UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

NATÁLIA CRUZ E MELO

Validação de genes diferencialmente expressos identificados em células MCF-7 com diferenças de expressão de PAR-4 (*Prostate Apoptosis Response-4*) antes e após a exposição de docetaxel.

São Paulo

2015

NATÁLIA CRUZ E MELO

Validação de genes diferencialmente expressos identificados em células MCF-7 com diferenças de expressão de PAR-4 (*Prostate Apoptosis Response-4*) antes e após a exposição de docetaxel.

Dissertação apresentada para
à Faculdade de Medicina de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Melo, Natália Cruz e

Validação de genes diferencialmente expressos identificados em células MCF-7 com diferenças de expressão de PAR-4 (*Prostate Apoptosis Response-4*) antes e após a exposição de docetaxel / Natália Cruz e Melo. -- São Paulo, 2015.

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

Orientadora: Maria Aparecida Nagai.

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Proteína deresposta a apoptose prostática
3.Docetaxel 4.Expressão gênica 5.Reação em cadeia da polimerase em tempo real
6.Via de sinalização Wnt

USP/FM/DBD-446/15

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho,

Inicialmente a **Deus**, que guiou meu caminho, colocando seus anjos na jornada, me
mostrando sempre a força da fé e do amor.

Aos meus pais **Manoel e Marísia**, minhas irmãs **Nayara e Nádia**, que me apresentaram
os valores mais importantes da vida, humildade e honestidade, que entenderam minha
ausência e me forneceram subsídios para seguir.

À querida **Dona Myrian**, que abriu a porta da sua casa e do seu coração.

Meus eternos agradecimentos e carinho a vocês!

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos e gratidão a **Dra. Maria Aparecida Nagai**, pela oportunidade, orientação e por me apresentar o universo da ciência.

À **Dra. Simone Aparecida de Bessa Garcia** que teve uma participação neste trabalho, muito obrigada pela força e pelos conhecimentos compartilhados.

À **Msc. Ana Carolina Pavanelli** por me ajudar nas análises do transcriptoma e pela amizade.

Ao grupo de Genética Molecular, **Aline, Bete, Carol Pavanelli, Erika, Flávia, Irina, Louro, Maria, Maira, Nai, Simone e Paulo**, meus agradecimentos pelo apoio, abraço amigo, brincadeiras e inúmeros cafés, com certeza foi mais divertido compartilhar esses anos com vocês.

A **Irina e Dona Myrian**, que se tornaram parte da minha família em São Paulo, muito obrigada pelo apoio e amizade.

Aos meus amigos do complexo HC e CTO, **Carol Cardoso, Igor, Jime, Néia, Sil e Tiff**, obrigada por compartilharem conversas, risos e tristezas, é um prazer ter a amizade de vocês.

Aos meus anjos da guarda **Amanda, Carol Leão, Dany, Lino e Lucas**, que durante muitos anos me acolheram com carinho e amizade.

A **Dra. Zulmirene Fonseca Cardoso**, pelo exemplo de humildade e superação, quando crescer quero ser como você! Meus agradecimentos e eterna amizade.

Ao grupo do **CTO**, por fornecerem apoio burocrático, lavagem de materiais e reuniões científicas, que possibilitaram a realização deste trabalho. Muito obrigada aprendi muito com vocês.

À **Universidade de São Paulo**, era um sonho fazer parte dessa estrutura e levar esse nome na minha formação.

À **todos os meus professores** de base e universitários, que compartilharam seu conhecimento e sonhos, com certeza carrego um pouco de cada um de vocês. À todos meus eternos agradecimentos.

Ao **Coral ICESP** pela força, alegria e superação, com vocês o valor do sorriso se tornou maior.

À **Avenida Paulista** que me ouviu silenciosamente todas as minhas magoas e alegrias durante esses anos.

As agências de fomento **FAPESP** e **CNPq/CAPES** pelo apoio financeiro.

À todos os guerreiros e guerreiras que lutam contra o câncer para viver, desejo que ciência possibilite dias mais agradáveis e felizes. Vocês são exemplo de fé e coragem.

Por todas as experiências vividas, tudo já valeria a pena, obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre.”
Albert Einstein

“Pensamos demasiadamente e sentimos muito pouco. Necessitamos mais de humildade que de máquinas. Mais de bondade e ternura que de inteligência. Sem isso, a vida se tornará violenta e tudo se perderá.”
Charles Chaplin

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”
Cora Coralina

RESUMO

Melo NC. *Validação de genes diferencialmente expressos identificados em células MCF-7 com diferenças de expressão de PAR-4 (Prostate Apoptosis Response-4) antes e após a exposição de docetaxel* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

O PAWR (*Prostate apoptosis response- 4*) também conhecido como PAR-4 é um gene pró-apoptótico identificado em células de câncer de próstata quando expostas a estímulos apoptóticos. A expressão de PAR-4 pode aumentar a sensibilidade da célula a apoptose, incluindo células de câncer de mama. Ensaios de expressão gênica por transcriptoma foram realizados em nosso laboratório (dados ainda não publicados), com o objetivo de analisar genes diferencialmente expressos associados à quimiossensibilidade ao docetaxel em células MCF-7 transfectadas com o vetor de expressão para PAR-4 (MCF7*pc*PAR4) e o com vetor vazio (MCF7*pc*NEO) antes e após o tratamento com docetaxel. Para avaliar a interação entre os genes diferencialmente expressos foram geradas redes gênicas funcionais utilizando o programa IPA- Ingenuity®. Dentre as diversas redes gênicas geradas destacaram-se as que continham genes relacionados direta ou indiretamente com a via de sinalização WNT (*Wingless-Type MMTV Integration 1*). O presente estudo visa validar genes diferencialmente expressos identificados em células MCF-7 com diferenças de expressão de PAR-4 antes e após a exposição de docetaxel. Através da anotação manual dos genes mais diferencialmente expressos, foram selecionados os genes *EGR1*, *XAF1*, *TARP* e *WNT5A* para validação por PCR em Tempo Real (qRT-PCR). A plataforma *Human WNT Signaling Pathway RT² Profiler™ PCR Array (PCR Array)* foi utilizada para avaliar o efeito da overexpressão de PAR-4 e do tratamento de docetaxel na expressão de genes das vias canônica e não canônica do WNT. A expressão positiva do gene *WNT5A* nas células MCF7*pc*PAR4 em relação a MCF7*pc*NEO foi confirmada por qRT-PCR na ausência e presença do tratamento com docetaxel. O gene *EGR1* apresentou regulação positiva significativa na técnica de qRT-PCR na ausência de tratamento, porém não apresenta o mesmo perfil de expressão observado no ensaio de transcriptoma. O gene *XAF1* apresentou regulação negativa nas células MCF7*pc*PAR4 quando comparadas com as células MCF7*pc*NEO na ausência e presença de docetaxel, com tendência a validação na ausência de tratamento e de não validação na presença de docetaxel. Foi observado o aumento significativo da expressão de *TARP* nas células MCF7*pc*PAR4 por qRT-PCR na ausência e presença de docetaxel, porém esses achados não confirmam os resultados obtidos no transcriptoma. Em nossos dados de *PCR Array* na comparação MCF7*pc*PAR4 vs MCF7*pc*NEO antes do tratamento, encontramos diferença de expressão significativa ($p < 0,005$) em 9 genes. Sendo que, os genes *CDKN2A*, *EGR1*, *FGF7*, *IL6* e *TWIST* apresentaram expressão positiva e os genes *NTRK2*, *SOX2*, *SOX9* e *WISP1* tiveram expressão negativa. Na comparação na presença de docetaxel observamos que os genes *CACNAD2A3*, *GDF5*, *IL6*, *FGF7*, *LEF1* e *TWIST* apresentaram regulação positiva e *FST* apresentou regulação negativa com significância estatística ($p < 0,005$). Dos 84 genes da plataforma *PCR array* foram observados 21 e 14 genes comuns entre ambas às técnicas na ausência e presença de docetaxel, respectivamente. Na ausência de docetaxel 16 genes apresentaram o mesmo perfil de expressão, dentre estes a regulação positiva de *GJA1*, *IGF1*, *IGF2*, *LEF1*,

MMP2, *PDGFRA*, *PTGS2* e *TWIST*, associadas á regulação negativa de *CDH1*, *JAG1*, *NTRK2* sugerem ativação da via WNT/ β -catenina. Enquanto, a expressão de *DAB2*, *WNT5A*, *FZD7* e *RUNX2* indica inativação dessa via. Na presença do tratamento 6 genes apresentaram o mesmo perfil de expressão. Dentre estes, a regulação positiva de *CTGF*, *DAB2* e *EGR1* sugerem inativação da via WNT/ β -catenina. Por outro lado, a expressão positiva de *FGF20*, *LEF1* e *PDGFRA* sugerem que via WNT/ β -catenina estaria ativa. Neste estudo, podemos mostrar que *PAR-4* modula genes da via de sinalização WNT. Porém, mais experimentos serão necessários para verificar quais mecanismos estão envolvidos e de que forma isso reflete na quimiossensibilidade a drogas.

Descritores: neoplasias da mama; proteína de resposta a apoptose prostática; docetaxel; expressão gênica; reação em cadeia da polimerase em tempo real; via de sinalização Wnt.

ABSTRACT

Melo NC. *Validation of differentially expressed genes identified in MCF-7 cells with differences in expression of PAR-4 (Prostate Apoptosis-Response 4) before and after exposure of docetaxel* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

PAWR (*Prostate Apoptosis Response-4*) also known as PAR-4 is a pro-apoptotic gene identified in prostate cancer cells when exposed to apoptotic stimuli. PAR-4 expression can increase sensitivity of cells to apoptosis, including breast cancer cells. Our laboratory performed transcriptome profiling (unpublished data), with the aim of analyzing differentially expressed genes associated with chemosensitivity to docetaxel in transfected MCF-7 cells with PAR-4 expression plasmid (MCF7*pc*PAR4) and with empty vector (MCF7*pc*NEO) before and after treatment with docetaxel. To assess the interaction between the differentially expressed genes functional gene networks were generated using the IPA Ingenuity® software. Networks generated containing genes directly or indirectly related with the WNT signaling pathway (Wingless-Type MMTV Integration 1) were highlighted. The present study aims to validate the differentially expressed genes identified in MCF-7 cells with different PAR-4 expression before and after exposure of docetaxel. By manual annotation of the genes most differentially expressed, the genes *EGR1*, *XAF1*, *TARP* and *WNT5A* were selected to be validated by quantitative real time PCR (qRT-PCR). The platform WNT Signaling Pathway Human RT2 Profiler™ PCR Array (Array PCR) was used to evaluate the effect of PAR-4 overexpression and docetaxel treatment in gene expression of canonical and non-canonical WNT pathways. The positive expression of *WNT5A* in MCF7*pc*PAR4 cells relative to MCF7*pc*NEO was confirmed by qRT-PCR in the presence and absence of docetaxel. The *EGR1* gene showed significant upregulation in the qRT-PCR in the absence of treatment, but showed a different expression profile of the one observed in the transcriptome assay. The *XAF1* showed a negative regulation in MCF7*pc*PAR4 cells when compared with MCF7*pc*NEO cells in the absence and presence of docetaxel, showing a similar trend in the absence of treatment but opposed trend in the presence of docetaxel. It was observed a significant increase in *TARP* expression in MCF7*pc*PAR4 cells by qRT-PCR in the absence and presence of docetaxel, but these findings do not confirm the results of the transcriptome. PCR Array data of MCF7*pc*PAR4 vs MCF7*pc*NEO comparison before treatment, showed a significant expression difference in nine genes ($p < 0.005$). The genes *CDKN2A*, *EGR1*, *FGF7*, *IL6* and *TWIST* showed positive expression and the genes *NTRK2*, *SOX2*, *SOX9* and *WISP1* had negative expression. In the presence of docetaxel it was observed that the genes *CACNAD2A3*, *GDF5*, *IL6*, *FGF7*, *LEF1* and *TWIST* showed upregulation and *FST* downregulation with statistical significance ($p < 0.005$). From 84 genes of the platform PCR array we observed 21 and 14 common genes between both techniques in the absence and presence docetaxel, respectively. In the absence of docetaxel 16 genes showed similar expression profile, among them the upregulation of *GJA1*, *IGF1*, *IGF2*, *LEF1*, *MMP2*, *PDGFRA*, *PTGS2* and *TWIST*, together with downregulation of *CDH1*, *JAG1*, *NTRK2* suggest activation of the WNT/ β -catenin pathway. While the expression of *DAB2*, *WNT5A*, *FZD7* and *RUNX2* indicates inactivation of this pathway. In the presence of treatment six genes showed the same expression profile. Among these, the upregulation of *CTGF*, *DAB2* *EGR1* suggest the inactivation of Wnt/ β -catenin pathway. On the other

hand, positive expression of *FGF20*, *LEF1* and *PDGFRA* suggests that Wnt/ β -catenin would be active. In this study, we show that PAR-4 modulates genes of the WNT signaling pathway. However, more experiments are needed to clarify the role of WNT canonical and non-canonical pathways and how this reflects on drug chemosensitivity.

Descriptors: breast neoplasia; prostate Apoptosis response-4 protein; docetaxel; gene expression; real-time polymerase chain reaction; Wnt signaling pathway.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de progressão do Câncer de Mama.....	24
Figura 2. Ação do quimioterápico Docetaxel.....	26
Figura 3. Esquema representativo dos domínios da proteína PAR-4.....	30
Figura 4. Mecanismo atual de indução da apoptose mediado por PAR4.....	34
Figura 5. Rede de interação molecular mostrando uma visão integrada dos genes mais expressos (vermelho) e menos expressos (verde) em células MCF7 _{pc} PAR4 vs MCF7 _{pc} NEO na ausência de tratamento.....	41
Figura 6. Rede de interação molecular mostrando uma visão integrada dos genes mais expressos (vermelho) e menos expressos (verde) em células MCF7 _{pc} PAR4 vs MCF7 _{pc} NEO na presença de tratamento.....	42
Figura 7. Desenho referente ao <i>Human WNT Signaling Pathway RT² Profiler™ PCR Array</i>	53
Figura 8. Expressão protéica de PAR-4 nas células MCF7 _{pc} PAR4 vs MCF7 _{pc} NEO..	57
Figura 9. Expressão relativa dos genes selecionados para validação nas células MCF7 _{pc} PAR4 vs MCF7 _{pc} NEO - Comparação das médias de expressão relativa dos genes <i>EGR1</i> e <i>XAF1</i>	59
Figura 10. Expressão relativa dos genes selecionados para validação nas células MCF7 _{pc} PAR4 vs MCF7 _{pc} NEO - Comparação das médias de expressão relativa dos genes <i>TARP</i> e <i>WNT5A</i>	60
Figura 11. Diferença de expressão gênica de genes da via do WNT, entre as células MCF7 _{pc} PAR4 vs MCF7 _{pc} NEO na ausência (A) e presença de docetaxel (B).....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos utilizados nas hibridizações do Western-blot.....	48
Tabela 2. Validação dos genes diferencialmente expressos nos ensaios de transcriptoma nas comparações célula MCF-7 $pcPAR4$ vs MCF-7 $pcNEO$, antes e após o tratamento com docetaxel.....	61
Tabela 3. Diferença de Expressão Gênica de genes da via de sinalização do WNT pela análise <i>Human WNT Signaling Pathway Array</i> na comparação MCF7 $pcPAR4$ vs MCF7 $pcNEO$ na ausência de docetaxel.....	64
Tabela 4. Diferença de Expressão Gênica de genes da via de sinalização do WNT pela análise <i>Human WNT Signaling Pathway Array</i> na comparação MCF7 $pcPAR4$ vs MCF7 $pcNEO$ na presença de docetaxel.....	64
Tabela 5. Tabela de integração dos dados de Transcriptoma e o <i>Human WNT Signaling Pathway</i> para as comparações MCF7 $pcPAR4$ vs MCF7 $pcNEO$ ausência de docetaxel.....	65
Tabela 6. Tabela de integração dos dados de Transcriptoma e o <i>Human WNT Signaling Pathway</i> para a comparação MCF7 $pcPAR4$ vs MCF7 $pcNEO$ na presença de docetaxel.....	66

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

1.0 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Câncer de Mama.....	18
1.1.2 Morfologia da Glândula Mamária, processo de iniciação e progressão do câncer de mama	21
1.1.3 Docetaxel.....	25
1.1.4 Marcadores Moleculares	27
1.2 Prostate Apoptosis Response-4 (<i>PAR-4</i>)	29
1.2.1 PAR-4 e a Apoptose	31
1.2.2 PAR-4 como supressor tumoral.....	35
1.2.3 PAR-4 e os parceiros de interação.....	36
1.2.4 Par-4 e o Câncer de Mama	37
1.2.5 PAR-4 e Quimiossensibilidade a drogas	39
2.0 OBJETIVO	44
3.0 MATERIAL E MÉTODOS	46
3. 1. Células em cultura	46
3.2 Tratamento com docetaxel.....	46
3.3.1 Extração Proteica.....	46
3.3.2 Western Blot.....	47
3.3.3 Densitometria	48
3.3.4 Extração de RNA.....	48
3.4.1 Tratamento do RNA com DNase I.....	49
3.4.2 Síntese de cDNA	50
3.5 Validação.....	51
3.5.1 Anotação Manual.....	51
3.5.2 Desenho de Oligonucleotídeo.....	51
4.5.6 Real time PCR	51

3.5.7 Análise da Expressão Gênica por qRT-PCR <i>array</i>	52
4.3 Seleção dos genes constitutivos.....	54
3.6 Análise dos dados da qRT-PCR <i>array</i>	54
3.7 Análise Estatística	55
3.8 Considerações éticas.....	55
4.0 RESULTADOS	57
4.1 Expressão da proteína PAR-4 em células de câncer de mama MCF7.....	57
4.3 Validação dos genes <i>EGRI</i> , <i>XAF1</i> , <i>TARP</i> , e <i>WNT5A</i> nas células MCF7PcPAR4 por qRT-PCR.	58
4.4 O efeito da expressão de PAR4 e do tratamento com docetaxel nos genes da via de sinalização de WNT.....	61
4.5 Integração dos dados de Transcriptoma e <i>Human WNT Signaling Pathway Array</i>	64
5.0 DISCUSSÃO	68
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

Introdução

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Mama

O carcinoma mamário é considerado uma patologia heterogênea, que apresenta variações genéticas, moleculares e histopatológicas, podendo apresentar curso clínico variável (Vargo-Gogola & Rosen, 2007).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama são: história familiar, idade, menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, o uso prolongado de contraceptivos orais, terapia de reposição hormonal e a obesidade (Oldenburg et al., 2007; Cecilio et al., 2015). O consumo de álcool e tabaco também podem aumentar a predisposição, quando utilizadas por longo período (Zhang et al., 2007; Cecilio et al., 2015).

