos experimentos de western blot estão descritas na Tabela 1. As análises de expressão proteica foram realizadas por densitometria utilizando a expressão da actina como normalizador da massa. As análises densitométricas foram realizadas no software de domínio público ImageJ, versão 10.2 (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos ensaios de Western Blot e respectivas diluições

Anticorpo	Empresa/Código	Diluição	Peso molecular	Diluição secundário
anti-Actina	Santa Cruz (C4)	1:3000	42kDa	mouse 1:1000
anti-PHLDA1	Santa Cruz (sc23866)	1:250	44kDa	mouse 1:1000
anti-AURKA	Origene (TA300714)	1:1000	46kDa	rabbit 1:2000
anti-p-AURKA phospho T288	Abcam (AB18318)	1:500	46kDa	rabbit 1:2000

3.8 Análise da Proliferação Celular

A proliferação celular foi investigada através do kit de proliferação *CyQUANT Direct Proliferation kit* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as células em meio DMEM-F12 completo, suplementado com 5% de soro de cavalo foram semeadas em triplicata em placas de 96 poços (Corning), na densidade de 1×10^4 células/poço. Após 24, 48, 72 e 96 h o meio foi removido das placas e as células foram incubadas com 1 x solução corante de ligação a 37 ° C durante 1 hora, no escuro. A fluorescência foi medida utilizando um leitor de microplacas Fluostar Optima (Fluostar Optima, BMG Labtech; Durham, NC) com excitação máxima de 485 nm e emissão máxima de 530 nm.

3.9 Ensaio de migração celular

A migração celular foi avaliada pelo ensaio de fechamento de ferida (*wound healing*). As células foram crescidas em placas de cultura de 6 poços até atingirem confluência. Posteriormente, foi produzida uma “ferida” na monocamada celular com auxílio de uma ponteira de 200 μL . As células foram lavadas por duas vezes com PBS e meio e soro adequados a linhagem foram adicionados. Imagens foram registradas em seguida, caracterizando o tempo inicial do ensaio (tempo 0). Posteriormente, as células foram incubadas a 37° C na estufa e após 18 e 24 horas foi realizada nova lavagem e troca de meio e soro adequados seguidas da captura de imagens com auxílio do software AxionVision (Zeiss) em campos correspondentes ao tempo inicial. As imagens foram analisadas com auxílio do software ImageJ e expressos em porcentagem de área da ferida.

3.10 Ensaio de invasão celular

Os ensaios de invasão foram realizados utilizando as câmaras de invasão BD *BioCoat growth factor reduced Matrigel* (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, células controle ou células shPHLDA1 (1×10^5) foram introduzidas no compartimento superior das câmaras de invasão. Após 18 h as células foram removidas da superfície superior de cada molde de inserção. As células na superfície inferior, que correspondem as células que migraram através da membrana e invadiram através da lâmina de Matrigel, foram fixadas com metanol, coradas com DAPI e contadas em microscópio de fluorescência (EVOS Cell Imaging Systems) em 10 campos representativos. Dados invasão celular foram expressos como o número médio de células por campo.

3.11 Ensaio de crescimento independente de ancoragem

Células isoladas foram semeadas na densidade de 526 células/cm² por poço de placa de 6 poços de ultra baixa adesão (*Ultralow Attachment Plates*, Corning, Lowell, MA, EUA) com meio DMEM / F12 (Gibco) suplementado e isento

de soro com a adição do suplemento B27 1 x (Gibco), incubadas em atmosfera humidificada com 5% de CO₂ a 37 ° C. Ao final de 9 dias em cultura, as mamógrafas $\geq 50 \mu\text{m}$ foram contadas e imagens foram registradas.

3.12 Ensaio Clonogênico

Para ensaio clonogênico, células controle e shPHLDA1 foram semeadas na proporção de 100 células por poço de placa de 6 poços e crescidas em atmosfera humidificada com 5% de CO₂ a 37 ° C durante 8 dias. Posteriormente, as células foram fixadas com metanol gelado por 10 minutos a -20 °C e coradas com cristal violeta 0,5% por 15 minutos. Colônias $\geq$ a 50 células foram contadas.

3.13 Imunofluorescência

Ao atingir confluência entre 40~60 %, as células foram lavadas com PBS 1X e fixadas com paraformaldeído (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, EUA) 4 % em PBS durante 10 minutos em temperatura ambiente. A permeabilização foi feita com Triton-X100 0,1 % (USB Corporation, Cleveland, USA) durante 20 minutos a 4 °C. Posteriormente, foi adicionada a solução de bloqueio de 3 % BSA (B o v i n e s e r u m a l b u m i n - Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, EUA) por 1 hora a temperatura ambiente. As células foram incubadas com anticorpo primário anti-actina na diluição 1:150 por 14-16h em câmara úmida em 3% de BSA. Em seguida, as células foram lavadas 3X com PBS e incubadas com anticorpo secundário (anti mouse Alexa Fluor-488) na diluição de 1:100 por mais 1 hora em câmara úmida, protegidas da luz. Após lavagens com PBS, os núcleos celulares foram marcados com DAPI (Invitrogen, Carlsbad, EUA) durante 10 minutos, protegidos da luz. Seguida a montagem das lâminas com PBS/Glicerol ou PBS/Glicerol acrescido de rodamina-faloidina na concentração de 1:200, as células foram visualizadas no microscópio Confocal Zeiss LSM 510 META /UV.

3.14 Análise de morte celular através da marcação por Annexin V-FITC/PI

Células MCF10A controle e células com expressão reduzida de PHLDA1, após atingirem aproximadamente 70% de confluência foram tratadas com o quimioterápico docetaxel (Taxotere - Aventis Pharmaceuticals Inc., Bridgewater, NJ) para indução de morte celular, na concentração de 2,0 nM e mesma quantidade final de etanol absoluto (inferior a 0,01%), por 24 horas, quando se procedeu com a análise de morte celular por citometria.

Para o ensaio de Annexin V-FITC/PI as células foram marcadas com Annexin V-FITC e PI e avaliadas para apoptose por citometria de fluxo de acordo com o protocolo do fabricante (BD Pharmigen, San Diego, CA, USA). Para a preparação do ensaio, as células foram recolhidas e separadas em tubos *ependorf* (1×10^5). Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e ressuspensas em 100 uL de tampão *Binding Buffer* (10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaOH, 2.5 mM CaCl_2) com 5 uL de Annexin V-FITC e 5 uL de PI. Após agitar gentilmente as células ressuspensas, foram incubadas ao abrigo da luz durante 15 minutos em temperatura ambiente. Ao final, foi feita a adição de 300 uL de *Binding Buffer* ao volume final e a leitura foi realizada com auxílio do citômetro *Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer* (Thermo Fischer Scientific).

3.15 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste t-student ou ANOVA conforme apropriado, com P-valor $<0,05$ considerado estatisticamente significativo. Os dados são expressos como média $\pm$ s.e.m. (erro padrão) quando representativos de 3 experimentos independentes ou média $\pm$ s.d. (desvio padrão) em caso de um único experimento ter sido realizado. Em todas as figuras, os asteriscos denotam níveis de significância como se segue: * P $<0,05$; ** P $<0,01$ e *** P $<0,001$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Linhagens normais e tumorais de mama possuem níveis de PHLDA1 distintos

Em estudos prévios, nosso grupo identificou PHLDA1 como diferencialmente expresso entre amostras de tumor de mama e amostras de tecido mamário normal e demonstrou por imunohistoquímica que a expressão reduzida de PHLDA1 está associada a um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama (Nagai et al. 2003; Nagai et al. 2007). Todavia, a relação de PHLDA1 em referência aos subtipos moleculares de câncer de mama ainda não foi explorada. Utilizando uma série de linhagens celulares disponíveis em nosso laboratório, que representam diferentes subtipos moleculares do câncer de mama, avaliamos o perfil de expressão proteica basal de PHLDA1 por WB nestas linhagens. Adicionalmente, o perfil de expressão transcricional de PHLDA1 foi analisado em um conjunto de 21 linhagens de células (Tabela 2) que representam os diferentes subtipos moleculares de câncer da mama, com base no estudo de Huang et al (2007). Os dados de expressão gênica foram adquiridos através da plataforma Oncomine (www.oncomine.org).

