UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

ANA CAROLINA PAVANELLI

Avaliação do transcriptoma e proteoma de células de câncer de mama com
diferente perfil de expressão de SPARC (*secreted protein acidic and rich in
cysteine*) na presença e ausência de docetaxel

São Paulo

2014

ANA CAROLINA PAVANELLI

Avaliação do transcriptoma e proteoma de células de câncer de mama com diferente perfil de expressão de SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*) na presença e ausência de docetaxel

Dissertação apresentada para a Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de mestre em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai

São Paulo

2014

Versão Corrigida

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pavanelli, Ana Carolina

Avaliação do transcriptoma e proteoma de células de câncer de mama com diferente perfil de expressão de SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*) na presença e ausência de docetaxel / Ana Carolina Pavanelli. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Oncologia.

Orientadora: Maria Aparecida Nagai.

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Proteína SPARC humana 3.Expressão gênica 4.Análise de sequência com séries de oligonucleotídeos 5.Quimiossensibilidade 6.Proteômica 7.Docetaxel

USP/FM/DBD-460/14

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: PAVANELLI, Ana Carolina

Título: Avaliação do transcriptoma e proteoma de células de câncer de mama com diferente perfil de expressão de SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*) na presença e ausência de docetaxel

Dissertação apresentada para a Faculdade
de Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de mestre em
Ciências

Programa de Oncologia

Aprovado em: _____ de _____ de _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. : _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho

Primeiramente a **Deus**, pois sem a presença Dele em minha vida, nada seria possível

Aos meus pais **Roberto e Néia** e ao meu irmão **Roberto Filho**, que são exemplo de luta, coragem e superação, me ensinaram que família é a base de tudo na vida, honestidade em primeiro lugar e humildade para enfrentar os problemas. Amo vocês!

Ao meu marido **Fabio**, que esteve presente em todos os momentos e nunca deixou faltar uma palavra de apoio, carinho e pela compreensão nestes anos de muita luta, eu amo muito você.

Obrigada a minha família que nunca me deixou desistir!

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a **Prof^a. Dra. Maria Aparecida Nagai** pela oportunidade, orientação e principalmente em tentar resolver os problemas existenciais nesta jornada

À **Dra. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay** pelas análises dos experimentos de proteômica

Ao **Prof. Dr. André Luiz Vettore de Oliveira** e **Fernando Zamunér** por terem me recebido no laboratório de Biologia Molecular do Câncer (UNIFESP) e me ajudarem com os experimentos de cDNA Microarray

Ao **Dr. Yuri Moreira** pelo apoio nas análises de cDNA Microarray

À **Dra. Flavia Regina Rotea Mangone** por todo seu apoio, que foi essencial para a realização desta dissertação. Amiga para todas as horas, e que sempre tem uma palavra confortante para enxergar as inúmeras dificuldades de forma mais divertida

À **Dra. Simone Aparecida de Bessa Garcia** que teve uma participação especial em minha jornada no laboratório. Inúmeras discussões científicas e pessoais, almoços inesquecíveis, uma amiga para sempre

À **Dra. Elisabete Cristina Miracca**, que por muitas vezes entendeu a minha ausência no Centro de Sequenciamento e me apoiou sempre que precisei

As amigas do laboratório da Genética Molecular e para a vida, **Natalia, Naieli, Aline, Maira, Irina, Paulo**, obrigada pelo apoio nas horas em que mais precisei. Um agradecimento especial ao amigo **Lourival**, que me aturou nas inúmeras análises de citometria. A minha amiga do coração, **Dra. Michelly**, que também contribuiu muito para a realização deste trabalho, e mesmo longe, o coração estava presente.

À minha amiga **Dra. Mariana Lopes dos Santos Curcio**, que me inseriu no mundo da ciência, e me apresentou a vida acadêmica e me ensinou que tudo na vida vale a pena. Muito obrigada Mari!

Ao **todos os integrantes da equipe do CTO** que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho

A **FAPESP** pelo apoio financeiro concedido no período de execução deste projeto

**“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o
que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o
que era antes”**

(Marthin Luther King)

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

Referência: adaptado de *International Commities of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Bibiloteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª edição. São Paulo: Serviço de Biblioteca e documentação, 2011

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

RESUMO

Pavanelli AC. *Avaliação do transcriptoma e proteoma de células de câncer de mama com diferente perfil de expressão de SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) na presença e ausência de docetaxel* Dissertação São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014

O gene *SPARC* (*secreted protein, acidic, cysteine-rich*; também denominado de Osteonectina; BM-40) codifica uma proteína de 42kDa, membro de uma família de proteínas matricelular, que interagem com receptores de superfície celular, fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular (ECM). *SPARC* desempenha importante papel no remodelamento de tecidos, migração celular, angiogênese, desenvolvimento embrionário, tumorigênese e quimiosensibilidade. O Docetaxel é um agente anti-microtúbulo pertencente à classe dos taxanos, sendo utilizado como uma droga quimioterápica eficaz para o tratamento do câncer de mama avançado. No entanto, é considerável o número de pacientes que não respondem ou adquirem resistência ao tratamento com os taxanos. Os mecanismos envolvidos na resistência ao docetaxel ainda não estão completamente estabelecidos. Em um estudo prévio de nosso grupo, identificamos os transcritos do gene *SPARC* como diferencialmente expressos em células epiteliais mamárias expressando diferentes níveis de HER-2. No presente estudo, nós avaliamos o efeito da expressão do *SPARC* na sensibilidade de células de câncer de mama ao Docetaxel. As células MCF-7 foram transfectadas com o vetor de expressão pCMV6-*SPARC* ou pCMV6-Neo. PCR em tempo real, western blot e imunofluorescência foram utilizados para caracterizar os clones de células com expressão de *SPARC*. A taxa proliferativa não foi alterada de forma significativa pela expressão de *SPARC*. No entanto, observou-se um aumento da sensibilidade ao docetaxel em células MCF7 expressando *SPARC* em comparação com as células MCF7 controle sem expressão de *SPARC*, indicando que a expressão de *SPARC* tem propriedades de aumentar a quimiosensibilidade em células de câncer de mama. Utilizamos a técnica de cDNA microarray, para avaliar o perfil de expressão de células MCF7 com expressão de *SPARC* em comparação com células MCF7 sem expressão de *SPARC* antes e após tratamento com docetaxel 5nM e 100nM por 24h. Identificamos diversos genes potencialmente envolvidos na quimiosensibilidade ao docetaxel mediada por *SPARC*. Setenta genes mais diferencialmente expressos (expressão aumentada ou reduzida) foram selecionados a partir dos diferentes tratamentos e várias redes moleculares foram identificadas utilizando o Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Após anotação gênica seis genes, *SPANXA1*, *ALDH1A3*, *TPM4*, *TARP*, *XAF1*, e *WNT5A* foram selecionados e validados por qPCR. Utilizando análise proteômica quantitativa livre de marcação avaliamos ainda a ocorrência de alterações proteômicas na comparação das células MCF-7 com super-expressão de *SPARC* antes e após tratamento com docetaxel. Entre as redes de interação molecular, a via de remodelamento de citoesqueleto foi a via mais abundante observada na comparação entre as células MCF-7 com expressão de *SPARC* e as células controle sem expressão de *SPARC* antes do tratamento com docetaxel; e a via do metabolismo de GTP foi a via mais abundante observada na comparação entre as células MCF7 com expressão de *SPARC* e as células controle sem expressão de *SPARC* após tratamento com docetaxel. Na integração dos dados de transcriptoma e proteoma identificamos quarenta genes diferencialmente expressos pelas duas abordagens, sendo a via WNT representada entre eles. Nossos resultados sugerem que a expressão *SPARC* pode influenciar a quimiosensibilidade ao Docetaxel em células MCF-7, modulando genes envolvidos em

diversos processos biológicos que podem estar relacionados com a sensibilidade a drogas.

Descritores: Neoplasias da mama, Proteína SPARC humana, Expressão gênica, Análise de sequência com séries de oligonucleotídeos, Proteômica, Quimiossensibilidade, Docetaxel

ABSTRACT

Pavanelli AC. *Transcriptome and proteome evaluation of breast cancer cells with different profile of SPARC expression (secreted protein acidic and rich in cysteine) in the presence and absence of docetaxel* Dissertação São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014

The *SPARC* (secreted protein, acidic, cysteine-rich) gene encodes a 42kDa protein that belongs to a family of matricellular proteins, which interact with cell-surface receptors, growth factors and the ECM (extracellular matrix) components. *SPARC* plays a role in tissue remodeling, cell migration, angiogenesis, embryonic development, tumorigenesis and chemiosensitivity. Docetaxel, which is an antimicrotubulin agent, is an effective chemotherapeutic drug for the treatment of advanced breast cancer. However, a considerable proportion of breast cancer patients do not respond positively to docetaxel. The mechanisms of docetaxel resistance are poorly understood. In a previous study, we identified *SPARC* as differentially expressed in mammary epithelial cells expressing different levels of HER-2. In the present study, we evaluate the effects of *SPARC* over-expression on the sensitivity of breast cancer cells to docetaxel. MCF7 cells were transfected with the expression vector pCMV6-*SPARC* or pCMV6-Neo. Real time PCR, western blot and immunofluorescence were used to characterize the clones over-expressing *SPARC*. Proliferation was not significantly affected by *SPARC* over-expression. However, we observed an increased sensitivity to docetaxel when comparing the MCF7 control cells with the MCF7 cells overexpressing *SPARC*, indicating that *SPARC* expression has chemosensitive properties in breast cancer cells. We used cDNA microarray to evaluate the expression profile of MCF7 cells with *SPARC* overexpression in comparison with MCF7 control cells before and after docetaxel treatment for 24h. We have identified several differentially expressed genes potentially involved in *SPARC*-mediated chemosensitivity to docetaxel. Seventy of the highly expressed genes were selected from all treatments and *several molecular networks were identified using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA)*. After manual annotation, six genes, *SPANXA1*, *ALDH1A3*, *TPM4*, *TARP*, *XAF1*, and *WNT5A*, potentially associated with *SPARC* mediated chemiosensitivity were selected and validated by qPCR. Using *label-free* approach for quantitative proteomic analysis, we further evaluated the proteomic changes in the comparison of the MCF7 cells control and over-expressing *SPARC* before and after docetaxel treatment. Among the molecular interaction networks, cytoskeleton remodeling pathway was the top pathway map observed in the comparison between MCF7 cells over-expressing *SPARC* and the control cells before docetaxel treatment and GTP metabolism pathway was the top pathway map observed in the comparison between MCF7 cells over-expressing *SPARC* and the control cells after docetaxel treatment. Transcriptome and proteome integrated data, resulted in forty commonly up and down regulated genes, being the WNT pathway represented among them. Our findings suggest that *SPARC* expression can influence Docetaxel sensitivity in MCF7 cells by modulating genes involved in diverse biologic process that might be related to drug sensitivity.

Descriptores: breast neoplasms, SPARC protein human, Gene expression, Oligonucleotide array sequence analysis, Chemosensitivity, Proteomic, Docetaxel

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de progressão do Câncer de Mama.....	25
Figura 2. Ação do quimioterápico Docetaxel.....	29
Figura 3. Estrutura da proteína SPARC com seus três domínios funcionais.....	31
Figura 4. Caracterização das Células MCF7 transfectadas com o vetor de expressão para superexpressão do SPARC.....	53
Figura 5. Imagem representativa da morfologia de células (A)MCF7, (B) MCF7 _{pcNeo} e (C) MCF7 _{pcSparc}	54
Figura 6. Efeito da expressão de SPARC na razão de proliferação das células MCF7.....	55
Figura 7. Efeito da expressão do SPARC na migração das células MCF7.....	56
Figura 8. Efeito da expressão de SPARC nas diferentes fases do ciclo celular antes e após o tratamento com o Docetaxel.....	57
Figura 9. Eletroflerogramas da qualidade e integridade das amostras de RNA total extraídos das linhagens celulares MCF7 _{pcNeo} e MCF7 _{pcSparc} antes e após tratamento com Docetaxel.....	59
Figura 10. Distribuição dos genes diferencialmente expressos classificados por funções e processos biológicos utilizando o <i>Gene Ontology</i>	61
Figura 11. Rede de interação molecular mostrando uma visão integrada dos genes mais expressos (vermelho) e menos expressos (verde) em células MCF7 _{pcSPARC} vs MCF7 _{pcNEO} controle (mantidas na presença do veículo), destacando os genes <i>SPARC</i> e <i>SPANXA1</i>	63
Figura 12. Rede de interação molecular mostrando uma visão integrada dos genes mais expressos (vermelho) e menos expressos (verde) em células MCF7 _{pcSPARC} vs MCF7 _{pcNEO} controle (mantidas na presença do veículo), destacando os genes <i>SPARC</i> e <i>WNT5A</i>	64

Figura 13. Rede de interação molecular mostrando uma visão integrada dos genes mais expressos (vermelho) e menos expressos (verde) em células MCF7 _{pc} SPARC vs MCF7 _{pc} NEO tratadas com 5nM de docetaxel, destacando os genes <i>SPARC</i> , <i>TWIST1</i> e <i>WNT3A</i>	65
Figura 14. Rede de interação molecular mostrando uma visão integrada dos genes mais expressos (vermelho) e menos expressos (verde) em células MCF7 _{pc} SPARC vs MCF7 _{pc} NEO tratadas com 100nM de docetaxel, destacando genes da via do WNT.....	66
Figura 15. Foto representativa de reação de amplificação do cDNA de <i>TWIST1</i> e <i>GAPDH</i> em diferentes linhagens celulares de mama.....	69
Figura 16. Expressão relativa dos genes selecionados para validação nas células MCF7 _{pc} SPARC e MCF7 _{pc} NEO - Comparação das médias de expressão relativa dos genes <i>XAF1</i> e <i>ALDH1A3</i> entre as células (A) MCF7 Neo e MCF7 Sparc.....	71
Figura 17. Expressão relativa dos genes selecionados para validação nas células MCF7 _{pc} SPARC e MCF7 _{pc} NEO - Comparação das médias de expressão relativa dos genes <i>SPANXA1</i> e <i>WNT5A</i> entre as células (A) MCF7 Neo e MCF7 Sparc.....	72
Figura 18. Expressão relativa dos genes selecionados para validação nas células MCF7 _{pc} SPARC e MCF7 _{pc} NEO - Comparação das médias de expressão relativa dos genes <i>TPM4</i> e <i>TARP</i> entre as células (A) MCF7 Neo e MCF7 Sparc.....	73
Figura 19. Remodelação do Citoesqueleto para comparação entre as células MCF7 _{pc} Sparc vs MCF7 _{pc} Neo Controle.....	76
Figura 20. Metabolismo do GTP para comparação entre as células MCF7 _{pc} Sparc vs MCF7 _{pc} Neo com 100nM de Docetaxel.....	77
Figura 21. Redes de Interações entre proteínas gerada para comparação MCF7 _{pc} Sparc vs MCF7 _{pc} Neo tratadas com 100nM de Docetaxel destacando genes da via WNT.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos Parâmetros da qualidade dos experimentos de <i>Microarray</i>	59
Tabela 2. Lista de genes identificados como diferencialmente expressos nas análises de transcriptoma.....	67
Tabela 3. Validação dos genes diferencialmente expressos nos ensaios de cDNA <i>Microarray</i> (FC=3,0) selecionados a partir das listas de comparações entre cada tratamento.....	74
Tabela 4. Lista de genes identificados como diferencialmente expressos tanto nas análises de transcriptoma quanto de proteoma.....	80
Tabela 5. Expressão diferencial dos genes da via do WNT nas análises por <i>WNT Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array</i> para a comparação MCF7pcSparc vs MCF7pcNeo Controle.....	82
Tabela 6. Expressão diferencial dos genes da via do WNT nas análises por <i>WNT Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array</i> para a comparação MCF7pcSparc vs MCF7pcNeo tratadas com 100nM de Docetaxel.....	83
Tabela 7. Genes que se destacaram nas análises de <i>Human WNT Signaling Pathway RT² Profiler PCR</i> e que estavam presentes nas análises de <i>Microarray</i>	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg micrograma

µl microlitro

µM micromolar

°C graus Celsius

cDNA DNA complementar

DNA ácido desoxirribonucleico

dNTP desoxirribonucleotídeo 5' trifosfato

ECM matriz extracelular

g grama

INCA Instituto Nacional do Câncer

kDa quilodáton

M molar

mg miligrama

ml mililitro

mM milimolar

mRNA RNA mensageiro

ng nanograma

nm nanômetro

nM nanomolar

pb pares de base

PCR reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

RNA ácido ribonucleico

U unidade

vs *versus*

WHO Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Câncer de Mama.....	20
1.2. Quimioterápico Docetaxel.....	28
1.3. Proteína SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein.....	30
2. OBJETIVO.....	38
3. MATERIAS E MÉTODOS.....	39
3.1.Linhagem Celular.....	40
3.2. Cultura de Células e Tratamentos.....	40
3.3. Transfecção do vetor de expressão para o gene SPARC.....	41
3.4. Extração Proteica.....	41
3.5. Western Blotting.....	42
3.6. Imunofluorescência.....	43
3.7. Análise de Proliferação Celular.....	43
3.8. Ciclo Celular e morte celular através da marcação com <i>Propidium Iodedi (PI)</i>	44
3.9. Ensaio de Migração Celular por <i>WOUND HEALING</i>	45
3.10. Extração de RNA.....	45
3.11. Amplificação.....	46
3.12. Extração proteica para a Proteômica.....	47
3.13. Caracterização do Perfil Proteico.....	48
3.14. Validação.....	48
3.14.1. Desenhos de Oligonucleotídeos.....	48
3.14.2. Tratamento do RNA com DNase I.....	49
3.14.3. Síntese de cDNA.....	49
3.14.4. PCR em Tempo Real (qPCR).....	50
3.15. Análise Estatística.....	51
3.16. Análise de Expressão Gência (qRT-PCR array)	51
4. RESULTADOS.....	52
4.1. Expressão da Proteína SPARC em Células de Câncer de Mama MCF7.....	53
4.2. Efeito da expressão do gene SPARC na morfologia das células MCF7.....	54

4.3. Efeito da expressão do SPARC na proliferação e migração das células MCF7 (Ensaio de <i>WOUND HEALING</i>	55
4.4. Efeito da expressão de SPARC nas fases do ciclo celular e em resposta ao quimioterápico Docetaxel nas células MCF7.....	56
4.5. Análise do perfil de expressão gênica de células MCF7 com diferença de expressão de SPARC antes e após tratamento com Docetaxel.....	58
4.6. Expressão dos genes <i>TWIST1</i> , <i>XAF1</i> , <i>TPM4</i> , <i>TARP</i> , <i>ALDH1A3</i> , <i>WNT5A</i> e <i>SPANXA1</i> nas células MCF7.....	68
4.7. Análise de Proteômica.....	74
4.8. Integração dos dados de Transcriptoma e Proteoma.....	78
4.9. Validação da expressão de genes da via do WNT por <i>WNT Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array</i>	80
 5. DISCUSSÃO.....	 85
 6. CONCLUSÕES.....	 95
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 97

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Mama

Câncer é o termo utilizado para representar um conjunto de mais de 100 doenças que tem em comum o crescimento desordenado (maligno) de células, que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se por meio de metástase para outras regiões do corpo (INCA, 2014). Estima-se mundialmente, que em 2020, o número de novos casos anuais seja da ordem de 15 milhões e que até 2030 este número será de 21,4 milhões, com a maior taxa de mortalidade comparada a outras doenças, até então consideradas como de maior ocorrência (WHO, 2007).