O histórico familiar no câncer de mama é um dos principais fatores de risco e está relacionado em aproximadamente 5 a 10% dos casos nos países desenvolvidos (MacPherson et al., 2000). A susceptibilidade genética do carcinoma mamário é herdada de maneira autossômica dominante e pode ser transmitida por ambos os sexos através das mutações em genes como o BRCA1, BRCA2, TP53, PTEN, ATM e STK11/LKB1 (Trichopoulos et al., 2008; Larsen et al., 2014), entre outros.

O aumento da idade como um preditor de risco para o tumor de mama, pode ser justificado pela contínua progressão de lesões benignas e de alterações morfológicas na mama normal, ocasionadas por um descontrole nos processos de apoptose e proliferação durante o ciclo de vida da mulher (Worsham et al., 2007).

O uso de contraceptivos orais foi associado com um aumento de 1,24% do risco para o desenvolvimento do câncer mamário (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002*).

A gravidez tardia contribui positivamente para o aumento do risco de desenvolvimento do tumor de mama (Clavel-Chapelon & Gerber, 2002), enquanto que a amamentação reduz o risco de desenvolvimento dessa patologia em 4,3% a cada 12 meses de aleitamento (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer*, 2002).

O sobrepeso e a obesidade são fatores de risco modificáveis e importantes para o desenvolvimento do carcinoma de mama. Estudos demonstraram que mulheres obesas na pós-menopausa apresentam um aumento três vezes maior de suscetibilidade ao desenvolvimento da doença em comparação com o grupo de não-obesas (Montazer et al., 2007). Este aumento pode ser explicado pelo acréscimo da conversão de precursores androgênicos a estradiol, em resposta a atividade enzimática da aromatase no tecido adiposo (Renehan et al., 2008).

A interação gene-ambiente e variações inter-individuais contribuem para o aumento da predisposição ao câncer de mama. Análises das variáveis envolvidas no desenvolvimento do câncer, como a exposição a fatores exógenos seguida de alterações genéticas e epigenéticas (principalmente em oncogenes e genes supressores de tumor), tornam-se fundamentais na construção de hipóteses precisas para a análise da origem e evolução de neoplasias (Loeb & Harris, 2008).

Apesar de ser considerado um câncer de bom prognóstico se diagnosticado e tratado adequadamente, as taxas de mortalidade por tumor de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados (INCA, 2014).

O carcinoma mamário é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou uma incidência de 1,67 milhões de novos casos dessa doença em 2012 o que representa 25% de todos os

cânceres. Desde 1990, o número de casos de câncer de mama tem aumentado gradativamente em muitos países, acompanhando os processos de urbanização da sociedade e a melhoria nas condições socioeconômicas (Jemal et al., 2008; 2011).

As taxas de incidência de câncer de mama variam quase quatro vezes entre as regiões do mundo, com números de 27 casos por 100 mil mulheres na África e Ásia a 96 casos por 100 mil mulheres na Europa Ocidental. O tumor de mama é considerado a quinta maior causa de morte na população feminina mundial (522.000 óbitos). Este tipo de câncer representa a motivo mais freqüente de óbitos na população feminina nas regiões em desenvolvimento (324.000 óbitos (14,3% do total)), e a segunda razão de óbitos por câncer nas regiões desenvolvidas (198.000 óbitos (15,4% do total)) (WHO, 2012).

As maiores taxas de mortalidade ocorrem em regiões em desenvolvimento, com renda média a baixa, incluindo América Latina, África e Ásia, onde os recursos disponíveis para prevenção, diagnóstico e tratamento são limitados ou inexistentes, abrangendo o Brasil. Países como Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Holanda, Dinamarca e Noruega, embora apresentem um aumento considerável na taxa de incidência, observa-se uma redução da mortalidade devido à detecção precoce e ao tratamento adequado das pacientes (WHO, 2012; Jemal et al., 2011; Cecilio et al., 2015).

Para o Brasil, em 2014 e 2015, são esperados 57.120 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres. Após os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer é o mais freqüente nas mulheres das regiões Sudeste (71,18/ 100 mil), Sul (70,98/ 100 mil), Centro-Oeste (51,30/ 100 mil) e Nordeste (36,74/ 100 mil). Na região Norte, é o segundo tumor mais incidente (21,29/ 100 mil) (INCA, 2014).

Segundo dados do INCA no período de 1979 a 2011, o número de óbitos por tumor de mama no Brasil foi superior a 4 milhões. A fim de reduzir de modo efetivo a mortalidade desta doença, torna-se necessário elaborar estratégias de prevenção e detecção precoce. Deste modo, novos programas para o rastreamento de doenças mamárias que sejam factíveis para países com dificuldades orçamentárias, precisam ser implementadas para reverter o perfil de mortalidade no cenário mundial (Tan et al., 2007).

1.1.2 Morfologia da Glândula Mamária, processo de iniciação e progressão do câncer de mama

A glândula mamária é formada estruturalmente por duas porções distintas: o parênquima e o estroma mamário. O estroma é constituído por tecido conjuntivo, tecido adiposo e colágeno, que contém fibroblastos, adipócitos, vasos sanguíneos, nervos e várias células do sistema imunológico. O parênquima é formado pela porção secretora, composta por cerca 15 a 20 lóbulos mamários, sendo que cada lóbulo contém uma série de ductos ramificados (Birnaum et al., 2004; Gjorevski & Nelson, 2011). O ducto mamário maduro consiste de uma camada externa de células mioepiteliais adjacentes a matriz extracelular e uma camada interna de células epiteliais luminais as quais circundam o lúmen (Gjorevski & Nelson, 2011).

A glândula mamária sofre um intenso remodelamento e diferenciação em mulheres adultas. Mudanças hormonais em cada ciclo menstrual induzem a proliferação do epitélio mamário, enquanto que durante a gravidez ocorre um intenso processo de ramificação dos ductos e aumento do número de alvéolos (Navarrete et al., 2005).

Os processos de proliferação e apoptose no tecido mamário normal são influenciados por vários fatores, incluindo a fase do ciclo menstrual, idade da mulher,

uso de contraceptivos orais (especialmente se nulíparas) e paridade recente (Anderson et al., 1999). As vias pelas quais os hormônios esteróides estimulam o crescimento do epitélio mamário são relevantes e estimulam investigação (Yao, 2006).

Os estrógenos são um grupo de pequenas moléculas que possuem atividade hormonal e sua interação com os receptores ER- α e ER- β (ERs), desempenha um papel importante no desenvolvimento normal da mama e na indução de tumores neste órgão. A via de sinalização de esteróides é uma das mais importantes vias em câncer de mama e aproximadamente 70% desses são positivos ao ER- α (Bouris et al., 2015). A associação do estrógeno como um fator de risco para o câncer de mama refere-se a sua exposição acumulativa no epitélio mamário (Feigelson & Henderson, 2000; Bouris et al., 2015).

Os ERs são integrantes de uma família de receptores nucleares, que podem atuar como fatores de transcrição de diversas maneiras, dentre elas a via clássica e a via ligante-independente. De acordo com o modelo clássico ocorre a ligação do hormônio com seu receptor, o que induz uma mudança conformacional no ER por dimerização. Essa interação hormônio/ receptor forma um complexo com proteínas co-regulatórias. Este complexo associa-se a sequências do tipo ERE (Elementos Responsivos ao Estrógeno) encontradas na região promotora de determinados genes alvo (O'Lone et al., 2004). Outra forma de ativação do receptor de estrógeno é denominada de ligante-independente. A ativação ligante-independente ocorre através da fosforilação de resíduos de serina, treonina e tirosina presentes no ER. Essa fosforilação é promovida pela ativação das vias de sinalização das MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), PI3K (*Phosphoinositide 3-Kinase*) e por sinais advindos de vias de fatores de crescimento como EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), ERBB2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*), receptor de insulina, entre outros. As vias

MAPKs e PI3K estão envolvidas com a transcrição de fatores de crescimento, proliferação celular e inibição da apoptose (Bjonstrom & Sjoberg, 2005). Uma vez que ER está ativado este pode regular a transcrição gênica na ausência da interação com hormônio (Arpino et al., 2008). Estes mecanismos demonstram que o estrógeno possui um papel importante na regulação de diversos genes que participam no desenvolvimento normal da glândula mamária e na progressão do câncer de mama.

Segundo o modelo de origem clonal a iniciação do câncer de mama ocorre devido a eventos de transformação genética e epigenética em uma única célula. A progressão subsequente do tumor é conduzida pelo acúmulo de alterações genéticas combinadas com a seleção clonal e expansão da célula tumoral, que podem resultar na redução da apoptose, replicação imortalizada, proliferação descontrolada, reprogramação energética, evasão do sistema imune, angiogênese e metástase (Hanahan & Weinberg, 2011; Kroigard et al., 2015).

Apesar da heterogenidade dos tumores de mama, diferentes modelos de progressão têm sido propostos para explicar o desenvolvimento desta doença. Segundo o modelo proposto por Polyak (2007) o processo de iniciação ocorre em uma célula do epitélio luminal por alterações genéticas e epigenéticas (Figura 1). O acúmulo dessas alterações leva a proliferação celular e extravazamento da membrana basal, caracterizando o carcinoma ductal não invasivo.

O contato das células transformadas com as células do microambiente da mama normal (células mioepiteliais, células endoteliais, fibroblastos, miofibroblastos, leucócitos, e outros tipos celulares) favorece o crescimento da massa tumoral. A capacidade de sobrevivência, perda de polaridade e adesão celular, atribuem as células transformadas um comportamento invasivo (Polyak, 2007). Neste estágio as células

tumorais invadem o tecido circundante normal da mama e atingem a região dos nódulos linfáticos (Liotta & Stetler-Stevenson, 1991; Rizwan et al., 2015).

Figura 1. Modelo de progressão linear do Câncer de Mama. Nos carcinomas *in situ*, as células mioepiteliais são genética e fenotipicamente alteradas. O processo de proliferação das células tumorais do lúmen leva o extravazamento da membrana basal, o contato das células transformadas com as células do microambiente da mama normal, favorece o crescimento da massa tumoral. 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, 2007).

No estágio metastático, as células tumorais adquirem a capacidade de migração, podendo atingir órgãos secundários tais como pulmão, ossos, fígado e cérebro. No estágio avançado da metástase as pacientes apresentam baixa taxa de sobrevida (Edge & Byrd, 2010).

1.1.3 Docetaxel

Os taxanos são uma classe de quimioterápicos anti-microtúbulos que incluem o paclitaxel e docetaxel. Estes medicamentos têm sido utilizados tanto por monoterapia como em combinação com outros medicamentos para o tratamento de diversos tumores como de ovário, mama, câncer de pulmão e sarcoma de Kaposi (Huang et al., 2014; Du et al., 2015)

O paclitaxel foi desenvolvido em 1971 a partir da casca da árvore do Teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*). Porém, somente em 1992 foi aprovada a utilização do composto para o tratamento de câncer (Rowinsky, 1997). O desenvolvimento do paclitaxel enfrentou alguns desafios, dentre eles o de natureza ambiental, pois a casca de *T. brevifolia* contém pequenas quantidades do composto (0,01-0,03%), além da baixa solubilidade do medicamento (Cragg et al., 1993).

O docetaxel foi o primeiro análogo do paclitaxel desenvolvido a fim de reduzir as dificuldades na obtenção do paclitaxel. O docetaxel é produzido a partir do *Taxus baccata* e se difere da estrutura química do paclitaxel e seus derivados em duas posições, que o tornam mais solúvel (Yared & Tkaczuk, 2012). Apesar disso, o uso clínico do docetaxel ainda apresenta alguns problemas como, baixa hidrossolubilidade, e efeitos adversos como a mielosupressão e neuropatia sensorial periférica, que limitam a dose a ser administrada (Noori et al., 2014; Du et al., 2015).

Atualmente são aceitos dois mecanismos de ação do docetaxel, sendo eles a inibição dos microtúbulos e a indução da apoptose. Os microtúbulos são filamentos ocos compostos pelas proteínas α e β tubulina, que possuem a capacidade de serem instáveis e dinâmicos (Pasquier & Kavallaris, 2008). Essas estruturas juntamente com os polímeros de actina e os filamentos intermediários do constituem citoesqueleto que

são essenciais às diversas funções celulares, dentre elas, desenvolvimento, morfologia e motilidade celular, transporte intracelular de vesículas e divisão celular. Devido à instabilidade dos microtúbulos durante a divisão celular ocorre o rearranjo do fuso mitótico e a segregação de cromátides-irmãs (Altmann & Gertsch, 2007).

Os inibidores de microtúbulos se ligam às proteínas α e β tubulina e estabilizam o fuso mitótico, dessa forma induzem a parada no processo de mitose e de proliferação celular (Figura 2). A apoptose induzida pelos taxanos é uma consequência direta de parada nas fases G2/M do ciclo celular (Rowinsky, 1997; Mackler & Pienta, 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 & Pienta, 2005).

O segundo mecanismo de ação proposto para docetaxel reside na inibição da família de proteínas *BCL-2* (*The B-cell lymphoma protein- 2 family*). Essa classe de proteínas é importante na regulação da apoptose. Os microtúbulos interagem com muitas organelas incluindo a mitocôndria, onde muitas proteínas da família BCL-2 estão localizadas. A estabilização dos microtúbulos induz a fosforilação de BCL-2, o que

impede a ligação de BAX (*BCL2-associated X protein*). Aumento de BAX livre ativa caspases e consequentemente conduz à apoptose (Mackler & Pienta, 2005).

Docetaxel é capaz de inibir os processos de migração de células endoteliais *in vitro* e a angiogênese *in vitro* e *in vivo*. A injeção de docetaxel em modelos animais foi capaz de reduzir o FGF2 (Fator de Crescimento de Fibroblastos 2) e a angiogênese (Hotchkiss et al., 2002; Palmeri et al., 2008).

Docetaxel é utilizado para o tratamento de câncer de mama, no entanto, um número considerável de pacientes com câncer de mama não respondem positivamente ao docetaxel (Yared & Tkaczuk, 2012). Mecanismos de resistência tem sido reportados, dentre eles alteração dos isótipos de β -tubulina (Shalli et al., 2005) e a expressão alterada dos genes, glicoproteína-P (McDonald et al., 2005), CYP3A4 (Myioshi et al., 2005), BRCA2 (Egawa et al., 2001), ErbB2 (Ciardiello et al., 2000) e p27 (Brown et al., 2004).

1.1.4 Marcadores Moleculares

O carcinoma mamário é uma doença heterogênea, que dificulta o tratamento individualizado e efetivo, sendo assim, são necessários estudos que foquem na melhor classificação destes tumores, visando condutas clínicas mais adequadas para cada paciente.

O trabalho pioneiro de Perou e colaboradores (2000) utilizou a análise de cDNA *microarray* para estratificar o tumor de mama de acordo com diferentes perfis de expressão gênica e consequentemente diferentes prognósticos. Esta abordagem possibilitou classificar essa doença nos seguintes subgrupos moleculares: Receptor Estrógeno positivo (ER+), HER2/ErBB2; tipo basal e tipo basal-like.

Trabalhos mais refinados foram realizados e permitiram subdividir os tumores ER+ em dois grupos, denominados de Luminal A e Luminal B (Sørli et al., 2001). A partir destes estudos, foi proposta a classificação molecular dos tumores mamários utilizada atualmente, identificados como: luminal A, luminal B, HER2+ e o triplo negativo e ou basal-like (Perou et al., 2000; Sørli et al., 2001).

