UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

LOURIVAL ANTUNES DE OLIVEIRA FILHO

**Papel da expressão celular e extracelular do *Par-4* na formação tumoral e
sensibilidade a droga**

São Paulo

2017

LOURIVAL ANTUNES DE OLIVEIRA FILHO

**Papel da expressão celular e extracelular do *Par-4* na formação tumoral e
sensibilidade a droga**

Versão Corrigida

A versão original se encontra disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o
Programa quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Tese apresentado 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

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira Filho, Lourival Antunes de

Papel da expressão celular e extracelular do *Par-4* na formação tumoral e sensibilidade a droga / Lourival Antunes de Oliveira Filho. -- São Paulo, 2017.

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

Orientadora: Maria Aparecida Nagai.

Descritores: 1.Par-4 2.Genes supressores de tumor 3.Neoplasias da mama
4.Apoptose 5.Biomarcadores

USP/FM/DBD-122/17

AGRADECIMENTOS

À **Profa Dra Maria Aparecida Nagai**, pela oportunidade, orientação e inúmeros ensinamentos que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

A todo grupo do Laboratório de Genética Molecular, **Carol, Flávia, Maira, Maria, Monica, Renan, Simone**. Obrigado por todo apoio, conhecimento compartilhado e pelos momentos de muitas risadas.

Obrigado **Simone e Flávia**, por toda a disposição e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho. E claro, por sempre encontrarem coisas no laboratório que estão na nossa frente, mas que somente mães conseguem enxergar.

Obrigado **Carol**, por todos os seus “Bom dia” repletos de muito bom humor pela manhã (sqn), pela amizade, por toda a ajuda nos experimentos e contribuição para a conclusão deste trabalho.

Gracias **Maria**, em primeiro lugar pelos alfajores! Pelas quase eternas visitas ao biotério, pelas discussões, ensinamentos e correções. Acho que a Argentina ganhou alguns pontos no meu conceito, mas ainda sou BRASIL!

Obrigado **Renan**, por que finalmente foi possível conversar sobre futebol com alguém nesse laboratório.

Aos amigos que não estão mais no laboratório: **Natália**, obrigado por toda a amizade, alegria e pelos incontáveis convites para tomar café. **Naieli**, obrigado pela amizade e o companheirismo de todos esses anos. Muitas discussões científicas, filosóficas, e sem falar em nossas longas críticas sobre filmes e seriados.

À minha amada esposa, **Laís**. Obrigado pelo seu amor, por sua paciência, carinho e encorajamento. Por ser o meu apoio nos dias difíceis e por ser a melhor parte do meu dia. Obrigado por me deixar fazer parte da sua vida e tornar o meu mundo mais colorido! Amo você!

Aos meus pais, **Lourival e Lidia**, vocês são os maiores professores que a vida me deu e são a minha inspiração. Obrigado por todo incentivo, cuidado e amor que me deram. Amo vocês!

Aos meus irmãos, **Rafael e Sophia, Cristina e Anderson e Delma e Lucas**. Obrigado por todo apoio e amor que vocês representam em minha vida. O maior presente que Deus me deu foi poder chamar vocês de irmãos! Amo vocês!

À **Tia Denise**, por tornar sua casa a minha casa. Por todo cuidado, preocupação e amor que me deu. Amo você!

Aos queridos **Arvid Samuel, Nvka, Jenifer e Erik**, por se tornarem uma extensão da minha casa em São Paulo e por sempre me receberem com muito amor e carinho. Amo vocês!

A toda minha **família e amigos**, que sempre me apoiaram e me incentivaram durante todos esses anos.

A todos os **professores e funcionários** do Centro de Investigação Translacional em Oncologia e do departamento de Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Em especial, a uma geração de **alunos** comprometidos com a ciência e que fizeram coisas incríveis durante todos esses anos. Gostaria de escrever o nome todos aqui, porém, o medo de esquecer alguém alinhado à gigantesca preguiça do momento me impedem de fazer tal coisa. Entretanto, sei que se você fez parte dessa geração, você sabe que seu nome está nesse agradecimento. Muito obrigado!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pelo apoio financeiro concedido no período de execução do projeto. Processo FAPESP 2013/08110-0.

“Porém, uma coisa eu faço: esqueço aquilo
que fica para trás e avanço para o que está
na minha frente. ”

Filipenses 3:13

RESUMO

Oliveira Filho LA. Papel da expressão celular e extracelular do *Par-4* na formação tumoral e sensibilidade a droga [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

O câncer de mama é o tumor mais incidente e a principal causa de mortalidade entre as mulheres no mundo. Não diferente de tantos outros tipos tumorais, o câncer de mama carrega em sua história uma etiologia complexa, heterogênea e multifatorial. O gene pró-apoptótico PAWR (*PKC apoptosis Wt1 regulator*; também denominado como PAR-4, *Prostate Apoptosis Response-4*) é conhecido por induzir seletivamente apoptose em uma grande variedade de células de câncer. O papel de Par-4 como supressor tumoral vem sendo bem estabelecido nos últimos anos. Entretanto, pouco tem sido explorado sobre o papel e os mecanismos envolvendo a função supressora de Par-4 em câncer de mama. Em estudos prévios do nosso grupo, foi possível demonstrar que a expressão reduzida de Par-4 está associada a um pior prognóstico em câncer de mama e que esta proteína pode ter um papel importante na morfogênese da glândula mamária. Além disso, a investigação em células MCF-7 demonstrou que a expressão de Par-4 aumenta a sensibilidade das células ao tratamento com docetaxel. Com objetivo de entender melhor o papel de Par-4 em células tumorais de mama, nós investigamos o efeito da supressão de Par-4 nas células MDA-MB-231 *in vitro* e *in vivo*. A redução da expressão foi alcançada a partir de transfecção das células com vetores plasmidiais contendo shRNAs específicos para o transcrito de Par-4 e subsequentemente foram realizados ensaios funcionais. A expressão reduzida de Par-4 foi capaz de aumentar a capacidade de formação de colônias das células MDA-MB-231 em cultura. Além disso, as células MDA-MB-231 transfectadas com shRNA-Par-4 tiveram uma redução significativa da morte celular (fase sub-G0/G1 do ciclo celular), em particular da morte por apoptose (Anexina-FITC/PI), após o tratamento com diferentes quimioterápicos. Em nosso estudo, as células MDA-MB-231-Controle tratadas com docetaxel apresentaram aumento nos níveis de Par-4 secretado, o que não foi observado nas células MDA-MB-231-shPar-4. Finalmente, nossos resultados *in vivo* sugerem que a expressão diminuída de Par-4 pode modular o crescimento tumoral em camundongos Balb/c NUDE. Em conjunto, nossos dados colaboram com o papel supressor de Par-4 já descrito na literatura e confirmam sua ação supressora em diferentes linhagens de

câncer de mama. Descritores: par-4; genes supressores de tumor; neoplasias da mama; apoptose; biomarcadores

ABSTRACT

Oliveira Filho LA. Role of cellular and extra-cellular Par-4 expression in tumor formation and drug sensitivity [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Breast cancer is the most incident tumor and the leading cause of mortality among women worldwide. Like other forms of cancer, breast cancer has a complex, heterogeneous and multifactorial etiology. The pro-apoptotic gene PAWR (PKC apoptosis WT1 regulator; also known as PAR-4, Prostate Apoptosis Response-4) is known to selectively induce apoptosis in a wide variety of cancer cells. The role of Par-4 as a tumor suppressor has been well established in recent years. However, little has been explored about the role and mechanisms of Par-4 suppressor function in breast cancer. Previous work from our research group demonstrated that the reduced expression of Par-4 is associated with a worse prognosis in breast cancer. Also an important role of Par-4 in the morphogenesis of the mammary gland was suggested. In addition, Par-4 overexpression in MCF-7 cells increased the sensitivity to docetaxel treatment. In order to better understand the role of Par-4 in breast tumor cells, we investigated the effect of Par-4 knock-down on MDA-MB-231 cells *in vitro* and *in vivo*. We performed shRNA-mediated Par-4 knockdown, and then carried out functional assays. The reduced expression of Par-4 was able to increase the colony formation capacity of MDA-MB-231 cells in culture. In addition, shRNA-Par-4 transfection in MDA-MB-231 cells led to a significant reduction of cell death (sub-G0/G1 cell cycle), particularly by apoptosis (Annexin-FITC/PI), after treatment with different chemotherapeutic agents. In our study, docetaxel-treated MDA-MB-231-Control cells showed increased levels of secreted Par-4, which was not observed in MDA-MB-231-shPar-4 cells. Finally, our *in vivo* results suggest that diminished Par-4 expression may modulate tumor growth in Balb/c NUDE mice. Taken together, our data support the suppressor role of Par-4 already described in the literature and confirm its suppressive action in different breast cancer cell lines.

Descriptors: par-4; genes, tumor suppressor; breast neoplasms; apoptosis; biomarkers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência e mortalidade dos principais tipos de câncer.....	17
Figura 2. Incidência dos principais tipos de câncer no Brasil em mulheres.....	18
Figura 3. Taxa de mortalidade das 5 localizações primárias mais frequentes.....	18
Figura 4. Domínios funcionais de Par-4.....	29
Figura 5. Mecanismos indução de apoptose por Par-4.....	32
Figura 6. Esquema do vetor de supressão pRS shRNA (short hairpin RNA – 29 nucleotídeos).....	39
Figura 7. Análise da expressão proteica de Par-4 nas células MDA-MB-231, MDA-Controle e MDA-shPar-4.	49
Figura 8. A redução da expressão de Par-4 não promove alterações no ciclo celular e proliferação das células MDA-MB-231	51
Figura 9. Diminuição da expressão de Par-4 não altera a migração de células MDA-MB-231.....	52
Figura 10. A redução de Par-4 aumenta a capacidade de células MDA-MB-231 em formar colônias.....	53
Figura 11. Efeito da supressão de Par-4 na morte celular e apoptose das células MDA-MB-231 em resposta ao tratamento com docetaxel.....	55
Figura 12. Efeito da supressão de Par-4 na morte celular e apoptose das células MDA-MB-231 em resposta ao tratamento com 5-FU.	57
Figura 13. Redução na expressão de Par-4 altera a expressão de proteínas envolvidas em vias de apoptose e reduz a secreção de Par-4.....	58
Figura 14. A supressão do gene PAR-4 acelera o crescimento tumoral in vivo das células de câncer de mama, MDA-MB-231.....	59
Figura 15. Efeito da supressão do gene PAR-4 no crescimento tumoral in vivo das células de câncer de mama, MDA-MB-231.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos utilizados nos ensaios de Western Blot e respectivas diluições... 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Apaf-1	<i>Apoptosis protease-activating factor</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Ataxia telangiectasia
BAD <i>death</i>)	Agonista de morte celular associado a BCL-2 (<i>BCL-2 antagonist of cell</i>
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BCL2	Célula B CLL/linfoma 2 (<i>The B-cell lymphoma protein-2 family</i>)
BID	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
BRCA1	Câncer de mama 1 (<i>Breast cancer 1</i>)
BRCA2	Câncer de mama 2 (<i>Breast cancer 2</i>)
BRIP1	<i>BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1</i>
BSA	Albumina bovina sérica (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CASP8	Caspase-8
CDH1	<i>Cadherin-1</i>
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CHEK2	<i>checkpoint kinase 2</i>
c-myc	Oncogene homólogo a mielocitomatose viral v-myc
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4</i>
DISC	<i>Death-Inducing Signalling Complex</i>
DMEM	<i>Dubelcco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
dNTPs	2'desoxirribonucleotídeos 5' trifosfato
EGFR <i>Receptor</i>)	Receptor do fator de crescimento epidermal (<i>Epidermal Growth Factor</i>
E2	17 β -Estradiol
ER	Receptor de Estrógeno (Estrogen Receptor)
ER-	Receptor de Estrógeno (Estrogen Receptor) negativo
ER+	Receptor de Estrógeno (Estrogen Receptor) positivo

ER α	Receptor de Estrógeno (Estrogen Receptor) alfa
ER β	Receptor de Estrógeno (Estrogen Receptor) beta
ERE	Elementos responsivos ao estrógeno
ERK1/2	Quinase de sinalização extracelular
Fas	Membro 6 da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral
FADD	Domínio de morte associado associado à via Faz (<i>Fas-associated via death domain</i>)
GADPH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>)
Her2	receptor de fator de crescimento epidermal 2
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IGF-1	Fator do crescimento do tipo insulina 1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MAPK	Proteína quinase ativada pelo mitógeno (mitogen-activated protein kinase)
MAPKK	Proteína quinase quinase ativada pelo mitógeno (<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>)
MEC	Matriz extracelular
MEK	Quinase ativada pelo mitógeno
mg	miligrama
ml	mililitro
mM	milimolar
NF-kB	Fator nuclear do gene enhancer do polipeptídio leve Kappa nas células-B 1 (<i>Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-cells 1</i>)
nM	nanomolar
PALB2	<i>partner and localizer of BRCA2</i>
Par-4	Proteína de resposta a apoptose prostática (<i>Prostate Apoptosis Response Protein 4</i>)
PAWR	<i>PKC apoptosis WT1 regulator</i>
pH	potencial hidrogeniônico
PI3-K	Fosfatidilinositol 3 – quinase (Phosphatidylinositol 3 – Kinase)
PKA	Proteína quinase A (Protein Kinase A)

PKC δ	Proteína quinase C zeta (Protein Kinase C zeta)
PTEN	Homólogo à fosfatase e tensina (Phosphatase and Tensin Homolog)
PR	Receptor de progesterona
q	braço longo do cromossomo
RAS	Homólogo ao oncogene viral de sarcoma de rato
RNA	Ácido Ribonucléico (Ribonucleic Acid)
r.p.m	rotações por minuto
shRNA	short hairpin RNA
SIM	Sistema de Informação sobre Mortalidade
STK11	<i>serine/threonine kinase 11</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor receptor</i>
TP53	proteína tumoral p53 (tumor protein p53)
TS	timidilato sintase
TXT	Taxotere
ul	microlitro
uM	micromolar
WHO	Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Epidemiologia e Fatores de Risco do Câncer de Mama	16
1.2	Função e Estrutura da Glândula Mamária	20
1.3	Classificação molecular do câncer de mama	24
1.4	PAR-4: estrutura e Função	27
2	OBJETIVO	37
2.1	Objetivos Específicos	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	Cultura de Células	38
3.2	Transfecção celular	38
3.3	Extração de RNA total	40
3.4	Síntese de cDNA e Real time PCR (qPCR)	41
3.5	Extração proteica	41
3.6	Western Blot	42
3.7	Densitometria	44
3.8	Análise da Proliferação Celular	44
3.9	Ensaio de migração celular	44
3.10	Ensaio Clonogênico	44
3.11	Análise de Ciclo Celular e Morte Celular através da marcação de PI (<i>Propidium Iodide</i>)	45
3.12	Análise de apoptose através da marcação de Annexin-FITC/PI	45
3.13	Crescimento tumoral <i>in vivo</i>	45
3.14	Imunohistoquímica	46
3.15	Análise estatística	47
4	RESULTADOS	48
4.1	Estudo funcional do PAR-4	48
4.1.1	A redução da expressão de Par-4 não promove alterações no ciclo celular, proliferação e migração das células MDA-MB-231	50
4.1.2	A expressão reduzida de Par-4 aumenta o potencial clonogênico das células MDA-MB-231	52
4.1.3	A supressão de Par-4 altera a sensibilidade das células MDA-MB-231 ao tratamento com diferentes quimioterápicos	53
4.1.4	Redução nos níveis de expressão de Par-4 altera o crescimento das células MDA-MB-231 <i>in vivo</i>	58
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXOS	76

1 INTRODUÇÃO

O câncer é definido como um grupo de doenças que se caracterizam pelo crescimento descontrolado e disseminação de células anormais (FACTS, 2017). Muito mais do que apenas uma massa de células prejudiciais em proliferação, Hanahan e Weinberg (2011) postularam que esse processo, a tempo conhecido como tumorigênese, é dirigido por um conjunto de alterações genéticas e epigenéticas que apontam como consequência 10 características distintas na transformação progressiva de células normais em células malignas: (i) manutenção de vias de sinalização proliferativa; (ii) evasão de supressores de crescimento; (iii) ativação de invasão e metástase; (iv) imortalidade replicativa; (v) indução de angiogênese; (vi) resistência a morte celular; (vii) evasão a defesa do hospedeiro pelo sistema imune; (viii) instabilidade genômica e mutação; (ix) alteração do metabolismo energético e, (x) inflamação promovida pelo tumor. Apesar de todo esclarecimento que essas características nos trazem a respeito do desenvolvimento da doença, a ordem em que os processos ocorrem e a importância determinante de cada um na transformação maligna ainda não estão totalmente elucidados.