O câncer de mama, por sua vez, é considerado um câncer de bom prognóstico se diagnosticado e tratado precocemente. Porém, ainda é uma doença com altas taxas de morbidade e mortalidade, provavelmente devido à realização de diagnósticos tardios (INCA, 2014). A incidência do câncer de mama tem aumentado gradativamente nos países em desenvolvimento devido ao aumento na expectativa de vida, urbanização exacerbada e a adoção do estilo de vida ocidental (WHO). No Brasil, depois do câncer de pele não melanoma, é a neoplasia mais frequente entre as mulheres nas regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste, e Nordeste. Na região Norte é o segundo tumor mais incidente, perdendo somente para tumores de colo de útero. Em publicação recente, o INCA estimou para o ano de 2014 a ocorrência de 57.120 novos casos da doença no país, com um risco de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2014).

Cerca de 90-95% dos casos de câncer de mama apresentam-se de forma esporádica e entre os principais fatores de risco podemos citar os fatores não modificáveis, tais como os fatores reprodutivos associados com a exposição prolongada aos hormônios esteroídicos. Deste modo, a menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade estão relacionados ao maior risco de desenvolvimento da doença. Entre os fatores de risco modificáveis têm-se o uso de terapia de reposição hormonal e de

anticoncepcionais orais, consumo de álcool, excesso de peso e ausência de atividade física (American Cancer Society: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-risk-factors>).

Em um estudo realizado por Danaei G *et al* (2005) os fatores de risco modificáveis estiveram presentes em 21% das mortes pela doença, sendo que a proporção de óbitos foi maior nos países com maior renda, e a contribuição que mais se destacou para esta estimativa foi o excesso de peso e ausência de atividade física.

A incidência de cancer da mama aumenta com a idade, dobrando a cada 10 anos até a menopausa, quando a taxa de aumento diminui drasticamente (Mcpherson K *et al.*,2000). No Brasil, a incidência dos Registros de Câncer de Base Populacional de alguns estados indicou que 60 a 70% dos casos novos ocorreram na faixa etária compreendida entre os 40 e 69 anos de idade. No que diz respeito à mortalidade por câncer de mama, dados disponíveis para o mesmo período mostraram que 91% das mortes foram registradas em mulheres com mais de 40 anos de idade. (Revisado em Revista Brasileira de Cancerologia, 2003).

A história familiar de câncer de mama está presente em aproximadamente 5-10% dos casos. A suscetibilidade para o desenvolvimento da doença é herdada de maneira autossômica dominante, a qual pode ser transmitida por qualquer um dos genitores, mesmo que nenhum desses genitores tenha desenvolvido a doença. Quando há desenvolvimento da doença em um parente de primeiro grau (mãe, irmã, filha) antes dos 50 anos, o risco de desenvolver a doença aumenta em torno de duas a três vezes (Mcpherson K *et al.*,2000).

Os genes supressores de tumor BRCA1 e BRCA2, que tem função na regulação de proliferação celular e de reparo de DNA, são os genes mais comumente associados à susceptibilidade genética ao câncer de mama. Estimativas iniciais sugeriram que a

porcentagem de câncer de mama familiar associados a mutações no gene BRCA1 eram superiores a 85%. No entanto, estudos mais recentes têm demonstrado que as mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 estão associadas a 20-25% dos tumores de mama hereditários (Melchor L *and* Benítez J, 2013). Além dos genes BRCA1 e BRCA2, diversos outros genes já foram identificados como associados à susceptibilidade ao câncer de mama familiar, incluindo genes de alta penetrância, tais como TP53, CDH1, PTEN, STK11, RAD51C e RAD51D, e outros genes com baixa/moderada penetrância foram descritos, tais como ATM, CHEK2, BRIP1 (Ellsworth R *et al.*, 2010; Larsen MJ *et al.*, 2014)

Em contra partida, o ciclo de gravidez e lactação tem se mostrado como fator protetor contra o desenvolvimento de câncer de mama, principalmente quando ocorre antes dos 30 anos de idade e com um intervalo de menos de 14 anos entre a menarca e a primeira gravidez (Key TJ *et al.*, 2001; Russo IH *and* Russo J, 2011). O aleitamento materno inibe a ovulação, diminuindo os hormônios de ciclos ovarianos, e consequentemente os tecidos mamários são menos expostos a hormônios durante este período. Assim, mulheres que não amamentam têm um risco maior de desenvolver câncer de mama do que as mulheres que amamentam (Bernstein L., 2002; Anothaisintawee T *et al.*, 2013).

O câncer de mama apresenta-se como uma doença heterogênea e de etiologia complexa, tendo uma grande variabilidade a nível molecular, patológico e de curso clínico (Hsiao YH *et al.*, 2010). O acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas e interação com hábitos de vida e o meio ambiente, terminam por inibir genes supressores e ativar oncogenes, causando desequilíbrio na homeostase celular (Riley LB *et al.*, 2009). As alterações genéticas mais frequentemente encontradas no câncer de mama estão associadas com as alterações em ganho de função dos proto oncogenes, c-MYC,

CCND1, INT-2, EGF, RAS e BCL-2, os quais estimulam proliferação, diferenciação e sobrevivência celular; e com as alterações de perda de função de genes supressores de câncer, TP53, CDH1, PTEN, BRCA1 e BRCA2, CHEK-2, que atuam no controle da proliferação celular desordenada e promovem reparos de danos no DNA (Volgstein B *and* Kinzler KW, 2004; Lee EY *and* Muller WJ, 2010).

Hanahan D *and* Weinberg RA (2000 e 2011) definiram um conjunto de características adquiridas pelas células que favorecem o desenvolvimento e progressão tumoral, sendo eles, a aquisição de independência aos sinais de crescimento e proliferação; capacidade de evasão a apoptose; potencial replicativo ilimitado; angiogênese sustentada; habilidade de invasão de tecidos e formação de metástase; evasão do sistema imune; reprogramação do metabolismo energético, além de duas importantes características que foram relatadas como facilitadores do processo tumorigênico: instabilidade genômica e inflamação.

Diversas evidências indicam que o desenvolvimento e a progressão do câncer não dependem somente de características genéticas das células tumorais, mas também de suas interações com o microambiente (De Wever O *et al.*, 2008). Alterações no microambiente predispoem células epiteliais a adquirirem características genéticas requeridas para uma transformação neoplásica. Portanto, o microambiente pode afetar a eficiência de formação do tumor, a taxa de crescimento tumoral, além do grau de invasão e capacidade metastática. (Elenbaas B *and* Weinberg RA, 2001).

A glândula mamária é constituída por células epiteliais e estromais, e estas se comunicam via Matriz Extracelular (MEC). A influência do estroma é de extrema importância para o desenvolvimento do epitélio mamário e, sob condições normais o estroma constitui uma importante barreira para a transformação celular (Gjorevski N *and* Nelson CM, 2011; Rudel RA *et al.*, 2011). Alterações no microambiente estromal

da glândula mamária representam um potencial para regulação da proliferação, invasão, diferenciação, e polaridade tanto das células epiteliais normais como das tumorais. Utilizando modelos *in vivo*, a superexpressão de estromelina (*STR-1*), uma metaloproteinase de matriz (MMP), resultou na degradação da membrana basal e de proteínas da MEC, levando a alterações do epitélio mamário, incluindo aumento da proliferação e ramificação ductal, desenvolvimento alveolar precoce, e apoptose em células alveolares secretoras, e estas alterações no epitélio e estroma mamário levaram esses animais a desenvolverem hiperplasia, displasias e carcinomas mamários (Elenbaas B and Weinberg RA, 2001). Estudos recentes associaram a importância de fibroblastos associados ao câncer (CAFs) no estroma e no microambiente tumoral em promover a iniciação de células tumorais, angiogênese, invasão e metástase (Revisado por Nwabo Kamdje AH *et al.*, 2014). Adicionalmente, estas células não só promovem a progressão do tumor, mas também acabam por induzir a resistência à quimioterapia.

Dados epidemiológicos apontam que a progressão do câncer de mama se inicia com a hiperproliferação ductal evoluindo posteriormente para o carcinoma *in situ*, passando para carcinoma invasivo e finalmente, para a doença metastática (Figura 1). O carcinoma ductal *in situ* é considerado o precursor da doença e embora aplicações de novas tecnologias estejam melhorando a capacidade de se detectar a doença em seu estágio inicial, os fatores envolvidos na progressão do câncer de mama precisam ser melhor elucidados (Polyak K, 2007).

A aplicação da genômica na biologia do câncer resultou em avanços no conhecimento da fisiopatologia da doença e melhor assistência às pacientes. Estudos de Perou CM *et al* (2000) e Sorlie T *et al* (2001) identificaram os principais subtipos de câncer de mama para definir os diferentes comportamentos biológicos e o curso clínico

Figura 1: Modelo de progressão do Câncer de Mama, proposto por Polyak K, 2007. Células normais progridem para carcinoma ductal *in situ*, invasivo e metastático. Células normais do ducto mamário são compostas de membrana basal e células epiteliais e mioepiteliais. As células que compõe o estroma incluem os leucócitos, fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais. Nos carcinomas *in situ*, as células mioepiteliais são genética e fenotipicamente alteradas. A degradação da membrana basal leva a diminuição do número de células mioepiteliais e aumento do número de fibroblastos, miofibroblastos, linfócito e células endoteliais no estroma. Estas alterações promovem a progressão para o carcinoma invasivo, liberando as células tumorais para invadir os tecidos circundantes, migrando para outros órgãos, conduzindo efetivamente para a metástase (Adaptado de Polyak K, 2007).

da doença. Perou CM *et al* utilizando a técnica de cDNA Microarray, analisaram 65 amostras de 42 pacientes, em 8.102 genes humanos, e demonstraram que a diversidade fenotípica dos tumores de mama estavam associadas a diversidade de expressão gênica. Análises mais refinadas realizadas por Sorlie *et al*, permitiram a subdivisão dos tumores receptores de estrógenos positivos em dois grupos distintos. Deste modo, os tumores de mama foram classificados em relação ao perfil de expressão gênica, e associação com prognóstico, ficando estabelecidos em Luminal A, Luminal B, HER2 Positivo, Triplo Negativo e/ou Basal-like (revisado por Yersal O and Barutca S, 2014).

O subtipo Luminal A compõe o maior subgrupo, sendo representado pelos tumores que apresentam alta expressão de receptores de estrógenos e progesterona, e elevada expressão de genes expressos pelas células epiteliais luminais, dentre eles as citoqueratinas 7/8 e 18/19. A expressão aumentada de HER-2 não é observada, o que caracteriza este tipo tumoral como de melhor prognóstico e resposta a terapia com antiestrogênios (Sorlie T *et al.*, 2003). Os Receptores de estrógeno e progesterona são exemplos de fatores preditivos consolidados no manejo clínico de pacientes com câncer de mama. Os estrógenos, principalmente o E2 (17 β -Estradiol), medeiam processos essenciais para o desenvolvimento da mama normal e desempenham um papel crítico no desenvolvimento e progressão do câncer de mama (Nagai MA *and* Brentani MM, 2008). Embora o ER α seja o receptor predominante na mama, a co-expressão do ER β em carcinomas de mama pode desempenhar um papel importante no controle dos efeitos mamotrópicos de ER α e pode ser um importante alvo para terapia endócrina (Nilsson S *and* Gustafsson JÅ, 2011).

O subtipo Luminal B, por sua vez, é caracterizado pelos tumores que apresentam baixa ou moderada expressão de genes expressos pelas células luminais epiteliais, dentre eles as citoqueratinas 7/8 e 18/19, porém co-expressam os genes ligados à proliferação celular, podendo apresentar alto índice mitótico. Os tumores Luminais B apresentam expressão do receptor de estrógeno e podem apresentar expressão do receptor de progesterona e positividade para HER-2. Quando comparados ao Luminal A, este subtipo está associado a piores prognósticos e recidiva tumoral. (Sorlier T *et al.*, 2003).

A determinação do índice de Ki-67 (gene de proliferação celular MKI67) por imunohistoquímica é um marcador fundamental utilizado na classificação dos subtipos luminal A do luminal B. Foi estabelecido que índices de positividade de Ki-67

inferiores a 14%, associados a outros marcadores, identificam o subtipo Luminal A, e os distinguem do subtipo Luminal B (Dowsett M *et al.*, 2011). Essa classificação alterou significativamente os valores de prevalência encontrados para os subtipos luminais, já que os tumores que apresentavam alto índice proliferativo eram classificados somente como Luminais A (Cheang MC *et al.*, 2009; Voduc KD *et al.*, 2010)

Os tumores que superexpressam o receptor HER-2 representam o subtipo HER-2 (Sorlie T *et al.*, 2001). A superexpressão de HER-2 ocorre em 15- 30% dos tumores de mama (Slamon DJ *et al.*, 1989) e está relacionado a um comportamento biológico agressivo e um pior prognóstico (Brenton JD *et al.*, 2005). Entretanto, estes tumores podem apresentar boa resposta a drogas que bloqueiam a atividade do HER-2, como por exemplo, o anticorpo monoclonal *Herceptin*. Este subtipo possui um padrão híbrido com alta frequência de mutações em TP53 (72%) e PIK3CA (39%) e menor taxa de outras mutações (Cancer Genome Atlas, 2012).

A maioria dos tumores de mama triplo negativos são também referidos como *basal-like*, devido ao fato, de seus fenótipos serem considerados efetivamente sinônimos. Porém dados clínicos, imunohistoquímicos e do perfil de expressão gênica apontam diferenças significantes entre estes dois subtipos (Foulkes WD *et al.*, 2010). O subtipo *basal-like* é caracterizado pelos baixos níveis ou ausência da expressão do ER, pela ausência do HER-2 e pela expressão de genes que usualmente são encontrados em células basais e/ou mioepiteliais. Já o subtipo triplo negativo tem características clínicas e patológicas únicas, sendo negativo para receptores de ER, PR e HER-2. Os tumores triplo negativos representam um problema clínico, devido ao comportamento agressivo, perda de alvos terapêuticos e consequentemente piores prognósticos. Entre as intrigantes características dos tumores triplo negativos podemos salientar a sua associação com a presença de mutação no gene BRCA1 e elevada taxa de mutação no

gene TP53; prevalência entre mulheres jovens (Irvin WJ Jr *et al.*,2008) e entre mulheres negras e hispânicas (Foulkes WD *et al.*,2010). O subtipo triplo negativo representa 15% do total de cânceres de mama (INCA), e apresenta resistência a terapias hormonais. Portanto a quimioterapia é a base do tratamento para este subtipo tumoral.

Após uma década de estudos buscando uma melhor compreensão dos subtipos tumorais de câncer de mama estabelecidos por Perou CM *et al* (2000), um trabalho publicado por Curtis C *et al* (2012) utilizando diversas técnicas de genômica/transcriptoma em tumores de 2000 pacientes, refinou a classificação molecular conhecida atualmente. Os dados obtidos sugeriram dez novos subgrupos, dentre eles pacientes que apresentaram melhores prognósticos, compostos predominantemente de Luminal A e pacientes compostas de casos HER-2 amplificado, que se caracterizam como os de pior sobrevida doença-específica. Além disso, a curva de sobrevida doença-específica mostrou desfechos clínicos distintos, confirmando que, o câncer de mama é heterogêneo a nível molecular e que estes subtipos moleculares diferem na sua resposta aos agentes terapêuticos.

1.2. Quimioterápico Docetaxel

A quimioterapia e a hormônioterapia são tratamentos adjuvantes do câncer de mama, desempenhando importante papel no controle da doença. Os taxanos e as antraciclinas representam as drogas quimioterápicas mais potentes utilizadas nos tratamentos desse tipo de câncer (Estévez LG *and* Gradishar WJ, 2004). O quimioterápico Docetaxel pertence ao grupo de taxanos, foi introduzido pela primeira vez em uso clínico durante a década de 90, e desde então tem se mostrado eficaz no tratamento do câncer de mama, proporcionando aumento da sobrevida livre da doença (DFS) e sobrevida total (OS) das pacientes (Hugh J *et al.*,2009). Este quimioterápico é

um agente anti-microtúbulo que exerce efeito anti-proliferativo pela ligação a subunidade β da tubulina, impedindo a depolimerização dos microtúbulos (Figura 2). A ação do Docetaxel nos microtúbulos impede a formação do fuso mitótico normal, inibindo a divisão celular causando parada no ciclo celular na fase G2-M, e consequente indução da apoptose (Pasquier E and Kavallaris M, 2008) e catástrofe mitótica (Morse DL *et al.*, 2005).

Figura 2: Ação do quimioterápico Docetaxel. Docetaxel inibe a depolimerização dos microtúbulos, impedindo a formação do fuso mitótico normal, e consequente inibição da divisão celular, causando parada no ciclo celular na fase G2-M. (Adaptado de Mackler NJ and Pienta KJ, 2005).

A quimiorresistência é um fator importante envolvido na ausência de resposta, podendo reduzir a sobrevida global das pacientes com câncer de mama localmente avançado e metastático (Wang H *et al.*, 2014). Embora o Docetaxel tenha se mostrado eficaz no tratamento de casos de câncer de mama, é considerável o número de pacientes que não respondem ao tratamento ou adquirem resistência aos taxanos. Estudos mostram que a superexpressão do HER2 está associada com aumento na agressividade e resistência a drogas quimioterápicas, dentre elas, o Docetaxel (Ciardiello F *et al.*, 2000; Troester MA *et al.*, 2004).

Estudos em nosso laboratório utilizando a técnica de SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) avaliaram o perfil de expressão gênica em células de câncer de mama

que apresentavam diferentes níveis de expressão de HER2 e que foram tratadas intensivamente com o quimioterápico Docetaxel. Foram identificados diversos genes diferencialmente expressos, que podem estar relacionados com a via de sinalização do HER2, dentre eles o SPARC, que apresentou alteração nos níveis de expressão em células epiteliais de mama podendo representar um possível potencial marcador de sensibilidade ao quimioterápico Docetaxel (Dos Santos ML *et al.*, 2006; Dos Santos ML *et al.*, 2009).

1.3. Proteína SPARC (Secreted Protein Acidic and rich in Cystein)

O gene SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine), está localizado no cromossomo 5q31.3-q32, e codifica uma proteína de 42 KDa (Lane TF and Sage EH, 1994; Breeken RA and Sage EH, 2000), também conhecida como Osteonectina ou BM-40. Essa proteína, foi primeiramente descrita por Termine JD *et al* (1981), como uma proteína específica dos ossos. Posteriormente, a proteína SPARC foi descrita como associada a MEC, porém sem funções estruturais, contrastando assim com outras proteínas clássicas da MEC, como colágeno e lamininas. (Bornstein P, 2000; Bradshaw AD, 2012).

Proteínas matricelulares são secretadas dentro do microambiente extracelular, e apresentam funções regulatórias. Recentemente essas proteínas foram descritas como sendo capazes de afetar diretamente o destino das células influenciando a transição epitélio-mesenquima, proliferação e sobrevivência, motilidade celular e invasão, adesão, extravasão, proliferação nos sítios metastáticos, angiogênese (Chong HC *et al*, 2012). Devido a sua diversidade de função na comunicação intercelular a matriz contribui substancialmente para a progressão tumoral (Engbring JA and Kleinman HK, 2003; Ioachim E *et al.*, 2002; Larsen M *et al.*, 2006).

Consistente com sua participação no remodelamento da matriz extracelular, a proteína SPARC pode influenciar diversos processos biológicos que alteram a fisiologia celular e tem sido associada ao processo de angiogênese e progressão tumoral (Watkins *et al.*, 2005).

A proteína SPARC é composta por três domínios funcionais (Figura 3) que contribuem para as suas distintas propriedades biológicas (Nagaraju GP and Sharma D, 2011). O domínio N-terminal (NT) está envolvido com espraio celular, além de apresentar propriedades quimiossensibilizadoras; o domínio “follistatin-like” (FS) contém 10 resíduos de cisteína e inibe a migração celular endotelial e o domínio C-terminal (EC) contém o módulo de ligação ao cálcio extracelular apresentando propriedades anti-angiogênicas (Chlenski A and Cohn SL, 2010).