Em relação aos níveis proteicos, as linhagens utilizadas como modelos de mama normal, MCF10A e Hb4a, exibiram os níveis mais baixos de PHLDA1 em comparação às demais linhagens, com a exceção de SKBR3 (adenocarcinoma invasivo, subtipo molecular Her2+), a qual não apresentou níveis proteicos detectáveis por WB. A linhagem MCF7 (adenocarcinoma ductal subtipo molecular Luminal A) apresentou nível proteico de PHLDA1 similar à MCF10A e Hb4a, enquanto que a linhagem invasiva do subtipo molecular basal, MDA-MB-231 e a linhagem C5.2 (derivada de Hb4a), que superexpressa Her2 em níveis equivalentes à linhagem SKBR3 (Lewis et al. 1996), apresentaram níveis similares de PHLDA1 entre si e comparativamente mais altos dentre todas as linhagens investigadas (Figura 7) ($P < 0,01$).

Figura 7. PHLDA1 apresenta variação de expressão proteica em diferentes linhagens de mama. (A) Western Blot representativo da expressão proteica de PHLDA1 e sua quantificação normalizada (B) em relação à expressão de Actina. *nr*: poços não-relacionados.

Similarmente aos nossos achados em nível proteico, a expressão transcricional de PHLDA1 apresentava níveis baixos para SKBR3 que foram progressivamente maiores em células MCF7 e MDA-MB-231 (ver Tabela 2 para detalhes); nenhuma diferença significativa na expressão de PHLDA1 específica para luminal A, luminal B, Her2-enriquecido ou subtipo basal foi passível de observação neste conjunto de dados, provavelmente devido ao pequeno número de amostras em cada grupo já que é possível observar uma tendência distinta entre os subtipos (Figura 8).

Figura 8. PHLDA1 apresenta variação de expressão transcricional em diferentes linhagens tumorais de mama. *Box plot* exibindo a expressão transcricional de PHLDA1 em diferentes linhagens tumorais de mama de acordo com o subtipo molecular (Basal-like, Her2+, Luminal A e Luminal B). Teste ANOVA com correção de Bonferroni, $P > 0,05$.

Tabela 2 - Perfil transcricional de PHLDA1 em painel de linhagens tumorais de mama*

Linhas celulares	Subtipo molecular	Valor da expressão
HCC1954	Basal	2.09628
MDAMB157	Basal	2.13389
MDAMB231	Basal	5.13442
MDAMB436	Basal	3.27935
MDAMB453	Basal	-1.29641
MDAMB468	Basal	0.86291
HCC1806	Basal	4.05229
BT20	Basal	1.89172
BT549	Basal	4.64367
HCC38	Basal	1.86541
HCC70	Basal	1.75172
HS578T	Basal	4.48293
AU565	Her2	-0.17714
MDAMB435	Her2	3.74567
SKBR3	Her2	-0.7586
HCC1419	Her2	-1.19447
MCF7	LumA	-0.69144
ZR751	LumA	-0.60022
ZR7530	LumA	0.44889
BT474	LumB	-0.67877
HCC1428	LumB	1.40444

*Conjunto de dados GSE6569, acessado via banco de dados ONCOMINE

(oncomine.org)

4.2 Hipóxia altera os níveis proteicos de Aurora A quinase na linhagem MCF7

Johnson et al (2011) indicaram a existência de um *looping* de regulação negativa entre PHLDA1 e a proteína Aurora quinase A (AURKA). Nós investigamos o nível de expressão de PHLDA1 e a expressão e ativação de AURKA (fosforilação no resíduo T-288) nas linhagens MCF10A e MCF7. Adicionalmente, investigamos o efeito da hipóxia em 48 e 72 horas na expressão destas proteínas para a linhagem MCF7 (Figura 9). A análise dos resultados mostra diminuição progressiva ao longo do tempo nos níveis de AURKA total em resposta a exposição à hipóxia. A expressão relativizada de pAURKA indica que possa estar havendo aumento na ativação de aurora. Os níveis de PHLDA1 não apresentaram alteração nos tempos avaliados.

Figura 9. Alteração nos níveis proteicos de AURKA frente à hipóxia. (A) Western blot representativo da expressão proteica de PHLDA1, AURKA total e pAURKA (fosforilada) na linhagem MCF7 e (B) quantificação normalizada de PHLDA1 em relação a expressão de Actina e de pAURKA em relação à AURKA total.

4.3 Estudo funcional de PHLDA1

Para o estudo funcional de PHLDA1, realizamos a supressão deste gene com vetores plasmidiais comercializados pela empresa Origene. Foram utilizados quatro

diferentes shRNAs específicos para o transcrito de PHLDA1, cada um contido individualmente em vetor pRS shRNA-PHLDA1, adicionalmente ao vetor pRS controle. A descrição detalhada do vetor pRS e das sequências de cada shRNA estão no item 3.4 de Materiais e Métodos.

Dois subclones (populações policlonais) gerados a partir da transfecção celular e selecionados com Puomicina que exibiram expressão reduzida de PHLDA1, avaliada por Western blot (Figura 10), foram selecionados para os ensaios funcionais, nomeados shPHLDA1 #1 e #2, além de um subclone controle.

Figura 10. Eficiência de knockdown em células MCF10A controle e shPHLDA1. Western blot da expressão de PHLDA1 nas células MCF10A controle (1° poço) e células shPHLDA1 #1 e #2 (2° e 3° poços, respectivamente).

4.3.1 A redução da expressão de PHLDA1 promove alterações morfológicas em células MCF10A

Alterações morfológicas foram observadas nas células MCF10A com expressão reduzida de PHLDA1 em comparação com as células controle. Crescidas em monocamada e em subconfluência, as células MCF10A formaram *clusters* e apresentaram lamelipódios nas extremidades dos *clusters*; quando em confluência, exibiram firme adesão célula-célula e morfologia cuboide (*cobblestone*) (Figura 11, painel superior), características típicas de células MCF10A cultivadas *in vitro* (Soule et al. 1990; Pauley et al. 1993). Em contraste, as células MCF10A com reduzida expressão de PHLDA1 apresentavam distinta razão núcleo/citoplasma, lamelipódios em maior frequência e extensão quando em subconfluência e contato célula-célula mais frouxo (Figura 11, painel superior). Quando em confluência, as células MCF10A shPHLDA1 eram semelhantes as células controle.

Figura 11. Fotomicrografias de contraste de fase mostrando as diferenças morfológicas das células em confluência (esquerda), subconfluência (meio) e detalhe em maior aumento (direita). As células controle (painel superior) e shPHLDA1 (painel inferior) apresentaram morfologia típica e indistinta quando em confluência; em subconfluência, as células com expressão reduzida de PHLDA1 apresentavam lamelipódios com mais frequência e maior extensão (setas pretas).

4.3.2 A redução da expressão de PHLDA1 aumenta a proliferação em células MCF10A

Os efeitos da desregulação de PHLDA1 na proliferação de células de mama já foram investigados em alguns estudos prévios. Interessantemente, estes estudos mostram efeitos distintos: Li et al (2014) e Johnson et al (Johnson et al. 2011) reportam que PHLDA1 regula negativamente a motilidade celular em células SKBR3 (Her2+) e em células MDA-MB-231 (Basal), respectivamente, tanto em condições normais quanto de baixa ancoragem. Oberst et al (2008) descrevem efeito semelhante apenas em condições de baixa ancoragem, não havendo alteração em condições normais de ancoragem (em células epiteliais de mama HME16C transformadas por superexpressão de Ras). Por outro lado, Kastrati et al (2014) relatam efeitos opostos em ambas as condições de cultivo em células MCF7 (ER+). Em nosso estudo investigamos se as células MCF10A eram capazes de manter a homeostase proliferativa após a supressão de PHLDA1 dado que os controles proliferativos desta linhagem apresentam-se funcionais, diferentemente das células tumorais (Brummer et al. 2006). Para isso, foi realizado um ensaio de proliferação utilizando o *CyQuant Proliferation Kit*, onde avaliamos alterações na proliferação celular em condições normais de ancoragem ao longo de 96 horas (4 dias). A redução de PHLDA1 foi capaz de aumentar

significativamente a proliferação em células MCF10A em comparação às células controle para ambos os clones (shPHLDA1 #1 e #2), ao longo de 96 horas (Figura 12).

