Débora Arcieri Casolari

**Interação entre as vias de sinalização do IGF-I, do ER e
da integrina β 1 na regulação da transcrição dos genes
PHLDA1 e *PAWR***

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai

São Paulo

2008

Débora Arcieri Casolari

**Interação entre as vias de sinalização do IGF-I, do ER e
da integrina β 1 na regulação da transcrição dos genes
PHLDA1 e *PAWR***

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai

São Paulo
2008

Dedico este trabalho

*Ao Marcus pelo amor e compreensão. Pelo carinho,
amizade e por ter sido companheiro em todas as horas.
E, principalmente, pelo incentivo nos momentos mais difíceis.*

*Aos meus pais, Ronaldo e Marli, e à minha irmã,
Tânia, pelo amor, por terem sempre acreditado em mim
e por me fazerem sempre acreditar nos meus sonhos.*

*Às minhas avós, Anna Maria e Dília, pelo apoio,
confiança e amor. Muito obrigada por tudo.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai, pela orientação e exemplo de dedicação à ciência.

À amiga Karina, pela companhia e amizade. Pela ajuda em todos os momentos, inclusive na realização dos experimentos, e por tornar os dias no laboratório e fora dele mais alegres.

À amiga Michelly, pelo companheirismo e suporte constantes. Pelo apoio, confiança e otimismo em todos os momentos, e pela ajuda essencial na realização de alguns experimentos.

À amiga Diana, pela amizade incondicional, apoio e paciência. Por sempre acreditar em mim e me incentivar a ir mais longe.

Aos amigos Thais, Lucimari, Sibeli, Yuri, Emerson, Simone, D. Antônia, Nádia, Renê, Regina, Daniela, Luciana, Cláudia, Ana Carolina, Mariana e Michelle, pelo carinho, amizade e ajuda.

À Mara e ao Tharcisio, por toda a ajuda e amizade.

À Andréia e ao Sidney, do Departamento de Farmacologia do ICB da USP, pela amizade e prontidão em ajudar sempre.

Às secretárias do Departamento de Radiologia, Elizângela e Rosilene, pela ajuda em todos os assuntos.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de estudo.

“O início da sabedoria é a admissão da própria ignorância.”

Sócrates.

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

Referências adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª. Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

Sumário

Lista de figuras	
Lista de abreviaturas	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Câncer de mama	02
1.2 Hormônios esteróides e câncer de mama	03
1.3 Matriz extracelular (ECM) e câncer de mama	14
1.4 Fatores de crescimento do tipo-insulina (IGFs) e câncer de mama ..	19
1.5 PHLDA1 (<i>pleckstrin homology-like domain</i> , família A, membro 1)	24
1.6 PAWR (PRKC, <i>apoptosis</i> , WT1, <i>regulator</i>)	26
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivos específicos	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Cultura celular.....	32
3.2 Interferência de RNA (RNAi).....	33
3.3 Extração de RNA pelo método de Chomczynski e Sacchi (1987)	34
3.4 Tratamento do RNA com DNase	35
3.5 RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction).....	36
3.6 Real time PCR (qPCR)	37
3.7 Western blot	38
3.8 Análise estatística	40
4 RESULTADOS	41
4.1 Efeito do tratamento com 17 β -estradiol (E2) e ICI 182.780 (ICI) sobre a expressão dos transcritos dos genes <i>PHLDA1</i> e <i>PAWR</i>	42
4.2 Efeito do tratamento com IGF-I sobre a expressão dos transcritos dos genes <i>PHLDA1</i> e <i>PAWR</i>	44
4.3 Interação entre IGF-I e ER sobre a expressão dos transcritos dos genes <i>PHLDA1</i> e <i>PAWR</i>	46
4.4 Determinação das vias de sinalização através das quais o IGF-I regula a expressão dos transcritos dos genes <i>PHLDA1</i> e <i>PAWR</i>	49
4.5 Efeito da integrina β 1 sobre a expressão dos transcritos dos genes <i>PHLDA1</i> e <i>PAWR</i>	50
4.6 Interação entre o IGF-I e a integrina β 1 sobre a expressão dos transcritos dos genes <i>PHLDA1</i> e <i>PAWR</i>	52
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÃO	80
7 REFERÊNCIAS	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	07
Figura 2	08
Figura 3	13
Figura 4	17
Figura 5	21
Figura 6	55
Figura 7	56
Figura 8	57
Figura 9	58
Figura 10	59
Figura 11	60
Figura 12	61
Figura 13	62
Figura 14	63
Figura 15	64
Figura 16	65
Figura 17	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AF-1	Activation function 1
AKT	Oncogene homólogo ao thimona viral v-akt murino
AP-1	Proteína de ativação 1
APM cíclico	Monofosfato de adenosina cíclico
ATPase	Constitui uma família de enzimas que catalisam a hidrólise do ATP
BRCA 1	Câncer de mama 1
BRCA 2	Câncer de mama 2
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
<i>c-myc</i>	Oncogene homólogo a mielocitomatose viral v-myc
CT	Threshold Cycle
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DCIS	Ductal carcinoma <i>in situ</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	2' desoxirribonucleotídeos 5' trifosfato
E2	17 β -estradiol
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
ER	Receptor de estrógeno

ERE	Elemento responsivo ao estrógeno
ERK1/2	Quinase de sinalização extracelular
FAK	Quinase de adesão focal
<i>fos</i>	oncogene homólogo ao ostiosarcoma viral murino v-fos FBJ
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
ICI	ICI182780
IGF-1	Fator do crescimento do tipo insulina 1
IGF-1R	Receptor do fator do crescimento do tipo insulina 1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
<i>jun</i>	Oncogene homólogo ao v-jun sarcoma vírus 17
kDa	quilo Dalton
LBD	Domínio de ligação ao ligante
LY	LY294002
MAPK	Proteína quinase ativada pelo mitógeno
MOPS	Ácido propanesulfônico 3-[N-morfolino]
mRNA	RNA mensageiro
Na₃VO₄	Ortovanadato de sódio
NF-kB	Fator nuclear do gene “enhancer” do polipeptídeo leve Kappa nas células-B1
<i>PAWR</i>	PRKC, apoptosis, WT1, regulator
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)