O subtipo luminal A é caracterizado por tumores que expressam o ER e receptores de progesterona (PR). Possuem negatividade de HER/ErbB2 e alta positividade para citoqueratinas 7/8/18/19, além de possuir valor de Ki-67 (marcador de proliferação) inferior a 14%. Os tumores luminal A são considerados de melhor prognóstico, uma vez que são responsivos a terapias anti-estrogênicas (Sørli et al., 2001; Sotiriou et al., 2003).

Os tumores Luminal B apresentam positividade para ER, PR e podem ou não expressar HER2/ErbB2. Apresentam baixa ou moderada expressão de citoqueratinas 7/8/18/19 e possuem valor de Ki-67 superior a 14%. São tumores de bom prognóstico, mas quando comparados ao luminal A, comportam-se como menos diferenciados e apresenta pior prognóstico (Sørli et al., 2001).

Tumores com positividade para HER2/ErbB2, são identificados pela expressão aumentada de HER2/ErbB2 e negatividade para ER e PR. Neoplasias de mama classificadas como HER2+ compreendem cerca de 30% dos casos de câncer de mama (Alaoui-Jamalil et al., 2015), possuem comportamento agressivo, curta sobrevida livre de doença e pior prognóstico, entretanto são responsivos a terapias que inibem a atividade do HER2, tal como o trastuzumab (Collins et al., 2012; Alaoui-Jamalil et al., 2015).

O subtipo triplo negativo apresenta ausência de expressão dos receptores hormonais (ER/PR) e HER2, são tumores agressivos e de alto grau histológico. Este

subtipo representa um desafio para a clínica, devido a falta de alvos terapêuticos (Nielsen et al., 2004; Zhang et al., 2014).

O estudo de Curtis e colaboradores (2012) utilizou técnicas de genômica e transcriptoma para avaliar 2000 amostras de pacientes com carcinoma mamário. Esta abordagem possibilitou a categorização em dez subgrupos, evidenciando assim, a complexidade dos tumores de mama e a importância da busca de novos biomarcadores. Entretanto, este trabalho manteve os tumores ER+ como os de melhor prognóstico e os tumores HER2+/ErbB2 como os tumores de pior prognóstico.

Apesar dos grandes avanços na classificação dos tumores de mama, uma das principais áreas de pesquisa em câncer de mama é a busca por novos biomarcadores. Seguindo essa linha de pesquisa, nosso grupo busca identificar biomarcadores capazes de prever a resposta terapêutica e progressão do câncer de mama. No trabalho de Nagai e colaboradores (2003), genes foram identificados diferencialmente expressos em tumores classificados em: ER+/PR+ e ER-/PR-. Este estudo possibilitou a identificação de genes candidatos a biomarcadores para o tumor de mama, dentre eles o gene *PAR-4*, proteína de interesse para este trabalho.

1.2 Prostate Apoptosis Response-4 (PAR-4)

O gene *PRKC apoptosis WT1 regulator* (PAWR) também conhecido como *Prostate Apoptosis Response-4* (PAR-4) foi identificado através da técnica de hibridização diferencial em células murinas de câncer de próstata andrógeno independente (AT3), tratadas ou não com ionomicina e cicloheximide. Este gene foi detectado superexpresso precocemente no processo apoptótico em resposta a elevada concentração de Ca^{2+} após o tratamento com ionomicina. A expressão de PAR-4 também foi observada na apoptose de células AT3 após a ablação androgênica induzida

por castração. Além disso, quando as células AT3 foram submetidas a um pré-tratamento com nifedipine (inibidor de canais de cálcio) resultou na inibição do gene Par-4, indicando que a ativação de Par-4 é um evento dependente de Ca^{2+} (Sells et al., 1994).

O gene *PAR-4* humano foi mapeado no cromossomo 12q21 (Johnstone, et al 1998), é constituído por 7 exóns e 6 intróns compreendendo 99,06 kB de DNA (Zhao & Rangnekar, 2007). Este gene codifica uma proteína de peso molecular de aproximadamente 40 kDa que consiste de 342 aminoácidos em seres humanos; 332 aminoácidos em ratos; e 333 aminoácidos em camundongos (El-Guendy et al., 2003). A proteína PAR-4 apresenta domínios funcionais altamente conservados entre as espécies. PAR-4 possui duas seqüências de localização nuclear (NLS), designadas de NLS1 (resíduos 20-25aa) e NLS2 (resíduos 137-153aa), um domínio SAC (*Selective for Apoptosis induction in Cancer cells*) (resíduos 137-195aa) e um domínio zipper de leucina na região C-terminal (resíduos 290-332aa) (Figura 3) (Gurumurthy et al., 2005).

Figura 3. Esquema representativo dos domínios funcionais da proteína PAR-4. PAR-4 possui quatro domínios funcionalmente ativos: dois domínios de proteína com seqüência de localização nuclear (NLS), designado NLS1 (resíduos entre 20-25 aminoácidos) e NLS2 (resíduos entre 137-153 aminoácidos); domínio SAC (resíduos entre 137-195 aminoácidos), domínio de *leucina-zipper* (resíduos entre 292-332 aminoácidos) (Adaptado de Zhao et al., 2007).

O domínio SAC possibilita a translocação nuclear, ativação das caspases, a inibição da atividade de NF- κ B (*Factor Nuclear kappa B*) e indução da apoptose. A superexpressão do domínio SAC foi considerada essencial e suficiente para induzir seletivamente a apoptose em células tumorais de próstata (El-Guendy et al., 2003).

PAR-4 também possui diversos sítios de fosforilação por quinases, tais como Proteínas Quinases A e C (PKA e PKC, respectivamente). Estes sítios parecem ser importantes na regulação, localização, dimerização e modificação pós-traducional da proteína PAR-4 (El-Guendy et al., 2003).

1.2.1 PAR-4 e a Apoptose

A expressão da proteína *PAR-4* é induzida por diversos estímulos, tais como retirada de fatores de crescimento, TNF (*Tumor Necrosis Factor receptor- TNFR1*), radiações ionizantes, e altos níveis de cálcio (Sells et al., 1997).

A superexpressão de PAR-4 é suficiente para induzir a apoptose em células tumorais hormônio independentes, enquanto que células normais ou imortalizadas e hormônio dependentes são resistentes à sua ação apoptótica na ausência de um segundo estímulo de morte (Chakraborty et al., 2001; El-Guendy et al., 2003).

A apoptose é um mecanismo celular importante e evolutivamente controlado para regular a morte celular em diferentes condições fisiológicas e patológicas. A desregulação deste processo confere uma vantagem celular crucial para a transformação tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011). A apoptose pode ocorrer por duas vias independentes denominadas de intrínseca e extrínseca, que convergem a via comum das caspases executoras.

A via de sinalização intrínseca envolve a mitocôndria e sua ativação ocorre por sinais internos (danos no DNA, privação de fatores de crescimento e ativação de

oncogenes). A regulação dessa via é realizada pela família de proteínas BCL-2. Após a indução de um sinal de morte interno ocorre a liberação do citocromo c e subsequentemente a formação de um complexo indutor de apoptose conhecido como apoptossomo. Este complexo é constituído de APAF-1 (*Apoptosis Proteases-activating factor-1*) e moléculas de caspase 9. Ativação da caspase 9 desencadeia a ativação de caspases executoras, tais como caspase 3, que desencadeiam o processo de apoptose (Portt et al., 2011).

A via extrínseca é desencadeada por receptores transmembrana de morte, membros da família do receptor TNF e FAS/ FAS L, cuja ativação é realizada pela ligação de citocinas ou por proteínas citotóxicas das células imunes (Askenazi & Dixit, 1998). Estes receptores ativados interagem com proteínas adaptadoras e com o complexo DISC (*Death Inducing Signalling Complex*), que ativam caspases iniciadoras (caspase 8), induzindo a atividade de caspases executoras (caspase 3, 6 e 7). A caspase 8, por sua vez também pode ativar a via intrínseca através da clivagem da proteína BID (*BH3-interacting domain death agonist*), gerando tBID, um fragmento permeabilizador mitocondrial que induz a liberação do citocromo c, consequentemente leva ativação da via intrínseca (Portt et al., 2011). PAR-4 parece emergir como facilitador geral de ambas as vias extrínseca e intrínseca de apoptose.

O mecanismo de indução da apoptose mediado por PAR-4, envolve diversos mecanismos, que regulam vias de sobrevivência com ações no citoplasma e no núcleo (Figura 4) (El-Guendy & Rangnekar, 2003).

A fosforilação do resíduo de treonina 155 (T155) de PAR-4 pela PKA (*Protein kinase A*), ativa a translocação de FAS / FASL para a membrana e inibe o NF- κ B. O papel preciso da fosforilação do resíduo T155 na translocação nuclear de PAR-4 ainda não está elucidado, mas há evidências que a fosforilação impede o dobramento do

domínio de zipper de leucina de PAR-4, e assim facilita a entrada nuclear da proteína. Embora necessária, a fosforilação por PKA não é suficiente para a entrada nuclear de PAR-4, sugerindo a influência de múltiplos fatores na translocação de PAR-4 no núcleo (El-Guendy & Rangnekar, 2003).

No citoplasma PAR-4 inibe a via de sobrevivência ativada por aPKC (*atypical Protein Kinase C*). Estas são proteínas compostas por resíduos de treonina/serina que desempenham um papel importante na ativação de NF- κ B e AP-1 (*Activator Protein 1*). PAR-4 interage com aPKC pelo domínio zipper de leucina, induzindo uma mudança conformacional em aPKC, que impede sua interação com FADD (Fas (TNFRSF6)-associated via death domain) e conseqüentemente inibe a formação do complexo DISC. Outro reflexo dessa interação é a inibição da ativação de NF κ B mediada pela aPKC. No núcleo, PAR-4 inibe a expressão de NF κ B pelo bloqueio da ativação intercedida por aPKC (El-Guendy & Rangnekar, 2003).

Burikhanov e colaboradores (2009) descreveram a secreção de PAR-4 em células normais e tumorais em modelos de próstata. A via de PAR-4 extracelular é estimulada por estresse do Reticulo Endoplasmático (RE). O RE pode induzir à formação de um complexo constituído por GRP78 (*Glucose-Regulated Protein-78*) e PAR-4, este complexo se transloca para a membrana plasmática onde PAR-4 é secretado para o meio extracelular. O GRP78 presente na membrana plasmática pode atuar como um receptor de PAR-4, essa interação pode ativar a via FADD/caspase 8 e 3 desencadeando o processo o extrínseco da apoptose.

Figura 4. Mecanismo atual de indução da apoptose mediado por PAR-4. PAR-4 induz a apoptose por diversos mecanismos, regulando vias de sobrevivência com ações no citoplasma e no núcleo. No citoplasma, aumenta a translocação de Fas e FasL para a membrana, bloqueia a atividade de PKC e da proteína anti-apoptótica BCL-2. No núcleo PAR-4 inibe a transcrição de NF-κB e inibe a expressão de *BCL-2* através de sua interação com *WT1* (Adaptado de El-Guendy & Rangnekar, 2003).

A proteína GRP78 é um membro da família de proteínas HSP70 e desempenha a função de regular a atividade de RE (Lee, 2007). Para avaliar a relevância de GRP78 na secreção, estudos utilizaram anticorpo neutralizante e iRNA (RNA de interferência) para inibir esta proteína, os resultados mostraram que a inibição de GRP78 foi capaz de inibir a via de secreção de PAR-4. Análises de western-blot e co-

imunoprecipitação com extratos celulares de PC-3 identificaram o receptor GRP78 como parceiro de interação de PAR-4 (Burikhanov et al., 2009).

1.2.2 PAR-4 como supressor tumoral

Do ponto de vista funcional, supressores de tumor são responsáveis pela preservação da integridade genômica, regulação do ciclo celular, proliferação celular, diferenciação e apoptose (Paige, 2003).

A redução na expressão de PAR-4 é observada em muitos tipos de câncer, como em carcinoma de células renais (Cook et al., 1999), neuroblastoma (Kogel et al., 2001), câncer do endométrio (Moreno-Bueno et al., 2007), e câncer de mama (Zapata-Benavides et al., 2009; Nagai et al., 2010). Moreno-Bueno e colaboradores (2007) analisaram amostras de tumor de endométrio e verificaram uma associação entre a diminuição na expressão de PAR-4 e hipermetilação da região promotora em 30% das amostras estudadas, sugerindo que a hipermetilação poderia ser um mecanismo responsável pela redução desse gene.

Estudos em camundongos *knockout* para PAR-4, mostraram o desenvolvimento espontâneo de tumores em diferentes tecidos, como pulmões, fígado, bexiga e do endométrio. Os tecidos do endométrio e de próstata parecem ser sensíveis à perda de PAR-4, sugerindo um papel desta proteína no desenvolvimento de tecidos hormônio-dependentes. Camundongos *knockout* de PAR-4 possuem vida média menor em comparação com os animais do tipo selvagem, devido à morte por tumores espontâneos (Garcia-Cao et al., 2005).

1.2.3 PAR-4 e os parceiros de interação

PAR-4 interage e forma complexo com diversas proteínas, como a TOP1 (*Topoisomerase 1*), WT1 (*Wilm tumor 1*), aPKC (*atipic Protein Kinase C*) e DLK (*DAP-Like Kinase*) (Vetterkinda et al., 2005), entre outras.

Evidências mostram que PAR-4 atua como um repressor intracelular da TOP1. PAR-4 interage com a TOP1 através do domínio de zipper de leucina, essa interação resulta na inibição da ação de TOP1 no relaxamento das fitas de DNA, dessa forma reduz a transformação celular (Goswami et al., 2007; Burihkanov et al., 2009).

A interação de PAR-4 com WT1, pode ocorrer de duas formas: interação zipper de leucina/zipper de leucina ou zipper de leucina/dedo de zinco. A interação zipper de leucina de PAR-4 com a zipper de leucina de WT1, forma um complexo que se liga a região promotora de *BCL-2*. Dessa forma, PAR-4 pode inibir a transcrição gênica de *BCL-2* mediada por WT1. Já a interação zipper de leucina de PAR-4 com dedo de zinco de WT1, resulta no sequestro de WT1 e consequentemente na repressão da transcrição de *BCL-2* (Cheema et al., 2003).

As isoformas da aPKC e DLK também se ligam a PAR-4 pelo domínio zipper de leucina. Ao se ligar a aPKC, PAR-4 melhora a função apoptótica, inibindo as proteínas BCL-2 e NF- κ B. Já a interação PAR-4/ DLK resulta no processo de morte celular caracterizada por alterações dramáticas do citoesqueleto que facilitam o processo apoptótico (Vetterkinda et al., 2005).

Estudo de Thonel (2014) identificou um sítio alvo de fosforilação em PAR-4 por CK2 (*Casein Kinase 2*). A fim de verificar as consequências desta fosforilação, sobre as funções pró-apoptóticas de PAR-4, os resíduos S124 e S223 de PAR-4 alvos de CK2 foram mutados. Foi observado que o mutante mimetizando PAR-4 não fosforilado

manteve as funções apoptóticas, enquanto mutante de PAR-4 fosforilado por CK2, perdeu a capacidade de inibir a via NF- κ B, além de apresentar resistência a apoptose. Assim, a fosforilação dos resíduos S124 e S223 de PAR-4 por CK2 resulta na perda das propriedades pró-apoptóticas de PAR-4 e reduz a ativação de caspases mediadas por PAR-4.

1.2.4 Par-4 e o Câncer de Mama

Estudos envolvendo PAR-4 e o câncer de próstata obtiveram grandes avanços, porém pouco se sabe do papel de PAR-4 no carcinoma mamário. Assim, nosso grupo tem se empenhado na busca do papel de PAR-4 nos processos de tumorigênese da mama.

Um trabalho de nosso grupo, avaliou a expressão de PAR-4, pAKT, ER, PR, HER2 e EGFR em 1116 amostras histopatológicas de tumor de mama. Os resultados apresentados forneceram evidências de que a redução da expressão nuclear de PAR-4 é um evento freqüente e está associada com a progressão do câncer de mama. PAR-4 se mostrou capaz de refinar a classificação de tumores Luminal A, mostrando que neste grupo a ausência atribuiu baixa taxa de sobrevida aos pacientes analisados. Quando a redução da expressão de PAR-4 foi relacionada com a positividade de marcadores estabelecidos clinicamente como pAKT, ER, PR, HER2 e EGFR, pode-se identificar um grupo com pior prognóstico (Nagai et al., 2010). Experimentos de cultura 3D com a linhagem MCF10A mostrou evidências que a expressão de PAR-4 pode ter um papel importante na formação do lumén durante o processo de morfogênese dos ácinos na glândula mamária (Nagai et al., 2010; Bessa-Garcia et al., 2010).

Outro estudo de nosso grupo avaliou a influência do IGF-1 (*Insulin-like factor*) e de 17 β -estradiol (E2) na modulação de PAR-4 em células de câncer de mama

MCF-7. O tratamento com E2 e IGF-1 se mostrou capaz de reduzir os níveis de mRNA de *PAR-4* de maneira tempo dependente, aumentando a proliferação celular. Subsequentemente, quando as células foram submetidas a inibidores de E2 e IGF-1 os níveis de *PAR-4* foram reestabelecidos, demonstrando que E2 e IGF-1 atuam em sinergismo na redução na expressão de *PAR-4*, mas que a ativação de IGF-1 não depende da ativação do ER (Casolari et al., 2011).