Figura 12. Aumento da proliferação em células MCF10A após diminuição da expressão de PHLDA1. Proliferação aumentada para células shPHLDA1 em comparação ao controle, determinada por ensaio com CyQuant após 24, 48, 72 e 96 horas. (Esquerda) Células controle *versus* shPHLDA1 #1, $P < 0,01$. (Direita) Células controle *versus* shPHLDA1 #2, $P < 0,05$. Análise de ajuste de curva *curve fit* para regressão não linear.

Adicionalmente, testamos se em condições de baixa ancoragem a redução de PHLDA1 seria suficiente para provocar alterações na proliferação celular. Para isso, as células foram crescidas em placas de ultrabaixa adesão, em meio sem soro suplementado com B27 (GIBCO). Após nove dias em cultura, verificamos que a eficiência de formação de mamóferas foi baixa em ambas as linhagens (controle e shPHLDA1). O tamanho e número de mamóferas formadas não foram estatisticamente diferentes entre as linhagens. Todavia, notavelmente, as mamóferas formadas pelas células com expressão reduzida de PHLDA1 apresentavam um formato mais irregular em comparação às células controle (Figura 13).

Figura 13. Mamosferas formadas a partir de células MCF10A com expressão reduzida de PHLDA1 exibem formato mais irregular em comparação às células controle. (A) Fotomicrografias representativas das mamosferas formadas a partir de células MCF10A controle (acima) e shPHLDA1 (abaixo) crescidas em condições de baixa ancoragem, após 9 dias em cultura. (B) Acima, gráfico ilustrando o tamanho médio das mamosferas formadas e, abaixo, o número de mamosferas formadas a partir das células controle e shPHLDA1. Média $\pm$ erro padrão de três experimentos independentes (*ns*, teste t para amostras não pareadas).

Nos estudos do câncer de mama, a cultura tridimensional (3D), onde as células crescem aderidas à membrana basal, tem permitido a aproximação de diversas características do epitélio mamário, incluindo a formação de estruturas acinares, que apresentam lúmen, polarização ápico-basal das células, deposição de componentes da membrana basal e até mesmo a reprodução de epitélios glandulares mamários produtores de leite (Streuli et al. 1991; Petersen 1992; Inman & Bissell 2010). Grande parte destes e outros estudos em cultura 3D envolvendo células de mama não malignas fazem uso das células MCF10A, a qual fez parte da publicação inicial que descreve o uso de cultura tridimensional em mama (Petersen 1992).

Neste estudo, avaliamos também se a redução da expressão de PHLDA1 poderia alterar o crescimento das células MCF10A quando crescidas em cultura tridimensional. Células MCF10A shPHLDA1 e células controle foram crescidas em cultura tridimensional, embebidas em MatrigelTM e o crescimento das mamosferas formadas foi registrado ao longo de sete dias com auxílio do software AxioVision (Zeiss). As

mamosferas formadas a partir de células com expressão diminuída de PHLDA1 apresentaram tamanho maior em comparação às controle. O tamanho médio das mamosferas formadas pelas células controle foi de 45, 61 e 68 μm no terceiro, quinto e sétimo dias em cultura tridimensional, respectivamente. Nos mesmos períodos, o tamanho médio das mamosferas formadas pelas células shPHLDA1 foi de 43, 72 e 103 μm para o subclone #1 e de 52, 80 e 98 μm para o subclone #2 (Figura 14).

Estes achados corroboram com a regulação negativa de PHLDA1 na proliferação em células epiteliais de mama.

Figura 14. Mamosferas formadas pelas células MCF10A controle e com reduzida expressão de PHLDA1 em cultura tridimensional. (A) Micrografias representativas das mamosferas formadas ao longo de 3, 5 e 7 dias em cultura *on top* com Matrigel para as células controle (topo), células shPHLDA1 #1 (meio) e células shPHLDA1 #2 (abaixo). As imagens foram adquiridas com auxílio do software AxioVision (Zeiss). (B) Gráfico contendo o tamanho médio $\pm$ desvio padrão correspondente a um experimento de 8 replicatas.

4.3.4 A expressão reduzida de PHLDA1 aumenta a migração e invasão em células MCF10A

Em mama, a motilidade celular já foi avaliada após a superexpressão de PHLDA1 em células SKBR3 (Li et al. 2014) e em células MDA-MB-231 (Johnson et al. 2011). Nestas linhagens, o aumento da expressão de PHLDA1 foi relacionado com

regulação negativa da motilidade. Todavia, o efeito da *supressão* de PHLDA1 ainda não havia sido investigado na motilidade de células de mama. Para esta avaliação, utilizamos o ensaio de fechamento de ferida (*wound healing*) e imagens foram adquiridas no tempo inicial, 18 e 24 horas após a realização da ferida na monocamada. Decorridas 18 horas de experimento, as células com expressão reduzida de PHLDA1 (shPHLDA1 #1 e #2) já haviam recoberto grande parte da área da ferida enquanto as células controle exibiam pouca motilidade. Vinte e quatro horas após, a área da ferida apresentou-se quase completamente recoberta nas células com expressão diminuída de PHLDA1 enquanto as células controle ainda mantinham a maior parte da área exposta (Figura 15).

Figura 15. Diminuição da expressão de PHLDA1 aumenta a migração em células MCF10A. A redução de PHLDA1 aumenta significativamente a migração em células MCF10A, avaliada por ensaio de fechamento de ferida. À esquerda, fotomicrografias representativas das células controle versus shPHLDA1 #1 (acima) e controle versus shPHLDA1 #2 (abaixo). À direita, gráficos mostrando a porcentagem de fechamento da ferida após 18 e 24 horas entre células controle e shPHLDA1 #1 e #2. Dados representam a média $\pm$ erro padrão para três experimentos independentes ** $P < 0,01$; *** $p < 0,001$, teste ANOVA de duas vias com correção de Bonferroni.

A capacidade de migrar e invadir foi especificamente analisada através de ensaio *Transwell*. Este ensaio testa a capacidade das células em remodelar seus sítios de adesão célula-matriz extracelular e, seguindo um agente quimiotático, migrar através

da matriz, a qual precisa ser degradada por proteinases secretadas. As células controle, conforme esperado, exibiram ínfima capacidade invasiva (Figura 16). Interessantemente, a redução da expressão de PHLDA1 significativamente promoveu um comportamento invasivo nas células MCF10A, aumentando a invasão numa razão de 63 e 28 vezes nas células shPHLDA1 #1 e #2, respectivamente, em relação ao controle ($P < 0,01$).

Figura 16. Diminuição da expressão de PHLDA1 promove a invasão em células MCF10A. A invasividade das células MCF10A após redução da expressão de PHLDA1 foi avaliada por ensaio Transwell. À esquerda, fotomicrografias representativas das células invasivas (núcleos corados com DAPI) entre controle *versus* shPHLDA1 #1 (acima) e entre controle *versus* shPHLDA1 #2 (abaixo). À direita, gráficos com a média $\pm$ erro padrão para número de células invasivas em três experimentos independentes entre células controle e shPHLDA1. ** $P < 0,01$, teste t para amostras não pareadas.

4.3.5 A expressão reduzida de PHLDA1 aumenta a capacidade de células MCF10A em formar clones

A habilidade celular de proliferar indefinidamente mantendo, todavia, o potencial replicativo é definida como o potencial clonogênico de uma célula. Este potencial pode ser avaliado *in vitro*, através da semeadura das células em baixa densidade. Adicionalmente ao potencial de aderir e sobreviver nestas condições de estresse aumentado, as células são testadas por sua habilidade em manter a capacidade proliferativa e replicativa. Incrementos nessa capacidade podem muitas vezes estar relacionados com malignidade, potencial células tronco ou resistência à morte celular (Lorenzini & Maier 2016; Franken et al. 2006; Sarma et al. 2010).

A capacidade de formar colônias a partir de células individuais após a supressão

de PHLDA1 foi avaliada em células MCF10A. Após 8 dias de plaqueamento em baixa densidade, as células foram coradas com cristal violeta e colônias com 50 ou mais células foram contadas. Para as células shPHLDA1 #2, foi encontrado número de colônias significativamente maior em comparação as células controle (Figura 17). Resultados semelhantes foram encontrados para as células shPHLDA1 #1, todavia, a diferença não foi significativa.