Com os recentes avanços e inovações em tecnologias para interrogar sistemas celulares e suas interações, nosso conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer tem avançando a uma taxa sem precedentes. Entretanto, quanto mais compreendemos, mais complexa essa família de doenças se revela. Uma representação do desafio de entender essa complexidade aparece nos mais recentes dados sobre a prevalência da doença no mundo. Em 2011, segundo os dados fornecidos pelo GLOBOCAN da Agência Internacional de Registro de Câncer (*IARC* - do inglês *International Agency for Research on Cancer*), o câncer aparece na lista das principais causas de morte no mundo, ficando a frente até mesmo das mortes causadas pelas doenças cardíacas coronárias ou por acidente vascular cerebral. Já no ano seguinte, a estimativa mundial apontou cerca de 14 milhões de novos casos, sendo que mais de 60% ocorreram em países em desenvolvimento. Além disso, a porcentagem para mortalidade se agrava quando se observa que dos 8 milhões de óbitos previstos, 70% ocorreram nesses mesmos países. Em 2017, apenas nos Estados Unidos (USA), são esperados cerca de 1.687,780 novos casos de câncer com uma estimativa de 600,920

mortes (FACTS, 2017). Entre os diversos tipos de câncer, aqueles com maior incidência anual no mundo são: pulmão (1,80 milhões de casos), mama (1,67 milhões), colorretal (1,36 milhões), próstata (1,11 milhões) e estômago (951,59 mil) (FERLAY et al., 2014).

O câncer de mama, não diferente de tantos outros tipos tumorais, carrega em sua história uma etiologia complexa, heterogênea e multifatorial. O desenvolvimento e progressão da doença dependem principalmente da combinação das características genéticas das células tumorais e a interação das mesmas com o microambiente (PLACE; JIN HUH; POLYAK, 2011; POLYAK; KALLURI, 2010; RUDOLPH; CHANG-CLAUDE; SCHMIDT, 2016). A partir da década de 1980 a incidência do câncer de mama aumentou muito, provavelmente relacionado ao aumento do rastreamento da doença, com a utilização da técnica de mamografia na mesma época. Em 1990, os índices estabilizaram, até que em 2000 os números de diagnóstico e mortalidade do câncer de mama começaram a diminuir. Esse declínio parece estar relacionado com a queda no uso da terapia hormonal na menopausa, que ocorreu após o estudo da *Women's Health Initiative* relacionar o uso da terapia com o aumento do risco de desenvolver câncer de mama. Apesar desse progresso considerável, o câncer de mama continua sendo a neoplasia mais frequente entre as mulheres em todo mundo e a maior causa de mortalidade (FACTS, 2017; FERLAY et al., 2014; GASS et al., 2009; KERLIKOWSKA et al., 2003).

1.1 Epidemiologia e Fatores de Risco do Câncer de Mama

Os dados globais mais recentes sobre o câncer de mama apontam que em 2012 foram diagnosticados 1.67 milhão de novos casos e 522 mil mortes por câncer de mama. 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 apontam um número 324 mil mortes por câncer de mama enquanto países desenvolvidos contabilizaram 198 mil mortes (Figura 1) (FERLAY et al., 2014).

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.

Para o Brasil, em 2016, foram estimados 57.960 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer é o segundo mais incidente na população geral e o mais incidente entre a população feminina do país (Figura 2). Em relação a sua distribuição geográfica, sua prevalência em mulheres figura entre as principais regiões do país: Regiões Sul (74,30/100 mil), Sudeste (68,08/100 mil), Centro-Oeste (55,87/100 mil) e Nordeste (38,74/100 mil). Apenas na região Norte, o câncer de mama aparece como segundo tumor mais incidente (22,26/100 mil), onde o câncer do colo do útero ocupa a primeira posição. Uma das principais hipóteses para esse menor índice de câncer de mama na região Norte é a de uma população mais jovem, e que amamenta mais, também. Outros fatores podem estar relacionados, como hábitos mais saudáveis de alimentação e menor uso de produtos industrializados e gorduras. Porém, a idade permanece como principal indicativo dessa estimativa (Instituto Nacional do Câncer - INCA. DA SILVA, 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.

Segundo as informações do banco de dados do INCA, entre os anos de 1979 a 2014, o câncer de mama no Brasil permaneceu como a principal causa de morte em mulheres entre as 5 localizações primárias mais frequentes (Figura 3). No ano de 2012, o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), do Ministério da Saúde, registrou 13.746 casos de morte relacionados ao câncer de mama no Brasil. Na mortalidade proporcional por câncer em mulheres, em 2013, os óbitos por câncer de mama ocupam o primeiro lugar no país, representando 16,1% do total de óbitos (Instituto Nacional do Câncer - INCA).

Figura 3. Taxa de mortalidade das 5 localizações primárias mais frequentes. Taxas de mortalidade das 5 localizações primárias mais frequentes em 2014, ajustadas por idade, pela população mundial, por 100.000 mulheres, Brasil, entre 1979 e 2014. Fonte: Adaptado de <http://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb>

A etiologia do câncer de mama se manifesta de forma complexa e, essencialmente multifatorial, não possuindo um fator único capaz de sustentar o surgimento da doença. Todavia, fatores de risco relacionados à susceptibilidade foram amplamente estabelecidos com o auxílio de estudos epidemiológicos. A utilização desses fatores é importante na identificação de indivíduos com alto risco de desenvolver o câncer de mama, processo essencial para favorecer à prevenção da doença (ÜBERSICHTSARBEIT; SCHMIDT-POKRZYWNIAK, 2009).

Entre os principais fatores de risco para o câncer de mama, a herança genética é predominante entre eles. O agrupamento do câncer de mama com uma incidência maior do que o esperado em algumas famílias tem sido reconhecido na literatura desde o século XIX. O primeiro relato de uma família com predisposição genética ao câncer de mama é tradicionalmente descrito pelo francês *Pierre Paul Broca*. Ao estudar o histórico e genealogia de sua família, devido ao diagnóstico de câncer de mama em sua esposa, *Pierre* constatou que a doença já estava presente há pelo menos quatro gerações (NIELSEN; HANSEN; SØRENSEN, 2016). Porém, a principal base para o argumento de que a herança genética representa um grande fator de risco ao desenvolvimento do câncer de mama está retratada nos estudos de gêmeos, uma vez que nesse grupo a incidência é quase 10 vezes maior em comparação ao risco médio da população (ANTONIOU; EASTON, 2006; MUCCI et al., 2016).

A principal ligação entre o desenvolvimento da doença e o histórico familiar ocorre pela herança de genes específicos relacionados à susceptibilidade ao câncer de mama. Dos casos identificados, a maioria correspondem a mutações que ocorrem em genes de alta penetrância, como *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *TP53*, *CDH1*, e *STK11*, conferindo um risco de até 80% de desenvolver câncer de mama. O restante dos casos se distribui entre os genes de moderada penetrância (*CHEK2*, *BRIP1*, *ATM*, e *PALB2*), onde a presença de mutações nesses genes atribui um risco duas vezes maior de desenvolver a doença do que em casos onde as mutações não são detectadas. Além disso, estudos utilizando a análise de *single-nucleotide polymorphisms* (SNPs) identificaram um pequeno número de polimorfismos em genes associados ao câncer de mama, tais como, *ATM*, *CASP8* (*cysteine-aspartic acid protease family with a role in apoptosis*), *CHEK2*, *CTLA4* (*encodes an inhibitory signal to T cells, affecting carcinogenesis via antitumor immunity*), *NBN*, *TP53* (SHIOVITZ; KORDE, 2015).

Além do histórico familiar, os fatores de risco relacionados ao desenvolvimento do câncer de mama podem ser divididos em fatores não modificáveis (idade, exposição hormonal endógena e densidade da mama) e fatores modificáveis ou potencialmente modificáveis (estilo de vida, obesidade, sedentarismo, dieta, tabagismo, ingestão de álcool em excesso e número de gestações a termo) (COLDITZ; BOHLKE, 2015). Nesse contexto, 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 (BRISKEN; MALLEY, 2010). Segundo a metanálise realizada pelo grupo de Nelson em 2012, a utilização de contraceptivos orais, a nuliparidade, e o primeiro parto com idade acima dos 30 anos estão associados com um risco aumentado de 1,5 vezes ao desenvolvimento de câncer de mama em mulheres com idade entre 40 e 49 anos.

1.2 Função e Estrutura da Glândula Mamária

A glândula mamária, órgão cerne na distinção dos mamíferos de outros animais, é especializada em produzir e secretar leite, tendo por função a alimentação e nutrição da prole. O leite materno, além de apresentar riqueza de componentes nutricionais, como gorduras, açúcares e proteínas, possui também uma série de outros fatores bioativos que protegem o lactente contra infecções e inflamações além de contribuírem para o amadurecimento do sistema imune, o desenvolvimento dos órgãos e estimulam a colonização intestinal microbiótica (BALLARD, 2013; INMAN et al., 2015).

Assim como a maioria dos tecidos glandulares, a glândula mamária é composta por uma grande variedade de tipo celulares, incluindo células epiteliais, adipócitos, fibroblastos, células do sistema imune, sistema linfático e células vasculares, que trabalham juntas para configurar e manter a função do órgão. O parênquima da glândula mamária é tradicionalmente descrito como uma bicamada composta de células epiteliais luminais e basais. O epitélio basal é constituído de células mioepiteliais que estão estritamente relacionadas com a liberação do leite materno durante a lactação através da sua contração em resposta a ocitocina. Entretanto, essa camada de células também desempenha um papel importante na síntese e manutenção da matriz extracelular (MEC). O epitélio luminal por sua vez é especializado na secreção de leite e constitui a face luminal dos ductos e alvéolos secretores. O conjunto dessas células é o principal

responsável pela arquitetura e função dos ductos e lóbulos da glândula mamária (INMAN et al., 2015). Os componentes do estroma, tecido que envolve o parênquima da glândula mamária, desempenham uma importante função estrutural, além disso, derivam sinais que influenciam no desenvolvimento e diferenciação da mama normal, sendo nesse contexto peça relevante na promoção ou inibição da tumorigênese e progressão tumoral. A MEC, componente essencial do microambiente celular, é um fator de exemplo na relação do estroma com processo de desenvolvimento tumoral da mama (ALLEN; LOUISE JONES, 2011; EGBLAD; WERB, 2002; HANSEN; BISSELL, 2000; JINKA et al., 2012; KHAMIS; SAHAB; SANG, 2012; LU et al., 2011). Embora tenha sido considerada por muito tempo apenas uma estrutura estável desempenhando um papel importante no suporte e manutenção da morfologia tecidual, a MEC tem se tornado uma parte fundamental do microambiente tecidual, sendo altamente dinâmica e versátil, influenciando nos aspectos biológicos das células (HYNES, 2009; REILLY; ENGLER, 2010). A MEC é um complexo sistema de macromoléculas com distintas propriedades físicas, bioquímicas e biomecânicas, sendo um componente indispensável no desenvolvimento embrionário e na homeostase tecidual. A dinâmica da Matrix Extracelular, o que se entende por sua produção, degradação e remodelamento, é altamente controlada por uma variedade de mecanismos regulatórios, os quais garantem sua normal atividade durante o desenvolvimento e funcionalidade do órgão. Em doenças como o câncer esses mecanismos de controle estão frequentemente alterados, o que reflete na direta desorganização da MEC e consequentemente mudanças nas características celulares, como por exemplo, a transformação hiperplásica em células epiteliais. Além disso, a desregulação da MEC afeta vários aspectos da biologia vascular, promovendo a angiogênese associada ao tumor e facilitando a invasão e metástase. (FATA; WERB; BISSELL, 2004; LU; WEAVER; WERB, 2012; MALLER; MARTINSON; SCHEDIN, 2010; PLACE; JIN HUH; POLYAK, 2011).

Na glândula mamária, os estrógenos e os fatores de crescimento, como o *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) também são fatores chaves no seu desenvolvimento normal e diferenciação. Os fatores hormonais são característicos por suas numerosas funções na fisiologia normal no corpo humano, os estrógenos, por exemplo, são fatores que estendem suas funções desde a regulação do ciclo menstrual e reprodução até modulação da densidade óssea e funções cerebrais. O estrógeno mais

predominantemente produzido no organismo é o 17 β -Estradiol (E2). A atividade do E2 ocorre principalmente através da ligação com receptores de estrógeno (ERs), que agem como fatores de transcrição, que uma vez ativados esses receptores regulam a expressão de múltiplos genes alvos. Além do E2 outros dois estrógenos são produzidos, o Estriol e Estrona, que embora sejam caracterizados como ligantes de alta afinidade, possuem fraca relação de ligação com ERs. Em relação ao seu mecanismo, os estrógenos agem em seu tecido específico principalmente pela interação com os receptores ER α e ER β . O nível da expressão e o subtipo do ER são os principais fatores que determinam a resposta tecido específica dos estrógenos. Apesar dos primeiros relatos desses receptores surgirem há cerca de meio século atrás, ainda hoje muitos esforços são direcionados para o entendimento desse complexo mecanismo molecular de ação entre os estrógenos e seus receptores. Atualmente existem duas principais vias de ação descritas para o complexo estrógeno-ERs. A primeira denominada como via clássica, é onde o complexo estrógeno-ERs ativado interage diretamente com elementos responsivos ao estrógeno (EREs) em regiões promotoras, levando a ativação transcricional de genes alvos. A segunda via por sua vez é descrita como um efeito rápido e estimulatório dos estrógenos em vias de transdução de sinal intracelular, tal via é frequentemente associada a uma resposta a ativação de vias de sinalização de Proteínas Ativadas por Mitógenos (MAPKs) e Fosfatidilinositol 3 - quinase (Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)). (HELDRING et al., 2007; LIANG; SHANG, 2013). Além disso, em um contexto patológico, como no desenvolvimento tumoral, os estrógenos ainda são capazes de interagir com outras vias importantes para potencializar a transformação maligna. Um exemplo disso é interação com a via dos receptores de fatores de crescimento. Os fatores de crescimento como os fatores de crescimento epidérmico (EGF) e os fatores de crescimento tipo-insulina (IGF) são capazes de modular a expressão dos receptores de estrógenos. O inverso nesse processo também ocorre, uma vez que a ativação dos ERs pode estimular a secreção dos fatores de crescimento (HAMILTON et al., 2015). Devido a grande importância desses hormônios no controle do desenvolvimento normal da mama, evidências mostram que alterações nas vias de sinalização envolvendo desses fatores implicam diretamente no desenvolvimento e progressão tumoral da mama (NAGAI; BRENTANI, 2008; WERNER; BRUCHIM, 2012).

Ao longo do tempo a glândula mamária passa por repetitivos ciclos de desenvolvimento estrutural, diferenciação funcional e regressão. No entanto, para que esse processo ocorra, um equilíbrio entre a proliferação e a morte celular deve ser cuidadosamente regulado. Um dos principais mecanismos envolvido nessa extensa reestruturação do tecido mamário é a morte celular programada ou apoptose, processo pelo qual a morte celular é ativada em resposta a estímulos fisiológicos, resultando em uma série de mudanças estruturais e bioquímicas na célula (COLITTI, 2012). O processo de morte celular por apoptose tem sido descrito como uma barreira natural ao desenvolvimento tumoral, uma vez que sua evasão é um dos processos chaves para a tumorigênese (ADAMS; CORY, 2007; HANAHAN; WEINBERG, 2011; LOWE; CEPERO; EVAN, 2004). Esse processo ocorre na maioria das células por dois mecanismos de ativação, os quais convergem para uma via comum de ativação de uma família de proteases conhecidas como Caspases, as quais possuem um papel fundamental na indução à morte celular. O primeiro mecanismo, conhecido como via extrínseca, é iniciado pela ligação de moléculas específicas (*FasL*, *TNF α* *TRAIL*) a receptores de morte, membros da família de receptor *TNF* (*Tumor Necrosis Factor receptor*) localizados na membrana celular, sendo o mais conhecido desses receptores o receptor *TNF* Tipo 1 (*TNFR1*). A ativação desses receptores pelo ligante induz a dimerização das moléculas receptoras, o recrutamento da proteína adaptadora *FADD* (*Fas-Associated protein with Death Domain*) e a formação do complexo *DISC* (*Death-Inducing Signalling Complex*), resultando na ativação de caspases iniciadoras (caspase 8) e efetoras (caspases 3 e 7). O segundo mecanismo, chamado de via intrínseca (mitocondrial), é iniciado a partir de estímulos como danos irreparáveis ao DNA, hipóxia, altas concentrações de cálcio e intenso estresse oxidativo. Uma vez ativada essa via resulta no aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, liberando no citoplasma moléculas pró-apoptóticas como o citocromo-c, a qual é responsável por formar um complexo indutor de apoptose com a *Apaf-1* (*Apoptosis protease-activating factor*) e moléculas de caspase 9 para a ativação de caspase 3 e indução da apoptose. Essa via é regulada por um grupo de proteínas membros da família de oncogenes *BCL-2* com atividade pró-apoptótica (*bax* e *bak*) ou anti-apoptótica (*bcl-2* e *bcl-xl*). Tanto a via extrínseca e a via intrínseca devem ser muito bem definidas e controladas, uma vez que a desregulação desses processos pode ser crucial para a carcinogênese (GALLUZZI et al., 2012; SIMSTEIN et al., 2008; WONG, 2011).