Objetivando examinar a relação entre a expressão de PAR-4 e sobrevida livre de recorrência (RFS), o grupo de Alvarez e colaboradores (2013) induziram tumor de mama em ratos. O modelo animal foi submetido ao tratamento com adriamicina e ciclofosfamida, seguidos do tratamento com paclitaxel. Os tratamentos levaram a regressão acentuada dos tumores, enquanto que os tumores não tratados continuaram a crescer. Após a regressão do tumor, os tratamentos foram encerrados e os ratos foram monitorados para recidiva. Os tumores que sofreram recidiva após quimioterapia exibiram uma redução acentuada na expressão de PAR-4. A mesma comparação foi estabelecida para pacientes com câncer de mama, onde os níveis de PAR-4 foram associados ao aumento de recorrência ao longo de 5 anos em comparação com mulheres cujos cânceres de mama expressavam maiores níveis de PAR-4.

Um trabalho recente de nosso laboratório verificou o papel de Par-4 em células MCF-7 expostas ao tratamento com docetaxel. As células MCF-7 foram transfectadas com o vetor de expressão de Par-4 e o com vetor vazio para a expressão desse gene. Pode-se observar que as células MCF-7 com over-expressão de Par-4, quando tratadas com docetaxel em diferentes concentrações, apresentaram maior porcentagem de apoptose. Concomitantemente, quando Par-4 foi silenciado nas células MCF-7, estas apresentaram aumento de proliferação (Pereira et al., 2013).

1.2.5 PAR-4 e Quimiossensibilidade a drogas

A função apoptótica de PAR-4 tem impulsionado vários estudos sobre a relação desta proteína e a quimiossensibilidade à drogas. Em células de leucemia o aumento da expressão de PAR-4, foi capaz de reduzir a expressão de inibidores de apoptose como cIAP-2 e XIAP, e de aumentar a expressão de caspases iniciadoras e executoras. Consequentemente, PAR-4 aumentou a sensibilidade dessas células a quimioterápico (Bergmann et al., 2004;. Boehrer et al., 2006).

Células de câncer do cólon (HT29) transfectadas com o vetor de expressão de PAR-4 apresentaram aumento na sensibilidade a apoptose. A administração em camundongos com câncer de colón de nanolipossomos com plasmídeos contendo PAR-4 e de 5-FU (5-fluorouracil), se mostrou mais eficaz em reduzir o tamanho de tumor quando comparado ao tratamento isolado com 5-FU (Kline et al., 2009).

O estudo de Wang e colaboradores (2012) foi realizado com o objetivo de determinar o mecanismo que PAR-4 induz a apoptose em células de câncer de cólon. Este forneceu evidências que PAR-4, atua no citoplasma inibindo NF- κ B e no núcleo bloqueando a transcrição do gene Droscha, com a redução da expressão de genes pró-sobrevivência e aumento da expressão de genes pró-apoptóticos. Deste modo, PAR-4 sensibiliza as células de câncer de cólon a apoptose frente ao tratamento com 5-FU.

Um trabalho de nosso grupo mostrou pela primeira vez que o aumento da expressão de PAR-4 sensibiliza as células de câncer de mama á drogas. Células MCF-7 transfectadas com PAR-4 quando submetidas ao tratamento com docetaxel apresentaram aumento significativo nas taxas de apoptose em resposta ao quimioterápico (Pereira et al., 2013).

Ensaio de expressão gênica por *cDNA microarray* foram realizados em nosso laboratório (dados ainda não publicados), com o objetivo de analisar o perfil de expressão de células MCF-7 transfectadas com o vetor de expressão para PAR-4 e com vetor vazio na ausência e presença do tratamento com docetaxel. A análise dos dados foi realizada utilizando-se o programa GeneSpring 12.5.G.X. Diversos genes foram identificados como diferencialmente expressos. Para avaliar a interação entre os genes diferencialmente expressos foi utilizado o programa IPA- Ingenuity® para gerar redes gênicas funcionais. Dentre as diversas redes gênicas geradas destacaram-se as que continham genes relacionados direta ou indiretamente com a via de sinalização WNT (*Wingless-Type MMTV Integration 1*) Figura 5 e 6. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo validar genes diferencialmente expressos identificados em células MCF-7 com diferenças de expressão de *PAR-4* antes e após a exposição de docetaxel.

Figura 5. Rede de interação molecular mostrando uma visão integrada dos genes mais expressos (vermelho) e menos expressos (verde) em células MCF7_{pcPAR4} vs MCF7_{pcNEO} na ausência de tratamento. Genes ou produtos de genes são representados como nós, e a 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. Genes circulado em vermelho são integrantes da via do WNT.

Figura 6. Rede de interação molecular mostrando uma visão integrada dos genes mais expressos (vermelho) e menos expressos (verde) em células MCF7_{pcPAR4} vs MCF7_{pcNEO} na presença de docetaxel. Genes ou produtos de genes são representados como nós, e a 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. Genes circulados em vermelho são integrantes da via do WNT.

Objetivo

2.0 OBJETIVO

- Validar genes diferencialmente expressos identificados em células MCF-7 com diferenças de expressão de PAR-4 (*Prostate Apoptosis Response-4*) antes e após a exposição de docetaxel.

Material e Métodos

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Células em cultura

A linhagem MCF-7 derivada de adenocarcinoma de mama é ER-positiva e foi adquirida da American Type Culture Collection (Rockville, MD). Em experimentos anteriores do laboratório as células MCF-7 foram transfectadas com o vetor de expressão pCMV6-XL6-PAR-4 contendo o vetor completo o cDNA completo de PAR-4 ou com o vetor vazio pCMV6-XL6-NEO. As células MCF7*pc*NEO e MCF7*pc*PAR4 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino (FBS) e mantidas em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂.

3.2 Tratamento com docetaxel

As células MCF7*pc*NEO e MCF7*pc*PAR4 foram tratadas com o quimioterápico Docetaxel (Taxotere; Aventis Pharmaceuticals Inc, Bridgewater, NJ), que foi dissolvido em etanol absoluto (solução estoque de 1 mM). As concentrações utilizadas foram de 100nM e 50nM de docetaxel (concentrações estabelecidas previamente no laboratório) e as células controle tratadas com etanol absoluto (inferior a 0,01%), por 24 horas. Para validação foi utilizada as células tratadas com 50nM de docetaxel.

3.3.1 Extração Proteica

Para a extração de proteínas, células MCF7*pc*NEO e MCF7*pc*PAR4 foram lavadas 2 vezes com PBS 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).

3.3.2 Western Blot

Os extratos proteicos quantificados e alíquotados 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-Par-4 Abcam, 1:2000), 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 (mouse, 1:2000) associado a peroxidase por 1,5 hora a temperatura ambiente. O anticorpo anti-actina foi utilizado como controle de massa. 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.

Tabela 1. Anticorpos utilizados nas hibridizações do Western-blot

Anticorpo	Empresa	Diluição do Anticorpo Primário	Diluição do Anticorpo Secundário
Anti- β -Actina	Millipore	1:2000	Mouse 1:2000
Anti-Par-4	Abcam (ab5787)	1:1000	Rabbit 1:10000

3.3.3 Densitometria

As análises semi-quantitativas da expressão protéica foram determinadas por densitometria da intensidade das bandas do Western-blot. A expressão da proteína do controle de massa da β -actina foi utilizada para normalização dos resultados. A densitometria foi realizada utilizando o software *ChemImagerTM 4400* (Alpha Innotec Corporation, San Leandro, USA)

3.3.4 Extração de RNA

Para os ensaios de análise de expressão gênica por Real Time, o RNA total foi extraído das células MCF7pcNEO e MCF7pcPAR4 controle e tratado com 50nM e 100 nM, por 24 horas, utilizando a metodologia de Isotiocianato de Guanidina e Fenol-

Clorofórmio (Chomczynsky and Sacchi, 1987). Em resumo, o método consiste na adição de 500ul de solução D gelada (Iosicionato de guanidina 4M, Citrato de sódio 25mM pH7,0, Sarcosil 0,05% e 0,1M de β -mercaptoetanol 98%). Em sequencia adicionou-se 70ul de acetato de sódio 2M pH 4,0, 500ul de fenol saturado, e 150ul 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. Em seguida foi removida a fase aquosa do sobrenadante, referente ao RNA extraído, transferindo assim para um novo tubo. Em seguida, foi adicionado nas 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 descartado e o precipitado dissolvido em 150ul de solução D, com adição de 170ul 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 descartado e novamente o precipitado foi lavado com etanol 75%, e centrifugado 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 me 30ul de água livre de DNase/RNase (Gibco, Gainthersburg, 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.

3.4.1 Tratamento do RNA com DNase I

A partir de 3ug do RNA extraído das amostras tratadas com docetaxel e controle foi realizado o tratamento 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 20µl de água livre de DNase/RNase (GIBCO, Gaintesburg, EUA).

3.4.2 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. A reação de síntese de cDNA foi realizada a 25°C por 10 minutos, seguida de uma 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 25µl, contendo: 2.5µl de cDNA (1:10); 125µM 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.

3.5 Validação

3.5.1 Anotação Manual

Os genes para validação foram selecionados por anotação manual de acordo com sua relevância nos processos de tumorigênese e quimiossensibilidade. A busca foi realizada utilizando o banco de dados do site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

3.5.2 Desenho de Oligonucleotídeo

Para a validação dos transcritos diferencialmente expressos foram desenhados oligonucleotídeos para uma região entre exóns, capazes de amplificar somente o gene de interesse, utilizando como base o Primer Express® Software v3.0.1 (Applied Biosystems) e 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.

4.5.6 Real time PCR

A quantificação relativa dos transcritos diferencialmente expressos foi feita por PCR em tempo real utilizando cDNAs provenientes das amostras de RNA das células MCF7 e oligonucleotídeos específicos desenhados para os transcritos a serem analisados e o kit SYBR Green PCR Reagent (PE Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação e detecção dos fragmentos amplificados foi feita utilizando-se o 7500 Detection System (Perkin Elmer).

Foram utilizados os cDNAs obtidos a partir do RNA total extraído das células MCF7_{pc}NEO e MCF7_{pc}PAR4, na ausência e na presença do tratamento com docetaxel. A detecção dos produtos foi feita pelo contínuo monitoramento do sinal fluorescente

emitido pelo interlacante de DNA SYBR Green. As reações foram realizadas em duplicata para cada amostra e o gene o GAPDH foi utilizado como referência.

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. As amostras foram analisadas 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 (*GAPDH*), 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).

No presente estudo utilizamos o GAPDH como normalizador, pois experimentos anteriores de nosso grupo fizeram reações de qRT-PCR com genes constitutivos (BAT, GAPDH, HP e RL13), em diferentes concentrações de docetaxel nas células MCF-7. Os dados obtidos foram analisados no software DataAsist v 3.01 (Applied Biosystems), sendo escolhido o gene GAPDH como normalizador por apresentar menor variação e menor *Score*.

3.5.7 Análise da Expressão Gênica por qRT-PCR array

Os cDNAs sintetizados das amostras MCF7*pc*NEO e MCF7*pc*PAR4, na ausência e na presença do tratamento com docetaxel, foram submetidas a análise de expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (*qRT-PCR array*). O *RT² Profiler™ PCR array* é uma ferramenta de análise da expressão gênica de um grupo específico de genes envolvidos em transdução de sinais, processos biológicos ou vias de sinalização envolvidas com o desenvolvimento de doenças por meio de qPCR. A geração de moléculas de DNA dupla fita e amplificação das sequências de interesse pela reação de

PCR *array* são detectadas através de fluorescência emitida pelo intercalante de DNA SYBR® Green. Esta técnica possui alta sensibilidade, reprodutividade e especificidade para vários genes simultaneamente.

Para reação da PCR em Tempo Real foram utilizados o equipamento 7500 Detection System (Perkin Elmer) e o *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. Todas as placas contêm um controle de DNA genômico (GDC), três controles de transcrição reversa (RTC) e três controles positivos da PCR, onde seus valores foram utilizados nos cálculos para determinação da expressão de cada gene alvo presente na placa (Figura 7).

ABC1	AHR	ANGTL4	ANTXR1	AXIN2	BGLAP	BIRC5	BMP4	BTRC	CACNA2D3	CCND1	CCND2
CD44	CDH1	CDKN2A	CDON	CEBPD	CTGF	CUBN	DAB2	DKK1	DLK1	DPP10	EFNB1
EGFR	EGR1	ETS2	PGF20	PGF4	PGF7	PGF9	FN1	FOSL1	FST	FZD7	GDF5
CDNF	G1A1	ID2	IGF1	IGF2	IL6	IRIS	JAG1	KLF5	LEFT	LRP1	MET
MMP2	MMP7	MMP9	MYC	NANOG	NRCAM	NRP1	NTRK2	PDGFPA	PITX2	PLAUR	POU5F1
PPAP2B	PPARD	PTCH1	PTGS2	RUNX2	SFRP2	SIX1	SMO	SOX2	SOX9	T	TCF4
TCF7	TCF7L1	TCFL2	TGB3	TLE1	TWIST1	VEGFA	WISP1	WISP2	WNT3A	WNT5A	WNT9A
ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Figura 7. Desenho referente à placa PCR array da via de sinalização de WNT. Esta plataforma é constituída por 84 genes chaves envolvidos na modulação dos processos biológicos da via do WNT e 5 genes endógenos. A placa contém um controle de DNA genômico (GDC), três controles de transcrição reversa (RTC) e três controles positivos da PCR.

A qRT-PCR foi realizada em um volume final de 25µl para cada poço da plataforma de PCR *array*, contendo os reagentes: RT² qPCR Master Mix, a diluição da reação de síntese de cDNA fita simples e água livre de nuclease. As condições da PCR

consistiu em um programa de ciclagem, 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.

4.3 Seleção dos genes constitutivos

Para análise de genes diferencialmente expressos obtidos no *Human Wnt Signaling Pathway RT² Profiler™ PCR Array* é essencial o uso de genes constitutivos. Estes foram utilizados como controles internos da reação para normalizar os dados da diferença de expressão nos experimentos de qRT-PCR. Esta plataforma contém 5 genes como potenciais normalizadores (ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1, RPL0).

Como mencionado no item 3.5.7 de materiais e métodos, estudo de nosso grupo mostrou que o gene GAPDH apresenta menor variação e menor *Score*, sobre diferentes concentrações de docetaxel em células MCF-7. Por tais motivos, para essas análises foram utilizados como genes normalizadores GAPDH e a B2M por apresentar Ct semelhante.

3.6 Análise dos dados da qRT-PCR array

Os dados com os valores de *thresholds* foram exportados para serem posteriormente analisados pelo programa *RT² Profiler PCR Array Data Analysis Template v 3.3* (SABiosciences). O programa executa o cálculo do *fold change* $2^{-\Delta\Delta CT}$, que consistiu no valor da expressão do gene normalizado $2^{-\Delta\Delta CT}$ na amostra do grupo experimental dividido pela expressão do gene normalizado $2^{-\Delta\Delta CT}$ na amostra do grupo controle, para cada gene. Os valores de *fold-change* > 1 indicaram um aumento de expressão gênica. Os valores de *fold-change* < 1 indicaram uma diminuição de expressão gênica.

3.7 Análise Estatística

Os resultados serão analisados pelo test-t (student) utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (Software Inc., EUA). Foram considerados valores $p < 0,05$ como estatisticamente significativos.

3.8 Considerações éticas

O presente projeto de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo de Pesquisa N° 458-13).

Resultados

4.0 RESULTADOS

4.1 Expressão da proteína PAR-4 em células de câncer de mama MCF7

As células MCF7 $_{pc}$ PAR4 e MCF7 $_{pc}$ NEO foram cultivadas até atingirem confluência de 70% e a expressão protéica do PAR-4 foi analisada pela técnica de Western Blot conforme descrito no item materiais e métodos. Como pode ser observado na Figura 8 as células MCF7 $_{pc}$ PAR4 cultivadas para validação apresentaram um aumento de aproximadamente 2,4 vezes da expressão de PAR-4 em relação as células MCF7 $_{pc}$ NEO.

Figura 8. Expressão protéica de Par-4 nas células MCF7 $_{pc}$ PAR4 vs MCF7 $_{pc}$ NEO. A. Imagem representativa de Western blot, utilizando o Anticorpo anti-PAR-4 (Abcam) e Anticorpo anti- β -Actina para normalização da massa. B. Representação Gráfica da razão dos valores densitométricos de PAR-4 pela actina.

4.3 Validação dos genes *EGRI*, *XAF1*, *TARP*, e *WNT5A* nas células MCF7*Pc*PAR4 por qRT-PCR.

Após anotação manual dos genes mais diferencialmente expressos identificados no ensaio de transcriptoma, foram selecionados para validação os genes *EGRI*, *XAF1*, *TARP* e *WNT5A*, devido sua relevância nos processos de tumorigênese e quimiossensibilidade á drogas.

Para a validação dos genes *EGRI*, *XAF1*, *TARP* e *WNT5A* foram consideradas a análise de qRT-PCR na comparação MCF-7*Pc*PAR4 vs MCF-7*Pc*NEO antes e após o tratamento com docetaxel. Porém, outra análise foi realizada para observar a influência apenas do docetaxel nas células MCF-7*Pc*PAR4 e MCF-7*Pc*NEO.