PDGFR	Receptor de fator de crescimento derivado de plaqueta
<i>PHLDA1</i>	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
PI3-K	Fosfatidilinositol 3- quinase
PKA	Proteína quinase A
PKCζ	Proteína quinase C ζ
PMSF	Fenilmetilsulfonilflorideo
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucléico
SAC	Domínio seletivo de indução de apoptose em células de câncer
SB	SB202190
SERM	Modulador seletivo do receptor de estrógeno
siC	si RNA controle negativo
siβ1	si RNA
SN	Soro normal
SP-1	Proteína específica 1
ST	Soro tratado
TGF-β	Fator de crescimento de transformação β
TNFα	Fator de necrose tumoral
WT1	Wilms Tumor 1

Resumo

Casolari DA. *Interação entre as vias de sinalização do IGF- I, do receptor de estrógeno (ER) e da integrina $\beta 1$ na regulação da transcrição dos genes *PHLDA1* e *PAWR** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

A interação entre as vias de sinalização do ER, do IGF-I e da integrina $\beta 1$ é essencial para a manutenção da homeostase da glândula mamária normal, e alterações nessas vias de sinalização estão associadas ao processo de tumorigênese da mama. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar a influência e inter-relação entre as vias de sinalização do IGF-I, do ER e da integrina $\beta 1$ na regulação da transcrição dos genes *PHLDA1* e *PAWR*. Para isso, células MCF-7 foram tratadas, por diferentes tempos, com 10nM de 17 β -estradiol (E2), 12,5nM de IGF-I, 30 μ M de LY294002 (inibidor da PI-3K), 30 μ M de SB202190 (inibidor da p38MAPK) e 1 μ M de ICI182780 (antagonista do ER), ou transfectadas com 40nM de siRNA para integrina $\beta 1$. A expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real e a expressão protéica por Western Blot. A expressão do gene *PHLDA1* aumentou após tratamento com E2 por 6h ($p=0,05$), e esse efeito foi inibido pelo tratamento com ICI ($p<0,05$). O tratamento com E2 por 24h inibiu a expressão do gene *PAWR* ($p<0,05$), e esse efeito foi dependente de ER, pois foi inibido pelo tratamento com ICI ($p<0,05$). O tratamento com IGF-I por 1,5h causou aumento na expressão do gene *PHLDA1* ($p<0,05$); e o tratamento com IGF-I por 24h causou diminuição na expressão do gene *PAWR* ($p<0,05$). Foi observado aumento na expressão protéica de *PHLDA1* após tratamento das MCF-7 com E2 ou IGF-I por 1:30h. A regulação da expressão do *PAWR* pelo IGF-I ocorreu através das vias da PI-3K e p38MAPK. O efeito do IGF-I sobre a expressão dos dois genes foi independente da ativação do ER, mas foi observado sinergismo entre E2 e IGF-I na inibição da expressão dos transcritos do *PAWR*, com diminuição na expressão para nível menor do que o observado após tratamento com E2 ou IGF-I sozinhos ($p<0,05$). A repressão da expressão da integrina $\beta 1$ resultou na diminuição dos níveis de expressão dos genes *PHLDA1* e *PAWR*. Não foi observada interação entre o IGF-I e a integrina $\beta 1$ na regulação dos genes *PHLDA1* e *PAWR*. Portanto, o gene *PHLDA1* é regulado positivamente pelo E2 e pelo IGF-I, mas não existe interação entre as vias. O gene *PAWR* é regulado negativamente pelo E2 e pelo IGF-I; o efeito do IGF-I é dependente da ativação da PI3-K e da p38MAPK, mas não do ER; e existe sinergismo entre E2 e IGF-I na regulação do *PAWR*.

Descritores: neoplasias de mama, expressão gênica, receptores estrogênicos, somatomedinas, integrinas, apoptose.

Abstract

Casolari DA. *IGF-I, estrogen receptor (ER) and β 1 integrin interaction over PHLDA1 and PAWR transcriptional regulation* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

The interactions among ER, IGF-I and β 1 integrin signaling pathways are essential for the maintenance of normal mammary gland homeostasis, and alterations in these pathways have been associated with mammary tumorigenesis. Therefore, the goal of this work was to investigate the influence and interaction among IGF-I, ER and β 1 integrin signaling pathways on the regulation of *PHLDA1* and *PAWR* transcription regulation. To accomplish that, MCF-7 cells were treated with 10nM 17 β -estradiol (E2), 12.5nM IGF-I, 30 μ M LY294002 (a PI3-K inhibitor), 30 μ M SB202190 (a p38MAPK inhibitor) and 1 μ M ICI182,780 (ICI – an ER antagonist), or transfected with 40nM siRNA aiming β 1 integrin. Real time PCR and western blot were used to evaluate gene and protein expression, respectively. *PHLDA1* mRNA expression increased after 6h of treatment with E2 ($p=0.05$), and this effect was inhibited by ICI ($p<0.05$). Treatment with E2 for 24h repressed *PAWR* gene expression ($p<0.05$) and this effect was dependent on ER, since treatment with ICI inhibited it ($p<0.05$). Treatment with IGF-I for 1.5h resulted in increased *PHLDA1* gene expression ($p<0.05$) and also *PHLDA1* protein expression; and treatment with IGF-I for 24h inhibited *PAWR* mRNA expression ($p<0.05$). IGF-I regulation of *PAWR* expression was dependent on PI3-K and p38MAPK activation. The regulation of both genes by IGF-I was independent of ER activation; however, IGF-I acted in synergism with E2 on *PAWR* expression resulting in lower *PAWR* expression than the observed after the treatments alone ($p<0.05$). Repression of β 1 integrin expression resulted in downregulation of *PHLDA1* and *PAWR* expression levels. No interaction was observed between IGF-I and β 1 integrin on *PHLDA1* and *PAWR* gene expression. In conclusion, *PHLDA1* is positively regulated by E2 and IGF-I, but there is no interaction between them on *PHLDA1* regulation. On the other hand, *PAWR* is negatively regulated by E2 and IGF-I; IGF-I effect is dependent on PI3-K and p38MAPK, but not on ER activation; E2 and IGF-I act synergistically on *PAWR* gene expression regulation.

Drescriptors: breast neoplasms, gene expression, receptors estrogen, somatomedins, integrins, apoptosis

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o primeiro em mulheres, sendo responsável por aproximadamente 23% de todos os casos de câncer na população feminina (Parkin, et al., 2005). No Brasil sua incidência só é menor que a de câncer de pele não melanoma. São estimados para 2008, 49.400 novos casos e com risco de 51 casos a cada 100 mil mulheres. (Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil).

O prognóstico do câncer de mama é bom, sendo a quinta causa de morte em relação a todos os tipos de câncer. Porém, em mulheres é a primeira causa de morte por câncer, sendo responsável por 14% das mortes por câncer em mulheres no mundo (Parkin et al., 2006).