Nos últimos anos, tem se tornado ainda mais evidente que a morte celular por apoptose tem um papel determinante na carcinogênese, no crescimento tumoral e na agressividade do câncer de mama. (DE JONG; VAN DIEST; BAAK, 2000; NISHIMURA et al., 1999; WANG et al., 2014). Apesar da indução da apoptose por agentes quimioterápicos ser um importante aspecto da terapia do câncer e a sua resistência ser considerada uma importante características para o desenvolvimento tumoral, alguns estudos têm demonstrado que a apoptose pode ser usada como marcador de pior prognóstico no câncer de mama. Nesses casos, a apoptose pode refletir um alto grau de agressividade biológico e prognóstico desfavorável, uma vez que os elevados índices de apoptose nesses tumores estão frequentemente associados com aspecto histológico pouco diferenciado, negatividade para ER e maiores índices proliferativos. Essa associação pode ser explicada como uma possível tentativa da resposta imune celular em induzir a apoptose como uma resposta supressora ao tumor (FARIAS, 2015).

1.3 Classificação molecular do câncer de mama

Ao longo dos anos, diferentes patologistas têm demandado horas e mais horas de descrições classificatórias de tumores originados a partir de um mesmo órgão, dando origem na atualidade a excelentes e bem estabelecidos diferentes subtipos histológicos. Essa observação, que revela a heterogeneidade da doença é comumente relacionada a níveis morfológicos, devido à presença de diferentes tipos celulares e a uma composição variável do estroma dependendo da região. No cenário de câncer de mama, a heterogeneidade morfológica foi uma peça fundamental na formação do sistema de classificação histológica, fornecendo importantes informações prognósticas. Com o surgimento de novas tecnologias de alto desempenho, principalmente voltadas à análise de expressão gênica, foi possível agregar conhecimento sobre a biologia e heterogeneidade, obtendo detalhes sobre as características genéticas no câncer (ZARDAVAS et al., 2015).

Na prática clínica, um conjunto de três bem estabelecidos biomarcadores, no caso, receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e o receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico, Her2, é utilizado como fator prognóstico no câncer de mama. A combinação do status dos receptores hormonais e a expressão do oncogene Her2 é capaz de estratificar os pacientes em diferentes subgrupos, determinando percurso clínico de cada um (VUONG et al., 2014).

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, sendo hoje um dos trabalhos mais influentes na classificação dos tumores de mama (PEROU et al., 2000). Inicialmente, foram analisados pelo grupo 8.102 genes em 65 espécimes de tumores de mama, dando origem a um conjunto de genes intrínsecos, diferencialmente expressos, sendo esses então submetidos à clusterização hierárquica e reunindo por fim os tumores por similaridade na expressão gênica. Esta clusterização inicial 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 (CANCER; ATLAS, 2013; CURTIS et al., 2012; HU et al., 2006; PRAT et al., 2010; SØRLIE et al., 2001, 2003). Destes estudos, cinco subtipos intrínsecos têm sido amplamente reproduzidos e bem estabelecidos para a classificação: Luminal A, Luminal B, Basal, Her2+, e normal-like. Esses subgrupos tumorais apresentam similaridades e diferenças tanto em expressão de genes como em ritmo de crescimento, vias de sinalização, composição celular, prognóstico e sensibilidade à terapêutica (PRAT et al., 2010).

Os tumores luminais, classicamente reconhecidos por seu status positivo para ER, têm sua origem em células epiteliais diferenciadas dos lúmens ductos-lobulares, correspondendo a cerca de 70% dos casos de câncer de mama. O grupo Luminal A, tipicamente com presença de PR em grande quantidade de células e ausência de Her2, apresenta baixo grau histológico e um prognóstico relativamente bom, além de apresentar baixa taxa de proliferação avaliada por Ki 67 (<14%). Já os tumores do tipo Luminal B, apresentam proporção variável de PR nas células e Her2 podendo ou não ser detectado, tem grau histológico mais alto, taxa de Ki 67 mais elevado (>14%), pior curso da doença e maior propensão à recidiva em relação ao Luminal A. De uma forma geral os tumores luminais respondem bem a hormônio terapia, além de que, o tratamento com trastuzumab pode ser empregado com sucesso nos casos de tumores do tipo Luminal B positivos para Her2. Cerca de 90% dos pacientes diagnosticados com câncer de mama, subtipo Luminal A, sobrevivem sem sinal da doença no período de 5 anos (DE BARROS; LEITE, 2015; VUONG et al., 2014; ZARDAVAS et al., 2015).

O subtipo Her2+ é composto por tumores que apresentam alto índice de expressão do receptor ERBB2 (Her2), consequência na maioria dos casos da amplificação do cluster localizado no cromossomo 17q12, que compreende o gene ERBB2. Grande parte dos tumores Her2 positivos apresenta negatividade para ER. Esse tipo tumoral é identificado como tumores de alto grau histológico, de alto índice proliferativo e comumente metastático. Conferem mau prognóstico ao paciente, apresentando taxa de sobrevida de 48,1% em 10 anos (DE BARROS; LEITE, 2015; VUONG et al., 2014; ZARDAVAS et al., 2015).

O subtipo Basal é o grupo que mais apresenta diversidade em relação às características histológicas, perfil de mutação, resposta a quimioterapia, comportamento metastático e taxa de sobrevida. Esse grupo 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 (80% dos tumores), os tumores do subtipo basal são chamados de triplo-negativos. Os tumores do subtipo basal, apresentam alto índice proliferativo, expressão de citoqueratinas 5/6 e 14 ou 17, EGFR, c-KIT, FOXC1 e frequentes mutações em TP53 e BRCA 1-2. Apesar da maior agressividade dos tumores basalóides, os mesmo possuem uma boa resposta a terapia adjuvante (DE BARROS; LEITE, 2015; VUONG et al., 2014; ZARDAVAS et al., 2015).

O grupo *normal-like* é caracterizado pela expressão de genes normalmente compartilhados em tecido epitelial normal. Todavia, sua classificação permanece bastante controversa, já que não está claro se esse subtipo existe de fato, ou se sua determinação deve-se à contaminação com amostras de tecido normal (DE BARROS; LEITE, 2015; VUONG et al., 2014; ZARDAVAS et al., 2015).

Embora as análises em larga escala do perfil de expressão de tumores sejam capazes de revelar subgrupos que se assemelham, possuem particularidades e que são determinantes para o curso clínico da doença, estudos mostram que uma ampla heterogeneidade na expressão gênica é encontrada também dentro de um mesmo subtipo. Um exemplo clássico disso é o tumor triplo negativo, que atualmente, já não é mais considerado um subtipo único e sim um conjunto de 4 subtipos: *Basal-like*, *Mesenchymal*, *Immune-enriched* e *Luminal AR* (AHN et al., 2016). Essa divergência dentro de um mesmo subgrupo reflete, na grande maioria das vezes, as diferentes

respostas à intervenção clínica de pacientes diagnosticados com o “mesmo” subtipo tumoral.

Dessa forma, apesar da grande utilidade e impacto que a classificação molecular atual desencadeou na história natural do câncer de mama, ainda permanece um grande desafio, o de romper a heterogeneidade encontrada nos tumores, trazendo uma distinção mais adequada dos subtipos de câncer de mama de forma eficiente e reprodutível. Por esse motivo, uma ampla gama de novos possíveis biomarcadores vem sendo descritos na literatura. Dentre eles, o gene PAR-4, estudado por nosso grupo de pesquisa e gene alvo desse trabalho, tem se mostrado como um possível relevante marcador prognóstico, uma vez que sua expressão tem impacto no prognóstico de pacientes com câncer de mama (NAGAI et al., 2010).

1.4 PAR-4: estrutura e Função

O gene supressor tumoral PAR-4 foi originalmente identificado em células de câncer de próstata de ratos em um estudo dirigido por Sells em 1994. A hipótese do grupo se baseava na existência de uma via comum ativada em resposta a estímulos apoptóticos. Após a indução de morte celular programada pelo aumento intracelular de Ca^{2+} , o PAR-4 foi identificado, por meio de técnicas de hibridização diferencial, como um gene de resposta imediata a apoptose.

A localização do gene PAR-4 é descrita no braço longo do cromossomo humano 12, na posição 12q21.2 (JOHNSTONE et al., 1998), que se estende aproximadamente entre 79,96Mb e 80,097K, região essa, frequentemente deletada e altamente instável em tumores pancreáticos e gástricos (KIMURA et al., 1998; SCHNEIDER et al., 2003). A localização cromossômica do gene PAR-4 varia entre espécies, em camundongos o gene está localizado no cromossomo 10, enquanto em Zebrafish sua localização está no cromossomo 4 e no cromossomo 11 em Macaco Rhesus. Entre essas mesmas espécies apenas em camundongos o gene está presente na fita *forward*, enquanto nas demais sua sequência está presente na fita *reverse*. O gene humano é formado por sete éxons e seis íntrons, gerando 99,046 bp de informação genética. A localização do códon de iniciação (ATG) fica no éxon 2. Um dos principais domínios do Par-4 é o domínio SAC (*death-inducing domain selective for apoptosis induction in cancer cells*) localizado entre os cromossomos 2 e 3, o qual possui sua sequência gênica conservada evolutivamente em chimpanzés, macacos Rhesus, ovelhas, camundongos, ratos, entre outros, alcançando

em alguns casos níveis de homologia de até 99% com a sequência humana (*National Center for Biotechnology Information - NCBI*).

Um significativo número de polimorfismos tem sido relatado na região referente ao gene PAR-4. Dentre os doze polimorfismos citados na literatura, seis estão sendo relacionados a *major depressive disorder* (MDD) e não tiveram associação com a resposta ao tratamento com *selective serotonin reuptake inhibitors* (SSRIs) (LIOU et al., 2011). Outros 3 polimorfismos foram associados ao desenvolvimento de câncer de próstata, onde foi possível identificar através da utilização do *ancestry informative markers* (AIMs) suas frequências em populações específicas. O polimorfismo rs12827748 foi o mais significativamente associado com o desenvolvimento de câncer e mostrou alta diferença de frequência entre as populações Européias e Oeste Africanas. Os dados deste estudo mostraram que os alelos menores estão ausentes em populações europeias e têm uma frequência inferior a 10% entre os africanos ocidentais (BONILLA et al., 2011).

A expressão de PAR-4 é descrita como reduzida em cerca de 70% dos casos de carcinoma de células renais (COOK et al., 1999), neuroblastomas (KÖGEL et al., 2001) e leucemia linfoblástica aguda e crônica (BOEHRER et al., 2001). Além disso, o PAR-4 pode ter a expressão modulada por oncogenes como Ras, Raf e Src, permitindo assim, em associação com outras proteínas que esses oncogenes iniciem a transformação celular, entretanto, nestes casos a restauração dos níveis de PAR-4 nas células inibe a progressão tumoral (GURUMURTHY et al., 2005).

Estruturalmente, a proteína codificada pelo gene PAR-4 é composta por 340 aminoácidos em humanos e contém múltiplos domínios diretamente relacionados à sua localização sub-celular e consequentemente função apoptótica (Figura 4). Os domínios chaves de Par-4 que são conservados evolutivamente são o domínio zipper de leucina e duas sequências de localização nuclear (NLS1 e NLS2) (EL-GUENDY; RANGNEKAR, 2003). Além desses domínios, em 2003, um estudo dirigido por El-Guendy identificou um domínio central, referente a uma sequência do gene PAR-4 composta por 52 aminoácidos, denominado domínio SAC, identificado como a sequência essencial e suficiente para iniciar indução de apoptose exercida pelo Par-4. Além desses domínios o Par-4 contém sítios de fosforilação também altamente conservados evolutivamente e essenciais para regulação de sua localização subcelular e

função. A fosforilação do resíduo de Treonina (Thr163) pela quinase PKA regula positivamente a ação do Par-4, uma vez que inicia sua translocação para o núcleo. Já a fosforilação do resíduo S230 pela quinase AKT é essencial para retenção do Par-4 no citoplasma em associação com a chaperona 14-3-3, impedindo que ocorra a translocação nuclear e consequentemente inibindo sua ação pró-apoptótica (GOSWAMI et al., 2005; GURUMURTHY et al., 2005). Além de sítios de fosforilação a proteína Par-4 também pode ser alvo de clivagem pela Caspase-3, gerando um fragmento de 25 kDa contendo o domínio SAC de Par-4, sendo esse fragmento essencial e suficiente para induzir a apoptose em células de câncer (THAYYULLATHIL et al., 2013).

Figura 4. Domínios funcionais de Par-4. Os domínios funcionais de Par-4 incluem duas sequências de localização nuclear (NLS), denominadas NLS1 (entre os aminoácidos 24-29) e NLS2 (entre os aminoácidos 146-163), ambas na região N-terminal; o domínio zíper de leucina (entre os aminoácidos 300-340), na região C-terminal e o domínio SAC (entre os aminoácidos 146-203). Além de seus domínios funcionais o Par-4 possui sítios de fosforilação e clivagem relacionados a sua função pró-apoptótica. A fosforilação do resíduo Thr163 pela quinase PKA induz a translocação a ativação de Par-4 via domínio SAC. Já a fosforilação do resíduo S230 pela quinase AKT é essencial para retenção do Par-4 no citoplasma em associação com a chaperona 14-3-3, impedindo que ocorra a translocação nuclear e consequentemente inibindo sua ação pró-apoptótica. Par-4 também é alvo de clivagem pela Caspase-3 gerando um fragmento contendo o domínio SAC e capaz de induzir apoptose em células tumorais. Criado pelo autor, baseado nos artigos: HEBBAR; WANG; RANGNEKAR, 2012; THAYYULLATHIL et al., 2013.

Uma das características que faz com que o Par-4 se torne alvo de grande interesse na terapia é sua habilidade seletiva em induzir apoptose em células tumorais. Essa seletividade tem sido atribuída à diferença de níveis de PKA entre células normais e células tumorais (EL-GUENDY et al., 2003b; GURUMURTHY et al., 2005; RANGNEKAR; SHRESTHA-BHATTARAI; RANGNEKAR, 2010). Diversos estudos assim como o publicado por Merkle Hoffmann em 2011 apresentam dados relevantes sobre o aumento dos níveis de PKA em diversos tipos de cânceres. Nas células normais os níveis basais de PKA são ineficazes na fosforilação do resíduo Thr163, tornando assim as células normais resistentes ao mecanismo de apoptose induzido pelo Par-4 (ZHAO; RANGNEKAR, 2008).

As análises dos aminoácidos de Par-4 também revelam outras regiões presentes na proteína, porém ainda não muito bem caracterizados em relação a sua função. Dentre essas regiões, são citados um sítio de ligação ATP-GTP, um sítio de fosforilação da proteína quinase C (PKC), um sítio de fosforilação da caseína quinase 2 (CK2) e também um sítio para N-glicosilação e N-miristoilação (HEBBAR; WANG; RANGNEKAR, 2012).