Figura 3: Estrutura da proteína SPARC com seus três domínios funcionais. O domínio Follistatin like, que compreende os aminoácidos 53 a 137 é mostrado em vermelho, verde e preto, o domínio C-terminal, que compreende os aminoácidos 138 a 286 é mostrado em azul e amarelo. (Adaptada de Brekken RA and Sage EH, 2001).

A proteína SPARC pode se ligar diretamente a proteínas da MEC, influenciar a secreção e ativação de Metaloproteinases da Matriz (MMP) (Yan Q and Sage EH, 1999), modular direta ou indiretamente a ação de diversos fatores de crescimento

envolvidos em angiogênese e remodelamento tecidual tais como FGF, VEGF, PDGF e TGF β (Clark CJ *and* Sage EH, 2008). Devido a essas interações, o SPARC é considerado um modulador do câncer por controlar funções celulares como adesão, proliferação, sobrevivência e migração celular. (Arnold SA *and* Brekken RA, 2009).

O SPARC é diferencialmente expresso em diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer de mama, e a capacidade do SPARC de inibir ou promover progressão tumoral é dependente do tipo celular (células endoteliais ou células tumorais), estágio tumoral e o tipo de interações estabelecidas com os diferentes componentes presentes no microambiente celular (Arnold SA *and* Brekken RA, 2009).

O efeito pleiotrópico da expressão do SPARC em diferentes tipos tumorais tem sido observado em diversos estudos (Watkins G *et al.*, 2005; Podhajcer OL *et al.*, 2008; Arnold SA *and* Brekken RA, 2009; Chlenski A *and* Cohn SL, 2010). Elevados níveis de SPARC em tumores malignos, incluindo mama, esôfago, cérebro, carcinoma de próstata, gliomas e melanomas, foram observados, sugerindo assim que a expressão aumentada de SPARC se associe com progressão tumoral (Framson PE *and* Sage EH, 2004; Bos TJ *et al.*, 2004; Koblinski JE *et al.*, 2005). Em contrapartida, outros estudos sugerem que o SPARC possa atuar como supressor tumoral, induzindo apoptose em células de câncer de ovário e com efeito antitumoral em cânceres de pâncreas e mama (Chlenski A *and* Cohn SL, 2010; Nagai MA *et al.*, 2011).

Estudo *in vivo*, utilizando como modelo xenotransplantes ortotópicos de câncer pancreático, mostrou que os tumores desenvolvidos em animais *knockout* para SPARC (SPARC $-/-$) apresentaram uma diminuição na deposição da MEC e maior frequência de metástase, em comparação com os tumores dos animais controle (SPARC $+/+$), indicando que o SPARC atue na tumorigênese (Arnold SA *et al.*, 2010). Outro estudo utilizando modelo *in vivo*, avaliou o papel do SPARC no potencial de formação de

metástase de células 4T1 (carcinoma de mama), e mostrou que a expressão do SPARC levou a uma redução do crescimento tumoral e metástase (Sangaletti S *et al.*, 2008). Estes dois estudos corroboram o efeito anti-proliferativo do SPARC em alguns tipos tumorais.

O papel do SPARC em câncer de mama é controverso. Um aumento da expressão do SPARC foi observado em células de adenocarcinoma de mama MCF-7/c-Jun e relacionado ao aumento do potencial invasivo e de migração destas células (Briggs J *et al.*, 2002). Já em células tumorigênicas MDA-MB-231, a expressão de SPARC inibiu invasão e formação de metástase (Koblinski JE *et al.*, 2005). Em tumores, Watkins G *et al* (2005) e Helleman J *et al* (2008) demonstraram que a alta expressão do SPARC está associada com progressão tumoral e fenótipo mais agressivo. No entanto, Hsiao YH *et al* (2010) e Nagai MA *et al* (2011) observaram que a redução na expressão desta proteína está associada a um pior prognóstico das pacientes analisadas.

A expressão do SPARC foi descrita como regulada negativamente em amostras de metástases cerebrais provenientes de câncer de mama em comparação com amostras de tumores primários, independentemente do subtipo tumoral. No entanto entre os tumores primários, o SPARC apresentou-se como regulada positivamente em amostras tumorais pertencentes ao subtipo triplo negativo (Wikman H *et al.*, 2014). Anteriormente a associação da expressão do SPARC com tumores triplo negativos já havia sido relatada por Nagai *et al* (2011) no qual pacientes com positividade para SPARC apresentaram melhores prognósticos do que aquelas com redução de sua expressão, mostrando, que a expressão desta proteína poderia ser utilizada na estratificação destes tumores de difícil manejo clínico.

Atualmente, diversos trabalhos vêm associando o envolvimento da expressão da proteína SPARC com quimiosensibilidade a drogas. Estudos realizados por Tai IT *et al* (2005) em modelos de carcinoma colorretal, atribuíram a SPARC tal função devido baixos níveis de sua expressão estarem associados com diminuição da sensibilidade à quimioterapia, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Esta característica também foi relatada por Dos Santos ML *et al* (2009) em linhagens de células de câncer de mama, no qual os transcritos do gene SPARC foram associados como possível potencial marcador de sensibilidade a quimioterapia com docetaxel.

Alterações no padrão de metilação da região promotora do gene SPARC podem levar a um aumento da expressão da proteína e melhorar a resposta à quimioterapia. Células de câncer colorretal quando tratadas com 5-aza-2'-deoxicitidina, inibidor de atividade da DNA metiltransferase, apresentaram aumento na expressão do SPARC com consequente aumento da resposta das células tumorais ao quimioterápico 5-aza-2'-deoxicitidina (Cheetham S *et al.*,2008; Nagaraju GP *and* Sharma D, 2011).

Outro estudo mostrou o envolvimento do SPARC no processo apoptótico através de sua interação com caspase-8. A interação SPARC-caspase-8 pode impedir a ligação desta protease com Bcl-2 e induzir a apoptose, influenciando a resposta à terapia, sensibilidade à quimioterapia e reversão de resistência a drogas quimioterápicas (Rahman M *et al.*,2011). Jeung HC *et al* (2010) realizaram um estudo Fase II em pacientes com câncer gástrico, comparando dois regimes de tratamentos semanais a base de Docetaxel com o objetivo de testar a eficácia e tolerância a quimioterápicos. A superexpressão do SPARC foi correlacionada com progressão precoce da doença, além de reduzir a taxa de sobrevida global, mostrando assim que o SPARC pode ajudar a individualizar a terapia em câncer gástrico avançado. Lindner JL *et al.*, 2014, correlacionou a expressão aumentada de SPARC em tumores de mama, com uma maior

probabilidade de ausência de qualquer tipo de câncer invasivo e nos gânglios linfáticos após quimioterapia neo-adjuvante na população total do estudo, e principalmente nas pacientes do subgrupo triplo-negativo.

Em modelo de câncer de pâncreas, a proteína SPARC é descrita como altamente expressa e secretada. Fresse KK *et al* (2012), estudando este tipo tumoral, observou que o SPARC pode atuar como uma proteína de ligação à albumina e sequestrar o quimioterápico nab-paclitaxel, e, deste modo, concentrar a droga intratumoral, mostrando que sua superexpressão pode ser correlacionada com melhor resposta para nab-paclitaxel. Em contra partida, o efeito de SPARC em promover melhor resposta ao nab-paclitaxel não foi observado em amostras de câncer de mama, (Schneeweiss A *et al.*, 2014). Deste modo, a significância de SPARC como preditivo de resposta a terapias com nab paclitaxel ainda está sob investigação e os achados podem aplicar-se a um tipo tumoral, mas não a outro.

Recentemente, camundongos SPARC^{-/-} mostraram maior resistência ao tratamento com o quimioterápico 5- Fluoracil, em um estudo que visava identificar processos moleculares associados a células tronco hematopoiéticas localizadas em microambientes diferentes. O quimioterápico 5-FU atua nas células em divisão, levando a mielossupressão, que por sua vez ativa as células tronco hematopoiéticas para a reconstituição do sistema hematopoiético prejudicado. Assim, repetidas doses de 5-FU resultam no funcionamento inadequado das células tronco hematopoiéticas e morte dos animais devido à falha da medula óssea. Os camundongos SPARC^{-/-} apresentaram uma menor sensibilidade à série do tratamento com 5-Fluoracil e sobreviveram por mais tempo comparados aos camundongos SPARC^{+/+} e controles da mesma ninhada (Ehninger A *et al.*, 2014).

À vista do exposto, a proposta do presente trabalho foi comparar o transcriptoma e o proteoma de células de câncer de mama com e sem de expressão do SPARC antes e após o tratamento com docetaxel, para caracterização de redes gênicas e proteicas associadas à expressão da proteína SPARC e que possam estar envolvidas na quimiosensibilidade ao Docetaxel.

2. OBJETIVO

Determinar o transcriptoma e o proteoma de células MCF-7 com e sem expressão de SPARC e avaliar a integração dos dados antes e após exposição ao docetaxel.

3. *MATERIAIS E MÉTODOS*

3.1. Linhagem Celular

A linhagem celular MCF-7 foi adquirida da American Type Culture Collection (Rockville, MD) e já faz parte do banco de linhagens celulares da Disciplina de Oncologia da FMUSP.

As células MCF-7 foram transfectadas com o vetor de expressão vazio *pcMV6-Neo* ou contendo o cDNA completo do gene SPARC (*pcMV6-SPARC*). Os clones selecionados já foram caracterizados e disponibilizados em nosso laboratório. A linhagem MCF-7 é derivada de adenocarcinoma de mama e ER-positiva (expressa cerca de 70 fmol/mg proteína). As células MCF-7 podem ser modelo para avaliar os efeitos da superexpressão do SPARC, por não expressarem essa proteína.

3.2. Cultura de Células e Tratamentos

As células foram cultivadas em meio apropriado suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO, Gainthesburg, EUA), contendo antibiótico-antimicótico (100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina e 0,25µg/ml de fungizona) (GIBCO, Gainthesburg, EUA), e mantidas em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂.

As células MCF7*pcNEO* e MCF7*pcSPARC*, foram tratadas com o quimioterápico Docetaxel (Taxotere; Aventis Pharmaceuticals Inc, Bridgewater, NJ), que foi dissolvido em etanol absoluto (solução estoque de 10 mM). As concentrações utilizadas foram de 5nM e 100nM de docetaxel (concentração estabelecida previamente no laboratório) e as células controle tratadas com a mesma quantidade final de etanol absoluto (inferior a 0,01%), por 24 horas.

3.3. Transfecção do vetor de expressão para o gene SPARC

Para o ensaio de transfecção, 3×10^5 células MCF-7 foram inoculadas em placas de cultura de 6 poços por 48 horas antes do início da transfecção. As células foram mantidas em meio suplementado com 10% de FBS e na confluência de 60 - 70% foram transfectadas utilizando-se 3 μ l de TurboFectin 8.0 para 1 μ g de DNA de plasmídeo. Após 24 horas da transfecção iniciou-se a seleção dos transfectantes com gentamicina (750 μ g/ml). A concentração de gentamicina foi determinada após a realização de curva de concentração (0 a 3000 μ g/ml). No quinto dia após se verificar a morte de 100% das células controle, que receberam apenas TurboFectin 8.0, as células foram tripsinizadas e transferidas para placas de 24 poços e posteriormente para garrafas de T25. A caracterização dos transfectantes para a expressão protéica do SPARC foi avaliada pelo ensaio de Western Blot, utilizando o anticorpo anti-SPARC (H-90) (Santa Cruz Biotechnology, INC).

3.4. Extração Proteica

Para a extração de proteínas, células MCF7_{pc}NEO e MCF7_{pc}SPARC foram lavadas 2X com PBS1X e incubadas com tripsina a 37°C para a remoção da monocamada de células. As células foram então transferidas para tubos eppendorf de 1,5ml e lisadas com tampão de lise previamente preparado (50,0mM de pirofosfato de sódio, 50,0mM de fosfato de sódio, 5,0mM de cloreto de sódio, 5,0mM de EDTA dissódico, 5,0mM de EGTA, 10,0mM de HEPES, 0,5% de Triton X-100, 2,0mM de Ortovanadato de sódio, 1,0mM de PMSF e 2,0mM de inibidores de protease). Esta solução ficou em gelo por 15 minutos com agitações a cada 5 minutos no vortex para completa lise das células. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 13000 rpm, por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo, e este corresponde ao

extrato proteico, e a concentração proteica foi determinada através do método de Bradford (Bradford MM, 1976).

3.5. Western Blotting

Os extratos proteicos quantificados e aliquotados com 30µg de proteínas foram desnaturados a 95°C por 5 minutos com Tampão de Lammelli 1X (7,5% Tris 2M pH 6,8; 0,5% SDS; 5% azul de bromofenol; 26% glicerol; 16,5% 2-mercaptoetanol). As amostras foram então separadas por eletroforese em gel de SDS-PAGE 10% em tampão de corrida Tris-Glicina (3,0g/l Tris-Base; 14,5g/l glicina; 0,1% SDS). A corrida foi realizada a 80V por 20 minutos e posteriormente 120V por 1 hora. Após este período, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose a 15V por 50 minutos, utilizando o aparelho Trans-Blot SD *Semi-dry Tranfer Cell* (Bio-rad, EUA) e tampão de transferência (48,0mM Tris; 39,0mM Glicina; 0,00375% SDS; 20% Metanol). As membranas foram então bloqueadas com 5% de leite desnatado em TBS-T (2,42g/l Tris-Base; 8,0g/l NaCl; 0,1% Tween-20), sob agitação *over night* a 4°C. Posteriormente, a incubação com o anticorpo primário (anti-SPARC H-90, 1:250), diluídos em solução de bloqueio, foi realizada durante 2h a temperatura ambiente. Após lavagem com TBS e TBS-T, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário (rabbit, 1:10000) associado a peroxidase por 1,5 hora a temperatura ambiente. A detecção das proteínas foi realizada por quimioluminescência com o kit *ECLTM Western Blotting Detector Reagents* (Amersham, UK) por 5 minutos, seguindo as instruções do fabricante. A revelação foi realizada em câmara escura com exposição da membrana ao filme de raio-X *Amersham HiperfilmTM ECL* (GE Healthcare, UK) por 10 minutos a temperatura ambiente.

3.6. Imunofluorescência

Após atingirem 70% de confluência, as células MCF7_{pc}NEO e MCF7_{pc}SPARC foram lavadas 3X com PBS1X e fixadas com paraformaldeído 4% em PBS durante 20 minutos. Após este período, foi realizada a permeabilização com Triton-X100 0,5% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionada a solução de bloqueio 1% BSA (Bovine Serum Albumin) por 1 hora a temperatura ambiente. As células foram então incubadas com o anticorpo primário (anti-SPARC H-90, 1:50), *overnight* em câmara úmida. Em seguida, as células foram lavadas 3X com PBS1X e incubada com o anticorpo secundário (rabbit Alexa Fluor 488, 1:300), 1 hora em câmara úmida protegida da luz. Posteriormente os núcleos celulares foram marcados com *Hoechst 33342* (Invitrogen, EUA), durante 10 minutos, protegidos da luz. Após montagem das lâminas, as células foram visualizadas no microscópio Confocal Zeiss LSM 510 META/UV.

3.7. Análise de Proliferação Celular

A análise da proliferação celular foi feita utilizando o Kit *Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit* (Molecular Probes, Invitrogen), segundo o protocolo estabelecido pelo fabricante. Este ensaio colorimétrico utiliza a atividade metabólica como parâmetro para a viabilidade celular e proliferação. O ensaio baseia-se na conversão do tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) em Formazan (sal insolúvel colorido). Esta redução do MTT é feita pela enzima *redutase succinate-tetrazolium* somente nas células metabolicamente ativas. As células MCF7_{pc}NEO e MCF7_{pc}SPARC foram cultivadas na proporção de $0,5 \times 10^4$ células/poço nas placas de 96 poços com meio completo e 10% de soro. Após adesão destas células, as células foram tratadas com concentrações de Docetaxel variando entre

500nM - 0,5nM. Após 24 horas de incubação com o quimioterápico, removeu-se o meio e lavou-se duas vezes com PBS 1X para retirar qualquer traço do vermelho de fenol presente. Adicionou-se 100,0 µl de meio sem vermelho de fenol com 10% de soro. Em seguida, 10,0 µl de MTT (12 mM) foi adicionado às células e ao controle que contém apenas o meio, por 4 horas a 37°C. A solução de HCl-SDS 0,01 M (100,0 µl) foi adicionada em cada poço, com posterior incubação por 17 horas a 37°C em câmara úmida. Após homogeneização, a quantificação do formazan solúvel foi feita através da leitura das amostras a 570 nm no leitor de placas *Biotrak II Plate Reader* (Amersham Biosciences, Cambridge, Inglaterra).

3.8. Ciclo Celular e Morte Celular através da marcação com *Propidium Iodide* (PI)

Para análise do ciclo e morte celular as células MCF7_{pc}NEO e MCF7_{pc}SPARC controle e tratadas aderidas e em suspensão foram recolhidas, lavadas uma vez com PBS 1X, fixadas com etanol 70% e estocados a -20° C até a análise por citometria. Posteriormente, as células fixadas foram lavadas duas vezes com PBS 1X 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 Cytomete* (Life Technologies), para os cálculos da percentagem de células nos diferentes estágios do ciclo (G0-G1, S-G2/M) e das células em morte celular (sub-G1).

3.9. Ensaio de migração celular por *WOULD HEALING*

O ensaio de would healing é um método de análise qualitativa in vitro da migração celular. Resumidamente, as células MCF7_{pc}NEO e MCF7_{pc}SPARC foram cultivadas em placas de 6 poços contendo 3 mL de meio de cultura com 10% de soro fetal bovino. Após a cultura se tornar 100% confluenta, foi realizada uma lesão na monocamada com o auxílio de uma ponteira pressionada contra o assoalho da placa de cultura, formando assim uma fenda na camada de células. Após lavagem para retirada dos resíduos celulares, foram adicionados 3ml de meio de cultura com 10% de Soro Fetal Bovino. O processo foi fotografado diariamente em um microscópio invertido (aumento 4X). Os dados foram expressos pela diferença entre a superfície recoberta e a condição controle (tempo 0h).

3.10. Extração de RNA

Para os ensaios de transcriptoma, o RNA total foi extraído das células MCF7_{pc}NEO e MCF7_{pc}SPARC controle e tratadas 5nM, 100nM, por 24 horas, utilizando a metodologia de Isotiocianato de Guanidina e Fenol-Clorofórmio (Chomczynski P and Sacchi N, 1987). O método consiste na adição de 500µl de solução D gelada (Isotiocianato de guanidina 4M, Citrato de sódio 25nM pH7,0, Sarcosil 0,05% e 0,1M de β-mercaptoetanol 98%). Em sequência foram adicionados 70µl de acetato de sódio 2M pH 4,0, 500µl de fenol saturado, e 150µl de clorofórmio-alcool isoamílico, deixando as amostras em gelo por 15 minutos. As amostras então, foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C. Retirou-se a fase aquosa do sobrenadante, referente ao RNA extraído, transferindo assim para um novo tubo. Em seguida, foram adicionado as amostras igual volume de isopropanol para precipitação, incubando-se por 16 horas a -20°C. Passada a incubação, os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 10.000 rpm

a 4°C, e o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido em 150µl de solução D, com adição de 170µl para nova precipitação do RNA incubando-se por 3 horas a -20°C. Os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C, e o sobrenadante foi descartado e novamente o precipitado foi lavado com etanol 75%, e centrifugados por 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o após secagem do excesso de etanol em, temperatura ambiente, o RNA foi dissolvido em 30µl de água livre de DNase/RNase (Gibco, Gainsburg, EUA).