A etiologia do câncer de mama é complexa e envolve diversos fatores de risco que podem ser divididos em hormonais e ambientais, sendo que o primeiro grupo é o mais importante. Os fatores hormonais estão relacionados com tempo de exposição aos hormônios esteroídicos durante a vida e incluem gravidez tardia – depois dos 30 anos de idade –, nuliparidade, menarca precoce (antes dos 12 anos) ou menopausa tardia (após os 50 anos), uso de contraceptivos orais e reposição hormonal. Os fatores ambientais incluem estilo de vida (dieta rica em gorduras, sedentarismo, consumo de álcool, cigarros,

obesidade), localização geográfica, status socioeconômico e exposição da mama à radiação (Martin, Weber, 2000; McPherson et al., 2000). Além disso, cerca de 5 a 10% de todos os casos de câncer de mama são hereditários e estão relacionados à presença de mutações na linhagem germinativa em genes que conferem predisposição ao aparecimento da doença (como *BRCA1* e *BRCA2*). As mulheres com maior probabilidade de apresentar alguma dessas mutações são as que vêm de famílias com diversos casos de câncer de mama ou as que desenvolvem o tumor precocemente (antes dos 40 anos de idade) (Ganz, 2005).

1.2 Hormônios esteróides e câncer de mama

Os estrógenos e progestinas são hormônios esteróides endógenos que possuem diversos efeitos fisiológicos. Em mulheres são responsáveis pelo controle do ciclo menstrual e por ações no metabolismo mineral, de carboidratos, proteínas e lipídeos.

Os estrógenos regulam crescimento, diferenciação e homeostase de diversos tecidos normais dos sistemas cardiovascular, musculoesquelético, imune, do sistema nervoso central, e especialmente dos órgãos sexuais (Heldring et al., 2007). Juntamente com outros hormônios os estrógenos causam crescimento normal da mama por promover crescimento ductal, desenvolvimento do estroma e acréscimo de gordura (Hardman et al., 1996).

A progesterona, juntamente com os estrógenos, causa proliferação do epitélio da glândula mamária durante a gravidez e num grau menor durante a fase lútea do ciclo menstrual (Hardman et al., 1996). Durante a gravidez, os estrógenos estimulam proliferação e crescimento ductal, enquanto altas concentrações de progesterona induzem desenvolvimento e diferenciação lóbulo-alveolar (Peck et al., 2002), efeitos potencialmente protetores contra o câncer de mama.

Alguns estudos sugerem que as progestinas sintéticas usadas em terapia de reposição hormonal combinadas com estrógenos aumentam o risco de desenvolver câncer de mama, comparado ao risco com uso de estrógeno sozinho (Schairer et al., 2000; Campagnoli et al., 2005a; LaCroix, 2005). Por outro lado, o uso de progesterona oral com estradiol transdérmico não aumentou o risco de desenvolver câncer de mama (Fournier et al., 2005). Foi proposto que o risco aumentado associado ao uso de progestinas sintéticas pode estar relacionado com atividade “não-progesterona” dessas substâncias. Estudos mostraram que progestinas derivadas de 19-nortestosterona interagem com o ER e exercem efeito proliferativo tipo-estrógeno em linhagens de células de câncer de mama *in vitro* (Campagnoli et al., 2005b).

Os estrógenos são importantes tanto no desenvolvimento normal da glândula mamária quanto na indução e progressão do carcinoma mamário. Diversos estudos experimentais mostram que os estrógenos têm efeito mitogênico em linhagens celulares derivadas de tumores de mama positivas para receptor de estrógeno (ER) promovendo um aumento de 30 a 50% na

fração de células em fase S (Altucci et al., 1996; Foster et al., 1996) através da regulação da transcrição de genes estrógeno-responsivos envolvidos no controle do ciclo celular (Foster et al., 2001).

A exposição prolongada ao estrógeno é um importante fator de risco para o desenvolvimento de câncer de mama, provavelmente por promover o acúmulo de alterações genéticas em células normais sob estímulo proliferativo (Allred et al., 2001). Essa hipótese também se aplica a células em lesões pré-malignas. Os altos níveis de ER encontrados na maioria das células em lesões pré-malignas pode contribuir para o aumento da proliferação dessas células, em relação às células normais, por hipersensibilizá-las e torná-las responsivas a níveis extremamente baixos de estrógenos (Mohsin et al., 2000).

O principal e mais potente estrógeno em humanos é o 17 β -estradiol (E2). Os metabólitos do E2, estrona e estriol, também estão presentes, porém são agonistas fracos do ER (Heldring et al., 2007). A maioria dos efeitos dos estrógenos sobre os seus tecidos alvos são mediados pelos receptores de estrógeno (ER α e ER β), que pertencem à superfamília de receptores nucleares e atuam como fatores de transcrição regulados pela ligação ao hormônio (Nagai, Brentani, 2008). O ER α (6q25) é expresso predominantemente na mama, útero, colo do útero e vagina, enquanto a expressão do ER β (14q) é mais freqüente em ovário, próstata, testículos, baço, pulmões, hipotálamo e timo (Hall et al., 2001).

Os receptores nucleares possuem um padrão molecular que inclui seis domínios estruturais e funcionais, denominados de A a F (Figura 1). O domínio A/B, localizado na região amino-terminal, apresenta grande variabilidade entre os diversos receptores esteroídicos e contém o domínio de transativação hormônio independente AF-1 (*activation function 1*). O domínio C, localizado na região central da molécula, é altamente conservado e contém o domínio de ligação ao DNA (DBD) com dois dedos de zinco. Esse domínio é de fundamental importância para a ativação da transcrição, por ser responsável pelo reconhecimento do ERE (Elemento Responsivo ao Estrógeno – sequência palindrômica específica de DNA separada por três nucleotídeos, 5'-GGTCAnnnTGACC-3') no gene alvo. O domínio D está relacionado à atuação das proteínas co-regulatórias (repressoras e ativadoras) e contém sinais de localização nuclear. Os domínios E/F, localizados na região carboxi-terminal, contém o domínio de ligação ao ligante (LBD), o qual apresenta os domínios de transativação AF-2/AF-2a, uma região de ligação para a proteína de choque térmico Hsp90, outro sinal de localização nuclear e sítios relacionados à ligação de proteínas co-regulatórias (Hall et al., 2001; Kumar et al., 1987; Sommer, Fuqua, 2001; Spiers, Walker, 2007; White, Parker, 1998).

Adaptado de Spiers V, Walker RA. *J Pathol.* 2007;211:499-506.