Um dos domínios críticos de Par-4, já citado anteriormente, é o domínio zipper de leucina, localizado na região c-terminal da proteína. Essa região contendo 5 leucinas repetidas em sequência, tem como função primária estabelecer a interação de Par-4 com outras proteínas (HEBBAR; WANG; RANGNEKAR, 2012). Essas interações, podem ao final modular a expressão e consequentemente a função da proteína Par-4 na célula. Além disso, o Par-4 pode sofrer alterações em sua expressão a nível transcricional, entretanto, os mecanismos envolvidos nessa interação e regulação ainda não estão muito bem esclarecidos. Sendo assim, diversos estímulos são encontrados na literatura descritos como moduladores da expressão de Par-4, dentre eles: fatores de crescimento e hormonal (CASOLARI et al., 2011; CHAN et al., 1999; CHUNG et al., 2007); quimioterápicos (JAGTAP et al., 2014); diversas quinases (DE THONEL et al., 2014; GURUMURTHY; GOSWAMI; VASUDEVAN, 2005); membros da família RAS (DONNINGER et al., 2010); p53 (BURIKHANOV et al., 2014); Fbxo45 (CHEN et al., 2014); e miRNAs (DU et al., 2015).

Segundo as descrições na literatura, o Par-4 exerce seu papel pró-apoptótico principalmente pela modulação de vias de morte e sobrevivência da célula. Para obter

êxito em sua função, a proteína age tanto através de mecanismos intracelulares como extracelulares. O mecanismo intracelular envolve a fosforilação de Par-4 pela proteína quinase A (PKA) em um resíduo específico encontrado no domínio SAC (T155). Quando encontrado em seu estado ativado, o Par-4 é capaz de induzir a translocação das proteínas Fas e FasL para a membrana celular, as quais interagem com a molécula adaptadora FADD formando o complexo indutor de morte DISC e levando a ativação da via de morte Fas/FasL-FADD-Caspase 8 (Figura 5). Ainda de forma intracelular, o Par-4 também age na modulação da função do NF- κ B na célula, uma importante citocina que age como um fator de transcrição, geralmente promovendo a sobrevivência celular. Essa modulação exercida pelo Par-4 ocorre pela interação com ζ PKC e TOP1 no citoplasma e no núcleo, respectivamente, inibindo a atividade de sobrevivência celular do NF- κ B. Além disso, no citoplasma o Par-4 pode inibir a atividade da proteína anti-apoptótica Bcl-2, ou até mesmo reduzir sua atividade transcricional via interação com WT1 no núcleo. O efeito do resultado da combinação da translocação do Fas/FasL e a inibição do NF- κ B é essencial para a ação apoptótica intracelular exercida pelo Par-4 (BURIKHANOV et al., 2009; RANGNEKAR; SHRESTHA-BHATTARAI; RANGNEKAR, 2010).

Figura 5. Mecanismos indução de apoptose por Par-4. Par-4 é capaz de induzir apoptose nas células tumorais via dos mecanismos de ação, intracelular e extracelular. Na via intracelular (a cima), o Par-4 pode agir tanto no núcleo como no citoplasma. No citoplasma, Par-4 aumenta a translocação de Fas e Fas L para a membrana, bloqueia atividade de PKC (via de sobrevivência por NF-κB) e da proteína anti-apoptótica Bcl-2. No núcleo Par-4 inibe a atividade transcricional de NF-κB e inibe a expressão de Bcl-2 através de sua interação com WT1. Na via extracelular (a baixo), em um contexto de estresse de retículo endoplasmático, o Par-4 forma um complexo com a proteína GRP78 na membrana do retículo, facilitando sua translocação para a membrana celular. Na membrana, o Par-4 é secretado para o meio extracelular e o próprio GRP78 que facilitou seu transporte permanece na membrana como um receptor. O Par-4 extracelular se liga novamente ao GRP78, recrutando para a membrana as proteínas FADD e induzindo a apoptose

pela ativação de Caspase-8. Criado pelo autor, baseado no artigo: HEBBAR; WANG; RANGNEKAR, 2012.

O efeito extracelular de Par-4 foi relatado por Burikhanov e colaboradores (2009) ao demonstrarem que a proteína codificada pelo gene PAR-4 também é secretada espontaneamente pelas células normais e tumorais de próstata em cultura. Utilizando o tratamento com brefeldina A (BFA) para bloquear o transporte e consequente secreção de proteínas pelo retículo endoplasmático (RE), o grupo demonstrou que a secreção do Par-4 ocorre por uma via clássica ER-Golgi e é estimulada por fatores indutores do estresse do retículo endoplasmático. O meio condicionado obtido através da cultura de células contendo os vetores de expressão Par-4-GFP e SAC-GFP apresentaram níveis de Par-4 e SAC secretado, os quais induziram as células tumorais de próstata PC-3 (hormônio-independentes) a apoptose. A mesma ação não ocorreu em células normais, evidenciando a seletividade do Par-4 para células tumorais. Além desses resultados obtidos, ensaios de co-imunoprecipitação e western blot com extratos celulares de PC-3 identificaram a ligação do Par-4 com o receptor GRP78, uma proteína específica localizada no RE, a qual funciona como uma chaperona envolvida no processo de conformação de proteínas e na regulação da sinalização do estresse do RE. Em condições de estresse do RE, o Par-4 intracelular se liga ao receptor GRP78 facilitando a translocação a partir do RE para a membrana plasmática. Na membrana, o mesmo GRP78 que transporta e secreta o Par-4 para o meio extracelular, agora age como um receptor para o Par-4 na superfície celular. Uma vez secretado o Par-4 se liga novamente ao GRP78 e juntamente com a proteína adaptadora FADD recruta Caspase 8 para a membrana, a qual inicia a apoptose por uma via de ativação da caspase 3.

Em 2013, um estudo dirigido por Burikhanov demonstrou que o efeito extrínseco do Par-4 pode ser modulado negativamente pelo NF- κ B, o qual inibe a ação apoptótica extracelular do Par-4 pelo bloqueio da sua translocação juntamente com o receptor GRP78 para a membrana celular. Os dados apresentados mostraram que o mecanismo pelo qual o NF- κ B bloqueia a translocação ocorre pela elevação dos níveis de expressão da proteína UACA (*uveal autoantigen with coiled-coil*), a qual se liga e sequestra o Par-4 impedindo sua translocação para a membrana celular. No mesmo estudo a proteína UACA apresentou elevados níveis de expressão em tumores prostáticos, adenocarcinoma pulmonar e carcinoma de células escamosas quando comparada aos níveis de expressão nos tecidos normais. Outro trabalho do mesmo

grupo em 2014 observou que a ativação de p53 em células normais induz o aumento de Par-4, o qual provoca apoptose em células de câncer de pulmão deficiente em p53 e em células de câncer de próstata. Mecanicamente, essa indução está relacionada com a habilidade do p53 em inibir a proteína UACA, impedindo sua ligação e consequente sequestro do Par-4 no citoplasma. Dessa forma, as células normais podem potencializar a secreção de Par-4 pela ativação de p53 e diminuir a resistência tumoral a terapias (BURIKHANOV et al., 2014).

O papel do Par-4 como supressor tumoral tem sido estudado em diversos trabalhos nos últimos anos. Um estudo publicado em 2007 por Moreno-Bueno e colaboradores, evidenciou a presença de metilação na região promotora do gene PAR-4, resultando no silenciamento do gene em cerca de 32% dos tumores endometriais. Um estudo do nosso grupo publicado por Nagai (2010) avaliando a expressão do Par-4 em câncer de mama avaliou 1.161 amostras de tumores primários de mama, nesse estudo verificou-se a negatividade da expressão do Par-4 em 57% das amostras, sendo que essa negatividade foi associada com o pior prognóstico (menor sobrevida livre de doença e menor sobrevida global) de pacientes com câncer de mama, principalmente os pacientes com o subtipo luminal A. Além disso, foi observado também que pacientes com tumores positivos para receptores EGFR e HER-2 e positivos para quinase p-Akt associado com a diminuição da expressão da proteína Par-4 apresentavam pior prognóstico ainda.

Um estudo do nosso grupo mostrou pela primeira vez o efeito do 17β Estradiol (E2) e do IGF-1 na regulação da expressão do gene PAR-4 em células MCF-7. Após 24 horas de tratamento as células apresentaram expressão diminuída do transcrito Par-4, sendo que o efeito do E2 foi dependente da ativação do receptor de estrógeno (RE), enquanto o efeito observado pelo IGF-1 foi dependente das vias de sinalização PI3K e P38MAPK. Esses resultados sugerem que a inibição da expressão do gene PAR-4 pelos mitógenos E2 e IGF-1 favorece a sobrevivência das células tumorais (CASOLARI et al., 2011).

Em outro trabalho conduzido pelo nosso grupo de pesquisa em 2013, foi possível confirmar o efeito supressor de Par-4 em células de adenocarcinoma mamário, MCF-7. O aumento de expressão de Par-4 nas células MCF-7 reduziu a sensibilidade das células em resposta ao tratamento com o quimioterápico docetaxel, além de exercer

um efeito inibitório no perfil proliferativo das mesmas. O efeito inverso também foi observado quando a expressão de Par-4 foi reduzida nas células de câncer de mama (PEREIRA et al., 2013).

A habilidade do domínio SAC/Par-4 na indução a apoptose se estende para condições *in vivo* também. Em um estudo conduzido por García-cao em 2005, foi possível verificar que camundongos com ausência de expressão de Par-4 eram mais propensos em desenvolver tumores de próstata e os camundongos machos apresentavam alta incidência à hiperplasia prostática. Além disso, o estudo demonstrou que camundongos com baixos níveis de expressão do gene PAR-4 sendo tanto homozigoto ou heterozigoto, desenvolviam tumores espontâneos e também apresentavam alta sensibilidade a indução de tumores por carcinógenos em diversos tecidos. Em 2009, Kline e Colaboradores exploraram a habilidade do Par-4 na sensibilização das células tumorais de colón injetadas em camundongos da linhagem Nude ao tratamento com o quimioterápico 5-Fluoracil. Após o tempo de crescimento dos tumores, os animais receberam injeções intravenosas e intratumorais com nanolipossomos contendo o plasmídeo de expressão para o gene PAR-4, as quais aumentaram a expressão do Par-4 nas células tumorais e a susceptibilidade a resposta ao tratamento com 5-Fluoracil. O grupo também demonstrou que o aumento de expressão de Par-4 na linhagem tumoral humana HT29 levou ao aumento dos níveis de apoptose em resposta ao quimioterápico 5-Fluoracil e essa resposta decorreu da inativação do fator NF- κ B. Essa diminuição dos níveis de NF- κ B pelo Par-4 é de extrema relevância no tratamento do câncer de cólon, uma vez que esta via é ativada nos tumores colo-retais.

Zhao e colaboradores (2007) relataram que camundongos expressando o domínio SAC apresentaram normalidade em relação ao desenvolvimento e expectativa de vida, além disso, os camundongos apresentaram resistência ao desenvolvimento de tumores espontâneos e tumores induzidos. Outros ensaios realizados pelo mesmo estudo com células MEF's (*Mouse Embryo Fibroblasts*) expressando o domínio SAC do Par-4 resultaram na sensibilização das células a apoptose e prevenção da transformação celular induzida pelos oncogenes Ras e c-Myc. Já em 2011 Zhao e colaboradores demonstram que a recombinação das proteínas Par-4 e SAC é eficaz na resistência ao desenvolvimento de metástase induzidas pela injeção de células LLC1 (*Lews Lung Carcinoma cells*) em camundongos. Além disso, os autores demonstraram que as células MEF's originadas de camundongos transgênicos com expressão de Par-4/SAC

quando co-cultivadas com células imortalizadas ou transformadas, induziam a apoptose em células transformadas, o que não ocorreu com células que não expressavam Par-4/SAC. No mesmo estudo ainda os autores verificaram que o soro dos animais, os quais receberam transplante de medula óssea com células de camundongos transgênicos expressando o domínio SAC, foram eficazes na indução da apoptose em células LLC1 em cultura, demonstrando assim que a atividade apoptótica do Par-4/SAC é secretada e pode ser transferida entre camundongos pelo transplante de medula.

As pesquisas direcionadas na área da terapia têm sido focadas constantemente na busca de tratamentos, os quais sejam seletivos apenas a células tumorais sem afetar as células normais do organismo. A combinação de um sistema de cultura de células *in vitro* com o auxílio do desenvolvimento de análises experimentais *in vivo* tem sido amplamente utilizada na pesquisa do câncer de mama para explorar essa problemática. A linhagem epitelial de adenocarcinoma mamário, MDA-MB-231, estabelecida em 1973, foi isolada a partir de efusão pleural de uma paciente mulher de 51 anos de idade (CAILLEAU; OLIVE; CRUCIGER, 1978). Essa linhagem tem sido extensamente utilizada no estudo de câncer de mama, sendo classificada como subtipo triplo negativo. Essas células quando inoculadas em modelos animais são capazes de formar tumor, além de poderem ser utilizadas em elegantes modelos metastáticos (PRICE et al., 1990).

Posto isto, o objetivo deste trabalho foi explorar o papel funcional de Par-4 nas células epiteliais de adenocarcinoma mamário, MDA-MB-231, a partir da redução da expressão de Par-4 nessas células. Explorando tanto os aspectos *in vitro* como *in vivo* deste modelo.

2 OBJETIVO

A principal proposta desse projeto é investigar o papel desempenhado pelo PAR-4 em células tumorais de mama durante o desenvolvimento tumoral e quimiosensibilidade.

2.1 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito *in vitro* e *in vivo* da supressão do PAR-4 na linhagem tumoral de mama, MDA-MB-231. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- Analisar os efeitos da diminuição da expressão do PAR-4 no comportamento das células MDA-MB-231, por meio de análises de ciclo celular, proliferação, migração e formação de colônias;
- Avaliar o efeito da expressão diminuída do PAR-4 na quimiosensibilidade em resposta a diferentes drogas;
- Avaliar o efeito da expressão diminuída do PAR-4 no crescimento tumoral *in vivo* das células MDA-MB-231.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de Células

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 Transfecção celular

Para a supressão do gene PAR-4 a combinação de duas sequências distintas, TI342398 (SEQ2) e TI342399 (SEQ3), do vetor pRS shRNA-Par-4 (Figura 6) foi

utilizada, além do vetor shRNA-C- (TR20003) como controle. 5×10^4 de células MDA-MB-231 foram distribuídas em cada poço de uma placa de 6 poços e após atingirem a confluência entre 30-50% as mesmas foram transfectadas utilizando o reagente TurboFectin 8.0 (OriGene), conforme instruções do fabricante.

Figura 6. Esquema do vetor de supressão pRS shRNA (short hairpin RNA – 29 nucleotídeos) utilizado para expressar a sequência codificadora do RNAi para inibir a tradução de Par-4 (OriGene, Rockville, EUA).

A transfecção com o reagente TurboFectin necessitou da preparação da mistura de transfecção contendo 100,0 µl do meio de cultura sem antibiótico e sem soro com 3,0 ou 6,0 µl do reagente turboFectin. Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, foram adicionados 1,0 µl (1 µg/µl) do vetor de silenciamento e seus respectivos controles na mesma concentração. Após 15 minutos de incubação, a mistura foi adicionada por gotejamento nas células em cultura contendo 3,0 ml de meio completo com soro. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂, os clones inicialmente foram selecionados com 0,75 µg/ml de Puromicina (*Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, EUA*) e mantidas após a seleção em um concentração de 0,5 µg/ml.

A caracterização dos clones transfectados para supressão de Par-4 foi feita por PCR em tempo real e Western Blot.

3.3 Extração de RNA total

Para a análise quantitativa por RT-PCR o RNA total foi extraído pelo método de fenol clorofórmio tiocianato de guanidina. Seguindo a execução do método, a monocamada de células foi lavada duas vezes com tampão PBS, com posterior adição de 700,0 µl de solução D gelada (Isotiociantao de Guanidina 4 M, Citrato de Sódio 25,0 mM pH7,0, Sarcosil 0,05 % e 0,1 M de β-Mercaptoetanol 98 %). Após a lise total das células, a solução foi transferida para um novo tubo de 2,0 ml. Em sequência foram adicionados 70,0 µl de acetato de sódio 2 M, pH 4,6; 700 µl de fenol saturado (pH 5,0-6,0); e 175,0 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (proporção 49:1). Após a adição de cada reagente, a mistura foi homogeneizada por agitação em vortex e deixada em banho de gelo por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000 r.p.m. e 4 °C. A fase aquosa sobrenadante (referente ao RNA extraído) foi transferida para um novo tubo cuidadosamente, evitando a retirada da interfase (proteínas e fragmentos maiores de DNA) e da fase inferior (proteínas e fragmentos menores de DNA). Em seguida, a amostra foi precipitada com igual volume de isopropanol a -20 °C por 16 horas. Após este período, a amostra foi centrifugada a 10.000 r.p.m. por 20 minutos e o precipitado resultante foi dissolvido em 150,0 µl de solução D, com adição de 170,0 µl de isopropanol para nova precipitação do RNA durante 16 horas a -20 °C. No terceiro dia da extração as amostras foram centrifugados por 20 minutos a 10.000 r.p.m. a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 150ul de etanol 75 % e centrifugado por 10 minutos a 10.000 r.p.m (esse processo de lavagem foi realizado 2 vezes). O sobrenadante foi desprezado e após secar o excesso de etanol a temperatura ambiente, o RNA foi dissolvido em água livre de RNase/DNase (GIBCO, Gainthersburg, EUA).