Na comparação MCF-7*Pc*PAR4 vs MCF-7*Pc*NEO na ausência de tratamento, observamos regulação positiva na expressão relativa do gene *EGRI* ($p=0,0365$). Após o tratamento com docetaxel podemos notar o aumento discreto na expressão relativa de *EGRI* em relação às células MCF-7*Pc*NEO (Figura 9).

A expressão relativa de *XAF1* não foi alterada na comparação a MCF-7*Pc*PAR4 vs MCF-7*Pc*NEO sem tratamento. Na presença do docetaxel *XAF1* apresentou regulação negativa, com significância estatística de $p=0,0036$, e pode ser observada na Figura 9.

Os resultados de qRT-PCR mostram regulação positiva significativa da expressão de *TARP* nas células com aumento de expressão de PAR-4 em relação as células MCF-7*Pc*NEO antes ($p=0,0003$) e após ($p=0,0052$) o tratamento com docetaxel (Figura 10).

(A)

(B)

Figura 9. Expressão relativa dos genes selecionados para validação nas células MCF7pcPAR4 e MCF7pcNEO - Comparação das médias de expressão relativa dos genes *EGR1* (esquerda) e *XAF1* (direita): (A) Entre os tratamentos nas células MCF7pcNEO e MCF7pcPAR4– Controle e tratadas com Docetaxel (B) MCF7pcNEO e MCF7pcPAR4 antes e após o tratamento com Docetaxel * comparação estatisticamente significativa $p < 0,05$, teste t.

Figura 10. Expressão relativa dos genes selecionados para validação nas células MCF7pcPAR4 e MCF7pcNEO - Comparação das médias de expressão relativa dos genes *TARP* (Esquerda) e *WNT5A* (Direita): (A) Entre os tratamentos nas células MCF7pcNEO e MCF7pcPAR4- Controle e tratadas com Docetaxel (B) MCF7pcNEO e MCF7pcPAR4 antes e após o tratamento com Docetaxel * comparação estatisticamente significativa $p < 0,05$, teste t.

Foi observada regulação positiva de expressão dos transcritos de *WNT5A* nas comparações MCF-7pcPAR4 vs MCF-7pcNEO na ausência de docetaxel. Após o tratamento, pode ser vista regulação positiva de *WNT5A* ($p=0,0497$) (Figura 10).

A expressão dos transcritos selecionados para validação nas técnicas de transcriptoma e qRT-PCR podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2. Validação dos genes diferencialmente expressos nos ensaios de transcriptoma nas comparações célula MCF-7_{pc}PAR4 vs MCF-7_{pc}NEO, antes e após o tratamento com docetaxel.

	EGRI		XAF1		TARP		WNT5A	
Comparação	Transcritoma	RT PCR	Transcritoma	RT PCR	Transcritoma	RT PCR	Transcritoma	RT PCR
PAR4 vs NEO CTR	ND	NC ↑3,09	↓1,79	NC ↓0,69	ND	NC ↑4,69	↑2,39	T ↑1,96
PAR4 vs NEO DOC	↑2,09	T ↑1,17	↑3,39	X ↓0,54	↓3,79	X ↑4,67	↑2,31	✓ ↑2,67
NEO DOC vs NEO CTR	ND	NC ↑2,49	↑3,15	T ↑2,00	↓2,72	X ↑1,76	↓2,12	X ↑1,22
PAR4 DOC vs PAR4 CTR	↓2,37	T ↓0,77	↓3,33	X ↑1,63	↑2,20	✓ ↑1,69	↓2,04	X ↑1,58

Transcriptoma: Fold change obtido pela análise de microarray. RT-PCR: resultado da validação pela técnica de PCR em Tempo real; Neo: MCF7_{pc}NEO, PAR-4: MCF7_{pc}PAR-4; ↑: regulação positiva; ↓: regulação negativa; X: Não Validado; ✓: Validado; T: Tendência a Validação; NC: Não conclusivo; ND: Não Detectado.

4.4 O efeito da expressão de PAR4 e do tratamento com docetaxel nos genes da via de sinalização de WNT

As análises das redes gênicas geradas pelo programa IPA- Ingenuity® mostraram a modulação de diversos genes integrantes da via de sinalização canônica e não-canônica de WNT nas células MCF-7 com aumento de expressão de PAR-4 antes e após o tratamento com docetaxel. Para validar estes achados foi utilizada a plataforma *WNT Signaling Pathway RT2 Profile PCR array* (PCR Array) que possui 84 genes chave envolvidos na modulação dos processos biológicos da via do WNT e 5 genes endógenos.

A expressão gênica dos genes da via do WNT foi observada nas comparações MCF7_{pc}PAR4 vs MCF7_{pc}NEO na ausência e presença de docetaxel. A partir da expressão relativa para os 84 genes analisados, foi possível obter o *Heat Map*. Nesta representação os genes com regulação negativa possuem valores de *fold-change* < 1 e estão apresentados em tonalidades de verde, já os genes com regulação positiva possuem valores de *fold-change* > 1 e estão representados em tonalidades de vermelho.

Enquanto, a cor preta mostra que não houve diferença de expressão e cor cinza representa genes cujo Ct foi $35 >$ ciclos (Figura 11).

A expressão relativa dos 84 genes analisados pode ser observada na Figura 11. Dos 84 genes da via do WNT analisados para a comparação MCF7 pc PAR4 vs MCF7 pc NEO na ausência de docetaxel, observamos que 9 genes apresentaram diferença de expressão estatisticamente significativa ($p < 0,005$). Destes, 5 genes apresentaram regulação positiva sendo eles *CDKN2A*, *EGR1*, *FGF7*, *IL6* e *TWIST* e 4 genes tiveram regulação negativa, sendo eles o *NTRK2*, *SOX2*, *SOX9* e *WISP1* (Tabela 3).

Na comparação MCF7 pc PAR4 vs MCF7 pc NEO tratadas com docetaxel encontramos 7 genes com diferenças de expressão estatística ($p < 0,005$). Dentre os genes modulados nesta comparação, 6 genes apresentaram regulação positiva sendo eles *CACNAD2A3*, *FGF7*, *GDF5*, *IL6*, *LEF1* e *TWIST* e somente *FST* apresentou regulação negativa (Tabela 4).

Figura 11. Diferença de expressão gênica de genes da via do WNT entre as células MCF-7pcPAR4 e MCF-7pcNEO na ausência e presença de docetaxel. Representação do Heat Map nas células MCF-7pcPAR4 e MCF-7pcNEO na ausência (A) e presença de docetaxel (B). Em vermelho temos genes com regulação positiva, em verde temos genes com regulação negativa, em preto genes sem diferença de expressão e em cinza genes com nível de expressão não detectada. (C) Histograma de expressão gênica de genes da via de sinalização do WNT, nas comparações MCF-7pcPAR4 vs MCF-7pcNeo na ausência (azul) e na presença de docetaxel (vermelho).

Tabela 3. Diferença de Expressão Gênica de genes da via de sinalização do WNT pela análise *Human Wnt Signaling Pathway Array* na comparação MCF7pcPAR4 vs MCF7pcNEO na ausência de docetaxel

Gene	Locus	Name	FC
↑CDKN2A	9p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	2,88
↑EGR1	5q31.1	early growth response 1	2,95
↑FGF7	15q21.2	fibroblast growth factor 7	2,99
↑IL6	7p21	interleukin 6	2,42
↑TWIST	7p21.2	twist family bHLH transcription factor 1	5,75
↓NTRK2	9q22.1	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	-2,94
↓SOX2	3q26.3-q27	SRY (sex determining region Y)-box 2	-3,87
↓SOX9	17q24.3	SRY (sex determining region Y)-box 9	-2,07
↓WISP1	8q24.22	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	-4,18

↑: genes regulados positivamente; ↓: genes regulados negativamente

Tabela 4. Diferença de Expressão Gênica de genes da via de sinalização do WNT pela análise *Human Wnt Signaling Pathway Array* na comparação MCF7pcPAR4 vs MCF7pcNEO na presença de docetaxel.

Gene	Locus	Name	FC
↑CACNAD2A3	9p21	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 3	2,20
↑FGF7	15q21.2	fibroblast growth factor 7	5,04
↑GDF5	20q11.2	growth differentiation factor 5	2,35
↑IL6	7p21	interleukin 6	4,03
↑LEF1	4q23-q25	lymphoid enhancer-binding factor 1	6,47
↑TWIST	7p21.2	twist family bHLH transcription factor 1	8,35
↓FST	5q11.2	Follistatin	-2,16

↑: genes regulados positivamente; ↓: genes regulados negativamente

4.5 Integração dos dados de Transcriptoma e *Human WNT Signaling Pathway Array*

Utilizando a expressão relativa, foi estabelecida uma comparação entre o valor de expressão dos genes da via do WNT presentes no *Human WNT Signaling Pathway* e os valores de *fold-change* apresentados pelo ensaio transcriptoma. As Tabelas 5 e 6 apresentam os genes diferencialmente expressos em ambas as técnicas.

Na comparação MCF7pcPAR4 vs MCF7pcNEO na ausência de docetaxel, dos 84 genes contidos no *PCR array*, encontramos 21 genes comuns com a técnica de

transcriptoma. Dentre estes, 16 genes apresentaram o mesmo perfil de expressão em ambas as técnicas e 5 genes apresentaram perfil de expressão diferente (Tabelas 5).

Na comparação MCF7_{pc}PAR4 vs MCF7_{pc}NEO na presença de docetaxel, foram encontrados 14 genes comuns. Dentre estes, 6 genes apresentaram o mesmo perfil de expressão e 8 genes apresentaram diferente perfil de expressão entre as duas técnicas (Tabela 6).

Tabela 5. Tabela de integração dos dados de Transcriptoma e o *Human WNT Signaling Pathway* para as comparações MCF7_{pc}PAR4 vs MCF7_{pc}NEO ausência de docetaxel.

GENES	LOCUS	DESCRIÇÃO	FC PCR array	FC array
CDH1	16q22.1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	↓1,63	↓5,67
DAB2	5p13.1	Dab, mitogen-responsive phosphoprotein, homolog 2 (Drosophila)	↑1,19	↑2,50
DPP10	2q14.1	dipeptidyl-peptidase 10 (non-functional)	↑1,19	↑2,41
FST	5q11.2	Follistatin	↓1,77	↑2,06
FZD7	2q33	frizzled class receptor 7	↓1,47	↓2,13
GJA1	6q22.31	gap junction protein, alpha 1, 43kDa	↑1,18	↑4,65
IGF1	12q23.2	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	↑1,46	↑2,89
IGF2	11p15.	insulin-like growth factor 2	↑1,04	↑2,05
JAG1	20p12.1-p11.23	jagged 1	↓1,30	↓2,18
LEF1	4q23-q25	lymphoid enhancer-binding factor 1	↑1,08	↑2,95
MMP2	16q13-q21	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	↑1,19	↑2,10
NANOG	12p13.31	Nanog homeobox	↓1,07	↑2,86
NTRK2	9q22.1	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	↓2,64	↓3,32
PDGFRA	4q12	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	↑1,19	↑1,66
PTGS2	1q25.2-q25.3	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	↑1,19	↑2,50
RUNX2	6p21	runt-related transcription factor 2	↓1,90	↓2,59
TWIST1	7p21.2	twist family bHLH transcription factor 1	↑5,75	↑1,51
WISP2	20q13.12	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	↑1,20	↓2,03
WNT3A	1q42	wingless-type MMTV integration site family, member 3A	↑1,71	↓2,26
WNT5A	3p21-p14	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	↑1,23	↑2,39
WNT9A	1q42	wingless-type MMTV integration site family, member 9A	↓1,44	↑2,24

↑: genes regulados positivamente; ↓: genes regulados negativamente

Tabela 6. Tabela de integração dos dados de Transcriptoma e o *Human WNT Signaling Pathway* para a comparação MCF7_{pcPAR4} vs MCF7_{pcNEO} na presença de docetaxel.

GENES	LOCUS	DESCRIÇÃO	FC	
			PCR array	FC array
CTGF	6q23.1	connective tissue growth factor	↑1,52	↑3,27
DAB2	5p13.1	Dab, mitogen-responsive phosphoprotein, homolog 2 (Drosophila)	↑1,75	↑2,08
EGR1	5q31.1	early growth response 1	↑1,29	↑2,09
FGF20	8p22	fibroblast growth factor 20	↑1,07	↑2,28
JAG1	20p12.1- p11.23	jagged 1	↓1,07	↑2,48
LEF1	4q23-q25	lymphoid enhancer-binding factor 1	↑6,47	↑1,79
NANOG	12p13.31	Nanog homeobox	↓1,99	↑2,65
PDGFRA	4q12	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	↑1,91	↑1,97
RUNX2	6p21	runt-related transcription factor 2	↓1,06	↑2,15
SOX9	17q24.3	SRY (sex determining region Y)-box 9	↓1,33	↑1,97
TCF7L2	2p11.2	transcription factor 7-like 1 (T-cell specific, HMG-box	↑1,22	↓4,02
TWIST1	7p21.2	twist family bHLH transcription factor 1	↑8,35	↓1,81
WISP1	8q24.22	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	↑1,46	↓2,16
WNT5A	3p21-p14	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	↓1,02	↑2,31

↑: genes regulados positivamente; ↓: genes regulados negativamente

Discussão

5.0 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado com objetivo de validar genes identificados como diferencialmente expressos em células MCF-7 com diferenças de expressão de PAR-4 antes e após a exposição ao docetaxel.

Devido a relevância nos processos de tumorigênese e quimissensibilidade, foram selecionados por anotação gênica manual os genes *EGR1*, *XAF1*, *TARP* e *WNT5A* para validação pela técnica de qRT-PCR.

O gene *EGR1* (*Early Growth Response 1*) está localizado no cromossomo 5q31. O produto desse gene é uma fosfoproteína nuclear capaz de induzir mitógenos e fatores de diferenciação (Mansoor, 2004). No ensaio de transcriptoma na comparação MCF-7_{pc}PAR4 vs MCF7_{pc}NEO na presença de docetaxel, *EGR1* apresentou regulação positiva. Nos experimentos de validação observamos regulação positiva significativa ($p=0,0365$) de *EGR1* na ausência de tratamento, sugerindo que a expressão dos transcritos deste gene foi modulada pela presença de PAR-4. Após o tratamento com docetaxel, observamos uma discreta regulação positiva de *EGR1* nas células com overexpressão de PAR-4, porém não é conclusiva à tendência a validação. A expressão de *EGR1* em tumores é controversa, sendo observada redução ou falta de expressão em glioma (Calogero et al., 2002), carcinoma hepatocelular, esofágico (Wu et al., 2002), câncer de pulmão (Mcdoniels-Silvers et al., 2002) e câncer de mama (Liu et al., 2007). Entretanto, é descrito o aumento de *EGR1* em tumores de próstata (Eid et al., 1998). *EGR1* pode atuar como supressor tumoral por induzir a apoptose em resposta ao stress, danos celulares e exposição à mitógenos. Camundongos *knockout* para *EGR1* apresentaram resistência a apoptose induzida por radiação (Gitenay & T Baron, 2010). Além disso, Mansoor (2004) sugere que células de câncer de próstata quando expostas à

radiação, aumentam a expressão de *EGR1*, que por sua vez inibe genes de sobrevivência e ativa genes pró-apoptóticos como *PAR4*. Outro estudo observou que à exposição ao estrógeno é capaz de ativar a expressão de *EGR1* em células MCF-7 (Chen et al., 2004). Nossos resultados sugerem que a expressão de *EGR1* é modulada pela presença de *PAR-4* em células MCF-7, além disso, estes genes poderiam estar atuando em sinergismo, na sensibilização das células de câncer de mama a apoptose.

O gene *XAF1* (*XIAP Associated Factor 1*), se localiza no cromossomo 17p13.1, o produto desse gene codifica uma proteína dedo de zinco, que se liga e neutraliza o efeito inibitório de *XIAP* (*X-linked inhibitor of apoptosis*) sobre a apoptose (Larref et al., 2004). Em nossos achados de transcriptoma *XAF1* apresentou regulação negativa na comparação MCF7_{pcPAR4} vs MCF7_{pcNEO} na ausência de docetaxel e regulação positiva na presença do tratamento. Nos experimentos de qRT-PCR a expressão de *XAF1* na ausência de docetaxel se manteve reduzida possuindo tendência a validação. Na presença de docetaxel *XAF1* mostrou regulação negativa significativa ($p=0,0036$), logo estes dados não corroboram com os achados do transcriptoma. A perda de *XAF1* foi observada numa variedade de linhagens celulares de tumores humanos (Ng KC et al., 2004; Xia et al., 2006), e está associada com o desenvolvimento e progressão de tumores malignos (Huang et al., 2010). O restabelecimento da expressão de *XAF1* induz apoptose, autofagia, e inibe o crescimento de tumores em cânceres gástricos, cólon, fígado, pâncreas e próstata (Huang et al., 2010; Sun et al., 2011), que evidenciam a função supressora tumoral de *XAF1*. Portanto, a restauração dos níveis de *XAF1* pode proporcionar uma estratégia promissora para terapia do câncer (Wang et al., 2012) e parece estar associada a mecanismos de sensibilidade á drogas.