Figura 1: Representação esquemática dos domínios estruturais e funcionais do ER. O receptor é constituído de 595 aminoácidos divididos em seis domínios estruturais A-F, os quais contêm diversos domínios funcionais. Os domínios estruturais e funcionais estão representados nas estruturas do ERα e do ERβ, respectivamente. A percentagem de conservação dos domínios está representada entre os receptores.

O mecanismo de ação dos receptores de estrógeno é complexo podendo ocorrer de maneira ligante-dependente, modelos clássico e não-clássico, ou de maneira ligante-independente (Figura 2). No modelo clássico a ligação do estrógeno ao seu receptor resulta em fosforilação, dissociação de chaperonas, alterações na conformação, dimerização, associação com proteínas co-regulatórias, interação com EREs na região promotora de genes alvo e regulação da transcrição gênica (Hall et al., 2001; Sommer, Fuqua, 2001; Spiers, Walker, 2007; White, Parker, 1998). No entanto, cerca de um terço dos

genes regulados pelo ER não apresentam ERE na sua região promotora (O'Lone et al., 2004). Nesses casos, a ativação do receptor ocorre através do modelo não-clássico, no qual a ligação do hormônio promove a interação do ER com outros fatores de transcrição, como fos/jun, e não diretamente com o DNA. Dessa forma, a ativação do ER regula a transcrição de genes que possuam em sua região promotora seqüências específicas para esses fatores de transcrição, como AP-1 e SP-1 (Björnström, Sjöberg, 2005; Nilsson et al., 2001; Spiers, Walker, 2007).

Adaptado de Björnström L, Sjöberg M. *Mol Endocrinol*. 2005;19(4):833-42.

Figura 2: Mecanismos de ação do ER. 1- Modelo clássico (ligante-dependente); 2- Modelo não-clássico (ERE-independente); 3- Modelo ligante-independente; 4- Modelo não-genômico.

Além da ativação mediada por hormônio, a função do ER pode ser modulada por sinais extracelulares na ausência do estrógeno. Este mecanismo independente de ligante envolve a ativação de vias de sinalização intracelular por receptores de fatores de crescimento (como receptor de fator de crescimento epidermal – EGFR – e receptor de fator de crescimento tipo insulina 1 – IGF-IR) e segundos mensageiros (como AMP cíclico). Assim, o ER é ativado pela fosforilação de resíduos de aminoácidos do domínio AF-1 na região N-terminal por quinases intracelulares, como ERK1/2, AKT, PKA e c-Src (Weigel, Zhang, 1998; Lannigan, 2003; Spiers, Walker, 2007).

A ativação do ER, por E2 ou fatores de crescimento, envolve fosforilação de resíduos serina. A maioria dos resíduos fosforilados na presença de E2 estão no domínio A/B do receptor, Ser-104, -106, -118, -154 e -167. Foram encontrados ainda, outros três sítios de fosforilação de serina, -236 no domínio DBD, -294 na região “hinge” e -305 no domínio LBD (Le Goff et al., 1994; Nilsson et al., 2001), e um único sítio de fosforilação de tirosina na posição -537 no ER α humano foi identificado *in vitro* e *in vivo* (Arnold et al., 1995; Nilsson et al., 2001). Os fatores de crescimento levam à fosforilação do ER α através de proteínas quinase, como a MAPK. A Ser-118 é um sítio de fosforilação crítico do ER α humano pela MAPK (Bunone et al., 1996; Kato et al., 1995; Nilsson et al., 2001). Porém, a ativação do ER α por fatores de crescimento pode ocorrer por fosforilação de outros resíduos do receptor além da Ser-118. Por exemplo, a quinase ribossomal S6 de 90kDa (pp90^{rsk1}), ativada pela MAPK após estímulo

por EGF, fosforila o ER α humano no resíduo Ser-167 (Joel et al., 1998; Nilsson et al., 2001).

Como descrito acima, os estrógenos exercem a maioria de seus efeitos através da ação dos ERs sobre a expressão gênica, porém outros efeitos dos estrógenos são tão rápidos que não podem depender da ativação da síntese de RNA e proteínas. Esse mecanismo de ação é conhecido como efeito não-genômico, e acredita-se que seja mediado por ERs associados à membrana plasmática e ligados a proteínas quinase de diversas vias de transdução de sinal, como por exemplo, a MAPK (Hall et al., 2001). Song et al. (2006) sugeriram um modelo no qual a ligação do E2 ao ER α induz a fosforilação da proteína Shc e sua ligação ao complexo E2-ER α . Então, Shc transporta o ER α para a membrana plasmática por se ligar ao IGF-IR, e este é fosforilado em resposta ao E2. A formação do complexo E2-ER α -Shc-IGF-IR resulta na ativação das metaloproteinases 2 e 9 que liberam HB-EGF da membrana. Em seguida, HB-EGF se liga ao EGFR potencializando a atividade das vias MAPK e PI-3K (Song et al., 2006).

Os efeitos não-genômicos dos estrógenos também podem influenciar a expressão gênica indiretamente, devido à ativação de vias de transdução de sinal que agem sobre fatores de transcrição. As funções de muitos fatores de transcrição, por exemplo, o AP-1, são reguladas por fosforilação mediada por proteínas quinase, portanto esses fatores podem ser alvos dos efeitos não-genômicos dos estrógenos. Essa via de sinalização pode ser chamada de sinalização “não-genômica-a-genômica”, e representa um mecanismo não-

nuclear pelo qual os estrógenos podem modular a função de fatores de transcrição e, conseqüentemente, regular a expressão de genes que não contém o ERE (Björnström, Sjöberg, 2005).

Acredita-se que o processo de tumorigênese da mama resulta da progressão de lesões benignas a malignas devido ao acúmulo de alterações genéticas, provável conseqüência do aumento da proliferação celular estimulada pelo ER. Essas alterações levariam à evolução do epitélio mamário normal a lesões proliferativas benignas, lesões proliferativas atípicas e, finalmente, carcinoma *in situ* e tumores invasivos (Allred et al., 2001). Estudos mostraram que a progressão da carcinogênese mamária está normalmente associada com resposta desregulada ao ER envolvendo aumento no número e atividade proliferativa das células epiteliais ER-positivas (Stoll, 2002). Na mama normal pré-menopausal as células ER-positivas são minoria e seu número aumenta com a idade alcançando o platô após a menopausa. As lesões hiperplásicas sem atipia apresentam pequeno aumento no número de células ER-positivas comparadas com o tecido normal, mas a hiperplasia ductal atípica e o carcinoma ductal *in situ* (DCIS – Ductal Carcinoma *in situ*) apresentam um aumento muito mais intenso (Shoker et al., 1999; Schor et al., 2006). De fato, as lesões associadas com maior risco de desenvolver carcinoma mamário invasivo são hiperplasia típica, hiperplasia ductal atípica, DCIS e carcinoma lobular *in situ* (Allred et al., 2001). Foi proposto, portanto, que um aumento na proporção de células epiteliais ER-positivas é um indício de alteração pré-maligna na mama (Shoker et al., 1999).