Figura 17. A redução de PHLDA1 aumenta a capacidade de células MCF10A em formar colônias. (A) Imagens representativas a partir de placas de 6 poços mostrando colônias coradas com cristal violeta para as células MCF10A controle *versus* shPHLDA1 #1 (esquerda) e para as células controle *versus* shPHLDA1 #2 (direita). (B) Gráfico mostrando o número de colônias após 8 dias em cultura para controle e shPHLDA1 #2. Dados estão expressos como a média $\pm$ erro padrão para o número de colônias com mais de 50 células * $P < 0,05$ (teste t para amostras não pareadas).

De forma notável, as colônias formadas a partir das células com expressão reduzida de PHLDA1 exibiam coloração menos intensa em comparação com as células controle, fortemente marcadas. Quando observadas em maior aumento, as células das colônias controle apresentavam-se intensamente justapostas enquanto as colônias das células com reduzida expressão de PHLDA1 apresentavam uma disposição dispersa e pobre em contatos célula-célula (Figura 18).

Estes achados confirmam as modificações morfológicas observadas previamente a partir de contraste de fase (ver Figura 11).

Figura 18. Aspecto das colônias de células MCF10A controle e shPHLDA1 crescidas em ensaio clonogênico. Após marcação com cristal violeta, as colônias apresentaram intensidade distinta na coloração e o padrão de crescimento contrastante entre células controle (esquerda) e shPHLDA1 (direita). Detalhe, células em maior aumento.

4.3.5 Mudanças na distribuição dos filamentos de actina após redução da expressão de PHLDA1 em células MCF10A

Migração e invasão são capacidades que envolvem intensa reorganização nos filamentos de actina do citoesqueleto em conjunto com a formação de protusões da membrana, que são necessárias ao crescimento invasivo (Saarikangas et al. 2010). As alterações morfológicas ocorridas nas células shPHLDA1 (presença de lamelipódios maiores e frequentes, capacidade migratória intensificada e capacidade invasiva adquirida) eram sugestivas de possível reorganização nos filamentos de actina. Dessa forma, investigamos a distribuição da actina nas células através de imunofluorescência com anticorpo anti-actina e coloração com rodamina-faloidina. Quando observadas ao microscópio, com efeito, células shPHLDA1 apresentaram projeções da membrana intensamente coradas para actina, não observadas nas células controle (Figura 19).

Figura 19. Células MCF10A controle e shPHLDA1 apresentam distinto padrão de marcação de actina. Células MCF10A com expressão reduzida de PHLDA1 (painel inferior) apresentam projeções da membrana ricas em actina, não observadas nas células controle (painel superior). Fotomicrografias representativas de células imunocoradas com anticorpo anti-actina (verde) e núcleo contracorado com DAPI.

Adicionalmente, a marcação com rodamina-faloidina deu destaque ao padrão disperso de organização das células, em contraste às células controle, fortemente unidas e agrupadas (Figura 20).

Figura 20. Contraste na organização da actina entre células controle e células com expressão diminuída de PHLDA1. Marcação com rodamina-faloidina (vermelho) destaca o contraste entre a morfologia das células controle (painel esquerdo), firmemente justapostas, com as células shPHLDA1 (painel direito), células pouco justapostas; núcleos contracolorados com DAPI. Anti-actina, verde.

4.3.5 A expressão diminuída de PHLDA1 não altera a sensibilidade ao quimioterápico docetaxel

O envolvimento de PHLDA1 em processos de morte celular já foi descrito em uma série de estudos (Park et al. 1996; Neef et al. 2002; Hossain et al. 2003; Hayashida et al. 2006; Gomes et al. 1999). Nós investigamos se a redução da expressão de PHLDA1 é capaz de alterar a resposta de células MCF10A frente a um estímulo apoptótico. Para estímulo de morte, as células foram expostas à concentração de 2nM do quimioterápico docetaxel (TXT) por um período de 24 horas e a morte celular foi avaliada por citometria de fluxo através de marcação com Anexina V-FITC/Iodeto de propídio (PI). O docetaxel pertence à família dos taxanos e corresponde a um quimioterápico que interfere, entre outros processos, na divisão mitótica provocando a estabilização dos microtúbulos e, conseqüentemente, podendo desencadear a morte celular (Morse et al. 2005). A apoptose é o mecanismo de morte predominante que ocorre em resposta ao tratamento com esta droga (Wang et al. 1998) e seu uso é aprovado para o tratamento de câncer de mama, câncer de cabeça e pescoço, câncer gástrico, câncer de próstata e câncer de pulmão de não pequenas células (Pazdur 2014). Conforme esperado, o tratamento com TXT foi capaz de induzir a morte tanto nas

células MCF10A controle quanto nas células shPHLDA1 ($P < 0,05$) (Figura 21B). Todavia, células controle e shPHLDA1 tiveram resposta similar em resposta à droga (Figura 21C).

Figura 21. A redução de PHLDA1 em células MCF10A não mostrou diferença na sensibilidade ao quimioterápico docetaxel (2nM). (A) Análise quantitativa de células não marcadas (vivas, Anexina V-FITC-/PI-). (B) Tratamento com docetaxel induz a morte em células MCF10A após tratamento na concentração de 2nM por 24 horas. (C) Efeitos de docetaxel na indução de apoptose precoce (Anexina V+/PI-) e tardia (Anexina V+/PI+) mensuradas por citometria de fluxo. (D) Citograma típico obtido durante a aquisição dos dados para análise dos resultados de apoptose. Teste ANOVA de duas vias com correção de Bonferroni.

Conforme mencionado anteriormente, estudos pioneiros do nosso grupo mostraram PHLDA1 como um forte marcador de prognóstico no câncer de mama a partir de um estudo em uma coorte de cerca de setecentos pacientes (Nagai et al. 2007) e estudos subsequentes indicaram seu envolvimento na regulação de apoptose, autofagia e efeito inibitório do crescimento em diferentes linhagens celulares: células HME16C transformadas com Ras; células do subtipo basal-like, MDA-MB-231; células Her2+, SKBR3 e ER+, MCF7 (Oberst et al. 2008; Johnson et al. 2011; Moad et al. 2013; Li et

al. 2014). Todavia, PHLDA1 vem também sendo reportado como um marcador folicular de célula tronco em uma série de estudos (Ohyama et al. 2006; Sellheyer & Nelson 2011; Yeh et al. 2012; Sellheyer & Krahl 2011; Sellheyer et al. 2012; Battistella et al. 2014) e foi adicionalmente descrito possuindo funções oncogências em células MCF7 (Kastrati et al. 2014). Dessa forma, torna-se evidente a existência de um envolvimento de PHLDA1 no processo de tumorigênese da mama, embora sua exata função biológica e se a sua desregulação é capaz de promover a malignidade ou ocorre, por outro lado, como uma consequência de alterações já presentes nas células tumorais não havia ainda sido explorado.

Assim, neste trabalho buscamos investigar o papel funcional de PHLDA1 partindo do princípio de sua desregulação em um contexto mais próximo ao normal e de sua potencial ação como gene supressor de tumor, tentando observar exclusivamente se sua regulação negativa era capaz, por si só, de promover quaisquer alterações em células não tumorais. Para isso, fizemos uso da linhagem celular epitelial humana de mama, MCF10A, imortalizada espontaneamente em cultura mantendo controles do ciclo celular e apoptose intactos e controles de proliferação normais, incluindo inibição por contato (Tait et al. 1990; Starcevic et al. 2001; Singletary & Gapstur 2001; Yoon et al. 2002; Brummer et al. 2006).