A concentração e pureza do RNA foram determinadas por leitura espectrofotométrica a 260nm no equipamento NanoDrop (Thermo Scientific). A pureza do RNA foi avaliada pela razão 260/280nm, que deve ficar entre 1,8 e 2,0. A qualidade (integridade) do RNA foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1 % contendo formaldeído. Para eletroforese, as amostras de RNA foram preparadas da seguinte maneira: em um volume de 3,0 µl de H₂O (livre de RNase/DNase) e 4,0 µl de tampão de aplicação (75,0 µl formamida deionizada; 24,0 µl formaldeído; 15,0 µl MOPS 10X; 10,0 µl H₂O livre de RNase/DNase; 10,0 µl glicerol; 8,0 µl azul de bromofenol 5 %) foi adicionado 1,0 µl da amostra de RNA. A mistura foi incubada por

15 minutos a 65 °C e dois minutos a 4 °C; em seguida, adicionou-se 1,0 µl de brometo de etídeo (1 mg/ml). Após aplicar o volume total no gel, a corrida eletroforética foi realizada em tampão MOPS (MOPS 0,02 M; acetato de sódio 5,0 mM; EDTA 0,1 mM; pH 7,0) a 60V (4V/cm).

3.4 Síntese de cDNA e Real time PCR (qPCR)

A síntese de cDNA foi realizada usando o kit *High Capacity Archive* (Applied Biosystems, Warrington-UK) seguindo as instruções do fabricante. A RT-PCR foi realizada usando o kit *SYBR Green* (Applied Biosystems, Foster City-USA) seguindo as recomendações do fabricante. As reações da RT-PCR foram processadas no *ABI PRISM 7500* (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 55°C por 1 minuto. Os seguintes primers de PCR foram utilizados: PAR-4, forward 5' – CCAGAGAAGGGCAAGAGCTCGG-3', reverse 5'- ATTGCATCTTCTCGTTTCCGC-3'; GAPDH, forward 5'- CCTCCAAAATCAAGTGGGGCG-3', reverse 5' – GGGGCAGAGATGATGACCCTT-3'. A expressão relativa foi calculada por $2^{-\Delta\Delta CT}$ (CT = Ciclo do início de quantificação do transcrito; ΔCt = Ct do gene de interesse menos o Ct do gene referência; $\Delta\Delta Ct$ = ΔCt da amostra de interesse menos ΔCt da mostra referência). Os valores médios das células controles servem como amostra de referência. Os resultados foram expressos em *n-fold* diferenças na expressão relativa de mRNA para a expressão de GAPDH e a amostra de referência.

3.5 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 Assay™ 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 uL das diluições de BSA bem como 5 uL dos extratos protéicos diluídos a serem quantificados. A seguir, foram adicionados 295 uL do Coomassie Plus – The Better Bradford Assay™ 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 absorbâncias foram plotados em um gráfico no Microsoft® Office Excel® 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, EUA) onde as absorbâncias da curva padrão serviram como referência para a quantificação dos extratos protéicos.

3.6 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 uL/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 uL/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 (Bio-Rad, 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-Par-4	Santa Cruz – SC1807	1:1000	42 kDa	Rabbit 1:5000
anti-Actina	Santa Cruz (C4)	1:3000	42kDa	Mouse 1:1000
anti-Pro-Caspase-7	Santa Cruz – sc-81654	1:1000	28-38 kDa	Mouse 1:5000
anti-Caspase-7	Cell Singaling – Asp198	1:200	20 kDa	Rabbit 1:5000

3.7 Densitometria

As análises semi-quantitativas da expressão protéica foram determinadas por densitometria da intensidade das bandas do Western Blot. Utilizou-se a expressão da proteína β -actina como controle de massa para a normalização dos resultados. As densitometrias foram realizadas utilizando o *software ImageJ*.

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 RPMI 1640 completo, suplementado com 5% de soro fetal bovino foram semeadas em triplicata em placas de 96 poços (Corning), na densidade de 1×10^4 células/poço. Após 24, 48, 72, 96 e 120 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 12 poços até atingirem confluência. Posteriormente, foi produzida uma “ferida” na monocamada celular com auxílio de uma ponteira de 200 μ L. A partir da hora zero do ensaio as células foram incubadas com meio específico e carenciadas de SFB (1%). As imagens foram adquiridas a cada 30 minutos, com o auxílio do microscópio Axiovert 200M - Carl Zeiss, e os pontos de 6, 12, 18 e 24 horas foram escolhidos para as análises comparativas. As imagens foram analisadas com auxílio do *software ImageJ “Wound Healing Tool”* e expressos em porcentagem de área da ferida.

3.10 Ensaio Clonogênico

Para ensaio clonogênico, células controle e shPar-4 foram semeadas na proporção de 1000 células por poço de placa de 6 poços e crescidas em atmosfera humidificada com 5% de CO₂ a 37 ° C durante 7 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. As imagens foram analisadas com o auxílio do software *ImageJ* “*Colony Area*” e expressos em porcentagem de área coberta.

3.11 Análise de Ciclo Celular e Morte Celular através da marcação de PI (*Propidium Iodide*)

Para análise do ciclo e morte celular, as células aderidas e em suspensão foram recolhidas, lavadas uma vez com PBS, fixadas com etanol 70% e estocados a -20° C até a análise por citometria. No momento da análise, as células fixadas foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em uma solução de PBS contendo 200 µg/ml RNase A; 0,1% Triton X-100 e 20 µg/ml Iodeto de Propídio. A progressão do ciclo celular foi analisada por citometria (*Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer*) utilizando o programa disponibilizado pelo próprio fabricante do equipamento (*Attune Cytometric Software*). Com a utilização do programa é possível calcular a porcentagem de células nos diferentes estágios do ciclo (G1, S-G2/M) e das células em morte celular (sub-G0).

3.12 Análise de apoptose através da marcação de Annexin-FITC/PI

Para o ensaio de Annexin-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 PharMingen, San Diego, CA, USA*). Para a preparação do ensaio, as células aderidas e em suspensão são recolhidas e separadas em tubos eppendorf (1×10^5). Em seguida, as células são lavadas 2 vezes com PBS e ressuspensas em 100uL de tampão *Binding Bufer* (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, as células são incubadas 15 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luz. Ao final, são adicionados mais 300 uL de *Binding Buffer* ao volume final e a leitura realizada com auxílio do *Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer*.

3.13 Crescimento tumoral *in vivo*

Os experimentos *in vivo* foram realizados com camundongos fêmeas da linhagem Balb/c NUDE (5 semanas de idade), adquiridos no Centro de Bioterismo da FMUSP (São Paulo, SP). Os animais foram mantidos no Biotério de experimentação animal do Centro de Medicina Nuclear (CMN) e todos os experimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa FMUSP (Anexo A). Células da linhagem tumoral de mama MDA-MB-23-Control e MDA-MB-231-shPar-4 ao atingirem 60% de confluência foram recolhidas, lavadas 2 vezes com PBS e re-

suspensas em meio RPMI 1640 com matrigel (1:1). As células foram injetadas na densidade de 2×10^6 no flanco esquerdo de cada animal. Os animais foram monitorados 2 vezes por semana para avaliar sinais de desconforto, morbidade e presença de tumores palpável. O volume do tumor foi calculado pela fórmula: $V = (a^2 \times b)/2$, onde a é o diâmetro menor e b o diâmetro maior em milímetros. Quando a média dos tumores de cada grupo atingiu cerca de 100 mm^3 os animais foram novamente randomizados para serem tratados com docetaxel. O tratamento consistiu de veículo (Solução Fisiológica 0,9%) ou docetaxel (2 vezes por semana, durante 2 semanas, 10 mg/Kg). A percentagem de regressão tumoral será avaliada 1 vez por semana e calculada por: $(V_f/V_i) \times 100$; onde V_f é o volume final e V_i volume inicial. Ao final do experimento, foi realizada a eutanásia dos animais por um método rápido, que não cause dor ou stresse. Os tumores e tecidos normais serão congelados imediatamente em nitrogênio líquido e estocados para posterior extração de DNA e RNA. Parte do material será fixada, embebida em parafina e processada para exame histológico por patologista e avaliação por imunohistoquímica.

3.14 Imunohistoquímica

Parte dos tumores retirados da experimentação *in vivo* foi entregue ao departamento de patologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) para que fossem processados e preparadas as lâminas de imunohistoquímica. A marcação das lâminas foi realizada com o sistemas de detecção de polímero Novolink Novocastra (*Leica Biosystem*), seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente, as lâminas foram desparafinizadas a 65°C por uma hora. Em seguida, o processo de rehidratação ocorreu na seguinte ordem: 2x Xilol (10 minutos); 1x Etanol 100% (10 minutos); 1x Etanol 95% (5 minutos); 1x Etanol 70% (5 minutos); 2x ddH₂O (5 minutos) e a recuperação antigênica foi realizada com Citrato de Sódio 10mM pH 6 (95°C em banho maria). Após esse processo, as lâminas foram lavadas em ddH₂O (10 passagens) e neutralizadas por 5 minutos com peroxidase endógena (*Peroxidase Block*). Após a neutralização as lâminas foram lavadas em PBS (2x – 5 minutos) e bloqueadas com *Protein Block* por 5 minutos. Ao final dessa primeira parte, as lâminas são novamente lavadas com PBS (2x – 5 minutos) e incubadas *over night* com o anticorpo primário. Em nossas lâminas, utilizamos o anticorpo Par-4 (Santa Cruz – SC1807) na diluição 1:400 (o kit fornece o diluente de anticorpo). Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas são lavadas com PBS (2x – 5 minutos), incubadas com Polímero (*Polymer* - sistema de

detecção secundário) por 30 minutos, lavadas novamente com PBS (2x – 5 minutos) e incubadas com a solução de Revelação (Diluição 1:20 – *DAB Substrate buffer/DAB Chromogen*)(atividade peroxidase, aparecimento de precipitação castanho). Finalmente, as lâminas foram enxaguadas em água, foi realizado uma contra-coloração com hamtoxilina (1 minuto) e as lâminas foram novamente desidratadas: 1x Etanol 70% (10 minutos); 1x Etanol 95% (5 minutos); 1x Etanol 100% (5 minutos); 2x ddH₂O (5 minutos); 2x Xilol (10 minutos); Xilol de montagem. Para a montagem das lâminas foi utilizado 1 ou 2 gotas de *Entellani*.

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

4.1 Estudo funcional do PAR-4

Com o objetivo inicial de entender o valor prognóstico de Par-4 em câncer de mama, nosso grupo, em um estudo anterior, investigou a expressão do gene em 1.161 amostras de tumores primários de mama e sua relação com o prognóstico dos pacientes (NAGAI et al., 2010). Utilizando a técnica de imunohistoquímica, os resultados obtidos por meio desse trabalho mostraram que 57% dos tumores apresentaram marcação negativa para a expressão de Par-4, sendo essa negatividade associada com o pior prognóstico (menor sobrevida livre de doença e menor sobrevida global) dos pacientes, principalmente relacionados com o subtipo luminal A. No mesmo ano, um estudo desenvolvido no México, também associou a expressão negativa de Par-4 com o prognóstico desfavorável em pacientes portadoras de câncer de mama, confirmando ainda mais o valor prognóstico de Par-4 no câncer de mama (ZAPATA-BENAVIDES et al., 2010). Interessantemente, em nosso estudo também foi possível observar a relação da expressão de Par-4 com outros marcadores já bem estabelecidos na literatura em câncer de mama. Os pacientes com tumores positivos para receptores EGFR e HER-2 e positivos para quinase p-Akt, quando associados com a diminuição da expressão da proteína Par-4 representavam um grupo de pior prognóstico ainda. Em conjunto, esses resultados evidenciaram pela primeira vez o PAR-4 como um gene supressor de tumor em câncer de mama. Todavia, os mecanismos de ação determinantes em sua função supressora em ainda não haviam sido estabelecidos em câncer de mama, sendo necessários novos estudos funcionais envolvendo o gene e câncer de mama.

Para o estudo funcional de Par-4 em células de adenocarcinoma mamário, MDA-MB-231, realizamos a supressão deste gene com vetores plasmidiais comercializados pela empresa Origene (Rockville, EUA). As células de adenocarcinoma mamário MDA-MB-231, são de origem epitelial e obtidas a partir de efusão pleural de sítios metastáticos de uma mulher de 51 anos de idade (ATCC). Essa linhagem é amplamente utilizada nos estudos direcionados ao câncer de mama por possuir alta tumorigenicidade e características invasivas. Essas células são classificadas como *Claudin-low* e fazem parte do subtipo molecular Basal devido à perda dos receptores hormonais e a negatividade para expressão de Her2. Adicionalmente, essas células recebem uma nova nomenclatura de grupo devido à baixa expressão de *claudin-3* e *claudin-4* (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011). Inicialmente, as células MDA-MB-231

foram transfectadas com vetores plasmidiais contendo 2 diferentes shRNAs (SEQ 2 e SEQ 3) específicos para o transcrito de Par-4. Após a seleção dos clones com antibiótico específico, foi possível estabelecer uma nova linhagem de células MDA-MB-231 em cultura, sendo sua principal alteração a supressão de cerca de 95% na expressão da proteína Par-4 (Figura 8). Durante todo o desenvolvimento deste trabalho, a supressão da expressão de Par-4 foi constantemente confirmada por meio de novos Western Blot, sendo assegurada a eficiência da transfecção até os últimos experimentos. A descrição detalhada do vetor pRS, de cada shRNA e da transfecção das células estão no item 3.2 do Material e Métodos. A partir deste momento, para uma melhor identificação as células que receberam o vetor vazio serão descritas como MDA-MB-231-Controle e as que receberam as sequências do vetor shRNA para silenciamento de Par-4 como MDA-MB-231-shPar-4. Após a seleção e expansão das células em cultura, uma primeira análise de expressão proteica e expressão do transcrito de Par-4 foi realizada para verificar a eficiência da transfecção das células MDA-MB-231.

Conforme observado na Figura 8, as células MDA-MB-231-shPar-4 apresentaram uma supressão tanto na expressão proteica (cerca de 95%) como na expressão do transcrito (cerca de 70%) de Par-4 quando comparada com as células MDA-MB-231-Controle. Também foi possível observar pela análise de western blot que a inserção do vetor pRS vazio não alterou significativamente a expressão proteica de Par-4 em relação a células MDA-MB-231 parental.

A

B

Figura 7. Análise da expressão proteica de Par-4 nas células MDA-MB-231, MDA-Controle e MDA-shPar-4. (A) Western Blot a partir de 30ug do extrato proteico obtido das células MDA-MB-231 não transfectadas (parental), MDA-MB-231-Controle e MDA-MB-231-shPar-4. (B) Representação gráfica da razão dos valores densitométricos de Par-4 normalizado pela Actina e representação da expressão relativa de Par-4 determinada por PCR em tempo real.

4.1.1 A redução da expressão de Par-4 não promove alterações no ciclo celular, proliferação e migração das células MDA-MB-231

Em um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, células de adenocarcinoma mamário, MCF-7, representantes do subtipo molecular luminal A, foram transfectadas com vetor plasmidial contendo a sequência completa de Par-4. O aumento da expressão de Par-4 nas células MCF-7 alterou a taxa de proliferação das células *in vitro*, com uma redução significativa avaliada nos tempos de 24, 48 e 72 horas. As células MCF-7-Par-4 também apresentaram redução na expressão de ERK fosforilado, sugerindo dessa forma uma relação da via Ras/Raf/MEK/ERK com a restrição da proliferação. (PEREIRA et al., 2013).