O aumento da atipia em lesões pré-malignas também aumenta a expressão do receptor de progesterona (PR). Aproximadamente 60% dos carcinomas de mama invasivos expressam PR, e a expressão desse receptor é normalmente um indicador de que o ER α está funcionando. Pacientes cujos tumores expressam ER α e PR apresentam maior probabilidade de resposta à terapia endócrina e melhor prognóstico do que pacientes cujos tumores não expressam esses receptores (Anderson, 2002). A terapia endócrina é indicada para pacientes com tumor de mama ER- e/ou PR-positivo. O tamoxifeno é um modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM) que apresenta atividade tanto agonista quanto antagonista sobre o ER, e é o tratamento endócrino padrão para câncer de mama dependente de estrógeno. O mecanismo de ação antagonista do tamoxifeno (Figura 3) envolve translocação do ER para o núcleo, ligação do complexo tamoxifeno-ER ao ERE de genes alvo (Katzenellenbogen et al., 1996) e inativação da região AF-2, porém a transcrição mediada pela região AF-1 não é afetada, característica que confere a atividade agonista aos SERMs (Howell, 2006). O efeito antagonista do tamoxifeno confere sucesso ao tratamento de pacientes com câncer de mama, mas seu agonismo parcial está associado à ocorrência de efeitos colaterais, como aumento no risco de desenvolver câncer de endométrio e eventos tromboembólicos (venosos e pulmonares) (Howell, 2006; Jordan, 2007).

Dowsett M, Nicholson RI, Pietras RJ. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;93:S11-S18.

Figura 3: Mecanismo de ação do E2, tamoxifeno e fulvestranto sobre a atividade do ER. (a) a ligação do E2 ao ER leva a dimerização, mudança na conformação e ligação do receptor no ERE do gene alvo regulando a transcrição gênica; (b) a ligação do tamoxifeno no ER inativa o domínio AF-2, mas não o AF-1, através do qual o ER ainda é capaz de regular a transcrição gênica; (c) a ligação do fulvestranto no ER acelera a degradação do receptor além de inativar os domínios AF-1 e AF-2 inibindo a transcrição regulada pelo ER.

A ocorrência desses efeitos indesejados levou ao desenvolvimento de novas drogas para o tratamento do câncer de mama que não apresentassem ação agonista sobre o ER. Como resultado foram descobertos os antagonistas puros do ER, esteróides análogos ao E2, dos quais o ICI 182.780, também conhecido como fulvestranto (Faslodex®), foi aprovado para o tratamento de câncer de mama avançado em mulheres pós-menopausais (Wakeling et al., 1991; Howell, 2006).

Assim como o tamoxifeno, o fulvestranto inibe competitivamente a ligação do E2 ao ER, porém com uma afinidade muito maior. Enquanto a afinidade do fulvestranto de ligação ao ER, comparada com a do E2, é de 89%, a do tamoxifeno é de apenas 2,5% (Wakeling et al., 1991; Dowsett et al., 2005). No entanto, o mecanismo de ação do fulvestranto é diferente do tamoxifeno (Figura 3). A ligação do fulvestranto induz a uma conformação do ER diferente da obtida após a ligação do E2 ou do tamoxifeno. Essa nova conformação inibe a dimerização do receptor, a translocação do complexo ligante-ER para o núcleo e a ligação do ER em genes alvo. Além disso, ocorre aumento no turnover do receptor, diminuição de sua meia-vida e aceleração da sua degradação, resultando em rápida diminuição nos níveis celulares de ER. O fulvestranto também inibe os domínios AF-1 e AF-2 do ER, assim, mesmo que algum complexo fulvestranto-ER seja translocado para o núcleo não ocorre transcrição gênica (Dowsett et al., 2005; Howell, 2006).

1.3 Matriz extracelular (ECM) e câncer de mama

O epitélio mamário é uma estrutura em bicamada, consistindo de uma camada interna contínua de células epiteliais lumbais e uma camada externa de células mioepiteliais. O epitélio está mergulhado no estroma mamário que é composto por fibroblastos, células endoteliais, células musculares lisas, adipócitos, células inflamatórias, células nervosas, e uma rede de

proteoglicanos e glicoproteínas chamada de matriz extracelular (ECM) (Hansen, Bissell, 2000).

As relações entre as células epiteliais, o estroma e a ECM são importantes para a manutenção da homeostase tecidual e para a resposta ao hormônio esteróide. Estudos em camundongos transgênicos mostraram que o desenvolvimento de tumores mamários experimentais é governado pela desorganização progressiva do microambiente glandular (Cardiff et al., 2000). Isso porque, a transformação maligna das células epiteliais adultas interrompe a regulação da homeostase, levando à perda do controle da arquitetura tecidual, adesão, morte e proliferação celular (Howlett, Bissell, 1993; Shekhar et al., 2003).

A ECM é formada por colágenos, glicoproteínas, como laminina e tenascina, e proteoglicanos que interagem com as células que estão mergulhadas ou adjacentes à matriz. Existem dois tipos de ECM, a matriz intersticial e a membrana basal, esta última é formada principalmente por laminina, colágeno IV, nidogen e perlecan (Bosman, Stamenkovic, 2003).

A membrana basal fornece sinais críticos para sobrevivência, proliferação e diferenciação celular do epitélio ductal e alveolar, ou seja, para sua morfogênese. Esses sinais são iniciados principalmente pelas lamininas. As lamininas pertencem a uma família de glicoproteínas que apresentam múltiplos domínios e são essenciais na formação da membrana basal. Elas promovem adesão celular e angiogênese, afetam a expressão gênica e estão envolvidas na proliferação, migração e diferenciação celular (Givant-Horwitz et al., 2005).

Em células de câncer de mama ER-positivas, foi mostrado que as lamininas reduzem a resposta ao estrógeno diminuindo sua eficácia em ativar a transcrição de genes através do ERE (Woodward et al., 2000).