O gene *TARP* (*TCR Gamma Alternate Reading Frame Protein*) está localizado no cromossomo 7p15-p14. Este gene apresentou regulação negativa no

transcriptoma na comparação MCF7 pc PAR4 vs MCF7 pc NEO na presença de docetaxel. Porém, nos experimentos de validação identificamos regulação positiva na expressão de *TARP* com significância na comparação MCF7 pc PAR4 vs MCF7 pc NEO antes ($p=0,0003$) e após ($p=0,0052$) o tratamento com docetaxel, dessa forma não confirmam o achado do transcriptoma. Estudos têm apontando *TARP* como biomarcador em câncer de próstata, pois é verificado o aumento da expressão em tecidos de tumores de próstata (Kristiansen et al., 2005; Fritzsche et al., 2010). Além disso, aumento de *TARP* foi associado a fatores de prognóstico importantes no tumor de próstata como PSA (*Prostate-Specific Antigen*) e aumento da idade. A marcação de *TARP* por imunohistoquímica foi capaz de separar tecido tumoral de próstata do tecido normal (Fritzsche et al., 2010). Epítomos da proteína *TARP* são encontrados em linfócitos T no microambiente de câncer de mama e de próstata, tal fato tem impulsionado a busca de imunoterapias específicas (Epel et al., 2008; Nguyen et al., 2010). Apesar dos dados da literatura apresentados, ainda não é elucidada a função de *TARP* em tumores. Nossos resultados de validação por qPCR corroboram com estudos na literatura que reportam o aumento de *TARP* nas células MCF7 (Fritzsche et al., 2010) e sugerem que a expressão deste gene é modulada pela presença de PAR-4 e pelo tratamento com docetaxel.

A regulação positiva dos transcritos do gene *WNT5A* (*wingless-type MMTV integration site family, member 5*) foi identificada nas análises de transcriptoma antes e após o tratamento com Docetaxel. Esses achados possuem tendência a validação na ausência de tratamento, e validação na presença de docetaxel ($p=0,0497$). O *WNT5A* membro da família WNT codifica uma proteína de 379 aa e sinaliza através de ambas as vias de WNT (canônica e não-canônica). Esta proteína é um ligante para os receptores *Frizzled* e *Tyrosine Kinase Orphan Receptor 2* (*ROR2*), que desempenha um papel essencial na embriogênese e oncogênese (Zhu et al., 2014). MacLeod e colaboradores

(2007) relataram que a β -catenina ativa constitutivamente em linhagens de células de câncer de cólon pode ser degradada pela exposição com Ca^{2+} extracelular. Este estudo mostrou que Ca^{2+} extracelular ativa os receptores sensíveis ao cálcio (CaSRs) em células epiteliais intestinais. Em resposta houve o aumento da transcrição e tradução de WNT5A. Este por sua vez, ativa a via WNT5A/ROR2 a qual levou a degradação de β -catenina pela ubiquitina-ligase Siah2. Contrariando a hipótese que WNT5A seria um supressor tumoral, esta proteína tem sido identificada como um oncogene. Em tumor gástrico a regulação positiva de WNT5A em pacientes foi associada com infiltração, metástase linfonodal, estágio avançado da doença e pior prognóstico (Kurayoshi et al., 2006). Em nossos dados WNT5A apresentou regulação positiva na comparação MCF7_{pcPAR4} vs MCF7_{pcNEO} na ausência e presença de docetaxel, nos levando a hipotetizar que a via WNT/ β -catenina estaria inativa. O aumento da expressão dos genes *PAR-4* e *WNT5A* podem atuar na redução da transcrição de genes alvos da via canônica do WNT, dessa forma colaborariam no aumento da sensibilidade ao docetaxel.

A família de proteínas WNT inclui pelo menos 19 glicoproteínas ricas em cisteína secretadas, que estão envolvidas na regulação de processos normais e patológicos, incluindo embriogênese, diferenciação e tumorigênese (Yao et al., 2014). As proteínas WNT são capazes de ativar diversas vias de sinalização, que podem ser divididas em duas categorias gerais; via canônica dependente de β -catenina e a via não-canônica independente de β -catenina.

Na via canônica, uma proteína WNT (tais como WNT1, WNT3A e WNT7A) liga-se aos receptores *Frizzled* e LRP 5/6, que desencadeia uma cascata de inibição da atividade da GSK-3 β (Glicogênio Sintase Quinase-3 β). A inativação de GSK-3 β pelo complexo Axina/APC leva a redução da degradação de β -catenina pelo sistema de ubiquitina/proteossoma. A β -catenina livre entra no núcleo e ativa os fatores

de transcrição TCF/LEF e, por sua vez desencadeia a transcrição de um conjunto de genes alvo do WNT, como *c-MYC*, *CICLINA D*, *VEGF*, *ENDOTELINA 1*, que conduzem à proliferação e transformação da celular (Veeman et al., 2003; Chakraborty et al., 2010). Na ausência da sinalização de WNT, a β -catenina é degradada pela ativação da GSK-3 β , porém os níveis são estabilizados quando o sinal de WNT é recebido.

Mudanças na sinalização de WNT e aberrações genéticas que afetam a via de WNT têm sido associadas com um grande número de malignidades, incluindo câncer de mama em humanos e camundongos (Brown et al., 2001; Lamb et al., 2013), câncer de ovário em humanos (Wright, 1999), câncer de pulmão (Pongracz JE & Stockley RA, 2006), câncer de cólon (Clevers, 2006), câncer de próstata (Polakis, 2007), entre outros.

Para avaliar o efeito da overexpressão de PAR-4 e do tratamento de docetaxel em células MCF-7 na expressão gênica de genes envolvidos com a via canônica e não canônica do WNT, foi utilizada a plataforma *PCR Array* para ampla análise de expressão gênica da via do WNT.

Em nossos dados de *PCR Array* na comparação MCF7 pc PAR4 vs MCF7 pc NEO antes do tratamento, encontramos diferença de expressão significativa ($p < 0,005$) em 9 genes. Sendo que, os genes *CDKN2A*, *EGR1*, *FGF7*, *IL6* e *TWIST* apresentaram expressão positiva e os genes *NTRK2*, *SOX2*, *SOX9* e *WISP1* tiveram expressão negativa. O perfil de expressão dos genes *EGR1*, *IL6*, *SOX2* e *WISP1* indicam provável inativação da via WNT/ β -catenina (David et al., 2002; Jing et al., 2014; Lam et al., 2010; Venkatesan et al., 2011). Por outro lado, o perfil de expressão dos genes *CDKN2A*, *FGF7*, *TWIST*, *NTRK2* e *SOX9*, sugerem provável ativação da via de sinalização de WNT/ β -catenina (Ayyanan et al., 2006; Katoh & Katoh, 2005; Vadnais et al., 2014; Barreto et al., 2012; Akiyama et al., 2007).

Na comparação na presença de docetaxel (Tabela 4) observamos os genes *CACNAD2A3*, *GDF5*, *IL6*, *FGF7*, *LEF1* e *TWIST* apresentaram regulação positiva e *FST* apresentou regulação negativa com significância estatística ($p < 0,005$). Sendo que, o perfil de expressão de *CACNAD2A3*, *GDF5*, *IL6* e *FST*, sugerem inativação da via WNT/ β -catenina (Wong et al., 2013; Lam et al., 2010; Enochson et al., 2014; Xiang et al., 2014). No entanto, a expressão de *FGF7*, *LEF1* e *TWIST*, sugerem que a via WNT/ β -catenina está ativa. Estes são genes alvo da via canônica, além de serem associados à EMT e a quimioresistência (Katoh & Katoh, 2005; Nguyen et al., 2009; Je et al., 2013).

Na integração dos dados das técnicas de transcriptoma e *PCR Array* podemos observar que diversos genes foram comuns entre as duas técnicas, indicando que o aumento da expressão de PAR-4 e do tratamento com docetaxel modulam os genes da via de sinalização do WNT. Considerando os genes comuns a ambas as técnicas na ausência de tratamento, foram observados 16 genes comuns. Dentre estes, a regulação positiva de *GJA1*, *IGF1*, *IGF2*, *LEF1*, *MMP2*, *PDGFRA*, *PTGS2* e *TWIST*, associadas à regulação negativa de *CDH1*, *JAG1*, *NTRK2* sugerem ativação da via WNT/ β -catenina (Desbois-Mouthon et al., 2001; Harper et al., 2006; Nguyen et al., 2009; Wu et al., 2007; Hwang et al., 2014; Nunez et al., 2011; Je et al., 2013; Mukherjee et al., 2012; Chen et al., 2010; Barreto et al., 2012). Enquanto, a expressão de *DAB2*, *WNT5A*, *FZD7* e *RUNX2* sugerem inibição desta via (Jiang et al., 2012; Zhu et al., 2014; Fernandez et al., 2014; Gaur et al., 2005)

Na presença do tratamento foram encontrados 6 genes comuns entre as duas técnicas, sendo que a expressão positiva de *CTGF*, *DAB2* e *EGR1* está associada com a inativação da via WNT/ β -catenina, pois estes genes são antagonistas desta via (Mercurio et al., 2003; Jiang et al., 2012; David et al., 2002). Contudo, a expressão positiva de

FGF20, *LEF1* e *PDGFRA* sugerem que via WNT/ β -catenina estaria ativa. Uma vez que estes são genes alvos desta via (Chamorro et al., 2005; Gracanin et al., 2014; Hwang et al., 2014).

Nossos resultados ainda são preliminares e não nos permitem afirmar qual via de WNT estaria ativa na presença de PAR-4 nas células MCF-7 com ou sem tratamento com docetaxel, ou predizer o papel biológico dessa via para a quimiosensibilidade ao docetaxel em células de câncer de mama. Entretanto, nossos dados indicam que o aumento da expressão de PAR-4 e o tratamento com docetaxel modulam os genes da via de sinalização de WNT e permitem algumas hipóteses.

Alteração na via de sinalização β -catenina/WNT é um evento freqüente no processo de tumorigênese. Em câncer de mama estudos demonstraram que a via β -catenina/WNT é fundamental para o desenvolvimento e progressão tumoral (Anastas et al., 2009; Lamb et al., 2013). Aumento dos níveis de expressão do receptor *Frizzled* ou a ativação aberrante de β -catenina foram associados à resistência a radioterapia e quimioterapia neste tipo de tumor (Zhang et al., 2012; Woodward et al., 2007). A regulação negativa da via WNT/ β -catenina a inibe a EMT e reduz a invasão em linhagens celulares de tumor de mama (Wu et al., 2012; Ahmad et al., 2012). Porém nenhum estudo abordou o envolvimento de PAR-4 com a via de sinalização de WNT e tratamento com docetaxel.

Dentre os genes diferencialmente expressos na ausência de tratamento destaca-se o gene *EGR1* por apresentar associação com PAR-4 (Manssor, 2004), além de ser um gene selecionado para validação por RT-PCR. Em nossos resultados de RT-PCR e PCR *array* verificamos regulação positiva significativa da expressão de *EGR1* em células com aumento da expressão de PAR-4. Um estudo utilizando a linhagem celular C57MG (*Mouse Mammary Epithelial Cell Line*) estimulou a expressão de *WNT1*

com TPA (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*), isto desencadeou inibição de *EGR1* e de outros genes de crescimento precoce. Esses resultados sugerem que a inibição de genes de crescimento precoce pode representar um passo na progressão tumoral em resposta à ativação da via WNT/ β -catenina (David et al., 2002). Logo o aumento da expressão de *EGR1* sugere que esta via estaria inativa, e o aumento da expressão de *PAR4* e *EGR1* poderiam atuar na regulação negativa da via WNT/ β -catenina.

Na comparação *MCF7pcPAR4* vs *MCF7pcNEO* após o tratamento com docetaxel, destaca-se o gene *CACNA2D3* por apresentar função pró-apoptótica como a de *PAR-4*. O *CACNA2D3* (*calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 3*) localizado no cromossomo 3p21.1, codifica uma proteína do complexo do canal de cálcio voltagem dependente. A perda dos alelos de *CACNA2D3* tem sido relatada em câncer de pulmão, mama e outros (Gao et al., 2000). A metilação da região promotora de *CACNA2D3* foi detectada no câncer gástrico e associada com pior prognóstico da doença (Wanajo et al., 2008). O trabalho de Palmeri e colaboradores (2012) identificou a metilação do *CACNA2D3* em tumor de mama e associou à capacidade metastática, porém ainda não é elucidado o papel deste gene no câncer de mama. Um estudo mostrou que *CACNA2D3* mediado pela concentração do cálcio intracelular Ca^{2+} , pode induzir a via intrínseca da apoptose e ativação de NLK (através da via WNT/ Ca^{2+}). A ativação de NLK antagoniza a via canônica de WNT, o que resulta na redução da transcrição de genes envolvidos nos processos de proliferação (*CCND1* e *C-MYC*), invasão (*MMP7*) e EMT (*SNAIL*) (Wong et al., 2013). Em nossos resultados na comparação *MCF-7pcPAR4* vs *MCF7pcNEO* na ausência e presença de docetaxel verificamos a regulação negativa de *CCND1* (Figura 11), que concordam com os dados da literatura. *PAR-4* foi primeiramente identificado em células de câncer de próstata induzidas a apoptose pelo aumento de Ca^{2+} (Sells et al., 1997). Esses dados em

associação com os nossos sugerem que PAR-4 pode atuar na presença de Ca^{2+} para ativar a via WNT/ Ca^{2+} , antagonizando a via WNT/ β -catenina, o que resultaria no aumento da sensibilidade das células a drogas quimioterápicas.

Alguns estudos têm mostrado que a combinação de inibidores da via canônica do WNT reduziram a proliferação das células de câncer de próstata e colo retal à quimioterápicos. O docetaxel é um estabilizador de microtúbulos, enquanto a via WNT/ β -catenina regula a dinâmica dos microtúbulos (Ciani et al., 2003). O estudo de He e colaboradores (2005) tratou células de câncer colo retal com anticorpo monoclonal para WNT1 e docetaxel. Essa combinação resultou no efeito sinérgico na sensibilização das células com docetaxel. Dados prévios do nosso laboratório confirmam que a presença de PAR-4 aumenta a sensibilidade das células MCF7 ao tratamento com docetaxel (Pereira et al., 2013). Os dados do presente estudo fornecem evidências de que a inativação da via WNT/ β -catenina possa ser um dos mecanismos de pelo qual PAR-4 aumenta a sensibilidade de células de câncer de mama ao docetaxel

A redução de β -catenina foi associada com a clivagem mediada por caspase 3 e 8, e por TRAIL. Estudo utilizou uma combinação de drogas em células TRAIL resistentes, os resultados mostraram que a diminuição na expressão β -catenina é elevada na atividade apoptótica máxima (Subramanian et al., 2009). PAR-4 ativa caspases tanto na via intrínseca como extrínseca de apoptose, dessa forma PAR-4 poderia colaborar para a redução nos níveis de β -catenina e contribuiria no aumento da quimiossensibilidade.

Muitos estudos têm focado em demonstrar a funcionalidade de PAR-4 em induzir os processos apoptóticos, entretanto pouco se sabe do envolvimento dessa interessante proteína em outros processos celulares. Neste estudo, podemos mostrar que *PAR-4* modula genes da via de sinalização WNT. Porém, mais experimentos serão

necessários para verificar quais mecanismos estão envolvidos e de que forma isso reflete na quimiossensibilidade a drogas.

Conclusões

CONCLUSÕES

- Os genes *EGR1*, *XAF1*, *TARP* e *WNT5A* foram identificados como diferencialmente expressos em células MCF7_{pcPAR4} vs MCF7_{pcNEO} antes e após o tratamento com docetaxel utilizando as técnicas de cDNA *microarray* e qRT-PCR, evidenciando uma associação desses genes com a quimiossensibilidade a taxanos.
- Nossos resultados sugerem que a expressão de *EGR1* é modulada pela presença de *PAR-4* em células MCF-7, dessa forma estes genes poderiam estar atuando em sinergismo, na sensibilização das células de câncer de mama a apoptose.
- O aumento da expressão de *TARP* nas células MCF-7 corrobora com estudos da literatura e indicam que a expressão deste gene é modulada pela presença de *PAR-4* e pelo tratamento com docetaxel.
- O aumento da expressão de *WNT5A* foi observada em células MCF7_{pcPAR4} vs MCF7_{pcNEO} antes e após o tratamento com docetaxel, sugerindo que *PAR-4* e *WNT5A* poderiam atuar na redução da transcrição de genes alvos da via canônica do WNT, dessa forma colaborariam no aumento da sensibilidade ao docetaxel.
- Nossos dados indicam que o aumento da expressão de *PAR-4* e o tratamento com docetaxel modulam os genes da via de sinalização de WNT. Porém, mais experimentos serão necessários para verificar quais mecanismos estão envolvidos e de que forma isso reflete na quimiossensibilidade a taxanos.