A concentração do RNA foi determinada pelo NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) e as absorbâncias 260 e 280nm também foram avaliadas, no qual a relação 260/280 ideal apresentou-se entre 1,9 e 2,0. As amostras também foram avaliadas quanto à integridade usando RNA Nano Chips em aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer, sendo utilizadas amostras que apresentavam um RIN>8.

3.11. Amplificação

200ng de RNA purificado pelo RNasey Mini Kit (Qiagen), conforme instrução do fabricante, foi utilizado para realização da etapa de amplificação. Para a etapa de amplificação, os RNAs purificados das amostras controle, tratadas e o RNA utilizado como referência (Universal Human Reference RNA – Agilent) com a adição de RNA controle (Spike-in) foi realizada utilizando o Kit Low Input RNA Linear Amplification kit 2-color (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente a enzima T7 RNA Polymerase foi adicionada com os fluorocromos cianina 5 (Cy-5): como amostra experimental e cianina 3 (Cy-3): como amostra de referência, para etapas de amplificação de RNAs complementares anti sense (cRNA). Após essa etapa os cRNA foram purificados pelo RNasey Mini Kit (Qiagen) e 825ng de cRNA marcados foram hibridizados com as lâminas Human GE

4X44K V2 (Agilent Technologies) por 17 horas a 65°C em forno de hibridização para microarrays. Então, as lâminas foram lavadas com os tampões GE Wash Buffer 1 e GE Wash Buffer 2 (Agilent Technologies), conforme protocolo do fabricante. Finalmente, as lâminas foram digitalizadas pelo Agilent Microarrays Scanner (Serviço de multiusuário, pertencente ao o laboratório de Biologia Molecular do Câncer, na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sob responsabilidade do Prof. Dr. André Luiz Vettore de Oliveira) e a quantificação dos dados e o controle de qualidade foram feitos utilizando o Agilent Feature Extration (FE) Software. Os dados extraídos foram importados para o Programa de Análise Agilent Gene Spring 12.5 - GX.

3.12. Extração proteica para a Proteômica

Para os ensaios de proteômica foram separados precipitados das amostras das células MCF7*pc*NEO e MCF7*pc*SPARC controle e tratadas com 5nM e 100nM de docetaxel por 24 horas. Os precipitados foram enviados para o Instituto Nacional do Câncer (INCA- Rio de Janeiro, Brasil), e todos os procedimentos foram realizados no CEMO (Centro de Transplante de Medula Óssea) em colaboração com a Dra. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay.

Resumidamente, células foram lavadas em PBS e ressuspensas em tampão de lise gelado contendo: 100mM de Hepes, 500mM KCl, 5mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 35% glicerol, 0,1mM b-Glicerolfosfato, 0,1 mM ortovanadato de sódio, 1mM DTT e incubadas em gelo por 30 minutos. Os lisados foram centrifugados a 12000 g, 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e utilizado como extrato total das proteínas. A quantificação do extrato proteico foi determinada utilizando o método de Bradford (Bradford MM, 1976).

3.13. Caracterização do perfil proteico

As amostras foram concentradas 16X e eluídas com 50mM bicarbonato de amônio, utilizando um sistema de ultra-filtração de 3kD (Millipore). As proteínas foram então desnaturadas (0,1% RapiGEST a 60°C durante 15 minutos) (Waters, Milford, EUA), reduzidas (10mM de ditioneitol a 60°C durante 30 min), alquiladas (iodoacetilamida 10mM durante 30 minutos à temperatura ambiente escuro), e digeridas enzimaticamente com tripsina em uma proporção de 1:50 de enzima para cada proteína (w/w). O scanamento (MSE) das amostras foi analisado por cromatografia multidimensional no espectrometro de massas Synapt HDMS. As proteínas foram identificadas e quantificadas utilizando o software *Proteinlynks global Server* (Waters) com a ferramenta *Expression E*. O programa MetaCore™ foi utilizado para determinar o perfil de proteômica.

3.14. Validação

3.14.1. Desenho de oligonucleotídeos

Para a validação dos transcritos diferencialmente expressos foram desenhados oligonucleotídeos para uma região entre exons, capazes de amplificar somente o gene de interesse, utilizando como base o Primer Express® Software v3.0.1 (Applied Biosystems). A especificidade de cada primer foi avaliada com o auxílio dos algoritmos ensemble (www.ensembl.org/index.html) e blat (www.genome.ucsc.edu). O tamanho do produto amplificado pelos oligonucleotídeos desenhados variou de 120 a 150 pares de bases.

3.14.2. Tratamento do RNA com DNase I

A partir de 3 μ g do RNA extraído conforme descrito no item 3.3.1 as amostras tratadas com docetaxel e controle foram tratadas com a enzima DNase I (1 U/ μ l – Promega, Madison, EUA) por 1 hora a 37°C, para a remoção de uma possível contaminação de DNA. Posteriormente, o RNA foi precipitado com etanol absoluto (2,5X volumes) e Acetato de Sódio (0,2 M pH 4,0) a -20°C por 16h. Passada a incubação, o RNA foi centrifugado por 30 minutos a 10.000 rpm a 4°C, e lavado com etanol 75%. Após nova centrifugação de 20 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado seco a temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, o precipitado foi ressuspensionado em 20 μ l de água livre de DNase/RNase (GIBCO, Gaithersburg, EUA).

3.14.3. Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit High-Capacity cDNA reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Warrington, UK), seguindo as instruções do fabricante. Em suma, uma mistura contendo dnTP, iniciadores randômicos (primers), transcriptase reversa e inibidor de RNase foi adicionada ao volume de RNA tratado, como descrito no item. A reação de síntese de cDNA foi realizada a 25°C por 10 minutos, seguida de incubação de 2 horas em banho-maria.

Para verificar a qualidade da síntese de cDNA foram realizadas reações de amplificação (*PCR*), utilizando as amostras de cDNA e os genes β -2-microglobulinas e GAPDH, como controle interno de massa da reação. As reações de *PCR* foram realizadas em um volume final de 25 μ l, contendo: 2.5 μ l de cDNA (1:10); 125 μ M de dNTP; 50mM KCL; 10mM de Tris-HCL pH8.3; 0,1mg/ml de gelatina; 1,5mM MgCl₂ e 0,75 U de Taq DNA Polimerase. A reação foi realizada em 35 ciclos: desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização a 55°C por 1 minuto e extensão a 75°C por 5 minutos.

Os produtos amplificados foram diluídos em tampão Type II e submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, utilizando o marcador de peso molecular 100pb.

3.14.4. PCR em tempo real (qPCR)

A quantificação relativa dos transcritos diferencialmente expressos foi realizada por *PCR* em tempo real (qPCR) utilizando o kit Power SYBR *PCR* Master Mix (Applied Biosystems, California, EUA). A amplificação e a detecção dos fragmentos amplificados foram feitas utilizando-se o equipamento Gene Amp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, California, EUA).

Foram utilizados os cDNAs obtidos a partir do RNA total extraído das células MCF7pcNEO e MCF7pcSPARC, na ausência e na presença do tratamento com docetaxel, e com os cDNAs obtidos a partir do RNA total das células MDA-MB-231pcNEO e MDA-MB-231pcSPARC. A detecção dos produtos foi feita pelo contínuo monitoramento do sinal fluorescente emitido pelo corante SYBR Green que se intercala a dupla fita do DNA e o gene de referência *GADPH* foi utilizado como normalizador da expressão dos transcritos selecionados.

Dessa forma, os valores quantitativos (*Ct*) foram obtidos a partir do ciclo limiar onde o aumento no sinal associado ao crescimento exponencial dos produtos de *PCR* começa a ser detectado. Os ensaios foram analisados em triplicata.

O nível de expressão gênica foi determinado pela seguinte fórmula: $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde ΔCT é a diferença entre a média do *CT* da amostra amplificada para o gene alvo e a média do *CT* da mesma amostra amplificada para o gene referência (*GADPH*), e $\Delta\Delta CT$ corresponde à diferença entre o ΔCT da amostra de interesse e o ΔCT da amostra utilizada como referência (Pfaffl MW, 2001).

3.15. Análise Estatística

Os resultados foram analisados por teste-t (Student) para amostras não pareadas com o programa Microsoft® Office Excel® 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, EUA) e por *one-way* ANOVA (teste Bonferroni ou teste Mann-Whitney) utilizando o programa SPSS for Windows 10.1.0, 2000 (SPSS Inc., Chicago, EUA). Os valores considerados significativamente diferentes apresentaram $p \leq 0,05$.

3.16. Análise da Expressão Gênica (qRT-PCR array)

Para reação da PCR em Tempo Real foram utilizados o equipamento 7500 Detection System (Perkin Elmer), e a placa de Human WNT Signaling Pathway RT2 Profiler™ PCR Array com amplo painel de expressão gênica da via do WNT. Esta plataforma é constituída por 84 genes chaves envolvidos na modulação dos processos biológicos da via do WNT e 5 genes endógenos. A qRT-PCR foi realizada seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, Os cDNAs sintetizados das amostras MCF7*pc*NEO e MCF7*pc*SPARC controles e tratadas com 100nM de Docetaxel, foram submetidos a análise de expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR array), no qual foi adicionado 25µl de RT2 qPCR Master Mix em cada poço da plataforma de PCR array. As condições do programa de ciclagem, foi realizado contendo um ciclo inicial à 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos à 95°C e 1 minuto à 60°C. Os dados com os valores de thresholds foram exportados e analisados pelo programa RT2 Profiler PCR Array Data Analysis Template v 3.3 (SABiosciences).

4. RESULTADOS

4.1. Expressão da proteína SPARC em células de câncer de mama MCF7

Neste estudo, com o objetivo de se avaliar o efeito da super-expressão de SPARC em células de câncer foram realizados ensaios de transfecção das células MCF7 com os vetores *pcMV6-Neo* (vetor vazio) e *pcMV6-SPARC*. A caracterização dos transfectantes para a expressão protéica do SPARC foi avaliada pelo ensaio de Western Blot, utilizando o anticorpo anti-SPARC (H-90) (Santa Cruz Biotechnology, INC). Na Figura 4A podemos observar que as células MCF7*pcSPARC* expressam a proteína SPARC. Essa expressão, no entanto, não é observada nas células MCF7*pcNEO*. Análises de imunofluorescência (Figura 4B) foram realizadas, confirmando a expressão do SPARC nas células MCF7*pcSPARC*.

Figura 4: Caracterização das células MCF-7 transfectadas com o vetor de expressão para superexpressão do SPARC. Avaliação da expressão protéica da SPARC e β-actina (controle de massa) por western blot das MCF-7 (A) tranfectadas com *pcMV6-Neo* e *pcMV6-SPARC*. Fotomicrografia mostrando a expressão e localização da proteína SPARC nas células MCF7*pcNEO* e MCF7*pcSPARC* (B) em monocamada. Anti-SPARC (Santa CruzA) 1:50 e anti-rabbit Alexa Fluor 594 (1:400; vermelho). Os núcleos foram corados com DAPI (1:5000; azul).

4.2. Efeito da expressão do gene SPARC na morfologia de células MCF7

Com o objetivo de avaliar a influência do gene SPARC na morfologia das células MCF7 transfectadas com o vetor de expressão e contendo o vetor vazio e compará-las, as células foram inoculadas e após uma confluência de 70%, fotos foram tiradas no microscópio invertido, com aumento de 10X. Podemos observar mudanças na morfologia nas células MCF7 expressando SPARC (MCF7*pc*SPARC) em comparação com as células MCF7 parental e MCF7*pc*NEO, que não expressam SPARC. Na Figura 5B, as células MCF7*pc*NEO apresentaram-se com morfologia muito semelhante as células epiteliais MCF não transfectadas (Figura 5A). No entanto, as células MCF7*pc*SPARC (Figura 5C) apresentam-se mais espalhadas e com aumento da formação de estruturas mais organizadas, em forma de “rosetas” e com células mais alongadas do que as células MCF7*pc*NEO (Figura 5B).

Figura 5. Imagem representativa da morfologia de células (A) MCF7 (B) MCF7*pc*NEO e (C) MCF7*pc*SPARC. Células MCF7*pc*NEO e MCF7*pc*SPARC foram mantidas em meio suplementado com 10% de FBS e ao atingirem a confluência de 70% fotos foram tiradas no misvrosκόpio invertido, no aumento de 10X.

4.3. Efeito da expressão do SPARC na proliferação e migração das células MCF7 (ensaio de *Wound Healing*)

Com o objetivo de avaliar o efeito da super-expressão de SPARC na proliferação das células MCF7 realizou-se o ensaio colorimétrico de redução do MTT. Como observado na Figura 6, não houve diferença estatisticamente significativa na razão de proliferação das células MCF7 transfectadas com o vetor para super-expressão da proteína SPARC (MCF7 $_{pc}$ SPARC) em relação as células MCF7 $_{pc}$ NEO.

Figura 6. Efeito da expressão de SPARC na razão de proliferação das células MCF-7. Células MCF7 $_{pc}$ NEO e MCF7 $_{pc}$ SPARC foram mantidas em meio suplementado com 10% de FBS e avaliadas por ensaio de MTT nos tempos de 24, 48, 72 e 96 após inoculação. As barras representam os valores absolutos de absorbância em leitura a 570 nm.

O efeito da expressão de SPARC na migração das células MCF7 $_{pc}$ NEO e MCF7 $_{pc}$ SPARC foi avaliado pelo ensaio de *Wound Healing* (Figura 7A). Observamos que as células MCF7 $_{pc}$ SPARC apresentaram um aumento da migração em relação as células controle MCF7 $_{pc}$ NEO, sendo este aumento foi significativo a partir de 48h. O fechamento da ferida para as células com expressão de SPARC se deu em 144 horas, enquanto que o controle não apresentou esta mesma capacidade de invasão.

Figura 7. Efeito da expressão do SPARC na migração das células MCF7. As imagens de cada poço foram registradas nos tempos de 0h até 144h horas após ferida na superfície da monocamada celular. Na Figura 7A, podemos observar uma imagem representativa de cada tempo. A comparação da porcentagem de migração das células entre os tempos estabelecidos está mostrada na Figura 7B.

4.4. Efeitos da expressão de SPARC nas fases do ciclo celular e em resposta ao quimioterápico Docetaxel nas células MCF7

Utilizando marcação com fluoróforo iodeto de propídeo (PI) e a técnica de citometria de fluxo avaliamos os efeitos da expressão de SPARC nas fases do ciclo celular na ausência e na presença de docetaxel. Para isto, as células MCF7pcNEO e MCF7pcSPARC foram mantidas em meio suplementado com 10% de FBS e tratadas com o veículo (controle) ou com 100nM de Docetaxel por 24 horas em triplicata. Podemos observar na Figura 8, que grande porcentagem da população das células controle MCF7pcNEO (19.95%) e

MCF7 pc SPARC (19.77%) permaneceram em G0/G1 na ausência de docetaxel, sendo que a fração de células que permaneceram em G0/G1 foi maior nas células MCF7 pc SPARC (8,60%) em relação a MCF7 pc NEO (5,45%) após o tratamento com docetaxel. O efeito do tratamento com docetaxel 100nM por 24h foi semelhante nas células MCF7 pc NEO (21.7%) e MCF7 pc SPARC (22.13%), resultando em um acúmulo significativo da população de células na fase G2/M. Observamos também um aumento significativo na porcentagem de células em Sub-G1 nas células MCF7 pc SPARC antes (3.13%; $p=0,012$) e após tratamento com docetaxel (3.64%; $p=0,001$) quando comparadas às células MCF7 pc NEO, que não expressam SPARC, antes (1.93%) e após o tratamento (1.81%). Além disso, observamos uma redução da população de células em fase S nas células MCF7 pc SPARC (4.18%) em comparação com as células MCF7 pc NEO (5.66%), após o tratamento com docetaxel.

Figura 8. Efeitos da expressão de SPARC nas diferentes fases do ciclo celular antes e após o tratamento com o quimioterápico Docetaxel. sub-G1 (% morte); S (Síntese); G0/G1 (2N); G2/M (4N); * comparação estatisticamente significativa $p<0,05$, teste Mean Witney e ANOVA.

4.5. Análise do perfil de expressão gênica de células MCF7 com diferença de expressão de SPARC antes e após tratamento com docetaxel

Visando avaliar os efeitos da super-expressão da proteína SPARC na modulação do perfil de expressão gênica das células MCF7 e identificar genes diferencialmente expressos potencialmente associados à quimiosensibilidade ao docetaxel mediada por SPARC, o perfil de expressão gênica das células MCF7_{pc}NEO e MCF7_{pc}SPARC antes e após o tratamento com 5nM e 100nM de docetaxel foi avaliado utilizando a técnica de *cDNA microarray*. Essas concentrações de docetaxel foram escolhidas por existirem dados na literatura mostrando diferentes efeitos dos taxanos docetaxel e paclitaxel em baixas e altas doses. Em baixa dose (2-10 nM) o docetaxel pode induzir catástrofe mitótica, seguida de aneuploidia e apoptose, ao passo que, na concentração considerada clínica (100 nM) esse quimioterápico induz um arraste em G2/M que pode levar ao fenômeno de “mitotic slippage” e a morte celular por apoptose e necrose (Morse DL et al., 2005; Bayet-Robert M et al., 2010).

Para análise do perfil de expressão, o RNA total das amostras de células MCF7_{pc}NEO e MCF7_{pc}SPARC controles e tratadas com docetaxel nas concentrações de 5nM e 100nM por 24 horas, foi avaliado quanto à integridade. Amostras foram consideradas de boa qualidade quando apresentam valores de RIN (*RNA Integrity Number*) acima de 7. Em nossos estudos, os RNAs extraídos apresentaram uma ótima qualidade, com valores RIN > 8.5, como exemplificado nos eletroferogramas da Figura 9.

Para os ensaios de *cDNA microarray*, os parâmetros de qualidade foram estabelecidos pelo fabricante no *software Agilent Feature Extration (FE)*. As métricas no *Agilent Gene Expression QC Report* nos fornecem informações úteis durante o processamento do *array*, além da qualidade do experimento. Em nossos experimentos de *Microarray*, todos os parâmetros analisados obtiveram a classificação *GOOD*, como

podemos observar na Tabela 1, permitindo assim prosseguirmos com padrões de qualidade adequados.

Figura 9. Eletroflerogramas da qualidade e integridade das amostras de RNA total extraídos das linhagens celulares MCF7pcNEO e MCF7pcSPARC antes e após o tratamento com o docetaxel.

Tabela 1. Resumo dos parâmetros da qualidade dos experimentos de Microarray. Disponíveis no *Agilent Gene Expression QC Report*.

Metric Name	Value	Excellent	Good	Evaluate
IsGoodGrid	1.00		>1	<1
AnyColorPrntFeatNonUn...	0.03		<1	>1
gNegCtrlAveBGSubSig	-5.97		-20 to 10	<-20 or >10
gNegCtrlSDevBGSubSig	3.16		<15	>15
rNegCtrlAveBGSubSig	-2.23		-20 to 4	<-20 or >4
rNegCtrlSDevBGSubSig	1.28		<6	>6
gNonCntrlMedCVBkSubSig...	16.33		0 to 18	<0 or >18
rNonCntrlMedCVBkSubSig...	16.90		0 to 18	<0 or >18
gE1aMedCVBkSubSignal	16.49		0 to 18	<0 or >18
rE1aMedCVBkSubSignal	15.76		0 to 18	<0 or >18
absE1aObsVsExpCorr	0.93		>0.86	<0.86
absE1aObsVsExpSlope	0.85		>0.85	<0.85
gDDN	-		-15 to 15	<-15 or >15
rDDN	-		-15 to 15	<-15 or >15

◆ Excellent ◆ Good ◆ Evaluate

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa *GeneSpring 12.5-GX*. A análise comparativa dos transcritos obtidos do perfil de expressão das

células MCF7_{pc}NEO e MCF7_{pc}SPARC na ausência do tratamento (mantidas na presença do veículo) e/ou nos tratamentos com 5nM e 100nM, considerando como *cut off* um *fold change* ≥ 3 , revelou 276 transcritos mais expressos na MCF7_{pc}SPARC quando comparada com as células MCF7_{pc}NEO controle; 401 transcritos mais expressos na MCF7_{pc}SPARC quando comparadas com as MCF7_{pc}NEO ambas tratadas com 5nM de docetaxel; 385 transcritos mais expressos nas células MCF7_{pc}SPARC quando comparadas com as células MCF7_{pc}NEO ambas tratadas com 100nM de docetaxel.