Inicialmente, a expressão basal de PHLDA1 em diferentes linhagens de mama presentes em nosso laboratório, foi investigada a nível proteico e, a nível transcricional, a partir de um conjunto de 21 linhagens, com base no trabalho de Huang et al (2007). Buscamos subdividir as linhagens em função de seu subtipo molecular, já que a correlação da expressão de PHLDA1 em função do subtipo molecular de câncer de mama nunca foi avaliada anteriormente. Apesar do conjunto limitado de linhagens investigadas, nossos dados, mesmo preliminares, apontam para um possível padrão diferencial de expressão em função dos subtipos moleculares. Tais subtipos são definidos especialmente com base em três principais biomarcadores: os receptores de estrógeno (ER), de progesterona (PR) e receptor ERBB2 (Her2) (Perou et al. 2000; Curtis et al. 2012). Baixa expressão de PHLDA1 estava relacionada com tumores Luminais (A e B) em comparação aos demais subtipos. Tumores luminais são positivos para ER (ER+). Johnson et al (2011), embora não tenham feito uma análise da expressão de PHLDA1 em função dos subtipos moleculares, encontraram correlação negativa significativa da expressão de PHLDA1 em relação ao *status* para o receptor de estrógeno. Tumores dos subtipos luminais sabidamente possuem um prognóstico

melhor em comparação aos demais (Basais e Her2+). Ainda assim, uma parcela considerável de pacientes com tumores deste subtipo apresentam um curso clínico ruim da doença. Nagai et al (2007) e Kastrati et al (2014) encontraram que pacientes com tumores ER+ que apresentam negatividade para a expressão de PHLDA1 tem um pior curso clínico em comparação àquelas que possuem positividade para a expressão de PHLDA1. Interessantemente, os dados de nosso ensaio funcional mostram que a redução de PHLDA1 promove um comportamento mais proliferativo e invasivo nas células MCF10A. Do ponto de vista clínico, como a redução ou silenciamento da expressão de PHLDA1 nas pacientes com este fenótipo ocorre é ainda uma incógnita, embora seja possível que processos de metilação estejam envolvidos. Sabidamente, o estrógeno favorece a proliferação celular (Ewan et al. 2005; Russo & Russo 2006; Briskin & O'Malley 2010). Dessa maneira, ER+ e PHLDA1- poderiam estar agindo sinergicamente no desenvolvimento de um fenótipo altamente proliferativo, menos favorável no curso da doença. Assim, potencialmente, é possível que PHLDA1 possa ser de utilidade no refinamento da determinação do prognóstico de pacientes dos subtipos luminais, os quais englobam a grande maioria dos tumores de mama (Anderson et al. 2002). Adicionalmente, uma das características que distingue os tumores Luminais A de tumores Luminais B é a expressão de genes relacionados à proliferação celular, especialmente definidos pelo índice ki67. A proteína ki67 é um indicador de proliferação celular, sendo que tumores Luminais B são mais proliferativos (índice ki67 $\geq 14\%$) que os Luminais A (índice ki67 $< 14\%$) (Feeley et al. 2014). Assim, é possível que a expressão de PHLDA1 neste subtipo também tenha correlação com o prognóstico. Um novo subtipo molecular que vem sendo estabelecido ao longo dos últimos anos, *Claudin low*, embora negativo para ER, possui expressão moderada de genes de proliferação e de transição epitélio-mesênquima (Sabatier et al. 2014). É também um bom candidato para a investigação de correlação da expressão de PHLDA1 com a sobrevida em pacientes dentro deste subtipo. Todavia, estas suposições permanecem especulativas, abertas à comprovação. Análises que busquem a correlação entre os subtipos moleculares e a expressão e valor prognóstico de PHLDA1 estão em curso em nosso laboratório e certamente trarão luz à compreensão da importância de PHLDA1 em mama.

A linhagem SKBR3, do subtipo Her2+, não apresentou níveis detectáveis de PHLDA1 ao nível proteico e sua expressão transcricional apresentou-se diminuída em relação às demais linhagens celulares avaliadas pelo grupo de Huang et al (2007).

Todavia, este fato parece não corresponder à tendência de expressão para PHLDA1 dentre as linhagens tumorais Her2+. Além disso, Li et al (2014) encontraram correlação significativa entre a alta expressão de PHLDA1 e tumores Her2+ e identificaram PHLDA1 como negativamente regulado após a inibição da sinalização de ErbB2 em células SKBR3. De fato, parece que *PHLDA1* é um gene altamente regulado por Her2, fato que se supõe, adicionalmente, com base na observação da baixa expressão proteica de PHLDA1 na linhagem Hb4a (linhagem normal de mama) em comparação à sua derivada, C5.2, que foi transfectada para superexpressão de Her2, e exibe níveis de Her2 equivalentes à SKBR3 (Harris et al. 1999). Análises da sobrevivência de pacientes com câncer de mama do subtipo Her2+ em função da expressão de PHLDA1 ainda não foram realizadas.

Estudos de Johnson et al (2011) indicam a existência de um *loop* de regulação negativa entre PHLDA1 e Aurora A quinase (AURKA) em células MDA-MB-231. Fanale et al (2013) aponta que a hipóxia provoca a diminuição da expressão de AURKA em células MCF7 e que essa diminuição é mais intensa após 48 horas de exposição. Nós avaliamos a expressão de PHLDA1 e AURKA na linhagem MCF7 após exposição à hipóxia por tempos prolongados (48 e 72h). Similarmente, encontramos redução nos níveis proteicos de AURKA após estímulo hipóxico. A expressão relativizada da forma ativada de Aurora A (pAURKA) mostra um aumento na configuração ativada desta proteína. Todavia, esse aumento é pouco conclusivo dado que o aumento de aurora ativada se deu mais em função da diminuição de aurora A total do que especificamente em função do aumento nos níveis de Aurora A fosforilada. De qualquer maneira, alterações nos níveis de PHLDA1 não foram observadas, indicando a inexistência de *loop* de regulação entre estas proteínas nestas condições. Interessantemente, Johnson et al (2011) apontam que a regulação negativa de PHLDA1 se dá pela fosforilação de seu resíduo Ser-98. Todavia, os autores realizaram sua investigação em um modelo híbrido, envolvendo a linhagem MDA-MB-231 humana e a proteína PHLDA1 murina, a qual possui complementaridade parcial com a proteína humana e não possui o mesmo resíduo na posição 98.

Posteriormente, exploramos o papel funcional de PHLDA1 nas células MCF10A após a diminuição da expressão deste gene através de transfecção com shRNAs específicos para o transcrito de PHLDA1 por vetores plasmidiais. Nós demonstramos que a diminuição da expressão de PHLDA1 está relacionada com um fenótipo agressivo nas células MCF10A, induzindo alterações morfológicas, aumento na taxa proliferativa

e migratória e induzindo a aquisição de um fenótipo invasivo, em concordância com uma atividade supressora tumoral de PHLDA1. Adicionalmente, o crescimento em condições de baixa ancoragem resultou em mamóferas de formato irregular para as células com baixa expressão de PHLDA1 em comparação com as células controle e, em crescimento tridimensional *on top*, em Matrigel, as células com baixa expressão de PHLDA1 apresentaram mamóferas de tamanho maior comparadas às controle.

Observadas sob contraste de fase ao microscópio, as células com expressão reduzida de PHLDA1 apresentavam lamelipódios maiores e mais frequentes nas extremidades dos *clusters* de células, em subconfluência. Estas projeções são conhecidas por facilitar o movimento da célula e agem como extensões sensoriais do citoesqueleto (como revisado por Lamouille et al, 2014). Em ensaio clonogênico, as diferenças morfológicas entre células controle e células shPHLDA1 foram evidenciadas após a coloração com cristal violeta. Células controle mostraram-se intensamente coradas em enquanto as células com expressão diminuída de PHLDA1 exibiam coloração menos intensa. As células controle exibiam firme adesão célula-célula enquanto que as células com expressão diminuída de PHLDA1 apresentavam contato célula-célula visivelmente frouxo.

Estas alterações morfológicas e comportamentais encontradas nas células com expressão diminuída de PHLDA1 sugeriram um possível padrão distinto na distribuição de actina. De fato, quando investigamos o padrão de marcação desta proteína em microscópio de fluorescência, observamos invadopódios ricos em actina nas células com expressão diminuída de PHLDA1, não observados nas células controle. Dramática reorganização do citoesqueleto de actina é requerida para a migração, incluindo sua constante polimerização e depolimerização para a formação de focos de adesão célula-matrix extracelular, remodelamento do citoesqueleto de actina para extensão de filopódios e lamelipódios, contração de filamentos de actina-miosina promovendo a motilidade celular e finalmente depolimerização de filamentos e desadesão em focos anteriores (McLean et al. 2005). Os invadopódios são estruturas relacionadas com funções proteolíticas e degradação de matriz extracelular, facilitadores da invasão celular (Yilmaz & Christofori 2009). Estes achados estão em concordância com a aumentada atividade migratória e com a aquisição de propriedades invasivas nas células MCF10A que ocorreram após redução da expressão de PHLDA1.