Referências Bibliográficas

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad A, Sarkar SH, Bitar B, Ali S, Aboukameel A, Sethi S, Li Y, Bao B, Kong D, Banerjee S, Padhye SB, Sarkar FH. Garcinol regulates EMT and Wnt signaling pathways in vitro and in vivo, leading to anticancer activity against breast cancer cells. **Mol Cancer Ther.** 2012; v.11, p.2193–2201.

Alaoui-Jamali MA, Morand GB, Silva SD. ErbB polymorphisms: insights and implications for response to targeted cancer therapeutics. 2015; v.6, p.1-26.

Altmann KH & Gertsch J. Anticancer drugs from nature natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. **Nat. Prod. Rep.** 2007; v.24, p.327–357.

Alvarez JV, Pan Tien-chi, Ruth J, Feng Y, Zhou A, Pant D, Grimley J S, Wandless TJ, DeMichele A, the I-SPY 1 TRIAL Investigators, Chodosh. L.A. Par-4 Down-regulation Promotes Breast Cancer Recurrence by Preventing Multinucleation following Targeted Therapy. **Cancer Cell.** 2013; v.24 (1), p.1-26.

Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang Ren, Zhang Z, Deng JM, Taketo MM, Nakamura T, Behringer RR, McCrea PD, Crombrughe B. Interactions between Sox9 and β -catenin control chondrocyte differentiation. **Genes Dev.** 2004; v.18, p.1072-1087.

Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. **Nat Rev Cancer**, v.13, p.11–26, 2013.

Anderson TJ. Pathological studies of apoptosis in the normal breast. **Endocr Relat Cancer**, v.6, p.9-12 1999.

Arpino G, Wiechmann L, Kent OC, Schiff R. Crosstalk between the Estrogen Receptor and the HER Tyrosine Kinase Receptor Family: Molecular Mechanism and Clinical Implications for Endocrine Therapy Resistance. **Endocr Rev.** 2008; n. 29, v.2, p.217–233.

Askenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signaling and modulation, **Rev. Science.** 1998; v.28, p.1305–1308.

Ayyanan A, Civenni G, Ciarloni L, Morel C, Mueller N, Lefort K, Mandinova A, Raffoul W, Fiche M, Dotto GP, Briskin C. Increased Wnt signaling triggers oncogenic conversion of human breast epithelial cells by a Notch-dependent mechanism. **PNAS**; 2006, v.103, p.3799–3804.

Barreto RA, Walker FR, Dunkley PR, Day TA, Smith DW. Fluoxetine prevents development of an early stress-related molecular signature in the rat infralimbic medial prefrontal cortex. Implications for depression? **BMC Neuroscience.** 2012; v.13, p.1-12.

Bergmann M, Kukoc-Zivojnov N, Chow KU, Trepohl B, Hoelzer D, Weidmann E, Mitrou PS, Boehrer S. Prostate apoptosis response gene-4 sensitizes neoplastic lymphocytes to CD95-induced apoptosis. **Ann Hematol.** 2004; v.83, p.646-653.

Bessa Garcia SAB, Pereira MC, Nagai MA. Expression Pattern of the Pro-apoptotic Gene PAR-4 During the Morphogenesis of MCF-A Human Mammary Epithelial Cells. **Cancer Micro environment**. 2011; v.4, p.33-38.

Birnaum D, Bertucci F, Ginestier C, Targett R, Jacquemier J, Charafe-Jaufret E. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? (review). **International Journal of Oncology**. 2004; v.25, p.249-258.

Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on targets gene. **Mol Endocrinol**. 2005; v.19, p. 833-842.

Boehrer S, Nowak D, Ruthardt M, Sattler N, Trepohl B, Schneider B, Hoelzer D, Mitrou P, Chow K.. Prostate-apoptosis-response-gene-4 increases sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. **Leuk Res**. 2006; v.30, p.597-605.

Bouris P, Skandalis SS, Piperigkou Z, Afratis N, Karamanoul K, Aletras AJ, Moustakas M, Theocharis AD, Karamano NK. Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells. **Matrix Biology**.2015; v.43, p.42–60.

Brown AM. Wnt signaling in breast cancer: have we come full circle? **Breast Cancer Research**. 2001; v.3, p.351-355.

Brown I, Shalli K, McDonald SL, Moir SE, Hutcheon AW, Heys SD Schofield AC. Reduced expression of p27 is a novel mechanism of docetaxel resistance in breast cancer cells. **Breast Cancer Res**. 2004, v.6, p.601-607.

Burikhanov R, Zhao Y, Goswami A, Qiu S, Schawarze SR, Ranaghekar VM. The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis. **Cell**, 2009; v. 138, p. 377-388.

Calogero A, Arcella A, Gregorio D, Porcellini A, Mercola D, Liu C, Lombardi V, Zani M, Giannini G, Gagliardi FM, Caruso R, Gulino A, Frati L, Ragona G. The Early Growth Response Gene EGR-1 Behaves as a Suppressor Gene that is Down-Regulated Independent of ARF/MDM2 but not p53 Alterations in Fresh Human Gliomas. **Clin. Cancer**. 2001; v.7, p.2788-2796.

Cecilio AP, Takakura ET, Jumes JJ, Santos JW, Herrera AC, Victorino VJ, Panis C. Breast cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. **Breast Cancer: Targets and Therapy**. 2015; v.7, p.43–49.

Chakraborty MSG, Qiu K M, Vasudevan, Rangnekar V M. Par-4 drives trafficking and activation of Fas and FasL to induce prostate cancer cell apoptosis and tumor regression. **Cancer Res**. 2001; v.61, p.7255–7263.

Chakraborty PK, Scharner B, Jurasovic J, Messner B, Bernhard D, Thevenod F. Chronic cadmium exposure induces transcriptional activation of the Wnt pathway and

upregulation of epithelial-to-mesenchymal transition markers in mouse kidney. **Toxicol Lett.** 2010; v.198, p.69-76.

Cheema SK, Mishra SK, Rangnekar VM, Tari AM, Kumar R, Berestein G. PAR-4 transcriptionally regulates Bcl-2 through a WT1 binding site on the bcl-2 promoter. **J. Biol. Chem.** 2003; v.278, p.19995–20005.

Chen CC, Lee WR, Safe S. Egr-1 Is Activated by 17 β -Estradiol in MCF-7 Cells by Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Phosphorylation of ELK-1. **Journal of Cellular Biochemistry.** 2004; v.93, p.1063–1074.

Chen X, Stoeck A, Lee SJ, Shih IM, Wang MM, Wang TL. Jagged1 Expression Regulated by Notch3 and Wnt/ β -catenin Signaling Pathways in Ovarian Cancer. **Oncotarget.** 2010; v. 1(3), 210-218.

Ciani L, Krylova O, Smalley MJ, Dale TC, Salinas PC. A divergent canonical WNT-signaling pathway regulates microtubule dynamics: Dishevelled signals locally to stabilize microtubules. **The Journal of Cell Biology.** 2003; v.164, p.243–253.

Ciardello F, Caputo R, Pomatico G, Laurentiis DM, Placido S, Bianco AR, Tortora G. Resistance to taxanes is induced by c-erbB-2 overexpression in human MCF-10 A mammary epithelial cells and is blocked by combined treatment with an antisense oligonucleotide targeting type I protein kinase A. **Int J Cancer.** 2000; v.85, p.710-715.

Clavel-Chapelon F & Gerber M. Reproductive factors and breast cancer risk. Do they differ according to age at diagnosis? **Breast Cancer Res Treat.** 2002; v.72, p.107-15.
Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. **Cell.** 2006; v.127, p.469-480.

Colasari D, Pereira CM, Bessa-Garcia SA, Nagai MA. Insulin-like growth factor-1 and 17 β -estradiol down-regulate prostate apoptosis response-4 expression in MCF-7 breast cancer cells. **International journal of molecular medicine.** 2011; n.3, p.1-6.
Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. **The Lancet.** 2002; v.360, p.187-195.

Collins LC, Marotti JD, Gelber S. Pathologic features and molecular phenotype by patient age in a large cohort of young women with breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 2012; v.131, p.1061-1066.

Cook J, Krishnan S, Ananth S, Sells SF, Shi Y, Walther MM, Linehan WM, Sukhatme VP, Weinstein MH, Rangnekar VM. Decreased expression of the pro-apoptotic protein Par-4 in renal cell carcinoma. **Oncogene.** 1999; v.18, p.1205–1208,

Curtis C, et al. The genomic and Transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature.** 2012; v. 486, p.346-352.

David A. Tice IS, Polakis P. Transcription of Immediate Early Genes with Serum Response Element-driven Activation of the Wnt Pathway Interferes. **J. Biol. Chem.** 2002; v.277, p.6118-6123.

Desbois-Mouthon C, Cadoret A, Blivet-Van MJ, Bertrand CG, Perret C, Capeau J. Insulin and IGF-1 stimulate the b-catenin pathway through two signaling cascades involving GSK-3b inhibition and Ras activation. **Oncogene**. 2001; v.20, p.252-259.

Du N, Song LP, Li XS, Wan L, Hong-Ying M, Zhao H. Novel pH-sensitive nanoformulated docetaxel as a potential therapeutic strategy for the treatment of cholangiocarcinoma. **Journal of Nanobiotechnology**. 2015; p.13-17.

Edge SB, Byrd DR. Compton. **AJCC cancer staging manual**, v.7, p.347–376, 2010.

Egawa C, Miyoshi Y, Takamura Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Decreased expression of BRCA2 mRNA predicts favorable response to docetaxel in breast cancer. **Int J Cancer**. 2001; v.95, p.255-259.

Eid MA, Kumar MV, Iczkowski KA, Bostwick DG, Tindall DJ. Expression of Early Growth Response Genes in Human Prostate Cancer. **Cancer**. 1998; v.58, p.2461-2468.

El-Guendy N, Zhao Y, Gurumurthys S, Burikhanov R, Rangekar VM. Identification of a unique core domain of par-4 Sufficient for selective apoptosis induction in cancer cells. **Mol Cell Biol**. 2003; v.23, n.16, p.5516–5525.

Enochson L, Stenberg J, Brittberg M, Lindahl A. GDF5 reduces MMP13 expression in human chondrocytes via DKK1 mediated canonical Wnt signaling inhibition. **Osteoarthritis and Cartilage**. 2014; v.22, p.566-577.

Epel M, Carmi I, Soueid-Baumgarten S, Oh SK, BeraT, Pastan I, Berzofsky J, Reiter Y. Targeting TARP, a novel breast and prostate tumor-associated antigen, with T cell receptor-like humanrecombinant antibodies. **Eur J Immunol**. 2008; v.38, p.1706-1720.

Feigelson HS, Henderson BE. Future possibilities in the prevetion of breast cancer role of genetic variation in breast cancer prevetion. **Breast Cancer**. 2000; v.2, p.277-282.

Fernandez A, Huggins A, Perna L, Brafmana D, Lub D, Yao S, Gaasterland T, Carsonb DA, Willerta K. The WNT receptor FZD7 is required for maintenance of the pluripotent state in human embryonic stem cells. **PNAS**. 2014; v.111, p.1409–1414.

Fritzsche FR, Stephan C, Gerhardt J, Lein M, Hofmann I, Jung K, Dietel M, Kristiansen G. Diagnostic and prognostic value of Tcell receptor gamma alternative reading frame protein (TARP) expression in prostate cancer. **Histol Histopathol**. 2010; v.25(6), p.733-739.

Garcia-Cao I, Duran A, Collado M, Diaz-Meco MT, Serrano M, Moscat J. Tumour-suppression activity of the proapoptotic regulator Par4. **EMBO**, 2003; v.6, p.577–583.

Gao B, Sekido Y, Maximov A, Saad M, Forgacs E. Functional properties of a new voltage-dependent calcium channel alpha(2)delta auxiliary subunit gene (CACNA2D2). **J Biol Chem**. 2000; v.275, p.12237–12242.

Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. **J Biol Chem.** 2005; v.280(39), p.33132-33140.

Gjorevski N, Nelson CM. Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland, **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2011; v.12, p.581-593.

Gitenay D and Baron VT. Is EGR1 a potential target for prostate cancer therapy? **Future Oncol.** 2009; v.5(7), p.993–1003.

Goswami A, Qiu S, Sexheimer TS, Ranganathan P, Burikhanov R, Pomier Y, Rangnakar VM. Par-4 binds topoisomerase I and attenuates its DNA relaxation activity. **Cancer.** 2007; v.68, p.1–9.

Cragg GM, Schepartz SA, Suffness M, Grever MR. The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. **Journal Natural Products.** 1993; v.56, p.1657–1668.

Gurumurthy S, Goswami A, Vasudevan. K.M, Rangekar. V.M. Phosphorylation of Par-4 by protein kinase A is critical for apoptosis. **Mol Cell Biol.** 2005; v.25, p.1146–1161.
Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell.** 2011; v.144(5), p.646-674.

Han XH, Jin YR, Tan L, Kosciuk T, Lee JS, Yoon JK. Regulation of the Follistatin Gene by RSPO-LGR4 Signaling via Activation of the WNT/β-Catenin Pathway in Skeletal Myogenesis. **Molecular and Cellular Biology.** 2014; v.34, p. 752–764.

He B, Reguart N, You L, Mazieres J, Xu Z, Lee AY, Mikami I, McCormick F, Jablons DM. Blockade of Wnt-1 signaling induces apoptosis in human colorectal cancer cells containing downstream mutations. **Oncogene.** 2005; v.21, p.3054-3058.

Hotchkiss KA, Ashton AW, Mahmood R, Russell RG, Sparano JA, Schwartz EL. Inhibition of endothelial cell function in vitro and angiogenesis in vivo by docetaxel (Taxotere): association with impaired repositioning of the microtubule organizing center. **Mol Cancer Ther.** 2002; v.1, p.1191–1200.

Huang J, Yao WY, Zhu Q, Tu SP, Yuan F, Wang HF, et al. XAF1 as a prognostic biomarker and therapeutic target in pancreatic cancer. **Cancer Sci.** 2010; v.101, p.559-567.
Harper J, Burns JL, Foulstone EJ, Pignatelli M, Zaina S, Hassan AB. Soluble IGF2 receptor rescues Apc(Min/+) intestinal adenoma progression induced by Igf2 loss of imprinting. **Cancer Res.** 2006; v.15, p.1940-8.

Huang ZJ, Yang N, Xu TW, Lin JQ. Antitumor efficacy of docetaxel-loaded nanocarrier against esophageal cancer cell bearing mice model. **Drug Res (Stuttg).** 2014. [Epub ahead of print].

Hwang Y, Suk S, Shih YRV, Seo T, Du1 B, Xie1 Y, Li Z, Varghese S. WNT3A promotes myogenesis of human embryonic stem cells and enhances in vivo engraftment. *Scientific Reports*. 2014; v.4, p.1-8.

Instituto Nacional do Câncer – INCA. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>

Je EC, Lca BS, Ga GA. The Role of Transcription Factor TWIST in Cancer Cells.**J Genet Syndr Gene Ther**. 2013; v.4, p.4-1.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer Statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008; .v.58, p.71-96.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69–90.

Jiang Y, He X and Howe FH. Disabled-2 (Dab2) inhibits Wnt/b-catenin signalling by binding LRP6 and promoting its internalization through clathrin. **The EMBO Journal**. 2012; v.31, p.2336–2349.

Jing Ji, Xing Wei, Yueling Wang. Embryonic stem cell markers Sox-2 and OCT4 expression and their correlation with WNT signal pathway in cervical squamous cell carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol**. 2014; v.7(5), p.2470-2476.

Johnstone RW, See RH, Sells SF, Wang J, Muthukkumar S, Englert C, Haber DA, Licht JD, Sugrue SP, Roberts T. A novel Repressor, par-4, Modulates Transcription and Growth Suppression Functions of the Wilms' Tumor Suppressor WT1. **Molecular and Cellular Biology**. 1996; v.16(12), p.6945-6956.

Katoh M and Katoh M. FGF signaling network in the gastrointestinal tract (Review). **Int J Oncol**. 2006; v.29(1) p.163-168.

Kline C, Saravanan S, Kester M, Irby R: Delivery of *Par-4* plasmid *in vivo* via nanoliposomes sensitizes colon tumor cells subcutaneously implanted into nude mice to 5-FU. **Cancer Biol Ther**. 2009; v.8(19), p.1831-1837.

Kogel D, Reimertz C, Mech P, Poppe M, Fruhwald MC, Eengermann. H, Scheidtmann. K.H, Prehn. J.H. Dlk/ZIP kinase-induced apoptosis in human medulloblastoma cells: requirement of the mitochondrial apoptosis pathway. **Br J Cancer**, v.85, p.1801–1808, 2001.

Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, Kaiser S, Bruemmendorf T, Roepcke S, Dahl E, Hinzmann B, Specht T, Pervan J, Stephan C, Loening S, Dietel M, Rosenthal A. Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival, **J. Pathol**. 2005; v.205, p.359-376.

Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, Kishida M, Inoue A, Asahara T, Yasui W and Kikuchi A: Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. **Cancer Res.** 2006; v.66, p.10439-10448.

Lamb R, Ablett MP, Spence K, Landberg G, Sims AH, Clarke RB: Wnt pathway activity in breast cancer sub-types and stem-like cells. **PLoS One.** 2013; v.8, p.1-11.