Os 70 genes mais diferencialmente expressos foram classificados em relação às funções e processos biológicos dos quais participam, utilizando o *Gene Ontology* (GO). As representações gráficas da distribuição destes genes segundo a classificação de GO são mostradas na Figura 10. Os genes diferencialmente expressos estão envolvidos em diferentes processos biológicos, tais como, diferenciação celular, indução de apoptose, transporte, *folding* de proteína, citoesqueleto e transdução de sinal, entretanto não observamos nenhuma alteração na percentagem de genes associados a nenhum processo biológico em específico. Em todos os tratamentos as categorias que apresentaram mais de 10% de percentagem foram: ligação a proteínas, processos metabólicos e resposta celular a estímulos.

(A)

(B)

(C)

Figura 10. Distribuição dos genes diferencialmente expressos classificados por funções e processos biológicos utilizando o *Gene Ontology* (GO). (A) MCF7pcSPARC vs MCF7pcNEO Controle; (B) MCF7pcSPARC vs MCF7pcNEO 5nM Docetaxel e (C) MCF7pcSPARC vs MCF7pcNEO 100nM Docetaxel.

Além da classificação dos genes diferencialmente expressos em funções e processos biológicos, avaliamos as interações entre genes e vias de sinalização associadas aos genes identificados como diferencialmente expresso. Para isso, foi utilizado o programa IPA- Ingenuity® para gerar redes gênicas funcionais a partir da lista dos 70 genes mais diferencialmente expressos identificados na comparação entre as células MCF7_{pcSPARC} vs MCF7_{pcNEO} antes e após o tratamento com Docetaxel por 24 horas. Várias redes gênicas foram geradas, e as redes gênicas que mais se destacaram estão representadas nas Figuras 11, 12, 13 e 14.

Figura 11. Rede de interação molecular mostrando uma visão integrada dos genes mais expressos (vermelho) e menos expressos (verde) em células MCF7_{pc}SPARC vs MCF7_{pc}NEO controle (mantidas na presença do veículo), destacando os genes *SPARC* e *SPANXA1*. Genes ou produtos de genes são representados como nós, e da relação biológica entre dois nós é representada como uma malha. A intensidade da cor do nó indica o grau de expressão positiva (vermelho) ou negativa (verde). As malhas descrevem a natureza da relação entre os nós: — interação direta (atua sobre); ----, interação indireta; ⊗ auto-regulação.

Figura 12. Rede de interação molecular mostrando uma visão integrada dos genes mais expressos (vermelho) e menos expressos (verde) em células MCF7_{pc}SPARC vs MCF7_{pc}NEO controle (mantidas na presença do veículo), destacando os genes *SPARC* e *WNT5A*. Genes ou produtos de genes são representados como nós, e da relação biológica entre dois nós é representada como uma malha. A intensidade da cor do nó indica o grau de expressão positiva (vermelho) ou negativa (verde). As malhas descrevem a natureza da relação entre os nós: — interação direta (atua sobre); ----, interação indireta; ⊖ auto-regulação.

Figura 13. Rede de interação molecular mostrando uma visão integrada dos genes mais expressos (vermelho) e menos expressos (verde) em células MCF7_{pc}SPARC vs MCF7_{pc}NEO tratadas com 5nM de docetaxel, destacando os genes *SPARC*, *TWIST1* e *WNT3A*. Genes ou produtos de genes são representados como nós, e da relação biológica entre dois nós é representada como uma malha. A intensidade da cor do nó indica o grau de expressão positiva (vermelho) ou negativa (verde). As malhas descrevem a natureza da relação entre os nós: — interação direta (actua sobre); ----, interação indireta; ⊖ auto-regulação.

Figura 14. Rede de interação molecular mostrando uma visão integrada dos genes mais expressos (vermelho) e menos expressos (verde) em células MCF7_{pc}SPARC vs MCF7_{pc}NEO tratadas com 100nM de docetaxel, destacando genes da via do WNT. Genes ou produtos de genes são representados como nós, e da relação biológica entre dois nós é representada como uma malha. A intensidade da cor do nó indica o grau de expressão positiva (vermelho) ou negativa (verde). As malhas descrevem a natureza da relação entre os nós: — interação direta (actua sobre); ----, interação indireta; ⊖ auto-regulação.

Na tabela 2 estão listados os genes diferencialmente expressos que foram selecionados após anotação manual de todos os 70 genes mais diferencialmente expressos *up* e *down* regulados dos três tratamentos, utilizando bancos de dados publicos. Várias funções biológicas foram descritas para estes genes: proliferação, angiogenese, invasão, além de quimiosensibilidade a drogas. Os genes destacados em vermelhos (*SPANXA1*, *TWIST1*, *ALDH1A3*, *TARP*) foram selecionados para validação por *PCR* em Tempo Real. Além destes, outros dois genes (*XAF1* e *WNT5A*) nos chamaram a atenção, devido suas modulações em nossos tratamentos, além de importância biológica, porém estes genes não estavam entre os 70 genes mais expressos (destacados em azul). Estes genes também foram selecionados para validação por *PCR* em Tempo Real.

Tabela 2. Lista de genes identificados como diferencialmente nas análises de transcriptoma. Em vermelho e azul, os genes selecionados para validação pro *PCR* em Tempo Real.

<i>Up</i> regulados na presença e ausência de Docetaxel em todos os tratamentos	C8or4, CEACAM6, CPNE4, FIGN, KCNMA1, SPANXA1 , SPANXB2, THBD, UGT1A6, VCX2, FAM198B
<i>Down</i> regulados na presença e ausência de Docetaxel em todos os tratamentos	ADRA2A, AGR3, CALB2, CALB2, CALCR, CRISPLD1, DACF, DLC1, DOK6, FOXI1, NAV3, NPAS3, PCDH10, PDE4B, RAMP1, SLC1A6, XAF1
<i>Up</i> regulados na presença do tratamento de 100nM de Docetaxel por 24 horas	ANKDR1, ATPBD4, CCDC68, CR2, DIAPH2, GABRA5, GPA33, GPR65, PAH, RSU1, TWIST1 , VIL1, ALDH1A3 , ANXA1, PPARG, TARP , SCIN, WNT5A
<i>Down</i> regulados na presença do tratamento de 100nM de Docetaxel por 24 horas	ADAM32, ADAMTS1, DPF3, ENTHD1, F11, GYPA, PNCK, SP8, ADCY1, CYP4F2, PIP5K1B, PLXA, PAMP3

4.6. Expressão dos genes *TWIST1*, *XAF1*, *TPM4*, *TARP*, *ALDH1A3*, *WNT5A* e *SPANXA1* nas células MCF7

Primeiramente, a fim de observar a expressão basal dos genes selecionados, foram realizados ensaios de *PCR* e *PCR* em Tempo Real utilizando cDNAs provenientes de linhagem celular de câncer de mama MCF-7 parental não transfectada. Foi observado que dentre os genes selecionados (*XAF1*, *TPM4*, *TARP*, *ALDH1A3*, *WNT5A* e *SPANXA1*) estavam expressos nas células não transfectadas. Assim, todas as análises subsequentes foram realizadas utilizando as comparações entre células MCF7_{pc}NEO e MCF7_{pc}SPARC e entre os tratamentos em cada uma das células. No entanto, observamos que na linhagem MCF7 o *TWIST1* não estava expresso. Diante disto, utilizamos outras linhagens celulares de mama para avaliar uma possível falha na padronização da reação ou a real ausência de expressão. O gene *TWIST1* se destacou em nossas análises de transcriptoma, visto que na rede gênica gerada para células MCF7_{pc}SPARC vs MCF7_{pc}NEO tratadas com 5nM Docetaxel este gene apresentou-se como negativamente regulado enquanto nas células tratadas com 100nM Docetaxel, apresentou-se positivamente regulado, sugerindo ser um gene regulado pelo tratamento com Docetaxel em células que superexpressam SPARC. Conforme representado na Figura 15, nas linhagens MCF7, MDAMB231 e SKBR3 foi constatada a ausência de expressão do *TWIST1*, mas que estava presente nas células das linhagens Hb4a, C5.2 e MCF10A. Sendo assim, neste momento, este gene não pode ser validado

Figura 15. Foto representativa de reação de amplificação do cDNA de TWIST e GAPDH em diferentes linhagens celulares de mama – Reação de *PCR* padronizada nas condições ideais de amplificação, demonstrando ausência de expressão de TWIST nas linhagens MCF7, MDA MB231 e SKBR3.

Os genes *XAF1*, *TPM4*, *TARP*, *ALDH1A3*, *WNT5A* e *SPANXA1* foram avaliados nas comparações entre as células MCF7*pc*SPARC e MCF7*pc*NEO antes e após o tratamento com 5nM e 100nM de docetaxel. Os resultados estão apresentados na Figura 16, 17 e 18.

Na ausência do tratamento com docetaxel foi observado um aumento da expressão relativa dos genes *XAF1*. Na comparação entre as células MCF7*pc*NEO após o tratamento com 5nM e 100nM de docetaxel foi observado um aumento na expressão dos transcritos dos genes *XAF1*. No entanto, nas comparações entre as células MCF7*pc*SPARC na ausência e na presença de docetaxel, observamos uma redução dos transcritos de *XAF1* nas células tratadas com 5nM e 100nM.

Para os transcritos do gene *TPM4* observamos um aumento da sua expressão relativa nas células MCF7*pc*SPARC em comparação com as células MCF7*pc*NEO, que não expressam SPARC. Nas comparações entre as células MCF7*pc*NEO após o tratamento com 5nM e 100nM foi observado um aumento da expressão dos transcritos. No entanto, observamos uma redução dos transcritos do *TPM4* nas células

MCF7_{pc}SPARC tratadas com 5nM de docetaxel. Estes resultados sugerem que os transcritos dos genes *XAF1* e *TPM4* são modulados pela expressão de SPARC e pelo docetaxel.

Nas comparações entre as células MCF7_{pc}SPARC vs. MCF7_{pc}NEO, foi observada um aumento na expressão do gene *TARP* antes e após o tratamento com Docetaxel.

O gene *ALDH1A3* apresentou uma tendência ao aumento de sua expressão nas comparações MCF7_{pc}SPARC vs. MCF7_{pc}NEO.

A mudança no perfil de expressão mais importante nas nossas análises foi o aumento gradativo e significativo de expressão do gene *WNT5A* nas células controle e com 5nM e 100nM de Docetaxel (p=0.041 (CTR); p=0.011 (5nM) e p=0,027(100nM)).

O gene *SPANXA1* apresentou aumento significativo de expressão nas comparações MCF7_{pc}SPARC vs. MCF7_{pc}NEO Controle (p=0.009) e MCF7_{pc}SPARC vs. MCF7_{pc}NEO 100nM (p=0.035) nas células transfectadas com o gene *SPARC*.

Figura 16. Expressão relativa dos genes selecionados para validação nas células MCF7_{pc}SPARC e MCF7_{pc}NEO - Comparação das médias de expressão relativa dos genes *XAF1* e *ALDH1A3* entre as células (A) MCF7 Neo e MCF7 Sparc em cada um dos tratamentos, (B) entre os tratamentos nas células MCF7 Neo e MCF7 Sparc CTR–Controle, 5nM e 100nM e (C) utilizando como amostra referência MCF7_{pc}NEO CTR. * comparação estatisticamente significativa $p < 0,05$, teste Mean Witney e ANOVA.

Figura 17. Expressão relativa dos genes selecionados para validação nas células MCF7_{pc}SPARC e MCF7_{pc}NEO - Comparação das médias de expressão relativa dos genes *SPANXA1* e *WNT5A* entre as células (A) MCF7 Neo e MCF7 Sparc em cada um dos tratamentos, (B) entre os tratamentos nas células MCF7 Neo e MCF7 Sparc CTR–Controle, 5nM e 100nM e (C) utilizando como amostra referência MCF7_{pc}NEO CTR. * comparação estatisticamente significativa $p < 0,05$, teste Mean Witney e ANOVA.

Figura 18. Expressão relativa dos genes selecionados para validação nas células MCF7_{pc}SPARC e MCF7_{pc}NEO - Comparação das médias de expressão relativa dos genes *TPM4* e *TARP* entre as células (A) MCF7 Neo e MCF7 Sparc em cada um dos tratamentos, (B) entre os tratamentos nas células MCF7 Neo e MCF7 Sparc CTR–Controle, 5nM e 100nM e (C) utilizando como amostra referência MCF7_{pc}NEO CTR. * comparação estatisticamente significativa $p < 0,05$, teste Mean Witney e ANOVA.

Tabela 3: Validação dos genes diferencialmente expressos nos ensaios de cDNA Microarray (FC=3,0) selecionados a partir das listas de comparações entre cada tratamento.

Comparação	XAF1		TPM4		ALDH1A3		TARP		SPANXA1		WNT5A	
	array	qPCR	array	qPCR	array	qPCR	array	qPCR	array	qPCR	array	qPCR
Sparc vs Neo Ctr	↓ -4,1	x	-	NA	↑ 5,13	T	↑ 6,22	T	↑ 87,92	√	↑ 2,39	√
Sparc vs Neo 5nM	↓ -4,9	T	↑ 4,54	x	↑ 5,16	T	↑ 6,55	T	↑ 77,23	√	↑ 2,33	√
Sparc vs Neo 100nM	↓ -5,08	T	↑ 4,43	T	↑ 9,23	T	↑ 13,76	T	↑ 82,95	√	↑ 4,84	√

Ensaio Microarray Fold Change (FC) 3,0; array: FC obtido pela análise de microarray. qPCR: resultado da validação pela técnica de PCR em Tempo real; NA: Não Avaliado; Neo: MCF-7 pcNeo, Sparc: MCF7pcSPARC, Ctr: Controle; 5nM e 100nM: concentração de Docetaxel utilizada nos tratamentos. X: Não Validado; √: Validado; T: Tendência a Validação

4.7. Análise da Proteômica

Para os ensaios de proteoma, *pellets* de células MCF7pcNEO e MCF7pcSPARC antes e após o tratamento com 5nM e 100nM de docetaxel foram enviados para o INCA (Instituto Nacional do Câncer - Rio de Janeiro). As amostras foram analisado por cromatografia multidimensional (MSE) em um espectrofotômetro de massa SYNAPT HDMS no laboratório da Dra. Eliana Abdelhay. Os dados de proteômica foram gerados utilizando o software *Proteinlynks global Server* (Waters) com a ferramenta *Expression E*, e o programa MetaCore™ foi utilizado para determinar o perfil de proteômica. Foram utilizadas as amostras controle e tratadas (5nM e 100nM) por 24 horas, seguindo o mesmo protocolo de tratamento utilizado no transcriptoma.

Após as análises utilizando o programa Metacore™, foram gerados diversos mapas com um conjunto de vias de sinalização e processos metabólicos, representando a expressão e a interação entre genes/proteínas.

A Figura 19 mostra o mapa do Remodelamento de Citoesqueleto, caracterizando uma das vias mais enriquecidas na comparação entre as células MCF7pcSPARC vs MCF7pcNEO Controle.

Na comparação MCF7_{pc}SPARC vs MCF7_{pc}NEO tratadas com 100nM Docetaxel a via mais enriquecida foi a via do metabolismo do GTP mostrada na Figura 20. Proteínas de uma mesma família apresentaram-se reguladas de forma diferente neste tratamento, como podemos observar na família de proteínas da Guanilato Ciclase Solúvel, na qual a Guanilato Ciclase Alfa apresenta-se com expressão reduzida, enquanto que a Guanilato Ciclase Beta apresenta-se com expressão aumentada. Além disso, na família de proteínas Guanilato Ciclase Alfa dois membros apresentaram regulações diferentes, sendo que a GUCYA1 apresenta expressão reduzida e a GUCYA2 tem sua expressão aumentada. O mesmo efeito de diferença de expressão nas nossas análises pode ser observado em outra família de proteínas, as Fosfodiesterases (PDEs), onde a PDE9A e PDE10A foram regulados negativamente e a PDE2A regulada positivamente. Além destas, a proteína PKM2 (*Pyruvate Kinase M2*) também se destacou neste mapa, sendo a sua expressão regulada negativamente.

Figura 19. Remodelação do Citoesqueleto para a comparação entre as células MCF7_{pcSPARC} vs MCF7_{pcNEO} Controle. Os níveis de expressão das proteínas estão representados como termômetros. Os termômetros com a cor vermelha identificam as proteínas *up* reguladas e os termômetros com a cor azul identificam as proteínas *down* reguladas.

Figura 20. Metabolismo de GTP para a comparação entre as células MCF7 pc SPARC vs MCF7 pc NEO tratadas com 100nM Docetaxel. Os níveis de expressão das proteínas estão representados como termômetros. Os termômetros com a cor vermelha identificam as proteínas up reguladas e os termômetros com a cor azul identificam as proteínas down reguladas.

4.8. Integração dos dados de Transcriptoma e Proteoma

Para a integração dos dados gerados a partir das duas metodologias, foram cruzadas as listas dos genes diferencialmente expressos para o transcriptoma e proteoma nos três tratamentos.

Em nossos estudos, destacou-se a via do gene *WNT*, que foi alterada entre os tratamentos de 5nM e 100nM de docetaxel no transcriptoma e 100nM de docetaxel na proteoma. Os transcritos dos genes *TCF (LEF)*, *TCF7L2* e *WNT5A* foram modulados positivamente na análise do transcriptoma. Por outro lado, os transcritos do gene *WNT* foram regulados negativamente em ambos os tratamentos no transcriptoma e positivamente na análise proteômica (Figura 21).

Figura 21. Redes de interações entre proteínas gerada para a comparação MCF7_{pc}SPARC vs MCF7_{pc}NEO tratadas com 100nM de Docetaxel, destacando genes da via WNT -utilizando o software MetaCore™.

A tabela 4 mostra a lista de 40 genes identificados como diferencialmente expressos tanto na análise do transcriptoma quanto na proteômica das células MCF7_{pc}NEO e MCF7_{pc}SPARC controles e tratadas com 5nM e 100nM de Docetaxel.

Tabela 4. Lista de genes identificados como diferencialmente expressos tanto nas análises de transcriptoma quanto de proteôma.

Tratamento	Up Regulados	Down Regulados
Sparc vs Neo Controle	ABCA1, GCNT1, GLI2	ACACB, ANO1, EPHN2, PTPRC, SDK2
Sparc vs Neo 5nM Docetaxel por 24 horas	ASCC3, NRK, PSD3, TPM4, TSC1	ADCY1, AGR2, CHADL, DCDC2, DYSF, INRS, JAK2, KALRN, MCPH1, MERTK, PDEA6, UACA
Sparc vs Neo 100nM Docetaxel por 24 horas	TPM4, UBR4, UTY, WNT5A	ABP1, ADCY1, CABP1, CMYA5, FREM2, MAGI1, MYOM2, MYRIP, NAV3, TTC18

4.9. Validação da expressão de genes da via do Wnt por *WNT Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array*

Os resultados das análises de transcriptoma e proteôma revelaram uma modulação de genes da via do WNT pelo docetaxel. A via de sinalização WNT é uma via altamente conservada que regula aspectos cruciais da determinação do destino da célula, migração celular, polaridade celular, padronização neural e organogênese durante o desenvolvimento embrionário e alterações nos genes que participam das vias canônicas e não canônicas do WNT estão associadas aos processo de tumorigênese.