A ligação das células à laminina ocorre através das integrinas. As integrinas pertencem à super família de receptores transmembrânicos que conectam as células à ECM e ancoram o citoesqueleto à membrana plasmática no interior das células (Clark, Brugge, 1995; Giancotti, Ruoslahti, 1999). Existem mais de vinte receptores integrinas formados pela heterodimerização entre diferentes subunidades α e β . Em células epiteliais mamárias normais elas dimerizam formando os receptores $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, e $\alpha6\beta4$ (Alford, Taylor-Papadimitriou, 1996).

A interação com a ECM ocorre nas terminações distais dos receptores, onde as subunidades α e β interagem. Os dímeros reconhecem pequenos domínios peptídicos das proteínas de matriz e a especificidade da ligação a esses domínios depende de ambas as subunidades (Bosman, Stamenkovic, 2003). A ligação a uma proteína da matriz e conseqüente agregação das subunidades das integrinas resulta em interação com proteínas adaptadoras, como talina, α -actinina, vinculina e paxilina, que as unem tanto ao citoesqueleto de actina quanto às proteínas que disparam cascatas de transdução de sinal, como a FAK que é fosforilada e recruta um complexo de sinalização composto por tirosina quinases e proteínas G (como MAPK e Rho GTPase) (Giancotti,

Ruoslahti, 1999) (Figura 4). Assim, as integrinas regulam diferentes processos biológicos, como adesão, migração, proliferação e diferenciação (Bosman, Stamenkovic, 2003). Na mama normal, a sinalização resultante da ligação laminina-integrina, por exemplo, tem papel importante na polarização das células epiteliais, na formação do lúmen e na expressão de β -caseína, um produto indicativo de diferenciação (Muschler et al., 1999).

Adaptado de Mirante CK, Brugge JS. *Nat Cell Biol.* 2002;4:83-90.

Figura 4: Sinalização mediada por integrinas. Proteínas adaptadoras (α -actinina, paxilina, talina, vinculina e tensina) ligam as integrinas, associadas às proteínas de matriz, ao citoesqueleto de actina e às proteínas de transdução de sinal (como FAK), que ativam outras proteínas sinalizadoras iniciando uma rede de sinalização intracelular que regula diversos processos biológicos.

Tanto mudanças quantitativas quanto qualitativas na expressão de integrinas já foram associadas ao câncer de mama (Hansen, Bissell, 2000). Essas mudanças na expressão podem resultar em razões alteradas de integrinas na superfície celular, o que afetaria a organização do tecido e a progressão do tumor devido à sinalização intracelular alterada. Um exemplo é o aumento, em células tumorais de mama, da expressão da integrina $\beta 1$ que promove crescimento e perturbação na morfogênese celular (Weaver et al., 1997). Foi demonstrado ainda que a integridade funcional da integrina $\beta 1$ é essencial para a indução de tumor de mama em um modelo de câncer de mama em camundongo transgênico (White et al., 2004), e que a inibição da atividade da integrina $\beta 1$ causa reversão do fenótipo tumoral com bloqueio da proliferação e indução de apoptose *in vitro* e *in vivo*, mesmo com a persistência das anormalidades genéticas (Weaver et al., 1997; White et al., 2004; Park et al., 2006). Esses resultados sugerem que a manutenção da arquitetura tecidual é essencial para que o fenótipo normal supere o genótipo transformado, agindo assim como um potente supressor de tumor.

As integrinas podem interagir com receptores de fatores de crescimento, como EGFR, PDGFR, TGF β , IGF-IR, entre outros (Adams, Watt, 1993; Dunn et al., 1998; Lal Goel et al., 2004; Streuli, 1999; Tai et al., 2003). Ao induzir a associação da integrina $\beta 1$ com o IGF-IR, o IGF-I leva ao aumento da adesão de células de mieloma à fibronectina. Em linhagens celulares tumorais de próstata expressando integrinas β_{1A} ou β_{1C} , o complexo formado entre o IGF-IR

ativado e a integrina β_{1A} , leva a proliferação celular e crescimento tumoral. Já a interação entre a proteína adaptadora Gab1 e a integrina β_{1C} causa inibição desse efeito e estimula adesão da célula à laminina (Lal Goel et al., 2004). O IGF-I também participa de outros mecanismos de adesão celular ativando as vias de sinalização PI-3K/AKT e ERK, a polimerização da actina e a formação do complexo de adesão focal contendo p125^{FAK} e paxilina (Tai et al., 2003). Ele causa ainda aumento da adesão de células de câncer de mama à laminina, também de forma dependente de IGF-IR (Dunn et al., 1998), fato que pode ser explicado pelo aumento da interação da integrina β_1 (abundante em células de câncer de mama) com moléculas de adesão focal ativadas pelo IGF-I (Tai et al., 2003).

1.4 Fatores de crescimento do tipo-insulina (IGFs) e câncer de mama

Altos níveis de IGF-I circulantes são associados ao desenvolvimento de câncer de mama em modelos animais (Wu et al., 2003). Além disso, alta concentração plasmática de IGF-I têm sido associada com risco elevado de desenvolvimento de diversos tipos de câncer em humanos, entre eles o de mama (Hankinson et al., 1998; Pollak, 2000; Yu et al., 2002).

Os IGFs são fatores peptídicos com homologia estrutural à insulina. Existem dois tipos de IGF, o IGF-I (com 70 aminoácidos) e o IGF-II (com 67 aminoácidos) (Rinderknecht, Humbel, 1976a,b). A maior parte dos IGFs

circulantes é encontrada em complexo com as proteínas ligadoras de IGF 1-6 (IGFBP 1-6) que podem modular as ações biológicas dos IGFs por interferirem com a ligação ao receptor e por regularem a biodisponibilidade desses fatores de crescimento. (Helle, 2004; Hwa et al., 1999).

Para exercerem suas ações, os IGFs se ligam a receptores transmembrânicos, e assim ativam várias cascatas de sinalização citoplasmáticas envolvidas na transdução de sinal mitogênico e anti-apoptótico para o núcleo da célula. Existem dois tipos de receptores de IGF, o tipo I (IGF-IR) e o tipo II (IGF-IIR). O IGF-IR regula a maioria dos efeitos fisiológicos dos IGFs, como proliferação, sobrevivência, transformação, diferenciação e interações célula-célula e célula-substrato (Surmacz, Bartucci, 2004). O IGF-IIR, cujo ligante é o IGF-II, não tem atividade de tirosina quinase e sua habilidade de transdução de sinal não é clara. Acredita-se que seja importante para a internalização e degradação do IGF-II (Pavelic et al., 2002).