Hossain et al (2003) reportaram alterações morfológicas em células vasculares endoteliais (HAEC) após a superexpressão de PHLDA1. Eles encontraram

colocalização de PHLDA1 com FAK, uma proteína que regula diversas funções celulares, incluindo adesões focais e migração celular (Zhao & Guan 2009). Nas células HAEC, após superexpressão de PHLDA1, ocorreu diminuição da adesão celular e morte celular programada mediada pela perda de ancoragem (*anoikis*) além de desorganização no citoesqueleto de actina. Os autores reportam que as alterações morfológicas induzidas pela expressão aumentada de PHLDA1 ocorreram independentemente da ativação de caspase, precedendo a ativação de *anoikis*. Eles mostram que a superexpressão de PHLDA1 desorganiza a montagem dos complexos de adesão focal interrompendo a sinalização de sobrevivência entre célula e matriz extracelular, levando a célula consequentemente a morte por perda de adesão. Interessantemente, as linhagens celulares utilizadas no estudo de Hossain et al (2003) eram também modelos de células não tumorais, o que permite inferir a função de PHLDA1 de forma mais fidedigna.

Dessa maneira, parece razoável crer que PHLDA1 esteja envolvido diretamente com a regulação do citoesqueleto de actina e que o balanço nos níveis de expressão de PHLDA1 é necessário para a manutenção da homeostase celular. Aumento na sua expressão parece estar associado com morte celular e diminuição da motilidade celular, como já reportado anteriormente (Johnson et al. 2011; Li et al. 2014). Estes estudos não investigaram alterações no citoesqueleto de actina, mas é provável que a regulação de motilidade reportada nestes estudos esteja também relacionada com tal tipo de alteração estrutural.

Notavelmente, várias proteínas estruturais e proteínas que regulam o citoesqueleto contêm domínios PHL (Lemmon et al. 2002). Estes domínios são conhecidos por interagir com fosfoinositóis (como revisto por Scheffzek et al, 2012), moléculas que desempenham função na migração dependente de lamelipódios através do controle da dinâmica de organização dos filamentos de actina na membrana plasmática e da regulação da direção do movimento celular durante a quimiotaxia (Saarikangas et al. 2010). A possível relação de PHLDA1 com fosfoinositóis envolvidos na regulação do citoesqueleto parece, dessa forma, promissora, entretanto, como tal regulação possa ocorrer, bem como quais os possíveis candidatos à esta interação, permanece por ser examinada.

Em resumo, nossos resultados mostram evidência de que a diminuição da expressão de PHLDA1 em células epiteliais normais de mama esta relacionada com alterações morfológicas e comportamentais das células. A relação de PHLDA1 com a organização de filamentos de actina na membrana plasmática não havia sido reportada

anteriormente em células de mama. Adicionalmente, está é também a primeira evidência indicativa de que a redução nos níveis de PHLDA1 é capaz de induzir a invasão em células normais de mama.

5. CONCLUSÕES

A redução da expressão de PHLDA1 promove aumento das capacidades migratória e proliferativa em células MCF10A, induz comportamento invasivo, e causa alterações morfológicas nestas células, especificamente, interações célula-célula de caráter mais frouxo em comparação as células controle e reorganização do citoesqueleto de actina. Estes achados em células normais de mama indicam um possível papel de PHLDA1 como supressor em um contexto tumoral.

6. REFERÊNCIAS

- Allinen, M. et al., 2004. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer cell*, 6(July), pp.17–32.
- American Cancer Society, 2007. Cancer Facts & Figures. *Atlanta*.
- Anderson, W.F. et al., 2002. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast Cancer Research and Treatment*, 76(1), pp.27–36.
- Andre, F. & Puztai, L., 2006. Molecular classification of breast cancer: implications for selection of adjuvant chemotherapy. *Nature clinical practice. Oncology*, 3(11), pp.621–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17080180> [Accessed January 21, 2013].
- Ballard, O. & Morrow, A.L., 2013. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric clinics of North America*, 60(1), pp.49–74. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3586783&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 1, 2015].
- Basseri, S. et al., 2013. Loss of TDAG51 results in mature-onset obesity, hepatic steatosis, and insulin resistance by regulating lipogenesis. *Diabetes*, 62(1), pp.158–69. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3526025&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 1, 2015].
- Battistella, M., Peltre, B. & Cribier, B., 2014. PHLDA1, a follicular stem cell marker, differentiates clear-cell/granular-cell trichoblastoma and clear-cell/granular cell basal cell carcinoma: a case-control study, with first description of granular-cell trichoblastoma. *The American Journal of dermatopathology*, 36(8), pp.643–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23719479>.
- Beckmann, M.W. et al., 1997. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 75(6), pp.429–39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9231883>.
- Bray, F.F.J.S.I.E.M.D.R.E.S.M.C.R.M.P.D.F.D., 2013. GLOBOCAN 2012 cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancerbase No. 11. *Lyon, France*:

- International Agency for Research on Cancer*, 1.0. Available at:
<http://globocan.iarc.fr>.
- Briskin, C. & O'Malley, B., 2010. Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(12), p.a003178. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2982168&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 13, 2014].
- Brummer, T. et al., 2006. Functional analysis of the regulatory requirements of B-Raf and the B-Raf V600E oncoprotein. *Oncogene*, 25(May 2006), pp.6262–6276.
- Butland, S.L. et al., 2007. CAG-encoded polyglutamine length polymorphism in the human genome. *BMC genomics*, 8, p.126. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1896166&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 31, 2014].
- Cancer Research UK, 2016. Worldwide cancer incidence statistics. Available at:
<http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer/incidence#heading-Two>.
- Chiu, S.-T., 2005. Clinicopathologic Correlation of Up-regulated Genes Identified Using cDNA Microarray and Real-time Reverse Transcription-PCR in Human Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 14(2), pp.437–443. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15734970>.
- Cianfrocca, M. & Goldstein, L.J., 2004. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *The oncologist*, 9(6), pp.606–16. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15561805> [Accessed December 16, 2014].
- Coutinho-Camillo, C.M. et al., 2013. Expression of PAR-4 and PHLDA1 is prognostic for overall and disease-free survival in oral squamous cell carcinomas. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 463(1), pp.31–9. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23748915> [Accessed January 1, 2015].
- Curtis, C. et al., 2012. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 486(7403), pp.346–52. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3440846&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 13, 2014].
- Danaei, G. et al., 2005. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*, 366(9499), pp.1784–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16298215>.
- Debnath, J., Muthuswamy, S.K. & Brugge, J.S., 2003. Morphogenesis and oncogenesis

- of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods*, 30(3), pp.256–268. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104620230300032X> [Accessed November 6, 2012].
- Dolberg, D.S. et al., 1985. Wounding and its role in RSV-mediated tumor formation. *Science (New York, N.Y.)*, 230(4726), pp.676–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2996144> [Accessed January 5, 2015].
- Ellsworth, R.E. et al., 2010. Breast cancer in the personal genomics era. *Current genomics*, 11(3), pp.146–61. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2878980&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ewan, K.B.R. et al., 2005. Proliferation of Estrogen Receptor- α -Positive Mammary Epithelial Cells Is Restrained by Transforming Growth Factor- β 1 in Adult Mice. , 167(2), pp.409–417.
- Ewertz, M. & Jensen, A.B., 2011. Late effects of breast cancer treatment and potentials for rehabilitation. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 50(2), pp.187–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21231780> [Accessed December 26, 2014].
- Fanale, D. et al., 2013. HIF-1 is involved in the negative regulation of AURKA expression in breast cancer cell lines under hypoxic conditions. *Breast Cancer Research and Treatment*, pp.1–13.
- Feeley, L.P. et al., 2014. Distinguishing luminal breast cancer subtypes by Ki67, progesterone receptor or TP53 status provides prognostic information. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 27(4), pp.554–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24051696>.
- Ford, D. et al., 1998. Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families. *The American Journal of Human Genetics*, 62(3), pp.676–689. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707638488>.
- Frank, D. et al., 1999. A novel pleckstrin homology-related gene family defined by Ipl / Tssc3 , TDAG51, and Tih1: tissue-specific expression, chromosomal location, and parental imprinting. , 1159, pp.1150–1159.