A placa *Human WNT Signaling Pathway RT² Profiler™ PCR Array* possui um amplo painel de genes da via do WNT, sendo constituída por 84 genes chaves envolvidos na modulação dos processos biológicos da via do WNT e 5 genes endógenos.

Entre os 84 genes avaliados na via do WNT para a comparação MCF7 pc SPARC vs MCF7 pc NEO Controle, 24 genes apresentaram alterações significativas ($p < 0,005$) na expressão. Desses, 15 genes apresentaram regulação positiva, enquanto que 9 genes apresentaram regulação negativa (Tabela 5). Quando comparamos as células MCF7 pc NEO vs MCF7 pc SPARC tratadas com 100nM de Docetaxel, 20 genes apresentaram alterações significativas ($p < 0,005$) na expressão, sendo que 10 genes apresentaram regulação positiva, e 10 genes apresentaram regulação negativa (Tabela 6).

A tabela 7 apresenta um resumo da comparação dos genes da via do WNT que se destacaram nas análises de *PCR Array*, alguns dos quais foram identificados como diferencialmente expressos nas análises por *cDNA microarray*. Dentre os 24 genes com alteração de expressão por *PCR Array* na comparação MCF7 pc SPARC vs MCF7 pc NEO Controle, 6 genes foram comuns as duas técnicas, e destes, somente 1 gene apresentou perfil de expressão diferente entre as duas técnicas. Para as análises de MCF7 pc SPARC vs MCF7 pc NEO tratadas com 100nM de Docetaxel, dos 20 genes com alteração de expressão na técnica de *PCR Array*, 8 genes foram comuns as duas técnicas, e destes, somente 2 genes apresentaram perfis de expressão diferentes entre as duas técnicas.

Tabela 5. Expressão diferencial dos genes da via do WNT nas análises por *WNT Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array* para a comparação MCF7pcSparc vs MCF7pcNeo Controle

GENE SYMBOL	Description	FOLD CHANGE
↑ANGPT4	Angiopoietin-like 4	3,0383
↑AXIN2	Axin 2	4,1022
↑BMP4	Bone morphogenetic protein 4	2,692
↑CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	2,1493
↑DKK1	Dickkopf homolog 1 (<i>Xenopus laevis</i>)	3,3689
↑EGR1	Early growth response 1	2,2394
↑FN1	Fibronectin 1	2,0356
↑FOSL1	FOS-like antigen 1	4,029
↑NRCAM	Neuronal cell adhesion molecule	3,5611
↑NRP1	Plasminogen activator, urokinase receptor	4,8061
↑PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor	2,8705
↑SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2	5,582
↑T	T, brachyury homolog (mouse)	2,113
↑TLE1	Transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, <i>Drosophila</i>)	2,5021
↑WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A	3,477
↓CACNA23	Calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 3	-14,8752
↓CEBPD	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	-2,2631
↓DLK1	Delta-like 1 homolog (<i>Drosophila</i>)	-2,0875
↓NANOG	Nanog homeobox	-2,9155
↓NTRK2	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	-2,6089
↓POU5F1	POU class 5 homeobox 1	-2,2305
↓PTCH1	Patched 1	-4,171
↓TCF7L1	Transcription factor 7-like 1 (T-cell specific, HMG-box)	-3,706
↓TWIST1	Twist homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	-3,3793
↓WNT9A	Wingless-type MMTV integration site family, member 9A	-2,2815

↑: genes positivamente regulados; ↓: genes negativamente regulados

Tabela 6. Perfil de expressão de genes da via Wnt pela análise por *Human WNT Signaling Pathway RT² Profiler™ PCR Array* para a comparação MCF7pcSPARC vs MCF7pcNEO tratadas com 100nM de Docetaxel

GENE SYMBOL	Description	FOLD CHANGE
↑ANGPT4	Angiopoietin-like 4	2,8299
↑AXIN2	Axin 2	3,5946
↑EGR1	Early growth response 1	2,6103
↑GDNF	Glial cell derived neurotrophic factor	4,9711
↑LEF1	Lymphoid enhancer-binding factor 1	3,9067
↑NRP1	Neuropilin 1	4,6701
↑NRCAM	Neuronal cell adhesion molecule	2,7329
↑PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor	2,1953
↑SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2	4,4426
↑WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A	3,1883
↓ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	-9,8435
↓ANTXR1	Anthrax toxin receptor 1	-2,537
↓BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5	-2,2055
↓CEBPD	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	-2,5113
↓CUBN	Cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	-2,2206
↓NANOG	Nanog homeobox	-3,6859
↓NTRK2	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	-2,6481
↓PTCH1	Patched 1	-7,0853
↓TCF7L1	Transcription factor 7-like 1 (T-cell specific, HMG-box)	-4,7569
↓TWIST1	Twist homolog 1 (Drosophila)	-2,7656

↑: genes positivamente regulados; ↓: genes negativamente regulados

Tabela 7: Genes que se destacaram nas análises de *Human WNT Signaling Pathway RT² Profiler™ PCR Array*, e que estavam presentes nas análises de *Microarray*. (A) MCF7pcSPARC vs MCFpcNeo Controle e (B) MCF7pcSPARC vs MCFpcNeo 100nM Docetaxel.

(A)

Gene	Placa Array WNT	Array
BMP4	↑(2,692)	↓(-2.08)
NRP1	↑(4,806)	↑(2.073)
SOX2	↑(5,582)	↑(2.439)
WNT5A	↑(3,477)	↑(2.379)
PTCH1	↓(-4,171)	↓(-8.116)
TCF7L1	↓(-3,706)	↓(-3.396)

(B)

Gene	Placa Array WNT	Array
EGR1	↑(2,610)	↓(-2.917)
NRP1	↑(4,670)	↑(3.039)
NRCAM	↑(2,733)	↑(3.516)
WNT5A	↑(3,188)	↑(4.841)
ANTXR1	↓(-2,537)	↓(-2.535)
NTRK2	↓(-2,648)	↓(-2.254)
PTCH1	↓(-7,085)	↓(-6.64)
TWIST1	↓(-2,766)	↑(7.425)

↑: genes positivamente regulados; ↓: genes negativamente regulados

5. DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos o transcriptoma e proteoma de células MCF7 com diferença na expressão do gene SPARC na presença e ausência do quimioterápico Docetaxel, afim de avaliarmos o envolvimento deste gene na quimiossensibilidade a droga em câncer de mama.

A quimioresistência representa um obstáculo para a terapia eficaz do câncer, assim, a melhor compreensão dos mecanismos que levam à resistência a droga pode resultar na melhor adequação dos protocolos terapêuticos para as pacientes (Djeu JY and Wei S, 2009). A proteína SPARC tem sido associada ao remodelamento da matriz extracelular (ECM), transição epitélio-mesenquima, proliferação e sobrevivência, motilidade celular e invasão, adesão, extravasão, proliferação nos sítios metastáticos, angiogênese e, inclusive, quimiossensibilidade (Chong HC *et al*, 2012). Porém, a sua função é dependente do contexto celular, do tipo e estágio tumoral e o tipo de interações estabelecidas com os diferentes componentes presentes no microambiente celular (Arnold SA and Brekken RA, 2009). Trabalhos anteriores de nosso grupo mostraram que a expressão do gene SPARC foi associada a quimiossensibilidade ao Docetaxel em linhagem de células de mama (Dos Santos ML *et al.*, 2009) e que a positividade desta proteína está associada com melhor prognóstico das pacientes com câncer de mama (Nagai MA *et al.*, 2011).

Os resultados do presente estudo apontaram para um painel de genes diferencialmente expressos que possam estar envolvidos envolvidos na quimiossensibilidade ao docetaxel. O processo de anotação gênica conduziu a escolha dos genes *SPANXA1*, *ALDH1A3*, *TPM4*, *TARP*, *XAF1* e *WNT5A*, para validação por PCR em Tempo Real.

O gene *SPANXA1* (*sperm protein associated with the nucleus in the X chromosome*), se destacou como um dos genes mais diferencialmente expressos nas

células MCF7 expressando SPARC e como positivamente regulado em todas as comparações MCF7*pc*SPARC vs MCF7*pc*NEO (FC=87.9 (CTR);FC=77.2 (5nM) e FC=82.6 (100nM)), sugerindo que a expressão dos transcritos do gene *SPANXA1* foi modulada pela presença de SPARC. Este perfil foi validado com as amostras de validação, e a expressão dos transcritos do *SPANXA1* se manteve aumentado nas células MCF7 com expressão de SPARC após o tratamento com Docetaxel. Esse gene pertence à família de proteínas SPANX, que estão envolvidas na morfogênese dos espermatozoides maduros (Westbrook VA *et al.*, 2000; Zendman AJ *et al.*, 2003), sendo classificados como CTs (*cancer/testis antigens*). A expressão dos genes CTs foi observada também em diversas linhagens de células derivada de tumores humanos (Yamada R *et al.*, 2013). Quatro membros da família SPANX (A1, A2, B e D) foram descritos como expressos em tumores humanos, tais como melanomas, carcinomas de bexiga, mielomas e tumores hematopoiéticos (Wang Z *et al.*, 2003; Westbrook VA *et al.*, 2004; Salemi M *et al.*, 2010). Resposta imune humoral e celular para proteínas codificadas pelos genes classificados como CTs têm sido observados em pacientes com doenças malignas, assim, os genes CTs são considerados alvos para a imunoterapia tumoral (Kouprina N *et al.*, 2003; Almanzar G *et al.*, 2009; Yamada R *et al.*, 2013). No presente estudo, outros genes da família do SPANX (B2, N4, N5) foram encontrados nas comparações de células MCF7 com diferente expressão de SPARC, sugerindo um possível papel do SPANX na tumorigênese da mama. Estudos clínicos e experimentais são necessários para melhor avaliar o papel dos genes SPANX em câncer de mama.

O gene *ALDH1A3* (*aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3*) nos dados de *cDNA array*, apresentou-se regulado positivamente em todas as comparações entre as células MCF7*pc*SPARC vs MCF7*pc*NEO. Os resultados de validação confirmam a regulação positiva deste gene nas células MCF7*pc*SPARC. O gene *ALDH1A3* codifica

uma enzima da família das aldeído-desidrogenases que atua na oxidação de retinol a ácido retinóico. As enzimas aldeído desidrogenase são uma família de enzimas intracelulares que estão envolvidos na proliferação celular, a diferenciação, a desintoxicação e resistência a drogas através da oxidação de aldeídos celulares (Koppaka V *et al.*, 2012). Aumento de sua expressão foi detectada em diferentes tumores tais como, hepatoma, adenocarcinoma de pulmão, mieloma, mama (Sreerama L *et al.*, 1995; Rekha GK *et al.*, 1997). Kock JG *et al.*, 2007 utilizando como modelo, animais geneticamente modificados heterozigotos para p53, e que desenvolvem tumores espontâneos de mama, descreveram o gene *ALDH1A3* como um dos genes responsáveis pelo desenvolvimento destes tumores. Além disto, amostras de tumor de mama metastática apresentaram um aumento nos níveis de ALDH1A3 (Marcato P *et al.*, 2011).

A modulação negativa da atividade de ALDH tem sido alvo de investigação para melhorar a eficácia dos fármacos quimioterápicos convencionais e radioterapia (Kim EI *et al.*, 2014) e determinadas isoenzimas da ALDH, principalmente a ALDH1A1 e ALDH1A3, são positivamente reguladas em células tumorais, resultando em uma diminuição da sensibilidade a ciclofosfamidas, diminuindo o efeito quimioterapêutico (Cortes-Dericks L *et al.*, 2014). Nossos dados mostraram um aumento de ALDH1A3 em células com aumento da expressão de SPARC, mas que não foi modulado pelo tratamento com docetaxel. A elevação da expressão de ALDH1A3 nas células MCF7_{pc}SPARC pode sugerir uma associação com EMT (*epithelial to mesenchymal transition*), processo que pode ser modulado por SPARC (Chong HC *et al.*, 2012).

O gene *TARP* (*TCR gamma alternate reading frame protein*), apresentou-se regulado positivamente em todas as comparações entre as células MCF7_{pc}SPARC vs MCF7_{pc}NEO. A expressão deste gene foi descrita pela primeira vez em células

epiteliais de próstata e posteriormente identificadas como expressa em tumores de câncer de mama (Wolfgang CD *et al.*, 2000). Fritzsche FR *et al* (2005) através da técnica de Microarray analisou mais de 600 casos de tumores de próstata e encontrou o TARP significativamente super expresso quando comparados ao tecido normal. Além disto, sua expressão foi correlacionada com pior prognóstico quando associada a marcadores já estabelecidos para tumores de próstata. Estudos associaram ao gene *TARP* a função de CTs e este gene tem sido proposto como um potencial alvo para a imunoterapia do câncer de próstata e mama (Epel M *et al.*, 2008; Oh S *et al.*, 2004; Hillerdal V *et al.*, 2012). Em nossos dados, observamos um aumento da expressão de TARP em associação com a expressão de SPARC e positivamente regulada pelo tratamento com Docetaxel 100nM tanto nestas células quanto nas células sem a expressão de SPARC, sugerindo que a modulação da expressão de TARP possa estar associada a resposta ao Docetaxel.

O aumento da expressão dos transcritos do gene *TPM4* (*tropomyosin 4*), foi identificado como aumentado expresso tanto nas análises de transcriptoma como na proteômica após o tratamento com Docetaxel. Este gene codifica uma proteína que pertence à família das tropomiosinas e se ligam a filamentos de actina tanto em células musculares como em não musculares. A redução da expressão de TPM4 tem sido identificadas em tumores de câncer cervical (Lomnytska MI., *et al* 2011), próstata e em células de mama (Li DQ *et al* 2006). Dados na literatura são escassos em relação ao comportamento da expressão do gene *TPM4* em câncer de mama. Mendes-Pereira AM *et al* (2011) mostraram que o silenciamento de um conjunto de genes, incluindo o TPM4, aumentou a sensibilidade de células MCF7 ao tratamento com Tamoxifeno. Nossos dados mostram uma associação entre a expressão de SPARC e TPM4, e pode estar associada a alteração de morfologia observada entre as células MCF7pcNEO e

MCF7_{pc}SPARC. Além disso, observamos que o Docetaxel promoveu regulação negativa e positiva dos transcritos de TPM4 nas células MCF7 expressando SPARC e sem expressão desse gene, respectivamente, sugerindo um possível papel do TPM4 na resposta ao Docetaxel.

Os transcritos do gene *XAF1* (*XIAP associated factor 1*) foram identificados como negativamente regulados em todas as comparações nas análises de transcriptoma. No processo de validação este gene foi identificado como mais expresso nas células SPARC e foi positivamente regulado nas células sem expressão de SPARC após o tratamento com o Docetaxel. Entretanto, a redução de expressão de XAF1 foi confirmada nas células SPARC após o tratamento com Docetaxel. Liston P *et al* (2001) através de ensaios *in vivo*, mostraram que XAF1 antagoniza a atividade anti-caspase de XIAP e inverte o efeito protetor de XIAP em linhagens celulares, levando às células a morte por apoptose, e que a diminuição da expressão de XAF1, conferiu proteção significativa das células a ação do quimioterápico etoposídeo. A perda de expressão de XAF1 pode também aumentar o limiar de sensibilidade de células tumorais a agentes quimioterapêuticos (Ng KC *et al.*, 2004). Além disso, a expressão de XAF1 aumentou a sensibilidade e morte celular e inibiu o crescimento tumoral em câncer de ovário e cólon, e em células transformadas com vírus potencialmente causadores de cânceres como carcinoma de nasofaringe e carcinomas gástricos (Wang Y *et al.*, 2012; Tu SP *et al.*, 2010; Park GB *et al.*, 2013). Dessa maneira, a expressão do gene XAF1 parece estar associada a mecanismos de sensibilidade a drogas, e nossos dados corroboram com a dos autores citados, e mostram pela primeira vez que a expressão de XAF1 está associada a ação do quimioterápico Docetaxel.

Nos resultados de proteômica vários mapas de vias de sinalização e metabolismo foram gerados. Os dois mapas mais abundantes e significativo para o nosso trabalho foram a via de Remodelamento do Citoesqueleto e via do Metabolismo de GTP.

Podemos observar que na comparação entre as células MCF7*pc*SPARC vs MCF7*pc*NEO Controle, as vias mais enriquecidas foram a de Remodelamento de Citoesqueleto, que contém alteração de expressão de várias proteínas relacionadas com a Matriz extracelular (colágeno, laminina), sugerindo que a proteína SPARC esteja atuando no remodelamento da Matriz, corroborando assim com uma de suas funções descrita na literatura (Clark *and* Sage, 2008; Nagaraju GP *and* Sharma D, 2011).

Na comparação MCF7*pc*SPARC vs MCF7*pc*NEO 100nM, observamos que a via do metabolismo do GTP foi a via que apresentou-se mais enriquecida. Proteínas Guanilato Ciclase Solúvel de uma mesma família apresentaram-se reguladas de forma diferente. A proteína Guanilato Ciclase Solúvel é a principal enzima responsável pela conversão enzimática do GTP (Guanosina trifosfato) para o cGMP (Guanosina monofosfato cíclico) (Kots AY *et al.*, 2006). As proteínas Guanilato Ciclase são ativadas endogenamente pelo óxido nítrico (NO), resultando na formação do cGMP. O cGMP por sua vez, atua como segundo mensageiro em várias células, e estão envolvidos em processos celulares como proliferação, regulação do ciclo celular e funções metabólicas. Estudos também demonstraram diferença de expressão das subunidades das proteínas Guanilato Ciclase, mostrando que células de hepatocarcinoma com baixa expressão e atividade desta proteína podem apresentar alta frequência de células iniciadoras do câncer quando comparadas com células cancerosas com alta expressão e atividade de Guanilato Ciclase (Mujoo K *et al.*, 2010).

Além disto, nossos resultados mostraram o mesmo efeito de diferença de expressão na família de proteínas Fosfodiesterases (PDEs). As PDEs são enzimas que

regulam os níveis intracelular de cGMP e cAMP (Adenosina monofosfato cíclico), e consequentemente exibem um papel central em múltiplas funções celulares (Isaac Levy et al., 2011). A inativação das PDEs acaba por levar a uma desregulação de cGMP e cAMP, e a desregulação destes fatores foi correlacionada com o desenvolvimento de tumorigênese (Kim MJ et al., 2006; Levy I et al., 2011).

Em nossas análises, a proteína PKM2 (*Pyruvate Kinase M2*) teve a sua expressão regulada negativamente na via do metabolismo do GTP. A Piruvato quinase (*PK*) é uma enzima glicolítica que catalisa a transferência de um grupo fosfato a partir de fosfoenolpiruvato (*PEP*) e ADP (Adenosina difosfato), gerando ATP (Adenosina trifosfato) e piruvato. Células tumorais aumentam a taxa de captação de glicose, diminuindo proporcionalmente a fosforilação oxidativa, mesmo na presença de O₂. Este fenômeno é conhecido como glicólise aeróbica ou efeito *Warbug* (revisado por Wong N et al., 2013). A expressão da proteína PKM2 é um evento chave para que ocorra este fenômeno e a expressão da isoforma M2 é necessária para ocorrer a glicólise aeróbica, e este fenótipo metabólico fornece uma vantagem para o crescimento tumoral (Cortés-Cros M et al., 2013). A expressão de PKM2 quando comparada com tecidos normais apresentou-se aumentada em câncer de pulmão, mama, próstata, cólon de útero (Bluemlein K et al., 2011). A proteína PKM2 desempenha um papel importante no metabolismo de células tumorais, podendo contribuir para um fenótipo mais agressivo, e ser um excelente alvo terapêutico (Tamada M et al., 2012).