Em nosso estudo investigamos se a supressão na expressão de Par-4 seria capaz de alterar o ciclo celular e o perfil proliferativo e migratório das células de tumor de mama, MDA-MB-231 em condições normais de crescimento. Para o ensaio de ciclo celular as células foram cultivadas em placas de 12 poços, sob as condições ideais de crescimento em cultura (atmosfera úmida, 37°C e 5% CO₂). Ao atingirem a confluência de 70%, as células foram coletadas e submetidas à marcação com Iodeto de Propídeo (PI) para então serem analisadas por citometria de fluxo (*Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer*). Para o ensaio de proliferação, utilizamos o kit comercial *CyQUANT® Direct Cell Proliferation Assay (Thermo Fisher Scientific)*, onde avaliamos alterações na proliferação celular em condições normais de ancoragem ao longo de 120 horas (5 dias). O kit contém dois componentes, um marcador fluorescente de ácidos nucleicos e um supressor de background, dessa forma, podemos avaliar diretamente o conteúdo de DNA das células e analisar com mais eficiência a taxa de replicação. Detalhes dos protocolos utilizados para a marcação com CyQuant e PI estão descritos nos itens 3.8 e 3.11, respectivamente do Material e Métodos. Em nossos resultados, a supressão da expressão de Par-4 não foi capaz de alterar significativamente o ciclo celular e também o perfil de proliferação das células MDA-MB-231 em comparação com as células controle (Figura 9).

Figura 8. A redução da expressão de Par-4 não promove alterações no ciclo celular e proliferação das células MDA-MB-231. (A) Representação gráfica da análise de ciclo celular das células MDA-MB-231-Control e das células MDA-MB-231-shPar-4. (B) Análise de proliferação das células shPar-4 em comparação ao controle, determinada por ensaio com CyQuant após 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Análise de ajuste de curva *curve fit* para regressão não linear.

Para avaliar o efeito da supressão de Par-4 na migração das células MDA-MB-231, utilizamos o ensaio de fechamento de ferida (*wound healing*). Para isso, as células foram cultivadas em placas de 12 poços até atingirem 100% de confluência. Nesse ponto, uma ferida vertical é gerada em cada poço com o auxílio de uma ponteira, onde então as células são desafiadas a migrarem para o ponto central da ferida com a intenção de fechá-la. A partir da hora zero do ensaio as células são incubadas com meio específico e carenciadas de SFB (1%), minimizando dessa forma, o efeito proliferativo das células no fechamento da ferida. As imagens foram adquiridas a cada 30 minutos, com o auxílio do microscópio Axiovert 200M - Carl Zeiss, e os pontos de 6, 12, 18 e 24

horas foram escolhidos para as análises comparativas. Decorrido o experimento, as células MDA-MB-231-shPar-4 não apresentaram diferença significativa na porcentagem de fechamento da ferida, quando comparadas as células controle (Figura 10).

Figura 9. Diminuição da expressão de Par-4 não altera a migração de células MDA-MB-231. A cima, fotomicrografias representativas das células controle versus shPar-4. A baixo, gráficos mostrando a porcentagem de fechamento da ferida após 6, 12, 18 e 24 horas entre células controle e shPar-4. Dados representam a média $\pm$ erro padrão para três experimentos independentes.

4.1.2 A expressão reduzida de Par-4 aumenta o potencial clonogênico das células MDA-MB-231

Em nosso estudo funcional do gene PAR-4, também avaliamos o efeito da supressão do gene no potencial clonogênico das células MDA-MB-231. Para avaliar esse efeito *in vitro*, utilizamos o ensaio de semeadura de células em baixa densidade.

Cerca de 1×10^3 células foram plaqueadas em placas de 6 poços e mantidas em cultura por 7 dias. Após o tempo de crescimento, as colônias foram coradas com cristal violeta e analisadas quanto a porcentagem de área coberta utilizando o software *ImageJ*. Após a quantificação da área, nas células MDA-MB-231-shPar-4 foi encontrado uma porcentagem de área coberta significativamente maior em comparação as células controle (Figura 11), representando um número maior de colônias formadas em resposta a supressão do gene PAR-4.

Figura 10. A redução de Par-4 aumenta a capacidade de células MDA-MB-231 em formar colônias. À esquerda, imagens representativas a partir de placas de 6 poços mostrando a análise da porcentagem de área coberta realizada pelo software *ImageJ-plugin "ColonyArea"* para as células MDA-MB-231 controle versus shPar-4. À direita, gráfico mostrando a porcentagem de área coberta, representando a quantidade de colônias formadas após 7 dias em cultura. Dados estão expressos como a média $\pm$ erro padrão da triplicata de três experimentos independentes. * $P < 0,05$ (teste t para amostras não pareadas).

4.1.3 A supressão de Par-4 altera a sensibilidade das células MDA-MB-231 ao tratamento com diferentes quimioterápicos

O Par-4 é caracterizado como um gene supressor tumoral, capaz de modular as vias envolvidas no processo de apoptose (HEBBAR; WANG; RANGNEKAR, 2012). Além disso, no estudo de 2013 do nosso grupo de pesquisa, dados consistentes foram apresentados mostrando que a expressão de PAR-4 aumenta a quimiossensibilidade das células MCF-7- ao tratamento com docetaxel (PEREIRA, 2013). Por esse motivo, investigamos se a supressão na expressão de Par-4 é capaz de alterar a resposta das células MDA-MB-231 frente a um estímulo apoptótico. Para o estímulo de morte, as

células foram expostas às concentrações de 5 e 100nM do quimioterápico docetaxel (TXT), por 24 horas e às concentrações de 30 e 500uM do quimioterápico 5-*Fluorouracil* (5-FU) por 72 horas. Após o tempo de tratamento, a morte celular das células foi avaliada por citometria de fluxo utilizando-se da marcação com Iodeto de propídeo (PI) para fase sub-G0/G1 do ciclo celular e a marcação com Anexina V-FITC/Iodeto de propídeo (PI) para detecção de morte celular por apoptose. Conforme o esperado, o tratamento com o TXT induziu um aumento na marcação de células em morte celular (sub-G0/G1) e na marcação de células em apoptose (Figura 12C). Entretanto, as células MDA-MB-231-shPar-4 apresentaram uma redução significativa na marcação de morte celular e apoptose quando comparadas as células controle. Importante neste momento, destacar o efeito clássico do docetaxel na parada do ciclo celular na fase G2/M tanto das células controle como das células shPar-4. A parada do ciclo celular representa a efetividade do tratamento com o docetaxel em ambas as linhagens. Entretanto, a expressão reduzida de Par-4 nas células MDA-MB-231-shPar-4 está aumentando à resistência das células a morte celular. No tratamento com 5-FU as células com redução de expressão de Par-4 apresentaram resposta semelhante de resistência ao tratamento com redução significativa de células em apoptose. No entanto, os resultados de morte celular por sub-G0/G1, apesar de apresentarem uma tendência de resistência nas células MDA-MB-231-shPar-4, não foram significativos (Figura 13C).

Adicionalmente, nós avaliamos a ativação de Caspase-7 nas células MDA-MB-231-shPar-4 em resposta ao tratamento com docetaxel, além de avaliar também a via extracelular de Par-4 pelos níveis de Par-4 secretado das células MDA-MB-231-shPar-4. Importante observar nesse momento que as concentrações utilizadas de TXT nesse experimento foram de 50 nM e 100 nM. Em nosso laboratório foram realizados alguns testes, com os quais foi possível definir que as células MDA-MB-231 respondem da mesma forma para ambas as concentrações (resultados não apresentados). Para a esses ensaios, avaliamos a expressão de Caspase-7 e Par-4 secretado nas células MDA-MB-231-Controle e MDA-MB-231-shPar-4 após o tratamento de 24 horas com TXT. Tanto o aumento de expressão de Caspase-7 como o aumento de secreção de Par-4 são notáveis nas células controle após o tratamento com TXT (Figura 14). Diferentemente, as células MDA-MB-231-shPar-4 não apresentam aumento nos níveis de Caspase-7 e de Par-4 secretado após o mesmo tempo de tratamento.

Figura 11. Efeito da supressão de Par-4 na morte celular e apoptose das células MDA-MB-231 em resposta ao tratamento com docetaxel. (A) Histogramas representativos das fases do ciclo celular das células MDA-MB-231-Control e MDA-MB-231-shPar-4 tratadas com veículo

(etanol) ou com as concentrações de 5 e 100nM de docetaxel por 24 horas. (B) *Dot Plot* representativos das células MDA-MB-231-Controle e MDA-MB-231-shPar-4 tratadas com veículo (etanol) ou com as concentrações de 5 e 100nM de docetaxel (TXT) por 24 horas. (C) Gráficos representativos da porcentagem de células em morte celular (esquerda -fase sub-G0/G1 do ciclo celular) e células em apoptose (direita) da linhagem MDA-MB-231-Controle versus a linhagem MDA-MB-231-shPar-4 tratadas com veículo (etanol) ou com as concentrações de 5 e 100nM de docetaxel por 24 horas. Os gráficos representam à média e desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$. Teste ANOVA de duas vias com correção de Bonferroni.

Figura 72. Efeito da supressão de Par-4 na morte celular e apoptose das células MDA-MB-231 em resposta ao tratamento com 5-FU. (A) Histogramas representativos das fases do ciclo celular das células MDA-MB-231-Control e MDA-MB-231-shPar-4 tratadas com veículo

(DMSO) ou com as concentrações de 30 e 500uM de 5-FU por 72 horas. (B) *Dot Plot* representativos das células MDA-MB-231-Controle e MDA-MB-231-shPar-4 tratadas com veículo (etanol) ou com as concentrações de 30 e 500uM de 5-FU por 72 horas. (C) Gráficos representativos da porcentagem de células em morte celular (esquerda -fase sub-G0/G1 do ciclo celular) e células em apoptose (direita) da linhagem MDA-MB-231-Controle versus a linhagem MDA-MB-231-shPar-4 tratadas com veículo (etanol) ou com as concentrações de 30 e 500uM de 5-FU por 72 horas. Os gráficos representam à média e desvio padrão de três experimentos independentes. * $p<0.05$ e *** $p<0.001$. Teste ANOVA de duas vias com correção de Bonferroni.

Figura 13. Redução na expressão de Par-4 altera a expressão de proteínas envolvidas em vias de apoptose e reduz a secreção de Par-4. (A) Western Blot de proteínas das células MDA-MB-231 transfectados com o vetor pRS-Controle (MDA-MB-231-Controle) e com o vetor shRNA para silenciamento de Par-4 (MDA-MB-231-shPar-4) após o tratamento de 24 horas com 50nM de TXT. Para o controle de massa utilizou-se do anticorpo anti-actina (Millipore). (B) Western Blot representativo da análise de Par-4 do sobrenadante de células controle e shPar-4 tratadas com 100nM de TXT por 24 horas.

4.1.4 Redução nos níveis de expressão de Par-4 altera o crescimento das células

MDA-MB-231 *in vivo*

Em nosso estudo, também investigamos a hipótese de que alterações nos níveis de expressão do gene PAR-4 podem alterar o crescimento de células tumorais de mama *in vivo*. Inicialmente, para testar a hipótese, desenvolvemos um ensaio piloto utilizando

2 animais Balb/c NUDE para cada grupo, controle e shPar-4. Para o ensaio, cada animal recebeu a inoculação de 5×10^6 células (1:1 meio/matrigel) no flanco esquerdo e então duas vezes por semana foram realizadas as medições dos tumores, além das observações em relação a qualquer sinal de desconforto dos animais. Em nosso experimento, os animais que receberam as células MDA-MB-231 com supressão de Par-4 desenvolveram os tumores mais rápido do que os animais que receberam as células controle (Figura 15A). A análise de imunohistoquímica dos tumores após o experimento confirmou que os tumores formados pelas células MDA-MB-231-shPar-4 permaneciam com a expressão reduzida da proteína após o seu desenvolvimento (Figura 15B).

Figura 14. A supressão do gene PAR-4 acelera o crescimento tumoral in vivo das células de câncer de mama, MDA-MB-231. (A) Células MDAMB-231-Controle e MDA-MB-231-shPar-4 (5×10^6 células/animal) foram injetadas subcutaneamente em animais fêmeas Balb/c NUDE a analisadas quanto a capacidade de formar tumor in vivo. (B) Marcação imunohistoquímica dos tumores com anticorpo Par-4 (coloração marrom indica células positivas), observados em microscópio de luz (10x, 20x e 40x). Em cima, os tumores formados por células MDA-MB-231-Controle, apresentando forte marcação positiva para o anticorpo Par-4. Em baixo, os tumores formados por células MDA-MB-231-shPar-4, apresentando a expressão reduzida da marcação para o anticorpo Par-4.

Com base nos resultados obtidos em nosso experimento piloto, um novo ensaio para analisar o efeito da supressão de Par-4 no crescimento tumoral *in vivo* foi realizado. Para esse novo experimento, separamos 4 animais Balb/c NUDE fêmeas (5 semanas de idade) para cada grupo (controle e shPar-4) e inoculamos 2×10^6 células no flanco esquerdo de cada animal. Inicialmente, tanto as células controle como as células com supressão de Par-4 parecem apresentar semelhanças na fase de latência. Entretanto, quando a fase exponencial de crescimento é atingida as células MDA-MB-231-shPar-4 crescem significativamente mais rápido do que as células controle (Figura 16). Nossos dados obtidos por esse experimento colaboram pela primeira vez com a hipótese de que a expressão de Par-4 pode modular o crescimento tumoral *in vivo* de células de câncer de mama MDA-MB-231.

Figura 15. Efeito da supressão do gene PAR-4 no crescimento tumoral *in vivo* das células de câncer de mama, MDA-MB-231. Células MDAMB-231-Controle (a cima) e MDA-MB-231-shPar-4 (a baixo) (2×10^6 células/animal) foram injetadas subcutâneamente em animais fêmeas Balb/c NUDE a analisadas quanto a capacidade de formar tumor *in vivo*.

5 DISCUSSÃO

O gene PAR-4, desde sua descoberta em 1994, tem sido alvo de um número significativo de estudos científicos. Ainda que sua identificação tenha ocorrido em meio à investigação de células de câncer, especificamente células de tumor de próstata, sua relação se estende para outras doenças, como no caso das doenças neurodegenerativas (CHAN et al., 1999; MATTSON et al., 1999; XIE, 2005). O desenvolvimento de estudos avaliando o papel de PAR-4 em câncer tem permitido estabelecer suas principais funções, propriedades e mecanismos de ação. Grande parte dos relatos sobre Par-4 envolve sua relação com o câncer de próstata, muito provavelmente devido ao seu pioneirismo na descoberta do gene. Entretanto, é possível encontrar estudos na literatura sobre Par-4 em diferentes tipos tumorais, como nos caso do carcinoma de células renais (COOK et al., 1999), neuroblastomas (KÖGEL et al., 2001) e leucemia linfoblástica aguda e crônica (BOEHRER et al., 2001). Em todos esses tumores a função supressora de Par-4 vem sendo bem estabelecida, o que o coloca como um potencial alvo terapêutico para essa classe de doença. Já a busca por “*Prostate Apoptosis Response-4*”+“*breast cancer*” no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) revela que menos de 10% do total de artigos publicados envolvem a investigação do gene nesse tipo tumoral. Dos artigos publicados, pouco se estabeleceu sobre os mecanismos de ação de Par-4 em câncer de mama. Por esse motivo, o principal objetivo desse trabalho foi investigar os mecanismos que envolvem a ação supressora de Par-4 em células de câncer de mama, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Em nossa investigação, a redução da expressão de Par-4 não alterou o ciclo celular, perfil proliferativo e a migração das células MDA-MB-231 em condições normais. Nossos dados obtidos de proliferação diferem dos resultados já descritos anteriormente encontrados nas células MCF-7, onde o aumento da expressão de Par-4 modulou a taxa de proliferação das células (PEREIRA et al., 2013). Entretanto, nesse ponto, é importante lembrar a distinta diferença entre as duas células, uma vez que ambas apresentam perfis moleculares diferentes que refletem em desigual comportamento biológico. Na literatura, alguns trabalhos investigaram a relação de Par-4 na proliferação de células de câncer. Em um estudo publicado por Franchitto em 2010, mostrou o envolvimento de Par-4 na proliferação de células tumorais HuH-28 e TFK-1. O silenciamento de Par-4 por siRNA nestas células induziu a proliferação celular e

também aumentou os níveis de expressão da proteína PCNA (*Proliferating cellular nuclear antigen*). Em outro estudo, a utilização de fibroblastos embriogênicos imortalizados (EFs) deficientes em Par-4 e com PTEN silenciado por shRNA apresentaram proliferação aumentada, demonstrando o efeito sinérgico da inibição destes dois supressores na ativação das vias de NF- κ B e Akt (FERNANDEZ-MARCOS et al., 2009).