- Franken, N.A.P. et al., 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), pp.2315–2319. Available at:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nprot.2006.339>.
- Fu, J. & Jeffrey, S.S., 2007. Transcriptomic signatures in breast cancer. *Molecular bioSystems*, 3(7), pp.466–72. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17579771> [Accessed January 4, 2015].
- Gomes, I. et al., 1999. A proline- and glutamine-rich protein promotes apoptosis in neuronal cells. *Journal of neurochemistry*, 73(2), pp.612–22. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10428057>.
- Gown, A.M., 2009. Molecular vs. Immunohistochemical Classification of Breast Cancer. *CONNECTION*, (2), pp.28–30.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>.
- Harris, R. a. et al., 1999. New model of erbB-2 over-expression in human mammary luminal epithelial cells. *International Journal of Cancer*, 80(August 1998), pp.477–484.
- Hayashida, N. et al., 2006. A novel HSF1-mediated death pathway that is suppressed by heat shock proteins. *The EMBO journal*, 25(20), pp.4773–83. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1618102&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 3, 2013].
- Hossain, G.S. et al., 2003. TDAG51 is induced by homocysteine, promotes detachment-mediated programmed cell death, and contributes to the development of atherosclerosis in hyperhomocysteinemia. *The Journal of biological chemistry*, 278(32), pp.30317–27. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12738777> [Accessed January 15, 2013].
- Hu, Z. et al., 2006. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC genomics*, 7, p.96. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1468408&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2014].
- Huang, F. et al., 2007. Identification of candidate molecular markers predicting sensitivity in solid tumors to dasatinib: rationale for patient selection. *Cancer research*, 67(5), pp.2226–38. Available at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-06-3633>.

- INCA - Ministério da Saúde, 2016. Atlas On-line de Mortalidade. Available at:
<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>.
- INCA - Ministério da Saúde, 2012. PERFIL DA MORBIMORTALIDADE BRASILEIRA DO CÂNCER DA MAMA. *Informativo quadrimestral do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA)*., 2.
- Inman, J.L. & Bissell, M.J., 2010. Apical polarity in three-dimensional culture systems: where to now? *Journal of biology*, 9(1), p.2. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2871524&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva, 2016. *INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016*, Available at:
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>.
- Jemal, A. et al., 2008. Cancer statistics, 2008. *CA: a cancer journal for clinicians*, 58(2), pp.71–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18287387> [Accessed July 17, 2014].
- Johnson, E.O. et al., 2011. PHLDA1 is a crucial negative regulator and effector of Aurora A kinase in breast cancer. *Journal of cell science*, 124(Pt 16), pp.2711–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21807936> [Accessed January 14, 2013].
- Joo, J.H. et al., 2007. Farnesol-induced apoptosis in human lung carcinoma cells is coupled to the endoplasmic reticulum stress response. *Cancer research*, 67(16), pp.7929–7936.
- Kastrati, I., Canestrari, E. & Frasor, J., 2014. PHLDA1 expression is controlled by an estrogen receptor-NFκB-miR-181 regulatory loop and is essential for formation of ER+ mammospheres. *Oncogene*, (April), pp.1–8. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24954507> [Accessed January 1, 2015].
- Kennecke, H. et al., 2010. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(20), pp.3271–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498394> [Accessed November 18, 2014].
- Kluttig, A. & Schmidt-Pokrzywniak, A., 2009. Established and Suspected Risk Factors in Breast Cancer Aetiology. *Breast care (Basel, Switzerland)*, 4(2), pp.82–87. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2931065&tool=pmcent>

- rez&rendertype=abstract [Accessed January 21, 2013].
- Koifman, E. de A. e S., 2002. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. , 48(1).
- Kuske, M.D. & Johnson, J.P., 2000. Assignment of the human PHLDA1 gene to chromosome 12q15 by radiation hybrid mapping. *Cytogenetics and cell genetics*, 89(1–2), p.1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10894922>.
- Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R., 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *National Review Molecular Cell Biology*, 15(3), pp.178–196.
- Larsen, M.J. et al., 2014. Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics. *Breast cancer : basic and clinical research*, 8, pp.145–55. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4213954&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 22, 2014].
- Lemmon, M.A., Ferguson, K.M. & Abrams, C.S., 2002. Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. *FEBS letters*, 513(1), pp.71–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11911883> [Accessed January 4, 2015].
- Lew, J.Q. et al., 2009. Alcohol and risk of breast cancer by histologic type and hormone receptor status in postmenopausal women: the NIH-AARP Diet and Health Study. *American journal of epidemiology*, 170(3), pp.308–17. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2727171&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 21, 2013].
- Lewis, G.D. et al., 1996. Growth Regulation of Human Breast and Ovarian Tumor Cells by Heregulin : Evidence for the Requirement of ErbB2 as a Critical Component in Mediating Heregulin Responsiveness.
- Li, G. et al., 2014. Modulation of ErbB2 blockade in ErbB2-positive cancers: the role of ErbB2 Mutations and PHLDA1. *PloS one*, 9(9), p.e106349. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4169529&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 1, 2015].
- Lorenzini, A. & Maier, A.B., 2016. Influence of Donor Age and Species Longevity on Replicative Cellular Senescence. In pp. 49–70. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-26239-0_4.
- Maffini, M. V et al., 2004. The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis. *Journal of cell science*, 117(Pt 8), pp.1495–502. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14996910> [Accessed January 5, 2015].
- Marchiori, a C., Casolari, D. a & Nagai, M. a, 2008. Transcriptional up-regulation of PHLDA1 by 17beta-estradiol in MCF-7 breast cancer cells. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*, 41(7), pp.579–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18641796>.
- Masciari, S. et al., 2013. Mutations : a Li Fraumeni Syndrome Consortium Effort. , 133(3), pp.1125–1130.
- McLean, G.W. et al., 2005. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nature reviews. Cancer*, 5(7), pp.505–515.
- Mcpherson, K., Steel, C.M. & Dixon, J.M., 2000. Breast cancer — epidemiology , risk factors , and genetics. , 321(September).
- Moad, A.I.H. et al., 2013. Rapamycin induces apoptosis when autophagy is inhibited in T-47D mammary cells and both processes are regulated by Phlda1. *Cell biochemistry and biophysics*, 66(3), pp.567–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23300026> [Accessed December 11, 2014].
- Morse, D.L. et al., 2005. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 4(10), pp.1495–1504.
- Nagai, M., 2016. Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 (PHLDA1) and cancer (Review). *Biomedical Reports*, 1, pp.275–281. Available at: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/br.2016.580>.
- Nagai, M.A. et al., 2003. Differentially expressed genes and estrogen receptor status in breast cancer. *International journal of oncology*, 23(5), pp.1425–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14532986> [Accessed December 31, 2014].
- Nagai, M.A. et al., 2007. Down-regulation of PHLDA1 gene expression is associated with breast cancer progression. *Breast Cancer Research and Treatment*, 106(1), pp.49–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17211533> [Accessed January 15, 2013].
- Nagai, M.A., 2012. *Encyclopedia of Signaling Molecules* S. Choi, ed., New York, NY: Springer New York. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-4419-0461-4> [Accessed January 4, 2015].
- Neef, R. et al., 2002. Identification of the human PHLDA1/TDAG51 gene: down-regulation in metastatic melanoma contributes to apoptosis resistance and growth

- deregulation. *Cancer research*, 62(20), pp.5920–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384558>.
- Oberg, H.-H. et al., 2004. Regulation of T-cell death-associated gene 51 (TDAG51) expression in human T-cells. *Cell death and differentiation*, 11(6), pp.674–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15002043> [Accessed January 15, 2013].
- Oberst, M.D. et al., 2008. TDAG51 is an ERK signaling target that opposes ERK-mediated HME16C mammary epithelial cell transformation. *BMC cancer*, 8, p.189. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2474852&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 21, 2012].
- Ohyama, M. et al., 2006. Characterization and isolation of stem cell – enriched human hair follicle bulge cells. , 116(1).
- Oldenburg, R. a et al., 2007. Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? *Critical reviews in oncology/hematology*, 63(2), pp.125–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17498966> [Accessed December 28, 2014].
- Paguirigan, A. et al., 2006. Mammary stem and progenitor cells: tumour precursors? *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 42(9), pp.1225–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16697180> [Accessed December 13, 2014].
- Park, C.G. et al., 1996. A novel gene product that couples TCR signaling to Fas(CD95) expression in activation-induced cell death. *Immunity*, 4(6), pp.583–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8673705>.
- Pauley, R.J. et al., 1993. The MCF10 family of spontaneously immortalized human breast epithelial cell lines: models of neoplastic progression. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 2 Suppl 3, pp.67–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7507749>.
- Pazdur, R., 2014. FDA Approval for Docetaxel. *National Cancer Institute - Division of Oncology Drug Products*. Available at: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-docetaxel>.
- Peaker, M., 2002. The Mammary Gland in Mammalian Evolution : A Brief Commentary on Some of the Concepts. , 7(3).