Genes da via do WNT foram identificados como modulados tanto nas análises de transcritoma quanto nas análises de proteômica em todos os tratamentos. Os genes *WNT* codificam para uma família de glicoproteínas constituídas até o presente momento, de 19 genes que participam na transdução de sinal através de sua ligação a membros da família de receptores *Frizzled* (FZD) que, quando ativados pela ligação

com as proteínas WNT, ativam uma cadeia de sinalização intracelular, denominadas via WNT (Pez F *et al.*, 2013). A expressão das proteínas via WNT tem papel importante em diversos processos biológicos, no desenvolvimento embrionário e no processo de tumorigenese, sendo associada com um grande número de malignidades, incluindo o câncer de mama (Michaelson JS *and* Leder P, 2001; Giles RH *et al.*, 2003; Pongracz JE *and* Stockley RA, 2006; Amin N *and* Vincan E, 2012). A via WNT é dividida em: via Wnt/ β -catenina e via β -catenina independente, que incluem via da polaridade da célula planar (PCP) e via de Wnt/ Ca^{2+} (revisado por, Zimmerman ZF *et al.*, 2012). Estudo utilizando linhagens de células mamárias mostrou que as WNTs 1, 2, 3 e 3a são capazes de induzir transformação nestas células pela acumulação citosólica da β -catenina (Alexander CM *et al.*, 2013). Loh YN *et al* (2013) mostrou que a resistência adquirida por células MCF-7 a tamoxifeno foi acompanhada por um aumento na via de sinalização WNT e de uma transição para um fenótipo mesenquimal.

Transcritos do gene *WNT5A* (*Wingless-related MMTV Integration Site 5*) foram identificados como regulado positivamente nas células que expressa SPARC, tanto no transcriptoma quanto na proteômica, sendo sua expressão modulada positivamente pelo tratamento com Docetaxel. A proteína foi descrita como um membro sinalizador da via WNT não canônica e age como um ligante para os receptores: *seven transmembrane receptor frizzled-5* (Frizzled) e o *tyrosine kinase orphan receptor 2* (Torres MA *et al.*, 1996). Classicamente, o WNT5A desempenha um papel essencial na regulação de vias de desenvolvimento durante a embriogênese e oncogênese (Logan CY *et al.*, 2004) e pode atuar como mediador de agressividade tumoral. Em tumores de ovário Peng C *et al* (2011), identificou alta expressão da proteína tumores de ovário quando comparados aos normais, e, células SKOV3 transfectadas com WNT5A aumentaram a quimioresistência quando comparados com células contendo o vetor

vazio. Corroborando com estes resultados, em modelo de tumores pancreáticos, a superexpressão de WNT5A resultou em um aumento da quimioressistência quando tratadas com Gemcitabina (Wei W *et al.*, 2014). Outro estudo recente relacionou o aumento da expressão de WNT5A com resistência a multi-drogas. Expressão elevada de WNT5A, além de secreção desta proteína para o meio extracelular foram observadas em células multirresistente modificadas de colo do útero, ovário, cólon e mama (Hung TH *et al.*, 2014). Em um estudo utilizando células de melanoma, o WNT5A promoveu indução de transição epitélio mesenquima e invasão celular (Dissanayake SK *et al.*, 2007). A identificação do WNT5A é mais uma evidência que a expressão de SPARC nas células MCF7 pode levar a EMT e pode estar associada a resposta ao Docetaxel.

6. CONCLUSÕES

- Utilizando as técnicas de transcriptoma e/ou proteômica, foi possível identificar genes como diferencialmente expressos nas células MCF7_{pc}NEO vs MCF7_{pc}SPARC antes e após o tratamento com Docetaxel, potencialmente associados a quimiossensibilidade, sendo eles XAF1, TARP, SPANXA1, ALDH1A3, TPM4 e WNT5A.
- Nossos estudos mostram, pela primeira vez, que os genes XAF1 e TARP podem estar envolvidos em resposta ao Docetaxel em câncer de mama.
- Genes da via WNT foram modulados pela expressão do SPARC e pela ação do Docetaxel, potencializando estes genes como moduladores de resposta a taxanos.
- Dados de proteômica das células MCF7_{pc}SPARC vs MCF7_{pc}NEO Controle mostraram diferença de expressão de proteínas relacionadas com remodelamento da matriz extracelular, sugerindo que a proteína SPARC esteja atuando no citoesqueleto, corroborando assim com sua função descrita na literatura.
- Células MCF7_{pc}SPARC vs MCF7_{pc}NEO tratadas com 100nM de Docetaxel mostraram a modulação de expressão de diversas proteínas relacionadas com o metabolismo do GTP, mostrando que possivelmente, a associação da via do metabolismo do GTP em resposta a droga.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albini A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer*. 2007 Feb; 7(2):139-47.

Alexander CM, Goel S, Fakhraldeen SA, Kim S. Wnt signaling in mammary glands: plastic cell fates and combinatorial signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Oct 1;4(10). pii: a008037. doi: 10.1101/cshperspect.a008037.

Almanzar G, Olkhanud PB, Bodogai M, Dell'agnola C, Baatar D, Hewitt SM, Ghimenton C, Tummala MK, Weeraratna AT, Hoek KS, Kouprina N, Larionov V, Biragyn A. Sperm-derived SPANX-B is a clinically relevant tumor antigen that is expressed in human tumors and readily recognized by human CD4+ and CD8+ T cells. *Clin Cancer Res*. 2009 Mar 15;15(6):1954-63. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1290. Epub 2009 Mar 10.

Anothaisintawee T, Wiratkapun C, Lerdsitthichai P, Kasamesup V, Wongwaisayawan S, Srinakarin J, Hirunpat S, Woodtichartpreecha P, Boonlikit S, Teerawattananon Y, Thakkinstian A. Risk factors of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Asia Pac J Public Health*. 2013 Sep;25(5):368-87. doi: 10.1177/1010539513488795. Epub 2013 May 23.

AMERICA CANCER SOCIETY. Disponível em: <http://www.cancer.org/Cancer/BreastCancer/index>. Acesso em 10 abril 2014.

Amin N, Vincan E. The Wnt signaling pathways and cell adhesion. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012 Jan 1;17:784-804.

Arnold SA, Brekken RA. SPARC: a matricellular regulator of tumorigenesis. *J Cell Commun Signal*. 2009 Dec;3(3-4):255-73. doi: 10.1007/s12079-009-0072-4. Epub 2009 Oct 7.

Arnold SA, Rivera LB, Miller AF, Carbon JG, Dineen SP, Xie Y, Castrillon DH, Sage EH, Puolakkainen P, Bradshaw AD, Brekken RA. Lack of host SPARC enhances vascular function and tumor spread in an orthotopic murine model of pancreatic carcinoma. *Dis Model Mech*. 2010 Jan-Feb;3(1-2):57-72. doi: 10.1242/dmm.003228. Epub 2009 Dec 9.

Bayet-Robert M, Morvan D, Chollet P, Barthomeuf C. Pharmacometabolomics of docetaxel-treated human MCF7 breast cancer cells provides evidence of varying cellular responses at high and low doses. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Apr;120(3):613-26. doi: 10.1007/s10549-009-0430-1. Epub 2009 Jun 10.

Bernstein L. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2002 Jan;7(1):3-15.

Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Maraninchi D, Viens P, Birnbaum D. Gene expression profiling and clinical outcome in breast cancer. *OMICS*. 2006 Winter;10(4):429-43.

Bluemlein K, Grüning NM, Feichtinger RG, Lehrach H, Kofler B, Ralser M. No evidence for a shift in pyruvate kinase PKM1 to PKM2 expression during tumorigenesis. *Oncotarget*. 2011 May; 2(5):393-400.

Bornstein P . Matricellular proteins: an overview. *J Cell Commun Signal*. 2009 Dec;3(3-4):163-5. Epub 2009 Sep 25.

Bos TJ, Cohn SL, Kleinman HK, Murphy-Ulrich JE, Podhajcer OL, Rempel SA, Rich JN, Rutka JT, Sage EH, Thompson EW. International Hermelin brain tumor symposium on matricellular proteins in normal and cancer cell-matrix interactions. *Matrix Biol*. 2004 Apr; 23(1):63-9.

Bradshaw AD. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012 Mar; 44(3):480-8. Epub 2012 Jan 9.

Brekken RA, Puolakkainen P, Graves DC, Workman G, Lubkin SR, Sage EH. Enhanced growth of tumors in SPARC null mice is associated with changes in the ECM. *J Clin Invest* 2003; 111:487-95.

Brekken RA, Sage EH. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biol*. 2000 Dec; 19(7):569-80.

Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol*. 2005 Oct 10; 23(29):7350-60. Epub 2005 Sep 6.

Briggs J, Chamboredon S, Castellazzi M, Kerry JA, Bos TJ. Transcriptional upregulation of SPARC, in response to c-Jun overexpression, contributes to increased motility and invasion of MCF7 breast cancer cells. *Oncogene*. 2002 Oct 10;21(46):7077-91.

Cancer Genome Atlas, 2012. Disponível em: <http://cancergenome.nih.gov/>. Acessado em 31 abril 2014

Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009 May 20; 101(10):736-50. doi: 10.1093/jnci/djp082. Epub 2009 May 12.

Cheetham S, Tang MJ, Mesak F, Kennecke H, Owen D, Tai IT. SPARC promoter hypermethylation in colorectal cancers can be reversed by 5-Aza-2'deoxyctidine to increase SPARC expression and improve therapy response. *Br J Cancer*. 2008 Jun 3;98(11):1810-9. doi: 10.1038/sj.bjc.6604377. Epub 2008 May 6.

Chen J, Wang M, Xi B, Xue J, He D, Zhang J, Zhao Y. SPARC is a key regulator of proliferation, apoptosis and invasion in human ovarian cancer. *PLoS One*. 2012; 7(8):e42413. doi: 10.1371/journal.pone.0042413. Epub 2012 Aug 3.

Chen J, Chen Y, Chen Z. MiR-125a/b regulates the activation of cancer stem cells in paclitaxel-resistant colon cancer. *Cancer Invest*. 2013 Jan; 31(1):17-23. doi: 10.3109/07357907.2012.743557.

Chlenski A, Cohn SL. Modulation of matrix remodeling by SPARC in neoplastic progression. *Semin Cell Dev Biol.* 2010 Feb; 21(1):55-65. Epub 2009 Dec 1.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr; 162(1):156-9.

Chong HC, Tan CK, Huang RL, Tan NS. Matricellular proteins: a sticky affair with cancers. *J Oncol.* 2012; 2012:351089. doi: 10.1155/2012/351089. Epub 2012 Feb 9.

Ciardiello F, Caputo R, Pomatito G, De Laurentiis M, De Placido S, Bianco AR, Tortora G. Resistance to taxanes is induced by c-erbB-2 overexpression in human MCF-10A mammary epithelial cells and is blocked by combined treatment with an antisense oligonucleotide targeting type I protein kinase A. *Int J Cancer.* 2000 Mar 1; 85(5):710-5.

Clark CJ, Sage EH. A prototypic matricellular protein in the tumor microenvironment - where there's SPARC, there's fire. *J Cell Biochem.* 2008 104 721-32.

Cortés-Cros M, Hemmerlin C, Ferretti S, Zhang J, Gounarides JS, Yin H, Muller A, Haberkorn A, Chene P, Sellers WR, Hofmann F. M2 isoform of pyruvate kinase is dispensable for tumor maintenance and growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013 Jan 8; 110(2):489-94. doi: 10.1073/pnas.1212780110. Epub 2012 Dec 24.

Cortes-Dericks L, Froment L, Boesch R, Schmid RA, Karoubi G. Cisplatin-resistant cells in malignant pleural mesothelioma cell lines show ALDH(high)CD44(+) phenotype and sphere-forming capacity. *BMC Cancer.* 2014 Apr 30; 14:304. doi: 10.1186/1471-2407-14-304.

Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y, Gräf S, Ha G, Haffari G, Bashashati A, Russell R, McKinney S; METABRIC Group, Langerød A, Green A, Provenzano E, Wishart G, Pinder S, Watson P, Markowitz F, Murphy L, Ellis I, Purushotham A, Børresen-Dale AL, Brenton JD, Tavaré S, Caldas C, Aparicio S. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature.* 2012 Apr 18; 486(7403):346-52. doi: 10.1038/nature10983.

Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancers). *Lancet.* 2005 Nov 19; 366(9499):1784-93.

De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer.* 2008 Nov 15; 123(10):2229-38. doi: 10.1002/ijc.23925.

Dissanayake SK, Wade M, Johnson CE, O'Connell MP, Leotlela PD, French AD, Shah KV, Hewitt KJ, Rosenthal DT, Indig FE, Jiang Y, Nickoloff BJ, Taub DD, Trent JM, Moon RT, Bittner M, Weeraratna AT. The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and

initiation of an epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem.* 2007 Jun 8; 282(23):17259-71. Epub 2007 Apr 10.

Djeu JY, Wei S. Clusterin and chemoresistance. *Adv Cancer Res.* 2009;105:77-92. doi: 10.1016/S0065-230X(09)05005-2.

Dos Santos ML, Palanch CG, Salaorni S, Da Silva WA Jr, Nagai MA. Transcriptome characterization of human mammary cell lines expressing different levels of ERBB2 by serial analysis of gene expression. *Int J Oncol.* 2006 Jun;28(6):1441-61.

Dos Santos ML, Gimenes KP, Silva WA Jr, Nagai MA. Transcriptome changes induced by docetaxel in human mammary cell lines expressing different levels of ERBB2. *Int J Mol Med.* 2009 Jun;23(6):733-43.

Dowsett M, Smith I, Robertson J, Robison L, Pinhel I, Johnson L, Salter J, Dunbier A, Anderson H, Ghazoui Z, Skene T, Evans A, A'Hern R, Iskender A, Wilcox M, Bliss J. Endocrine therapy, new biologicals, and new study designs for presurgical studies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2011; 2011(43):120-3. doi: 10.1093/jncimonographs/lgr034.

Ehninger A, Boch T, Medyouf H, Müdder K, Orend G, Trumpp A. Loss of SPARC protects hematopoietic stem cells from chemotherapy toxicity by accelerating their return to quiescence. *Blood.* 2014 Jun 26; 123(26):4054-63. doi: 10.1182/blood-2013-10-533711. Epub 2014 May 15.

Elenbaas B, Weinberg RA. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res.* 2001 Mar 10; 264(1):169-84.

Ellsworth RE¹, Decewicz DJ, Shriver CD, Ellsworth DL. Curr. Breast cancer in the personal genomics era. *Genomics.* 2010 May; 11(3):146-61. doi: 10.2174/138920210791110951

Engbring JA, Kleinman HK. The basement membrane matrix in malignancy. *J Pathol.* 2003 Jul;200(4):465-70.

Epel M, Carmi I, Soueid-Baumgarten S, Oh SK, Bera T, Pastan I, Berzofsky J, Reiter Y. Targeting TARP, a novel breast and prostate tumor-associated antigen, with T cell receptor-like human recombinant antibodies. *Eur J Immunol.* 2008 Jun;38(6):1706-20. doi: 10.1002/eji.200737524.

Estévez LG, Gradishar WJ. Evidence-based use of neoadjuvant taxane in operable and inoperable breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004 May 15; 10(10):3249-61.

Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2010 Nov 11; 363(20):1938-48

Framson PE, Sage EH. SPARC and tumor growth: where the seed meets the soil? *J Cell Biochem.* 2004 Jul 1; 92(4):679-90.

Frese KK, Neesse A, Cook N, Bapiro TE, Lolkema MP, Jodrell DI, Tuveson DA nab-Paclitaxel potentiates gemcitabine activity by reducing cytidine deaminase levels in a mouse model of pancreatic cancer. *Cancer Discov.* 2012 Mar; 2(3):260-9. doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0242. Epub 2012 Feb 28.

Fritzsche FR, Stephan C, Gerhardt J, Lein M, Hofmann I, Jung K, Dietel M, Kristiansen G. Diagnostic and prognostic value of T cell receptor gamma alternative reading frame protein (TARP) expression in prostate cancer. *Histol Histopathol.* 2010 Jun;25(6):733-9.

Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Jun 5; 1653(1):1-24.

Gjorevski N, Nelson CM. Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Aug 10; 12(9):581-93. doi: 10.1038/nrm3168.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4; 144(5):646-74.

Helleman J, Jansen MP, Ruigrok-Ritstier K, van Staveren IL, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Sieuwerts AM, Klijn JG, Sleijfer S, Foekens JA, Berns EM. Association of an extracellular matrix gene cluster with breast cancer prognosis and endocrine therapy response. *Clin Cancer Res.* 2008 Sep 1; 14(17):5555-64.

Henry NL, Hayes DF. Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring and treatment of primary and metastatic breast cancer. *The Oncologist*, v. 11, p. 541-552, 2006.

Hillerdal V, Nilsson B, Carlsson B, Eriksson F, Essand M. T cells engineered with a T cell receptor against the prostate antigen TARP specifically kill HLAA2+ prostate and breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Sep 25; 109(39):15877-81. Epub 2012 Sep 10.

Hsiao YH, Chou MC, Fowler C, Mason JT, Man YG. Breast cancer heterogeneity: mechanisms, proofs, and implications. *J Cancer.* 2010 Jun 1; 1:6-13.

Hugh J, Hanson J, Cheang MC, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C, Reed J, Krajewska M, Treilleux I, Rupin M, Magherini E, Mackey J, Martin M, Vogel C. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol.* 2009 Mar 10; 27(8):1168-76. Epub 2009 Feb 9.

Hung TH, Hsu SC, Cheng CY, Choo KB, Tseng CP, Chen TC, Lan YW, Huang TT, Lai HC, Chen CM, Chong KY. Wnt5A regulates ABCB1 expression in multidrug-resistant cancer cells through activation of the non-canonical PKA/ β -catenin pathway. *Oncotarget.* 2014 Oct 24. [Epub ahead of print]

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA). ESTIMATIVA 2014: incidência de cancer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>. Acesso em 10 abril 2014.

Irvin WJ Jr, Carey LA. What is triple-negative breast cancer? *Eur J Cancer*. 2008 Dec; 44(18):2799-805. Epub 2008 Nov 12.

Ioachim E, Charchanti A, Briasoulis E, Karavasilis V, Tsanou H, Arvanitis DL, Agnantis NJ, Pavlidis N. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. *Eur J Cancer*. 2002 Dec; 38(18):2362-70.

Jeung HC, Rha SY, Im CK, Shin SJ, Ahn JB, Yang WI, Roh JK, Noh SH, Chung HC. A randomized phase 2 study of docetaxel and S-1 versus docetaxel and cisplatin in advanced gastric cancer with an evaluation of SPARC expression for personalized therapy. *Cancer*. 2011 May 15; 117(10):2050-7. doi: 10.1002/cncr.25729. Epub 2010 Nov 29.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009 Jun; 119(6):1420-8. doi: 10.1172/JCI39104.

Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol*. 2001 Mar; 2(3):133-40.

Kim MJ, Lee JH, Park SY, Hong KW, Kim CD, Kim KY, Lee WS. Protection from apoptotic cell death by cilostazol, phosphodiesterase type III inhibitor, via cA P-dependentprotein kinase activation. *Pharmacol Res*. 2006 Oct;54(4):261-7. Epub 2006 Jun 6.

Koblinski JE, Kaplan-Singer BR, VanOsdol SJ, Wu M, Engbring JA, Wang S, Goldsmith CM, Piper JT, Vostal JG, Harms JF, Welch DR, Kleinman HK. Endogenous osteonectin/SPARC/BM-40 expression inhibits MDA-MB-231 breast cancer cell metastasis. *Cancer Res*. 2005 Aug 15;65(16):7370-7.