O IGF-IR é expresso em todos os tecidos humanos com exceção das células hepáticas e dos linfócitos T (Sachdev, Yee, 2001). Este receptor é uma glicoproteína composta por duas subunidades α e duas subunidades β . As subunidades α extracelulares são responsáveis pela ligação ao ligante e as subunidades β , que possuem uma porção transmembrânica e uma intracelular, transmitem o sinal induzido pelo ligante (Surmacz, Bartucci, 2004).

A ligação do IGF-I ou IGF-II ao IGF-IR resulta em ativação de sua atividade tirosina quinase com subsequente autofosforilação de resíduos de

tirosina da subunidade β e recrutamento de proteínas adaptadoras sinalizadoras, como IRS-1 e Shc (Figura 5) (Dupont et al., 2003; Surmacz, Bartucci, 2004). A principal via de sinalização induzida pela fosforilação de tirosina de IRS-1 é a da PI-3K, a qual está envolvida na regulação da mitogênese e do metabolismo, no rearranjo do citoesqueleto de actina e na resistência a apoptose (Shepherd et al., 1998; Surmacz, Bartucci, 2004). Porém, a associação da IRS-1 com o complexo GRB2/SOS leva à estimulação de outra via de sinalização, a da Ras/MAPK, uma via que está relacionada com uma grande variedade de respostas celulares, incluindo proliferação e diferenciação celular (Goalstone, Draznin, 1998; Surmacz, Bartucci, 2004; White, 1998).

Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:505-18.

Figura 5: Ativação e sinalização do IGF-IR. O IGF-IR é um receptor de membrana tipo tirosina quinase que pode ser ligado por IGF-I ou IGF-II. A ligação de IGF ativa o receptor e este estimula vias de sinalização, principalmente as vias da PI3K-AKT e da MAPK (RAF-MEK-ERK), que regulam proliferação e sobrevivência celular.

A ativação das vias de crescimento e sobrevivência induzidas por IGF-IR pode ser influenciada por interações entre a célula e a ECM. Como dito anteriormente, a associação de proteínas da via do IGF-IR com integrinas transmite sinais de sobrevivência dependentes da ECM. Além disso, o IGF-IR também regula a atividade de diversas proteínas que participam da organização

do citoesqueleto, como FAK, paxilina e p130Cas (Kim, Feldman, 1998; Guvakova, Surmacz, 1999), estimula adesão intercelular e melhora a sobrevivência celular em condições independentes de ancoragem (Mauro et al., 2003; Guvakova, Surmacz, 1997).

Na mama, o IGF-I é expresso em células do estroma adjacentes às células epiteliais normais. O IGF-IR tem papel importante no desenvolvimento da mama normal, mas já foi implicado na etiologia do câncer de mama. Os IGFs são potentes mitógenos para as células de câncer de mama em cultura (Bartucci et al., 2001). Além disso, Jones et al. (2007) demonstraram que o IGF-IR é essencial no controle do desenvolvimento do ducto mamário e que sua superexpressão em um modelo de camundongo transgênico é suficiente para indução de hiperplasia mamária e formação de tumor. Acredita-se que a atividade tumorigênica do IGF-IR no epitélio mamário esteja relacionada com a superativação das vias de proliferação e sobrevivência reguladas pelo receptor (Pollak, 2000; Sachdev, Yee, 2001; Sisci, Surmacz, 2007), isso porque diversos componentes do sistema IGF encontram-se desregulados no câncer de mama, e como consequência estimulam a resposta ao IGF-I. O próprio IGF-IR, por exemplo, encontra-se significativamente superexpresso e altamente ativado em câncer de mama primário quando comparado com seu perfil em células epiteliais normais (Koda et al., 2003).

Sabe-se que o ER não trabalha isolado do restante da célula, e muitos outros elementos, principalmente aqueles que participam das cascatas de transdução dos fatores de crescimento, foram identificados como podendo

influenciar ou sendo influenciados pela sinalização do ER. Portanto, tais elementos possuem o potencial de aumentar a atividade do receptor nas células de câncer de mama.

Como dito anteriormente, a ação de fatores de crescimento pode levar a ativação do ER na ausência de E2. Além disso, em células e tecidos que respondem a E2, a resposta induzida por fator de crescimento está ligada à expressão do ER. Por exemplo, em camundongos knockout para ER α , os efeitos do EGF e do IGF-I são atenuados ou completamente inibidos (Curtis et al., 1996; Klotz et al., 2002). Já a proliferação de células MCF-7 induzida por IGF-I é inibida pelo tratamento com anti-estrógenos ou com o inibidor da PI3-K (LY294002) (Zhang et al., 2005), e uma linhagem MCF-7 negativa para ER α não responde ao estímulo de crescimento induzido por IGF-I, efeito esse revertido pela re-expressão do receptor (Oesterreich et al., 2001). Também foi visto que células ER α -negativas respondem à presença de IGF-I apenas com migração e não com proliferação, portanto, parece que o ER α interfere nas atividades de proliferação e sobrevivência de IGF-I, mas não na de motilidade (Oesterreich et al., 2001; Surmacz, Bartucci, 2004).

Por outro lado, os estrógenos, via ER, podem aumentar a expressão de componentes da via do IGF, como IRS-1 (Lee et al., 1999), IGF-I (Fournier et al., 2001) e IGF-IR (Stewart et al., 1990), e o tratamento com os antiestrógenos tamoxifeno e ICI 182.780 inibe a expressão e sinalização de IGF-IR e IRS-1 (Surmacz, Bartucci, 2004). Portanto, um estímulo simultâneo com IGF-I e E2

ativa vias de sinalização comuns resultando em efeito sinérgico ou aditivo na resposta celular.

Como descrito acima, a manutenção da estrutura e da função da glândula mamária normal depende de um sistema complexo de transdução de sinal. As vias de sinalização ativadas pelas integrinas, fatores de crescimento e estrógenos são fundamentais na manutenção da homeostase de crescimento e diferenciação da glândula mamária e alterações nessas vias estão associadas com o desenvolvimento e progressão do câncer de mama (Hansen, Bissell, 2000).

Assim, neste estudo, iremos investigar a influência e inter-relação entre as vias de sinalização do ER, do IGF-I e da integrina $\beta 1$ na regulação da transcrição dos genes *PHLDA1* e *PAWR*, associados a sobrevivência celular, e identificados em estudos prévios de nosso grupo como sendo regulados pelo estrógeno via ER.