- Perou, C.M. et al., 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), pp.747–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23000897> [Accessed September 23, 2014].
- Petersen, O.W., 1992. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(19).
- Peto, J. & Mack, T.M., 2000. High constant incidence in twins and other relatives of women with breast cancer. , 26(december), pp.411–414.
- Prat, A. et al., 2010. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, 12(5), p.R68. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3096954&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Rho, J., Gong, S. & Kim, N., 2001. TDAG51 Is Not Essential for Fas / CD95 Regulation and Apoptosis In Vivo. , 21(24), pp.8365–8370.
- Rhodes, A. et al., 2000. Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice : interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. , pp.125–130.
- Riegert-Johnson, D.L. et al., 2010. Cancer and Lhermitte-Duclos disease are common in Cowden syndrome patients. *Hereditary cancer in clinical practice*, 8(1), p.6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2904729&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Russo, J. et al., 2005. Breast Differentiation and Its Implication in Cancer Prevention. , 11, pp.931–937.
- Russo, J. et al., 2001. Cancer Risk Related to Mammary Gland Structure and Development. , 223(July 2000), pp.204–223.
- Russo, J. et al., 1996. Molecular basis of human breast epithelial cell transformation. In F. Calvo, M. Crepin, & H. Magdelenat, eds. *Breast Cancer Advances in Biology and Therapeutics*. Paris: JOHN LIBBEY EUROTTEXT, pp. 33–43.
- Russo, J., 2014. *Techniques and Methodological Approaches in Breast Cancer Research*, Available at: <https://books.google.com/books?id=oHceBAAAQBAJ&pgis=1>.
- Russo, J. & Russo, I.H., 2004. *Molecular Basis of Breast Cancer* 1st ed.

- Intergovernmental Panel on Climate Change, ed., Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Available at:
<http://ebooks.cambridge.org/ref/id/CBO9781107415324A009>.
- Russo, J. & Russo, I.H., 2006. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 102(1–5), pp.89–96. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1832080&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 4, 2015].
- Saarikangas, J., Zhao, H. & Lappalainen, P., 2010. Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiological reviews*, 90, pp.259–289.
- Sabatier, R. et al., 2014. Claudin-low breast cancers: clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. *Molecular cancer*, 13, p.228. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4197217&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 30, 2014].
- Sarma, N.J., Takeda, A. & Yaseen, N.R., 2010. Colony Forming Cell (CFC) Assay for Human Hematopoietic Cells. *Journal of Visualized Experiments*, (46). Available at: <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=2195>.
- Scheffzek, K. & Welte, S., 2012. Pleckstrin homology (PH) like domains - versatile modules in protein-protein interaction platforms. *FEBS letters*, 586(17), pp.2662–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22728242> [Accessed December 12, 2014].
- Sellheyer, K. & Krahl, D., 2011. PHLDA1 (TDAG51) is a follicular stem cell marker and differentiates between morphoeic basal cell carcinoma and desmoplastic trichoepithelioma. *The British journal of dermatology*, 164(1), pp.141–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20846311> [Accessed December 13, 2012].
- Sellheyer, K. & Nelson, P., 2011. Follicular stem cell marker PHLDA1 (TDAG51) is superior to cytokeratin-20 in differentiating between trichoepithelioma and basal cell carcinoma in small biopsy specimens. *Journal of cutaneous pathology*, 38(7), pp.542–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21352265> [Accessed January 21, 2013].
- Sellheyer, K., Nelson, P. & Kutzner, H., 2012. Fibroepithelioma of Pinkus is a true basal cell carcinoma developing in association with a newly identified tumour-

- specific type of epidermal hyperplasia. *The British journal of dermatology*, 166(1), pp.88–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21910710> [Accessed January 21, 2013].
- Shao, J. & Diamond, M.I., 2007. Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Human molecular genetics*, 16 Spec No(2), pp.R115-23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17911155> [Accessed December 31, 2014].
- Singletary, K.W. & Gapstur, S.M., 2001. Alcohol and Breast Cancer. , 286(17), pp.2143–2151.
- Sørli, T. et al., 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), pp.10869–74. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=58566&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sørli, T. et al., 2003. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. , 100(14), pp.8418–8423.
- Sotiriou, C. et al., 2003. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18), pp.10393–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=193572&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sotiriou, C. & Pusztai, L., 2009. Gene-expression signatures in breast cancer. *The New England journal of medicine*, 360(8), pp.790–800. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19228622>.
- Soule, H.D. et al., 1990. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Research*, 50(18), pp.6075–86.
- Starcevic, S.L., Elferink, C. & Novak, R.F., 2001. Progressive resistance to apoptosis in a cell lineage model of human proliferative breast disease. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(10), pp.776–82. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11353788.
- Streuli, C.H. et al., 1991. Control of Mammary Epithelial Differentiation : Basement Membrane Induces Tissue-specific Gene Expression in the Absence of Cell-Cell

- Interaction and Morphological Polarity. , 115(5).
- Tait, L., Soule, H.D. & Russo, J., 1990. Ultrastructural and immunocytochemical characterization of an immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res*, 50(18), pp.6087–6094.
- Tavares, T.S. et al., 2008. Gene microarray analysis of human renal cell carcinoma: The effects of HDAC inhibition and retinoid treatment. *Cancer Biology and Therapy*, 7(10), pp.1607–1618.
- The Cancer Genome Atlas Network, 2012. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), pp.61–70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3465532&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 14, 2014].
- Tlsty, T.D. et al., 2004. Genetic and epigenetic changes in mammary epithelial cells may mimic early events in carcinogenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 9(3), pp.263–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15557799>.
- Toyoshima, Y. et al., 2004. TDAG51 mediates the effects of insulin-like growth factor I (IGF-I) on cell survival. *The Journal of biological chemistry*, 279(24), pp.25898–904. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15037619> [Accessed January 15, 2013].
- Wang, R. et al., 1998. Protein kinase C regulates Fas (CD95/APO-1) expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(5), pp.2201–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9725212>.
- Watson, C.J. & Khaled, W.T., 2008. Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development (Cambridge, England)*, 135(6), pp.995–1003. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18296651> [Accessed November 19, 2012].
- Weigelt, B., Peterse, J.L. & van 't Veer, L.J., 2005. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature reviews. Cancer*, 5(8), pp.591–602. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16056258> [Accessed November 3, 2012].
- WHO, 2013. Latest world cancer statistics Global cancer burden rises to 14 . 1 million new cases in 2012 : Marked increase in breast cancers must be addressed. , (December), pp.2012–2014.
- Williamson, M.P., 1994. The structure and function of proline-rich regions in proteins. , 260, pp.249–260.

- Wiseman, B.S. & Werb, Z., 2002. Stromal Effects on Mammary Gland Development and Breast Cancer. , 296(May), pp.1046–1050.
- Xu, Q. et al., 2010. Bacterial pleckstrin homology domains: a prokaryotic origin for the PH domain. *Journal of molecular biology*, 396(1), pp.31–46. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2817789&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 31, 2014].
- Yeh, I., McCalmont, T.H. & Leboit, P.E., 2012. Differential expression of PHLDA1 (TDAG51) in basal cell carcinoma and trichoepithelioma. *British Journal of Dermatology*, 167(5), pp.1106–1110.
- Yilmaz, M. & Christofori, G., 2009. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1–2), pp.15–33.
- Yoon, D.-S. et al., 2002. Variable Levels of Chromosomal Instability and Mitotic Spindle Checkpoint Defects in Breast Cancer. *The American Journal of Pathology*, 161(2), pp.391–397. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64194-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64194-6).
- Zhao, J. & Guan, J.-L., 2009. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer metastasis reviews*, 28(1–2), pp.35–49.