Por definição, o potencial clonogênico de uma célula é conhecido como a habilidade celular de proliferar indefinidamente mantendo, todavia, o potencial replicativo de formar grandes colônias de células. Uma das formas de se avaliar esse potencial *in vitro* é através da semeadura das células em baixa densidade, o que testa a capacidade da célula em aderir e manter sua habilidade replicativa frente a essa condição de estresse aumentado. Entretanto, não são apenas as capacidades de aderir e replicar das células que pode influenciar sua sobrevivência e formação de colônias, outras características podem ser muito importantes nesse contexto, tais como, a malignidade, potencial de células tronco ou resistência à morte celular (FRANKEN et al., 2006; LORENZINI; MAIER, [s.d.]; SARMA; TAKEDA; YASEEN, 2010).

A capacidade de formar colônias a partir de células individuais após a supressão de Par-4 foi avaliada nas células MDA-MB-231. Após 7 dias de plaqueamento, as células MDA-MB-231-shPar-4 apresentaram um aumento significativo na porcentagem de área coberta, o que representa a quantidade de colônias formadas na placa. Pela primeira vez estamos observando em câncer de mama o efeito da expressão de Par-4 na capacidade das células tumorais em formar colônias. Na literatura, já é bem estabelecido que a expressão basal de Par-4 não é suficiente para induzir a apoptose em células normais, porém, acompanhado de outro estímulo apoptótico o Par-4 é capaz de levar à célula a morte. Em nossos resultados, estamos demonstrando que em condições de estresse aumentado (baixa densidade celular) a redução da expressão de Par-4 está aumentando a capacidade das células MDA-MB-231 em resistir à morte celular, o que ao final está influenciando na formação de colônias na placa. A habilidade de Par-4 em modular a capacidade de formação de colônias de células tumorais já vem sendo observado na literatura. Alguns estudos descrevem a capacidade de Par-4 em inibir a transformação celular induzida pela expressão de oncogenes, como por exemplo, o oncogenes da família Ras. O aumento de expressão de Par-4 em células de fibroblasto (NIH3T3) transformadas pela superexpressão do oncogenes Ras inibe

significativamente a capacidade de formação de colônias dessas células em cultura. O inverso também foi observado, uma vez que o silenciamento de Par-4 nas células NIH3T3-Ras aumentou a capacidade de formação de colônias dessa linhagem (BARRADAS et al., 1999; GOSWAMI et al., 2005; QIU et al., 1999). Os mesmos dados foram relatados em um estudo desenvolvido por Moreno-Bueno em 2007. O aumento de expressão de Par-4 em um painel de células de carcinoma endometrial reduziu drasticamente a capacidade de formação de colônias dessas células. E mais recentemente, um elegante trabalho publicado por Chen e colaboradores (2014) identificou a interação de Par-4 com uma ubiquitina ligase, chamada de Fbxo-45. Essa interação leva a ubiquitinação de Par-4 no citoplasma e consequente a sua degradação proteossomal. Nesse trabalho, os autores observaram que a degradação de Par-4 em resposta ao aumento da expressão de Fbxo-45 em células HeLa resultou no aumento da capacidade de formação de colônias das células. Essa ação direta de Par-4 na formação de colônias foi confirmada, uma vez que a restauração dos níveis de Par-4 reduziu novamente a capacidade das células HeLa na formação de colônias. Com base nos dados constatados na literatura, nossos resultados apoiam e demonstram pela primeira vez em câncer de mama a hipótese de que a expressão de Par-4 modula a capacidade de formação de colônia de células tumorais em cultura.

O envolvimento de Par-4 no processo de morte celular já é muito bem estabelecido na literatura, sendo essa sua principal função biológica (BURIKHANOV et al., 2013, 2014; GURUMURTHY; RANGNEKAR, 2004; RANGNEKAR, 1998; SELLS et al., 1997). Um dos grandes objetivos deste trabalho foi avaliar se a alteração na expressão de Par-4 seria capaz de modular a sensibilidade da resposta das células MDA-MB-231 frente a um estímulo apoptótico. Para estímulo apoptótico, nosso estudo utilizou dois quimioterápicos frequentemente utilizados na terapia de câncer de mama, docetaxel e *5-Fluorouracil* (5-FU). O docetaxel (Taxotere ou TXT) é um taxano estabilizador de microtúbulos utilizado na clínica para tratamento de pacientes com diversos tumores, entre eles, o câncer de mama, próstata e carcinoma de pequenas células do pulmão. Os Taxanos são as drogas anti-microtúbulos mais utilizadas na quimioterapia e incluem dois membros: docetaxel e paclitaxel. A apoptose é o principal mecanismo de morte que ocorre em resposta ao tratamento com o docetaxel (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). O 5-FU é um análogo de uracila com um átomo de flúor na posição C-5 substituindo um hidrogênio. Possui uma grande facilidade de entrar na célula por mecanismos de transporte e uma vez dentro da célula é convertido em uma série de metabólitos ativos. Esses metabólitos ativos são capazes de desregular a síntese de RNA e a ação da timidilato sintase (TS). De forma simplificada, a combinação desses fatores resulta no dano ao DNA, que ao final direciona a célula para a ativação de morte celular por apoptose (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003). Além disso, seu uso também é aprovado para o tratamento de câncer de mama, coloretal, câncer gástrico e pancreático (PAZDUR, 2014). Os diferentes tempos de tratamento e as concentrações utilizadas para cada droga em nosso estudo foram baseados em achados da literatura (HERNÁNDEZ-VARGAS; PALACIOS; MORENO-BUENO, 2007; LI et al., 2013; SHIOTA, 2013) e de posteriores testes em nosso laboratório. Observamos que o tratamento, tanto com o docetaxel, como o 5-FU foi capaz de induzir morte celular nas células MDA-MB-231. Interessantemente, a redução na expressão de Par-4 reduziu significativamente a sensibilidade das células MDAMB-231 em resposta aos tratamentos. Nossos dados obtidos nessa análise corroboram os resultados previamente publicados por nosso grupo em células de adenocarcinoma mamário MCF-7, nas quais a expressão de Par-4 aumentou a sensibilidade ao quimioterápico docetaxel (PEREIRA et al., 2013). Além do câncer de mama, diversos trabalhos tem buscado elucidar melhor a relação entre a expressão de Par-4 e a sensibilidade a diferentes tratamentos. Em 2014, Jagtap avaliou o papel de Par-4 na resposta a drogas quimioterápicas em células tronco tumorais. Nesse estudo, células HNGC-2 (linhagem estabelecida de glioblastoma multiforme) e uma linhagem primária G1, expressando marcadores de células tumorais, foram expostas a diversos agentes alquilantes, cujos efeitos são descritos sendo efetivos no tratamento de gliomas. Dentre os agentes utilizados, foram inclusos a lomustina, carmustina, UCN-01, oxaliplatina, temozolomida e tamoxifeno. Somente tamoxifeno induziu apoptose nas células estudadas, acompanhando um aumento de expressão de Par-4, o que sugere uma associação da proteína com a sensibilidade ao tratamento com tamoxifeno. Outro estudo avaliando a atividade da curcumina durante morte celular em células de glioma maligno mostrou que a curcumina exibia um efeito pro-autofágico potente nas células humanas de glioma maligno. O estudo também apresentou dados mostrando que o efeito pró-autofágico de curcumina ocorria via geração rápida de ROS, levando ao aumento de regulação de Par-4 (THAYYULLATHIL et al., 2014). Em um trabalho utilizando células de osteosarcoma MG63 e Saos-2, o grupo dirigido por

Notaro demonstrou que a combinação do tratamento de TRAIL com WIN (canabinóide sintético), induziu a apoptose nas células de osteosarcoma. A apoptose das células foi acompanhada pelo aumento de expressão de Par-4, sugerindo uma ação de Par-4 na indução de morte dessas células (NOTARO et al., 2014). Em 2005, o tratamento de células isoladas a partir de pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) com Imatinibe foi associado ao aumento de expressão de genes associados a apoptose, dentre eles o Par-4, o qual apresentou seus níveis aumentados em células responsivas ao tratamento (CHOW et al., 2005).

Devido ao envolvimento de Par-4 nas vias apoptóticas, em nossa investigação buscamos avaliar a expressão de proteínas relacionadas a apoptose nas células MDA-MB-231-shPar-4. Após o tratamento com TXT, as células controle apresentaram aumento na expressão de Caspase-7 ativada, confirmando a ativação da via apoptótica em resposta ao tratamento. Já os níveis de expressão de Caspase-7 nas células MDA-MB-231-shPar-4 permaneceram inalterados mesmo frente ao tratamento com TXT. Esses dados sugerem que a redução na sensibilidade ao tratamento das células MDA-MB-231 está ocorrendo devido à ausência de Par-4 e consequente inativação de vias apoptóticas. Além disso, devido ao fato de que o Par-4 pode ser secretado em células tumorais (BURIKHANOV et al., 2009), nós investigamos em nosso modelo se a ausência de detecção da proteína poderia estar ocorrendo devido ao aumento de secreção. Nesse ensaio, utilizamos o tratamento de TXT como indutor de estresse para ativar a secreção de Par-4 e coletamos o sobrenadante das células para as análises. Após 24 horas de tratamento com 100nM de TXT as células controles apresentaram um aumento nos níveis de Par-4 secretado, o que não foi observado nas células MDA-MB-231-shPar-4. Em 2009, o estudo publicado por Burikhanov demonstrou dados convincentes de que a proteína codificada pelo gene PAR-4 é secretada espontaneamente pelas células normais e tumorais de próstata em cultura e que o meio condicionado dessas células podem induzir a apoptose em células tumorais. Entretanto, até o momento não foram publicados dados demonstrando a secreção de Par-4 em células de câncer de mama. Nossos resultados obtidos nessa etapa são importantes tanto para garantir a ausência de Par-4 intracelular e extracelular nas células MDA-MB-231-shPar-4, como também para evidenciar pela primeira vez um possível efeito da secreção de Par-4 na indução de apoptose nas células MDA-MB-231.

Em nosso estudo funcional, investigamos o efeito da expressão reduzida de Par-4 no crescimento *in vivo* das células MDA-MB-231. Nosso estudo piloto revelou uma diferença significativa no crescimento das células MDA-MB-231-shPar-4 quando comparadas as células controle. Os tumores formados pelas células MDA-MB-231-shPar-4 atingiram a medida de 150 mm³ cerca de 30 dias antes das células controle. As análises de imunohistoquímica dos tumores retirados após o crescimento não revelaram diferenças estruturais entre os tecidos formados por células shPar-4 e células controle. Entretanto, utilizando um anticorpo específico para Par-4 foi possível confirmar a redução da expressão de Par-4 nos tumores formados por células MDA-MB-231-shPar-4. O efeito supressor de Par-4 em modelos *in vivo* vem sendo explorado e comprovado há alguns anos em diferentes trabalhos publicados na literatura (GARCÍA-CAO et al., 2005; KLINE et al., 2009; ZHAO et al., 2007, 2011). Em câncer de mama, apesar de preliminares nossos dados colaboram com a hipótese de que a expressão de Par-4 pode modular o crescimento tumoral *in vivo* de células MDA-MB-231.

6 CONCLUSÕES

A redução da expressão de Par-4 promove um aumento na capacidade das células MDA-MB-231 de formar colônias *in vitro*, além de reduzir a sensibilidade de resposta das células ao tratamento com os quimioterápicos docetaxel e 5-Fluorouracil. Nossos dados também indicam que a expressão de Par-4 pode modular o crescimento das células MDA-MB-231 *in vivo*. Esses achados colaboram com o papel supressor de Par-4 já descrito na literatura e confirmam sua ação supressora em diferentes linhagens de câncer de mama.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, n. 9, p. 1324–37, 26 fev. 2007.
- AHN, S. G. et al. Breast Cancer Molecular Classification of Triple-Negative Breast Cancer. v. 19, n. 3, p. 223–230, 2016.
- ALLEN, M.; LOUISE JONES, J. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. **The Journal of pathology**, v. 223, n. 2, p. 162–76, jan. 2011.
- ANTONIOU, A. C.; EASTON, D. F. Models of genetic susceptibility to breast cancer. **Oncogene**, p. 5898–5905, 2006.
- BALLARD, O. Human Milk Composition Nutrients and Bioactive Factors. **Pediatric Clinics of NA**, v. 60, n. 1, p. 49–74, 2013.
- BARRADAS, M. et al. The downregulation of the pro-apoptotic protein Par-4 is critical for Ras-induced survival and tumor progression. **The EMBO journal**, v. 18, n. 22, p. 6362–9, 15 nov. 1999.
- BOEHRER, S. et al. Deregulated expression of prostate apoptosis response gene-4 in less differentiated lymphocytes and inverse expressional patterns of par-4 and bcl-2 in acute lymphocytic leukemia. **The hematology journal: the official journal of the European Haematology Association / EHA**, v. 2, n. 2, p. 103–7, jan. 2001.
- BONILLA, C. et al. Prostate Cancer Susceptibility Loci Identified on Chromosome 12 in African Americans. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. 2–7, 2011.
- BRISKEN, C.; MALLEY, B. O. Hormone Action in the Mammary Gland. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, p. 1–16, 2010.
- BURIKHANOV, R. et al. The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis. **Cell**, v. 138, n. 2, p. 377–88, 23 jul. 2009.
- BURIKHANOV, R. et al. Novel Mechanism of Apoptosis Resistance in Cancer Mediated by Extracellular PAR-4. **Cancer research**, n. December, p. 1867–1874, 10 jan. 2013.
- BURIKHANOV, R. et al. Paracrine Apoptotic Effect of p53 Mediated by Tumor Suppressor Par-4. **Cell reports**, v. 6, n. 2, p. 271–277, 7 jan. 2014.
- CAILLEAU, R.; OLIVE, M.; CRUCIGER, Q. V. J. Long-Term Human Breast Carcinoma Cell Lines Of Metastatic Origin: Preliminary Characterization Relda Cailleau, Matilde Olive, And Quita V. J. Cruciger. **In Vitro**, Department of Medicine, M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute, Houston, Texas 77030. v. 14, n. 11, p. 3–7, 1978.
- CANCER, T.; ATLAS, G. HHS Public Access. v. 490, n. 7418, p. 61–70, 2013.
- CASOLARI, D. A et al. Insulin-like growth factor-1 and 17 β -estradiol down-regulate prostate apoptosis response-4 expression in MCF-7 breast cancer cells. **International journal of molecular medicine**, v. 28, n. 3, p. 337–42, set. 2011.

- CHAN, S. L. et al. Prostate apoptosis response-4 mediates trophic factor withdrawal-induced apoptosis of hippocampal neurons: actions prior to mitochondrial dysfunction and caspase activation. **Journal of neurochemistry**, v. 73, n. 2, p. 502–12, ago. 1999.
- CHEN, X. et al. Fbxo45-mediated degradation of the tumor-suppressor Par-4 regulates cancer cell survival. **Cell Death and Differentiation**, v. 21, n. 10, p. 1535–1545, 2014.
- CHOW, K. U. et al. Imatinib induces apoptosis in CLL lymphocytes with high expression of Par-4. **Leukemia**, v. 19, n. 6, p. 1103–5; author reply 1105–6; discussion 1106–7, jun. 2005.
- CHUNG, H. et al. IGF-I inhibition of apoptosis is associated with decreased expression of prostate apoptosis response-4. **The Journal of endocrinology**, v. 194, n. 1, p. 77–85, jul. 2007.
- COLDITZ, G. A; BOHLKE, K. Preventing breast cancer now by acting on what we already know. **npj Breast Cancer**, v. 1, n. April, p. 15009, 2015.
- COLITTI, M. BCL-2 family of proteins and mammary cellular fate. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 41, n. 4, p. 237–47, ago. 2012.
- COOK, J. et al. Decreased expression of the pro-apoptotic protein Par-4 in renal cell carcinoma. **Oncogene**, v. 18, n. 5, p. 1205–8, 4 fev. 1999.
- CURTIS, C. et al. Europe PMC Funders Group. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 346–352, 2012.
- DA SILVA, J. A. G. **Estimativa, 2016. Incidência de Câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.
- DE BARROS, A.; LEITE, K. Classificação molecular dos carcinomas de mama : uma visão contemporânea. **Rev Bras Mastologia**. 2015;25(4):146-55, 2015.
- DE JONG, J. S.; VAN DIEST, P. J.; BAAK, J. P. Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. **British journal of cancer**, v. 82, n. 2, p. 368–73, 2000.
- DE THONEL, A et al. Regulation of the proapoptotic functions of prostate apoptosis response-4 (Par-4) by casein kinase 2 in prostate cancer cells. **Cell death & disease**, v. 5, p. e1016, jan. 2014.
- DONNINGER, H. et al. The Ras effector RASSF2 controls the PAR-4 tumor suppressor. **Molecular and cellular biology**, v. 30, n. 11, p. 2608–20, jun. 2010.
- DU, W. W. et al. The microRNA miR-17-3p inhibits mouse cardiac fibroblast senescence by targeting Par4. **Journal of cell science**, v. 128, n. 2, p. 293–304, 2015.
- EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161–74, mar. 2002.
- EL-GUENDY, N. et al. Identification of a Unique Core Domain of Par-4 Sufficient for Selective Apoptosis Induction in Cancer Cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 16, p. 5516–5525, 2003a.