Koppaka V, Thompson DC, Chen Y, Ellermann M, Nicolaou KC, Juvonen RO, Petersen D, Deitrich RA, Hurley TD, Vasiliou V. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacol Rev*. 2012 Jul; 64(3):520-39. doi: 10.1124/pr.111.005538. Epub 2012 Apr 27.

Kots AY, Bian K, Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP signaling pathway as a focus for drug development. *Curr Med Chem*. 2011; 18(22):3299-305.

Kouprina N, Mullokandov M, Rogozin IB, Collins NK, Solomon G, Otstot J, Risinger JI, Koonin EV, Barrett JC, Larionov V. The SPANX gene family of cancer/testis-specific antigens: rapid evolution and amplification in African great apes and hominids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2; 101(9):3077-82. Epub 2004 Feb 18.

Lane TF, Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J*. 1994 Feb;8(2):163-73.

Larsen M, Artym VV, Green JA, Yamada KM. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling 2006. *Curr Opin Cell Biol* 18 463-471.

Larsen MJ, Thomassen M, Gerdes AM, Kruse TA. Hereditary Breast Cancer: Clinical, Pathological and Molecular Characteristics
Hereditary breastcancer: clinical, pathological and molecular characteristics *eCollection* 2014. Oct 15; 8:145-55. doi: 10.4137/BCBCR.S18715.

Lee EY, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Oct 1; 2(10):a003236. Epub 2010 Aug 18.

Levy I, Horvath A, Azevedo M, de Alexandre RB, Stratakis CA. Phosphodiesterase function and endocrine cells: links to human disease and roles in tumor development and treatment. *Curr Opin Pharmacol.* 2011 Dec;11(6):689-97. doi: 10.1016/j.coph.2011.10.003. Epub 2011 Oct 31.

Li DQ, Wang L, Fei F, Hou YF, Luo JM; Wei-Chen, Zeng R, Wu J, Lu JS, Di GH, Ou ZL, Xia QC, Shen ZZ, Shao ZM. Identification of breast cancer metastasis associated proteins in an isogenic tumor metastasis model using two dimensional gel electrophoresis and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry. *Proteomics.* 2006 Jun;6(11):3352-68.

Lindner JL, Loibl S, Denkert C, Ataseven B, Fasching PA, Pfitzner BM, Gerber B, Gade S, Darb-Esfahani S, Sinn BV, Huober J, Engels K, Tesch H, Karn T, Pommerenke F, Liedtke C, Untch M, Müller V, Rack B, Schem C, von Minckwitz G. Expression of Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) in Breast Cancer and Response to Neoadjuvant Chemotherapy. *Ann Oncol.* 2014 Oct 29. pii: md487.

Liston P, Fong WG, Kelly NL, Toji S, Miyazaki T, Conte D, Tamai K, Craig CG, McBurney MW, Korneluk RG. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol.* 2001 Feb; 3(2):128-33.

Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004; 20:781-810.

Loh YN, Hedditch EL, Baker LA, Jary E, Ward RL, Ford CE. The Wnt signalling pathway is upregulated in an in vitro model of acquired tamoxifen resistant breast cancer. *BMC Cancer.* 2013 Apr 2; 13:174. doi: 10.1186/1471-2407-13-174.

Lomnytska MI, Becker S, Bodin I, Olsson A, Hellman K, Hellström AC, Mints M, Hellman U, Auer G, Andersson S. Differential expression of ANXA6, HSP27, PRDX2, NCF2, and TPM4 during uterine cervix carcinogenesis: diagnostic and prognostic value. *Br J Cancer.* 2011 Jan 4; 104(1):110-9. doi: 10.1038/sj.bjc.6605992. Epub 2010 Nov 30.

Mackler NJ, Pienta KJ. Drug insight: Use of docetaxel in prostate and urothelial cancers. *Nat Clin Pract Urol.* 2005 Feb; 2(2):92-100; quiz 1 p following 112.

Marcato P, Dean CA, Pan D, Araslanova R, Gillis M, Joshi M, Helyer L, Pan L, Leidal A, GujarS, GiacomantonioCA, LeePW.. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stemcells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells*. 2011 Jan; 29(1):32-45. doi: 10.1002/stem.563.

Mason IJ, Taylor A, Williams JG, Sage H, Hogan BL. Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryo parietal endoderm, is related to an endothelial "culture shock" glycoprotein. *EMBO J* 5 1465-1472.

Mcpherson K, Stell CM, Dixon JM., Breast Cancer – Epidemiology, Risk Factors and Genetics. *BMJ*, v.321, p 624-628, 2000.

Melchor L, Benítez J. The complex genetic landscape of familial breast cancer. *Hum Genet* 2013 Aug; 132(8):845-63. doi: 10.1007/s00439-013-1299-y. Epub 2013 Apr 5.

Ménard S, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM. Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *J Cell Physiol*. 2000 Feb;182(2):150-62.

Mendes-Pereira AM, Sims D, Dexter T, Fenwick K, Assiotis I, Kozarewa I, Mitsopoulos C, Hakas J, Zvelebil M, Lord CJ, Ashworth A. Genome-wide functional screen identifies a compendium of genes affecting sensitivity to tamoxifen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Feb 21;109(8):2730-5. Doi: 10.1073/pnas.1018872108. Epub 2011 Apr 11.

Michaelson JS, Leder P. beta-catenin is a downstream effector of Wnt-mediated tumorigenesis in the mammary gland. *Oncogene*. 2001 Aug 23;20(37):5093-9.

Morse DL, Gray H, Payne CM, Gillies RJ. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2005 Oct;4(10):1495-504.

Mujoo K, Sharin VG, Martin E, Choi BK, Sloan C, Nikonoff LE, Kots AY, Murad F. Role of soluble guanylyl cyclase-cyclic GMP signaling in tumor cell proliferation. *Nitric Oxide*. 2010 Jan 1;22(1):43-50. doi: 10.1016/j.niox.2009.11.007. Epub 2009 Dec 3.

Nagai MA, Brentani MM. Gene expression profiles in breast cancer to identify estrogen receptor target genes. *Mini Rev Med Chem*. 2008 May;8(5):448-54.

Nagai MA, Gerhard R, Fregnani JH, Nonogaki S, Rierger RB, Netto MM, Soares FA. Prognostic value of NDRG1 and SPARC protein expression in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Feb;126(1):1-14. Epub 2010 Apr 6.

Nagaraju GP, Sharma D. Anti-cancer role of SPARC, an inhibitor of adipogenesis. *Cancer Treat Rev*. 2011 Jan 13.

Ng KC, Campos EI, Martinka M, Li G. XAF1 expression is significantly reduced in human melanoma. *J Invest Dermatol*. 2004 Dec; 123(6):1127-34.

Nilsson S, Gustafsson JÅ. Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clin Pharmacol Ther*. 2011 Jan;89(1):44-55. Epub 2010 Dec 1.

Nwabo Kamdje AH, Seke Etet PF, Vecchio L, Muller JM, Krampera M, Lukong KE. Signaling pathways in breast cancer: Therapeutic targeting of the microenvironment. *Cell Signal*. 2014 Aug 3; 26(12):2843-2856. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.07.034.

Oh S, Terabe M, Pendleton CD, Bhattacharyya A, Bera TK, Epel M, Reiter Y, Phillips J, Linehan WM, Kasten-Sportes C, Pastan I, Berzofsky JA Human CTLs to wild-type and enhanced epitopes of a novel prostate and breast tumor-associated protein, TARP, lyse human breast cancer cells. *Cancer Res*. 2004 Apr 1; 64(7):2610-8.

Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, et al. 2002. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell Proteomics* 1:376–86.

Park GB, Choi Y, Kim YS, Lee HK, Kim D, Hur DY. ROS and ERK1/2-mediated caspase-9 activation increases XAF1 expression in dexamethasone-induced apoptosis of EBV-transformed B cells. *Int J Oncol*. 2013 Jul; 43(1):29-38. doi: 10.3892/ijo.2013.1949. Epub 2013 May 20.

Pasquier E, Kavallaris M. Microtubules: a dynamic target in cancer therapy. *IUBMB Life*. 2008 Mar; 60(3):165-70.

Peng C, Zhang X, Yu H, Wu D, Zheng J. Wnt5a as a predictor in poor clinical outcome of patients and a mediator in chemoresistance of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2011 Feb;21(2):280-8. doi: 10.1097/IGC.0b013e31820aaadb.

Perez EA. Breast cancer management: opportunities and barriers to an individualized approach. *Oncologist*. 2011;16 Suppl 1:20-2. doi: 10.1634/theoncologist.2011-S1-20.

Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.

Pez F, Lopez A, Kim M, Wands JR, Fromentel CC, Merle P. Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: molecular targets for the development of innovative anticancer drugs. *J Hepatol*. 2013 Jul 5. pii: S0168-8278(13)00445-5. doi: 10.1016/j.jhep.2013.07.001.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1; 29(9):e45.

Podhajcer OL, Benedetti LG, Girotti MR, Prada F, Salvatierra E, Llera AS. The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host. *Cancer Metastasis Rev*. 2008 Dec; 27(4):691-705.

Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*. 2007 Nov;117(11):3155-63.

Pongracz JE, Stockley RA. Wnt signalling in lung development and diseases. *Respir Res.* 2006 Jan 26; 7:15.

Rahman M, Chan AP, Tai IT. A peptide of SPARC interferes with the interaction between caspase8 and Bcl2 to resensitize chemoresistant tumors and enhance their regression in vivo. *PLoS One.* 2011;6(11):e26390. Epub 2011 Nov 1.

Rekha GK, Devaraj VR, Sreerama L, Lee MJ, Nagasawa HT, Sladek NE. Inhibition of human class 3 aldehyde dehydrogenase, and sensitization of tumor cells that express significant amounts of this enzyme to oxazaphosphorines, by chlorpropamide analogues. *Biochem Pharmacol.* 1998 Feb 15; 55(4):465-74.

Revista Brasileira de Cancerologia, Considerações sobre a prevenção do câncer de mama feminina. 2003, 49(4): 227-23

Riley LB, Desai DC. The molecular basis of cancer and the development of targeted therapy. *Surg Clin North Am.* 2009 Feb;89(1):1-15, vii.

Rudel RA, Fenton SE, Ackerman JM, Euling SY, Makris SL. Environmental exposures and mammary gland development: state of the science, public health implications, and research recommendations. *Environ Health Perspect.* 2011 Aug; 119(8):1053-61. doi: 10.1289/ehp.1002864. Epub 2011 May 17.

Russo IH, Russo J. Pregnancy-induced changes in breast cancer risk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2011 Sep;16(3):221-33. doi: 10.1007/s10911-011-9228-y.

Salemi M, Calogero AE, Vicari E, Migliore E, Zaccarello G, Cosentino A, Amore M, Tricoli D, Castiglione R, Bosco P, Rappazzo G. A high percentage of skin melanoma cells expresses SPANX proteins. *Am J Dermatopathol.* 2009 Apr;31(2):182-6. doi: 10.1097/DAD.0b013e3181978d6f.

Salemi M, Calogero AE, Zaccarello G, Castiglione R, Cosentino A, Campagna C, Vicari E, Rappazzo G. Expression of SPANX proteins in normal prostatic tissue and in prostate cancer. *Eur J Histochem.* 2010;54(3):e41.

Salerno P, Garcia-Rostan G, Piccinin S, Bencivenga TC, Di Maro G, Doglioni C, Basolo F, Maestro R, Fusco A, Santoro M, Salvatore G. TWIST1 plays a pleiotropic role in determining the anaplastic thyroid cancer phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 May;96(5):E772-81. doi: 10.1210/jc.2010-1182. Epub 2011 Mar 9.

Sangaletti S, Di Carlo E, Gariboldi S, Miotti S, Cappetti B, Parenza M, Rumio C, Brekken RA, Chiodoni C, Colombo MP. Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis. *Cancer Res.* 2008 Nov 1; 68(21):9050-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1327.

Schneeweiss A, Seitz J, Smetanay K, Schuetz F, Jaeger D, Bachinger A, Zorn M, Sinn HP, Marmé F. Efficacy of Nab-Paclitaxel Does Not Seem to Be Associated with SPARC Expression in Metastatic Breast Cancer. *Anticancer Res.* 2014 Nov; 34(11):6609-15.

Sreerama L, Rekha GK, Sladek NE. Phenolic antioxidant-induced overexpression of class-3 aldehyde dehydrogenase and oxazaphosphorine-specific resistance. *Biochem Pharmacol*. 1995 Mar 1; 49(5):669-75.

Sympson CJ, Talhouk RS, Alexander CM, Chin JR, Clift SM, Bissell MJ, Werb Z. Targeted expression of stromelysin-1 in mammary gland provides evidence for a role of proteinases in branching morphogenesis and the requirement for an intact basement membrane for tissue-specific gene expression. *J Cell Biol*. 1994 May; 125(3):681-93.

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989 May 12;244(4905):707-12.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11; 98(19):10869-74.

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8; 100(14):8418-23. Epub 2003 Jun 26.

Sternlicht MD, Lochter A, Sympson CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, Pinkel D, Bissell MJ, Werb Z. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell*. 1999 Jul 23; 98(2):137-46.

Tai IT, Dai M, Owen DA, Chen LB. Genome-wide expression analysis of therapy-resistant tumors reveals SPARC as a novel target for cancer therapy. *J Clin Invest*. 2005 Jun; 115(6):1492-502. Epub 2005 May 12

Tamada M, Suematsu M, Saya H. Pyruvate kinase M2: multiple faces for conferring benefits on cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2012 Oct 15; 18(20):5554-61. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0859.

Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell*. 1981 26 99-105.

Thomasset N, Lochter A, Sympson CJ, Lund LR, Williams DR, Behrendtsen O, Werb Z, Bissell MJ. Expression of autoactivated stromelysin-1 in mammary glands of transgenic mice leads to a reactive stroma during early development. *Am J Pathol*. 1998 Aug; 153(2):457-67.

Torres MA, Yang-Snyder JA, Purcell SM, DeMarais AA, McGrew LL, Moon RT. Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by adominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol*. 1996 Jun; 133(5):1123-37.

Troester MA, Hoadley KA, Sørlie T, Herbert BS, Børresen-Dale AL, Lønning PE, Shay JW, Kaufmann WK, Perou CM. Cell-type-specific responses to chemotherapeutics in breast cancer. *Cancer Res.* 2004 Jun 15; 64(12):4218-26.

Tu SP, Sun YW, Cui JT, Zou B, Lin MC, Gu Q, Jiang SH, Kung HF, Korneluk RG, Wong BC. Tumor suppressor XIAP-Associated factor 1 (XAF1) cooperates with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand to suppress colon cancer growth and trigger tumor regression. *Cancer.* 2010 Mar 1; 116(5):1252-63. doi: 10.1002/cncr.24814.

Vieira DS, Duflath RM, Schmitt FC, Zeferino LC. [Breast cancer: new concepts in classification]. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2008 Jan; 30(1):42-7. [Article in Portuguese].

Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 2004 Aug; 10(8):789-99.

Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol.* 2010 Apr 1; 28(10):1684-91. doi: 10.1200/JCO.2009.24.9284. Epub 2010 Mar 1.

Wang H, Vo T, Hajar A, Li S, Chen X, Parissenti AM, Brindley DN, Wang Z. Multiple mechanisms underlying acquired resistance to taxanes in selected docetaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2014 Jan 22; 14:37. doi: 10.1186/1471-2407-14-37.

Wang Y, Mao H, Hao Q, Wang Y, Yang Y, Shen L, Huang S, Liu P. Association of expression of XIAP-associated factor 1 (XAF1) with clinicopathologic factors, overall survival, microvessel density and cisplatin-resistance in ovarian cancer. *Regul Pept.* 2012 Oct 10; 178(1-3):36-42. doi: 10.1016/j.regpep.2012.06.005. Epub 2012 Jul 1.

Wang Z, Zhang Y, Liu H, Salati E, Chiriva-Internati M, Lim SH. Gene expression and immunologic consequence of SPAN-Xb in myeloma and other hematologic malignancies. *Blood.* 2003 Feb 1; 101(3):955-60. Epub 2002 Aug 22.

Wong N, De Melo J, Tang D. PKM2, a Central Point of Regulation in Cancer Metabolism. *Int J Cell Biol.* 2013; 2013:242513. doi: 10.1155/2013/242513. Epub 2013 Feb 14.

Watkins G, Douglas-Jones A, Bryce R, Mansel RE, Jiang WG. Increased levels of SPARC (osteonectin) in human breast cancer tissues and its association with clinical outcomes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005; 72:267-72.

Wei W, Sun HH, Li N, Li HY, Li X, Li Q, Shen XH. WNT5A modulates cell cycle progression and contributes to the chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2014 Oct; 13(5):529-38.

Westbrook VA, Diekman AB, Klotz KL, Khole VV, von Kap-Herr C, Golden WL, Eddy RL, Shows TB, Stoler MH, Lee CY, Flickinger CJ, Herr JC. Spermatid-

specific expression of the novel X-linked gene product SPAN-X localized to the nucleus of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 2000 Aug; 63(2):469-81.

Westbrook VA, Schoppee PD, Diekman AB, Klotz KL, Allietta M, Hogan KT, Slingluff CL, Patterson JW, Frierson HF, Irvin WP Jr, Flickinger CJ, Coppola MA, Herr JC. Genomic organization, incidence, and localization of the SPAN-x family of cancer-testis antigens in melanoma tumors and cell lines. *Clin Cancer Res.* 2004 Jan 1;10(1 Pt 1):101-12.

Wikman H, Westphal L, Schmid F, Pollari S, Kropidlowski J, Sielaff-Frimpong B, Glatzel M, Matschke J, Westphal M, Iljin K, Huhtala H, Terracciano L, Kallioniemi A, Sauter G, Müller V, Witzel I, Lamszus K, Kemming D, Pantel K. Loss of CADM1 expression is associated with poor prognosis and brain metastasis in breast cancer patients. *Oncotarget.* 2014 May 30; 5(10):3076-87.

Witty JP, Wright JH, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases are expressed during ductal and alveolar mammary morphogenesis, and misregulation of stromelysin-1 in transgenic mice induces unscheduled alveolar development. *Mol Biol Cell.* 1995 Oct; 6(10):1287-303.

Wolfgang CD, Essand M, Vincent JJ, Lee B, Pastan I. TARP: a nuclear protein expressed in prostate and breast cancer cells derived from an alternate reading frame of the T cell receptor gamma chain locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 15;97(17):9437-42.

World Health Organization – WHO. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>. Acesso em 31 julho 2014.

Yamada R, Takahashi A, Torigoe T, Morita R, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kubo T, Watarai K, Kondo T, Hirohashi Y, Sato N. Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue Antigens.* 2013 Jun; 81(6):428-34. doi: 10.1111/tan.12113. Epub 2013 Apr 11.

Yan Q, Sage EH. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem.* 1999 Dec; 47(12):1495-506.

Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* 2004 Jun 25; 117(7):927-39.

Yang J, Mani SA, Weinberg RA. Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res.* 2006 May 1; 66(9):4549-52.

Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol.* 2014 Aug 10;5(3):412-24. doi: 10.5306/wjco.v5.i3.412.

Zendman AJ, Zschocke J, van Kraats AA, de Wit NJ, Kurpisz M, Weidle UH, Ruiters DJ, Weiss EH, van Muijen GN. The human SPANX multigene family: genomic organization, alignment and expression in male germ cells and tumor cell lines. *Gene*. 2003 May 8; 309(2):125-33.

Zimmerman ZF, Moon RT, Chien AJ. Targeting Wnt pathways in disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Nov 1; 4(11). pii: a008086. doi: 10.1101/cshperspect.a008086.