Lareef MH, Tahin Q, Song J, Russo I H, Mihaila D, Slater CM, Balsara B, Testa JR, Broccoli D, Grobelny J V, Mor G, Cuthbert A, Russo J. **Mol. Carcinog.** 2004; v.39, p.234–246.

Larsen MJ, Thomassen M, Gerdes AM, Kruse TA. Hereditary Breast Cancer: Clinical, Pathological and Molecular Characteristics Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics. **Breast Cancer (Auckl).** 2014; v.8, p.145-155.

Lee AS. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. **Cancer Res,** 2007; v.67, p.3496–3499.

Liotta L A, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: An imbalance of positive and negative regulation. **Cancer Research,** 1991; v.51, p.5054–5059.

Liu J, Liu YG, Huang R, Yao C, Li S, Yang W, Yang D, Huang RP. Concurrent Down-regulation of Egr-1 and Gelsolin in the Majority of Human Breast Cancer Cells Cancer Genomics Proteomics. 2007; v.4(6), p.377-385.

Loeb LA. & Harris CC. Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective. **Cancer Res;** 2008, v.68, p.6863- 6870.

Mackler NJ and Pienta KJ. Drug Insight: use of docetaxel in prostate and urothelial cancers. **Nature Clinical Practice Urology.** 2005; v.2, p.92-100.

MacLeod RJ, Hayes M, Pacheco I. Wnt5a secretion stimulated by the extracellular calcium-sensing receptor inhibits defective Wnt signaling in colon cancer cells. **AmPhysiol Gastrointest Liver Physiol.** 2007; v.293, p.403–411.

Mansoor MA. Regulation of Radiation-Induced Apoptosis by Early Growth Response-1 Gene in Solid Tumors. **Current Cancer Drug Targets.** 2004; v.4, p.43-52.

MacPherson K, Stell CM, Dixon JM. Breast Cancer – Epidemiology, Risk Factors and Genetics. **B.M.J,** 2000; v.321, p.624-628.

McDonald SL, Stevenson DA, Moir SE, Hutcheon AW, Haites NE, Heys SD and Schofield AC: Genomic changes identified by comparative genomic hybridisation in docetaxel-resistant breast cancer cell lines. **Eur J Cancer.** 2005; v.41, p.1086-1094.

Mcdoniels-Silvers AL, Nimri CF, Stoner GD, Lubet RA, You M. Differential Gene Expression in Human Lung Adenocarcinomas and Squamous Cell Carcinomas. **Clin. Cancer.** 2002; v.8, p.1127-1138.

Mercurio S, Latinkic B, Itasaki N, Krumlauf R, Smith JC. Connective-tissue growth factor modulates WNT signalling and interacts with the WNT receptor complex. **Development**. 2004; v.131(9), p.2137-2147.

Montazer A, Sadighi J, Farzadi F, Maftoon. F, Vahdaninia.M, Ansari. M. Weight, height, body mass index and risk of breast cancer in postmenopausal women: a case-control study. **BMC Cancer**. 2007; v 8, v.278, p.1-7.

Moreno-Bueno G, Fernandez-Marcos PJ, Collado M, Tendero MJ, Rodriguez-Pinilla SM, Garcia-Cao I, Hardisson D, Diaz-Meco MT, Moscat J, Serrano M. Inactivation of the candidate tumor suppressor par-4 in endometrial cancer. **Cancer Res**, 2007; v.67, p. 1927–1934.

Mukherjee N, Bhattacharya N, Alam N, Roy A, Roychoudhury S, Panda CK. Subtype-specific alterations of the Wnt signaling pathway in breast cancer: Clinical and prognostic significance. **Cancer Sci**. 2012; v.103, p.210–220.

Myiوشي Y, Taguchi T, Kim SJ, Tamaki Y and Noguchi S: Prediction of response to docetaxel by immunohistochemical analysis of CYP3A4 expression in human breast cancer. **Breast Cancer** 2005; v.12, p.11-15.

Nagai MA, Rós N, Bessa AS, Moura-Neto M, Miraca EC, Brentani MM. Differentially expressed genes and estrogen receptor status in breast cancer. **International Journal of Oncology**, 2003; v.23, p.1425-1430.

Nagai MA, Gerhard R, Salaorni S, Fregnani JH, Nonogaki S, Netto MM, Soares FA. Down-regulation of candidate tumor suppressor gene PAR-4 is associated with poor prognosis in breast cancer. **Int J Oncol**. 2010; v.8(5), p.41-49.

Navarrete MA, Maier CM, Falzoni R, Quadros LG, Lima GR, Baraca EC, Nazário AC. Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. **Breast Cancer Research**. 2005; v.7, p.306–313.

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M, Perou CM. Immunohistochemical and Clinical Characterization of the basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. **Clin Cancer Res**. 2004; v.10 (16), p.5367-5374.

Nguyen DX, Chiang AC, Zhang XH, Kim JY, Kris MG, Ladanyi M, Gerald WL, Massagué J. WNT/TCF signaling through LEF1 and HOXB9 mediates lung adenocarcinoma metastasis. **Cell**. 2009; v.10, p.51–62.

Ng KC, Campos EI, Martinka M, Li G. XAF1 expression is significantly reduced in human melanoma. **J Invest Dermatol**. 2004; v.123, p.1127-1134.

Nguyen MC, Tu GH, Koprivnikar KE, Gonzalez-Edick M, Jooss KU, Harding TC.. Antibody responses to galectin-8, TARP and TRAP1 in prostate cancer patients treated

with a GM-CSF-secreting cellular immunotherapy. **Cancer Immunol Immunother.** 2010; v.59, p.1313–1323.

Noori Koopaei M, Khoshayand MR, Mostafavi SH, Amini M, Khorramizadeh MR, Jeddi Tehrani M, Atyabi F, Dinarvand R. Docetaxel loaded PEG-PLGA nanoparticles: optimized drug loading, in-vitro cytotoxicity and in-vivo antitumor effect. **Iran J Pharm Res.** 2014; v.13, v.819–833.

Núñez F, Bravo S, Cruzat F, Montecino M, De Ferrari GV. Wnt/b-Catenin Signaling Enhances Cyclooxygenase-2 (COX2) Transcriptional Activity in Gastric Cancer Cells. **PLoS ONE.** 2011; v.6, p.1-10.

Oldenburg RA, Meijers-Heijoe H, Cornelisse CJ, Deville P. Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found? **Critical Reviews in Oncology/Hematology.** 2007; v.63, p. 125–149.

O' Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U. Genomic targets of nuclear strogen receptors. **Mol Endocrinol,** 2004; v.18(8), p.1859-1875.

Palmieri C, Rudraraju B, Monteverde M, Lattanzio L, Gojis O, Brizio R, Garrone O, Merlano M, Syed N, Nigro C and Crook T. Methylation of the calcium channel regulatory subunit a2d-3 (CACNA2D3) predicts site-specific relapse in oestrogen receptor-positive primary breast carcinomas. **British Journal of Cancer.** 2012; v.107, p.375–381.

Palmeri L, Vaglica M, Palmeri S. Weekly docetaxel in the treatment of metastatic breast cancer. **Therapeutics and Clinical Risk Management.** 2008; v.4(5), p.1047–1059.

Paige AJ. Redefining tumour suppressor genes: exceptions to the two-hit hypothesis. **Cell Mol Life Sci.** 2003; v.60(10), p.2147-63.

Pasquier E, Kavallaris M. Critical Review Microtubules: A Dynamic Target in Cancer Therapy. **Cell Mol Life Sci.** 2003; v.60(10), p.2147-2163.

Pereira MC, Bessa-Garcia SA, Burikhanov R, Pavanelli AC, Antunes L, Rangnekar VM. and Nagai MA. Prostate apoptosis response-4 is involved in the apoptosis response to docetaxel in MCF-7 breast cancer cells. **International Journal of Oncology.** 2013; v.43, p.531-538.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van De Rijn. M, Jeffey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross. DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Bostein D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature,** 2000; v.406, p.747-752.

Polakis P. Wnt signaling and cancer. **Genes and Development.** 2007; v.14, p.1837-1851.

Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. **J. Clin. Invest.** 2007; v.117, p.3155–3163.

Pongracz JE, Stockley RA. Wnt signaling in lung development and diseases. **Respiratory Research.** 2006; v.7, p.7-15.

Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT. Anti-apoptosis and cell survival: A review. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2011; v.1813 p. 238–259.

Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. **Lancet**. 2008; v.371, p.569–578.

Rizwan A, Bulte C, Kalaichelvan A, Cheng M, Krishnamachary B, Bhujwala ZM, Jiang L, Glunde K⁴. Metastatic breast cancer cells in lymph nodes increase nodal collagen density. **Sci Rep**. 2015; v.7, 1-6.

Rowinsky EK. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. **Annu Rev. Med**. 1997; v.48, p.353–374.

Shalli K, Brown I, Heys SD and Schofield AC: Alterations of beta-tubulin isotypes in breast cancer cells resistant to docetaxel. **FASEB J**. 2005; v.19, p.1299-1301.

Lam SP, Luk JM, Man L, Ng KTP, Cheung CK, Rose-John S, Lo CM. Activation of Interleukin-6–Induced Glycoprotein 130/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Pathway in Mesenchymal Stem Cells Enhances Hepatic Differentiation, Proliferation, and Liver Regeneration. **Liver Transplantation**. 2010; v.16:1195-1206.

Sells SF, Wood DP Jr, Joshi-Barve SS, Muthukumar S, Jacob RJ, Crist SA., Humpheys S, Rangnekar VM. Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and independent prostate cells. **Cell Growth Differ**. 1994; v.5, p.457–466.

Sells SF, Hans S, Muthukumar S, Maddiwar N, Jonhstone R, Boghaert E, Gills D, Liu G, Nair P, Moning S, Collin P, Mattson MP. Expression and function of the leucine zipper protein Par-4 in apoptosis. **Mol Cell Biol**. 1997; v.7, p.3823–3832.

Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aasf T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisenh MB, Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quistl H, Matesec JC, Brown PO, Botstein D, Lønning P E, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **PNAS**. 2001; v.98, p.10869–10874.

Sotiriou C, Neo SY, McShane LM. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2003; v.100, p.10393-10298.

Subramanian S, Prajna AR, Basabi RY, Malay C, Lucas W, Mishra SK Paramasivam, Srinivas Caspase mediated Cleavage of β -Catenin precedes Drug-induced Apoptosis in Resistant Cancer Cells. **J. Biol Chem**. 2009; v.284, p.13577-13588.

Tan SM, Evans AJ, Lam TP, Cheung KL. How relevant is breast cancer screening in the Asia/Pacific region? **The Breast**, 2007; v.16, p.113-119,

Trichopoulos D, Adami HO, Ekblom A, Hsieh CC, Lagiou P. Early life events and conditions and breast cancer risk: from epidemiology to etiology. **Int. J. Cancer**. 2008; v.122, p. 481-485.

Vadnais C, Shooshtarizadeh P, Rajadurai CV, Lesurf R, Hulea L, Davoudi S, Cadieux C, Hallett M, Park M, Nepveu A. Autocrine Activation of the Wnt/b-Catenin Pathway by CUX1 and GLIS1 in Breast Cancers. **The Company of Biologists**. 2014; v.000, p.1–10.

Vargo-Gogola T, Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature**, 2007; v.7, p.659-72.

Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. **Dev Cell**. 2003; v.5, p.367-377.

Venkatesan B, Prabhu SD, Venkatachalam K, Mummidi S, Valente AJ, Clark RA, Delafontaine P, Chandrasekar B. WNT1-Inducible Signaling Pathway Protein-1 Activates Diverse Cell Survival Pathways and Blocks Doxorubicin-induced Cardiomyocyte Death. **Cell Signal**. 2010; v.22(5), p.809–820.

Vetterkinda S, Lenberger S, Kubicek J, Boosen M, Appela S, Naimd HY, Scheidetmann KH, Preussa UT. Binding of Par-4 to the actin cytoskeleton is essential for Par-4/Dlk-mediated apoptosis. **Experimental Cell Research**. 2005; v.305, p.392–408.

Wanajo A, Sasaki A, Nagasaki H, Shimada S, Otsubo T, Owaki S, Shimizu Y, Eishi Y, Kojima K, Nakajima Y, Kawano T, Yuasa Y, Akiyama Y. Methylation of the calcium channel-related gene, CACNA2D3, is frequent and a poor prognostic factor in gastric cancer. **Gastroenterology**. 2008; v.135, p.580–590.

Wang B-D, Kline CLB, Pastor DM, Olson TL, Frank B, Luu T, Sharma AK, Robertson G, Weirauch MT, Patierno SR, Stuart JM, Irby RB, Lee NH. Prostate apoptosis response protein 4 sensitizes human colon cancer cells to chemotherapeutic 5-FU through mediation of an NFκB and microRNA network. **Molecular Cancer**. 2010; v.9:98, p.1-12.

Wang YY, Mao HL, Hao QZ, Wang Y, Yang YM, Shen L, Huang SL, Liu PS. Association of expression of XIAP associated factor 1 (XAF1) with clinicopathologic factors, overall survival, microvessel density and cisplatin-resistance in ovarian cancer. **Regulatory Peptides**. 2012; v.78, p.36–42.

Wong AM, Kong KL, Chen L, Liu M, Wong AM, Zhu C, Tsang JW, Guan XY. Characterization of CACNA2D3 as a putative tumor suppressor gene in the development and progression of nasopharyngeal carcinoma. **International Journal of Cancer**. 2013; v.133, p.2284–2295.

Wright K, Wilson P, Morland S, Campbell I, Walsh M, Hurst T, Ward B, Cummings M, Chenevix-Trench G. beta-catenin mutation and expression analysis in ovarian cancer:

exon 3 mutations and nuclear translocation in 16% of endometrioid tumors. **International Journal of Cancer**. 1999; v.82, p.625-629.

Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, Rosen JM. WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2007; v.104, p.618–623.

World Health Organization–WHO. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>. Acesso em 31 julho 2013.

Worsham M J, Raju U, Lu M, Kapk A, Botttrel A, Cheng J, Shah V, Savera A, Wolman SR. Risk Factors for breast cancer from benign breast disease in a diverse population. **Breast Cancer Res Treat**. 2009; v., p.1–12.

Wu B, Crampton SP, Hughes CCW. Wnt signaling induces MMP expression and regulates T cell transmigration. **Immunity**. 2007; v.26(2): 227–239.

Wu MY, Liang YR, Wu XY, Zhuang CX. Relationship Between Egr- 1 Gene Expression and Apoptosis in Esophageal Carcinoma and Precancerous Lesions. **World J. Gastroenterol**. 2002; n.8, p.971-975.

Wu Y, Ginther C, Kim J, Mosher N, Chung S, Slamon D, Vadgama JV: Expression of Wnt3 activates Wnt/ β -catenin pathway and promotes EMT-like phenotype in trastuzumab-resistant HER2-overexpressing breast cancer cells. **Mol Cancer Res**. 2012; v.10, p.1597–1606.

Xia Y, Novak R, Lewis J, Duckett CS, Phillips AC. Xaf1 can cooperate with TNF α in the induction of apoptosis, independently of interaction with XIAP. **Mol Cell Biochem**. 2006; v.286, p.67-76.

Yao J. Combined cDNA array comparative genomic hybridization and serial analysis of gene expression analysis of breast tumor progression. **Cancer Res**. 2006; v.66, p.4065–4078.

Yao L, Sun B, Zhao X, Zhao X, Gu Q, Dong X, Zheng Y, Sun J, Cheng R, Qi H, Jindan A. An Overexpression of Wnt5a Promotes Angiogenesis in NSCLC. **BioMed Research International**. 2014; v.2014, p.1-8.

Yared JA, Tkaczuk KHR. Update on taxane development: new analogs and new formulations. **Drug Design, Development and Therapy**. 2012; v.6, p. 371-384.

Zapata-Bernavides P, Méndez-Vázquez JL, González-Rocha TR, Zamora-Avila DE, Franco-Molina MA, Garza-Garza R, Rodriguez-Padilla C. Expression of prostate apoptosis response (Par-4) is associated with progesterone receptor in breast cancer. **Biological and Life Sciences**, 2010; v.40(6), p.1-6.

Zhang H, Zhang X, Wu X, Li W, Su P, Cheng H, Xiang L, Gao P, Zhou G: Interference of Frizzled 1 (FZD1) reverses multidrug resistance in breast cancer cells through the Wnt/ β -catenin pathway. **Cancer Lett.** 2012; v.323, p.106–113.

Zhang L, Yeger H, Das B, Irwin MS, Baruchel S. Tissue microenvironment modulates CXCR4 expression and tumor metastasis in neuroblastoma. **Neoplasia.** 2007; v.9, p. 36-46.

Zhang L, Fang C, Xu X, Li A, Cai Q, Long X. Androgen Receptor, EGFR, and BRCA1 as Biomarkers in Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis. **BioMed Research International.** 2015; v.2015, p 1-12.

Zhao Y, Rangnekar. V.M. Apoptosis and tumor resistance conferred by Par-4. **Cancer Biol Therapy.** 2007; v.7, p1867-1874.

Zhu N, Qin L, Luo Z, Guo Q, Yang L, Liao D. Challenging role of Wnt5a and its signaling pathway in cancer metastasis (Review). **Exp Ther Med.** 2014; v.8(1), p.3-8.