EL-GUENDY, N. et al. Identification of a Unique Core Domain of Par-4 Sufficient for Selective Apoptosis Induction in Cancer Cells Identification of a Unique Core Domain of Par-4 Sufficient for Selective Apoptosis Induction in Cancer Cells. **Molecular and Cellular Biology**, 2003b.

EL-GUENDY, N.; RANGNEKAR, V. M. Apoptosis by Par-4 in cancer and neurodegenerative diseases. **Experimental cell research**, v. 283, n. 1, p. 51–66, 1 fev. 2003.

FACTS, C. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2017. Atlanta: **American Cancer Society**; 2017.

FARIAS, R. Avaliação da apoptose no carcinoma ductal infiltrante da mama: associação com graus histológicos e fatores prognósticos Assessment of apoptosis in breast cancer : association with Avaliação da apoptose no carcinoma ductal infiltrante da mama : associação . n. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2005; 51(3): 209-218. October, 2015.

FATA, J. E.; WERB, Z.; BISSELL, M. J. Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. **Breast cancer research : BCR**, v. 6, n. 1, p. 1–11, jan. 2004.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–86, 2014.

FERNANDEZ-MARCOS, P. J. et al. Simultaneous inactivation of Par-4 and PTEN in vivo leads to synergistic NF- B activation and invasive. **PNAS**, p. 4–9, 2009.

FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat Protoc**. v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.

GALLUZZI, L. et al. Non-apoptotic functions of apoptosis-regulatory proteins. **EMBO reports**, v. 13, n. 4, p. 322–30, abr. 2012.

GARCÍA-CAO, I. et al. Tumour-suppression activity of the proapoptotic regulator Par4. **EMBO reports**, v. 6, n. 6, p. 577–83, jun. 2005.

GASS, M. et al. Breast Cancer after Use of Estrogen plus Progestin in Postmenopausal Women. **N Engl J Med**, p. 573–587, 2009.

GOSWAMI, A. et al. Binding and phosphorylation of par-4 by akt is essential for cancer cell survival. **Molecular cell**, v. 20, n. 1, p. 33–44, 7 out. 2005.

GURUMURTHY, S. et al. Phosphorylation of Par-4 by Protein Kinase A Is Critical for Apoptosis Phosphorylation of Par-4 by Protein Kinase A Is Critical for Apoptosis. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 3, 2005.

GURUMURTHY, S.; GOSWAMI, A.; VASUDEVAN, K. M. Phosphorylation of Par-4 by Protein Kinase A Is Critical for Apoptosis. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 3, p. 1146–1161, 2005.

GURUMURTHY, S.; RANGNEKAR, V. M. Par-4 inducible apoptosis in prostate cancer cells. **Journal of cellular biochemistry**, v. 91, n. 3, p. 504–12, 15 fev. 2004.

HAMILTON, N. et al. Biologic Roles of Estrogen Receptor- γ and Insulin-Like Growth Factor-2 in Triple-Negative Breast Cancer. **Biomed Res Int.** v. 2015, 2015.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.

HANSEN, R. K.; BISSELL, M. J. Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones. **Endocrine-related cancer**, v. 7, n. 2, p. 95–113, jun. 2000.

HEBBAR, N.; WANG, C.; RANGNEKAR, V. M. Mechanisms of apoptosis by the tumor suppressor Par-4. **Journal of cellular physiology**, v. 227, n. 12, p. 3715–21, dez. 2012.

HELDRING, N. et al. Estrogen Receptors : How Do They Signal and What Are Their Targets. **Physiol Rev.** p. 905–931, 2007.

HERNÁNDEZ-VARGAS, H.; PALACIOS, J.; MORENO-BUENO, G. Molecular profiling of docetaxel cytotoxicity in breast cancer cells: uncoupling of aberrant mitosis and apoptosis. **Oncogene**, v. 26, n. 20, p. 2902–2913, 2007.

HOLLIDAY, D. L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast cancer research : BCR**, v. 13, n. 4, p. 215, 2011.

HU, Z. et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. **BMC Genomics**, v. 12, p. 1–12, 2006.

HYNES, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science (New York, N.Y.)**, v. 326, n. 5957, p. 1216–9, 27 nov. 2009.

INMAN, J. L. et al. Mammary gland development : cell fate specification , stem cells and the microenvironment. **Development**. v. 2, p. 1028–1042, 2015.

JAGTAP, J. C. et al. Expression and regulation of prostate apoptosis response-4 (Par-4) in human glioma stem cells in drug-induced apoptosis. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e88505, 2014.

JINKA, R. et al. Alterations in Cell-Extracellular Matrix Interactions during Progression of Cancers. **International journal of cell biology**, v. 2012, p. 219196, jan. 2012.

JOHNSTONE, R. W. et al. Mapping of the human PAWR (par-4) gene to chromosome 12q21. **Genomics**, v. 53, n. 2, p. 241–243, 1998.

KERLIKOWSKE, K. et al. Declines in Invasive Breast Cancer and Use of Postmenopausal Hormone Therapy in a Screening Mammography Population. **J Natl Cancer Inst.** p. 1335–1339, 2003.

KHAMIS, Z. I.; SAHAB, Z. J.; SANG, Q.-X. A. Active roles of tumor stroma in breast cancer metastasis. **International journal of breast cancer**, v. 2012, p. 574025, jan. 2012.

KIMURA, M. et al. Identification of Two Common Regions of Allelic Loss in Chromosome Arm 12q in Human Pancreatic Cancer Identification of Two Common Regions of Allelic Loss in Chromosome Arm 12q in. **Cancer Res.** p. 2456–2460, 1998.

KLIN, C. L. et al. Delivery of PAR-4 plasmid in vivo via nanoliposomes sensitizes colon tumor cells subcutaneously implanted into nude mice to 5-FU. **Cancer biology & therapy**, v. 8, n. 19, p. 1831–7, out. 2009.

KÖGEL, D. et al. Dlk/ZIP kinase-induced apoptosis in human medulloblastoma cells: requirement of the mitochondrial apoptosis pathway. **British journal of cancer**, v. 85, n. 11, p. 1801–8, 30 nov. 2001.

LI, X. et al. 53BP1 Sensitizes Breast Cancer Cells to 5-Fluorouracil. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. 1–9, 2013.

LIANG, J.; SHANG, Y. Estrogen and cancer. **Annual review of physiology**, v. 75, p. 225–40, jan. 2013.

LIU, Y. et al. Evidence of involvement of the human Par-4 (PAWR) gene in major depressive disorder. **World J Biol Psychiatry**, v. 4, n. 201, p. 288–295, 2011.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil : Mechanisms Of Action And Clinical Strategies. **Nature**, v. 3, n. May, p. 330–338, 2003.

LORENZINI, A.; MAIER, A. B. Influence of Donor Age and Species Longevity on Replicative Cellular Senescence. **Springer**, 2016.

LOWE, S. W.; CEPERO, E.; EVAN, G. Intrinsic tumour suppression. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 307–15, 18 nov. 2004.

LU, P. et al. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 12, dez. 2011.

LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. **The Journal of cell biology**, v. 196, n. 4, p. 395–406, 20 fev. 2012.

MALLER, O.; MARTINSON, H.; SCHEDIN, P. Extracellular matrix composition reveals complex and dynamic stromal-epithelial interactions in the mammary gland. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 15, n. 3, p. 301–18, set. 2010.

MATTSON, M. P. et al. Mark P. Mattson,* Wenzhen Duan, Sic L. Chan, and Simonetta Camandola. Review. Par-4: An Emerging Pivotal Player in Neuronal Apoptosis and Neurodegenerative Disorders. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 13, p. 17–30, 1999.

MERKLE, D.; HOFFMANN, R. Roles of cAMP and cAMP-dependent protein kinase in the progression of prostate cancer: cross-talk with the androgen receptor. **Cellular signalling**, v. 23, n. 3, p. 507–15, mar. 2011.

MORENO-BUENO, G. et al. Inactivation of the Candidate Tumor Suppressor Par-4 in Endometrial Cancer. **Molecular Biology, Pathobiology, and Genetics**, n. 21, p. 1927–1935, 2007.

MUCCI, L. A. et al. The Heritability of Breast Cancer among Women in the Nordic Twin Study of Cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** n. 8, p. 145–151, 2016.

NAGAI, M. A. et al. Down-regulation of the candidate tumor suppressor gene PAR-4 is associated with poor prognosis in breast cancer. **Int J Oncol.** p. 41–49, 2010.

- NAGAI, M. A.; BRENTANI, M. M. Gene Expression Profiles in Breast Cancer to Identify Estrogen Receptor Target Genes. **Medicinal Chemistry**, p. 448–454, 2008.
- NELSON, H. et al. Risk Factors for Breast Cancer for Women Aged 40 to 49 Years. **Ann Intern Med**. 2012.
- NEVE, R. M. et al. NIH Public Access. v. 10, n. 6, p. 515–527, 2009.
- NIELSEN, F. C.; HANSEN, T. V. O.; SØRENSEN, C. S. Hereditary breast and ovarian cancer : new genes in confined pathways. **Nature Publishing Group**, v. 16, n. 9, p. 599–612, 2016.
- NISHIMURA, R. et al. Apoptosis in breast cancer and its relationship to clinicopathological characteristics and prognosis. **J Surg Oncol**, v. 71, n. 4, p. 226–234, 1999.
- NOTARO, A. et al. Involvement of PAR-4 in Cannabinoid-Dependent Sensitization of Osteosarcoma Cells to TRAIL-Induced Apoptosis. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 5, p. 466–478, 2014.
- PEREIRA, M. C. et al. Prostate apoptosis response-4 is involved in the apoptosis response to docetaxel in MCF-7 breast cancer cells. **International journal of oncology**, v. 43, n. 2, p. 531–8, ago. 2013.
- PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–52, 17 ago. 2000.
- PLACE, A. E.; JIN HUH, S.; POLYAK, K. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. **Breast cancer research : BCR**, v. 13, n. 6, p. 227, jan. 2011.
- POLYAK, K.; KALLURI, R. The Role of the Microenvironment in Mammary. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2010.
- PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Res**. 2010.
- PRICE, J. E. et al. Tumorigenicity and Metastasis Mice1 of Human Breast Carcinoma Cell Lines in Nude. **Cancer Res**. p. 717–721, 1990.
- QIU, S. G. et al. Negative regulation of Par-4 by oncogenic Ras is essential for cellular transformation. **Oncogene**, v. 18, n. 50, p. 7115–23, 25 nov. 1999.
- RANGNEKAR, V. M. **Apoptosis mediated by a novel leucine zipper protein Par-4.pdf**, 1998.
- RANGNEKAR, V. M.; SHRESTHA-BHATTARAI, T.; RANGNEKAR, V. M. Cancer-selective apoptotic effects of extracellular and intracellular Par-4. **Oncogene**, v. 29, n. 27, p. 3873–80, 8 jul. 2010.
- REILLY, G. C.; ENGLER, A. J. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. **Journal of biomechanics**, v. 43, n. 1, p. 55–62, 5 jan. 2010.
- RUDOLPH, A.; CHANG-CLAUDE, J.; SCHMIDT, M. K. Gene – environment interaction and risk of breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 114, n. 2, p. 125–

133, 2016.

SARMA, N. J.; TAKEDA, A.; YASEEN, N. R. Colony Forming Cell (CFC) Assay for Human Hematopoietic Cells. **J Vis Exp.** n. December, p. 2–7, 2010.

SCHNEIDER, B. G. et al. Regions of allelic imbalance in the distal portion of chromosome 12q in gastric cancer. **Molecular pathology : MP**, v. 56, n. 3, p. 141–149, 2003.

SELLS, S. F. et al. Commonality of Apoptosis of the Gene Programs in Androgen-dependent Prostate Cells1 Induced and by Effectors. **Cell Growth Differ.** v. 5, n. April, p. 457–466, 1994.

SELLS, S. F. et al. Expression and function of the leucine zipper protein Par-4 in apoptosis. **Molecular and cellular biology**, v. 17, n. 7, p. 3823–32, jul. 1997.

SHIOTA, M. Establishment of a 5-fluorouracil-resistant triple-negative breast cancer cell line. **International Journal of Oncology**, p. 1985–1991, 2013.

SHIOVITZ, S.; KORDE, L. A. reviews 59. n. i, p. 1164–1168, 2015.

SIMSTEIN, R. et al. Experimental Biology and Medicine Cancer : Insights From the MCF-7 Cell. 2008.

SØRLIE, T. et al. 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**, v. 98, n. 19, p. 10869–74, 11 set. 2001.

SØRLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **PNAS**, v. 100, n. 14, p. 8418–8423, 2003.

THAYYULLATHIL, F. et al. Caspase-3 mediated release of SAC domain containing fragment from Par-4 is necessary for the sphingosine-induced apoptosis in Jurkat cells. **Journal of molecular signaling**, v. 8, n. 1, p. 2, jan. 2013.

THAYYULLATHIL, F. et al. ROS-dependent prostate apoptosis response-4 (Par-4) up-regulation and ceramide generation are the prime signaling events associated with curcumin-induced autophagic cell death in human malignant glioma. **FEBS open bio**, v. 4, p. 763–76, 2014.

ÜBERSICHTSARBEIT, R. A.; SCHMIDT-POKRZYWNIAK, A. K. A. Breast Care Established and Suspected Risk Factors in Breast Cancer Aetiology. **Breast Care (Basel)** p. 82–87, 2009.

VUONG, D. et al. Molecular classification of breast cancer. p. 1–14, 2014.

WANG, R. et al. Protein Kinase C Regulates Fas (CD95/APO-1) Expression. **J Immunol.** 1998.

WANG, R.-A. et al. Resistance to apoptosis should not be taken as a hallmark of cancer. **Chinese journal of cancer**, v. 33, n. 2, p. 47–50, 2014.

WERNER, H.; BRUCHIM, I. IGF-1 and BRCA1 signalling pathways in familial cancer. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 12, p. e537–e544, dez. 2012.

WONG, R. S. Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, v. 30, n. 1, p. 87, jan. 2011.

XIE, J. PAR-4 Is Involved in Regulation of Secretase Cleavage of the Alzheimer Amyloid Precursor Protein. **J Biol Chem**. v. 280, n. 14, p. 13824–13832, 2005.

ZARDAVAS, D. et al. heterogeneity. **Nature Publishing Group**, v. 12, n. 7, p. 381–394, 2015.

ZHAO, Y. et al. Cancer resistance in transgenic mice expressing the SAC module of Par-4. **Cancer research**, v. 67, n. 19, p. 9276–85, 1 out. 2007.

ZHAO, Y. et al. Systemic Par-4 inhibits non-autochthonous tumor growth. **Cancer Biology & Therapy**, v. 12, n. 2, p. 152–157, 15 jul. 2011.

ZHAO, Y.; RANGNEKAR, V. M. Apoptosis and tumor resistance conferred by Par-4. **Cancer Biol Ther**. n. December, p. 1867–1874, 2008.

ANEXOS

ANEXO A - Termo de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

APROVAÇÃO

O Coordenador da CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **03.10.2013**, após atendimento a diligência encaminhada **APROVOU *ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº **320/13** intitulado: **"Papel da expressão celular e extracelular do Par-4 na formação tumoral e sensibilidade a droga" que utilizará 80 camundongos**, apresentado pelo **Departamento de RADIOLOGIA E ONCOLOGIA**.

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

Pesquisador (a) Responsável: Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai

Pesquisador (a) Executante: Lourival Antunes de Oliveira Filho

CEP-FMUSP, 03 de Outubro de 2013.

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

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