1.5 *PHLDA1* (pleckstrin homology-like domain, família A, membro 1)

O gene *PHLDA1* (também conhecido como *TDAG51*) está localizado no cromossomo 12q15 e codifica uma proteína que pertence à família de proteínas com domínio homólogo à plecstrina (Frank et al., 1999). Dos três membros dessa família, entre eles *lpl/Tsc* e *Tih*, o *PHLDA1* é o único que possui um domínio rico em prolina/glutamina/histidina que causa indução de morte celular

(Hayashida et al., 2006). A proteína PHLDA1 foi encontrada no citoplasma de células em cultura, mas apresenta um domínio de localização nuclear, indicando que pode ser translocada para o núcleo em condições específicas (Neef et al., 2002).

O mecanismo pelo qual PHLDA1 induz apoptose ainda não é bem compreendido, mas já foram relatados mecanismos dependentes e independentes de Fas, de acordo com o tipo celular em que é expresso. Em células T, a indução de apoptose ocorre após aumento da expressão de Fas induzido por PHLDA1 (Park et al., 1996), porém em MEF e HELA a indução de apoptose por PHLDA1 é independente da expressão de Fas (HAYASHIDA et al., 2006).

Foi descrito que PHLDA1 tem sua expressão gênica e protéica reduzida em células de melanoma metastáticas, comparadas com células de melanoma primárias (Neef et al., 2002). E em células endoteliais vasculares, o aumento da expressão de PHLDA1 resulta em alterações morfológicas, diminuição da adesão e *anoikis*, apoptose causada por perda de adesão celular (Hossain et al., 2003).

Ao contrário dos outros estudos com PHLDA1, Toyoshima et al. (2004) demonstraram um efeito antiapoptótico para essa proteína. Em fibroblastos de camundongo (NWTB3) que expressam níveis aumentados de IGF-IR, o IGF-I estimula a expressão gênica e protéica de PHLDA1, e a supressão da expressão do PHLDA1 por siRNA inibe o efeito protetor do IGF-I contra

apoptose em células carenciadas, sugerindo que essa proteína seja um regulador crucial dos efeitos anti-apoptóticos do IGF-I (Toyoshima et al., 2004).

Utilizando a técnica de DDRT-PCR (*Differential Display Reverse Transcription* – PCR) nosso grupo identificou diversos genes diferencialmente expressos em células de câncer de mama ER-positivas na presença ou ausência de uma monocamada de laminina. Foi observado que transcritos do gene *PHLDA1* estão aumentados em células de câncer de mama ER-positivas aderidas à monocamada de laminina (Da Ros, 2003). E dados do laboratório confirmaram que o *PHLDA1* é positivamente regulado pelo estrógeno. Em outro estudo, foram identificados genes que são diferencialmente expressos em tecido mamário normal e tumoral, independente da expressão do ER. Dentre esses genes, o *PHLDA1* foi identificado como menos expresso em tumores, comparado à mama normal (Nagai et al., 2003). Recentemente, nosso grupo demonstrou que pacientes com tumor de mama que expressa *PHLDA1* têm melhor prognóstico do que pacientes cujos tumores não expressam esse gene. Foi demonstrado ainda, que das pacientes com tumores que expressam *PHLDA1*, as portadoras de tumores ER-negativos têm prognóstico um pouco melhor do que as que possuem tumor ER-positivo (Nagai et al., 2007).

1.6 PAWR (PRKC, apoptosis, WT1, regulator)

O gene *PAWR* (ou *Par4* – *prostate apoptosis response 4*) está localizado no cromossomo 12q21 e codifica para uma proteína de 332 aminoácidos que apresenta duas seqüências de localização nuclear e um domínio zíper de leucina. A expressão do *PAWR* foi registrada em quase todos os tecidos de humanos e de vários outros mamíferos e vertebrados (El-Guendy, Rangnekar, 2003).

Ainda não se conhece o mecanismo exato de ação de PAWR, mas sabe-se que tem função pró-apoptótica, e inibe WT1 e PKC ζ . PAWR também estimula a função apoptótica da quinase Dlk/Zip, inibe as proteínas Bcl-2 e NF- κ B e causa diminuição da expressão de ERK-2. Além disso, PAWR estimula apoptose por induzir a translocação de Fas/FasL para a membrana celular (El-Guendy, Rangnekar, 2003).

A expressão de PAWR é necessária, mas não suficiente, para a indução de apoptose em células de próstata (Sells et al., 1994, 1997). Sua expressão sensibiliza células tumorais de próstata a diversos estímulos apoptóticos, como elevação intracelular de cálcio (Sells et al., 1994) e tratamento com taspargina (Sells et al., 1997). Já o tratamento de neurônios embrionários de hipocampo de rato com estradiol, vitamina E e ácido úrico inibe a expressão do gene *PAWR* e a morte celular causada pela ausência de fatores tróficos (Chan et al., 1999).

Na linhagem de células de câncer de mama MCF-7, a retirada dos estrógenos do meio de cultura resulta em redução da proliferação celular e

promove a apoptose (Kyprianou et al., 1991), porém os mecanismos envolvidos neste processo de indução de morte celular ainda não estão estabelecidos. Dados do nosso grupo mostram um aumento significativo na expressão dos transcritos do gene *PAWR* nas células MCF-7 após a retirada dos estrógenos e de fatores de crescimento do soro (De Bessa, 2004). Além disso, dados do laboratório corroboram os resultados obtidos por Chan et al. (1999) em células nervosas, mostrando que a exposição das células MCF-7 ao estrógeno é capaz de reduzir a expressão dos transcritos do *PAWR* aos níveis observados nas células controle, sugerindo que o estrógeno em associação com outros fatores mitogênicos tenha papel importante na regulação desse gene.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Investigar a possível interação entre as vias de sinalização do IGF-I, do ER e da integrina $\beta 1$ sobre a regulação da expressão de genes associados à sobrevivência celular na linhagem de células de câncer de mama em cultura MCF-7.

2.1 Objetivos específicos

Verificar os efeitos do E2 na regulação da expressão dos transcritos dos genes *PHLDA1* e *PAWR* na linhagem de células de câncer de mama MCF-7, na presença e ausência do antiestrógeno fulvestranto (ICI 182.780).

Verificar os efeitos do IGF-I na regulação da expressão dos transcritos *PHLDA1* e *PAWR* na linhagem de células de câncer de mama MCF-7 na presença e ausência de E2 e de ICI 182.780.

Verificar os efeitos do IGF-I na regulação da expressão dos transcritos dos genes *PHLDA1* e *PAWR* na linhagem de células de câncer de mama MCF-7, na presença e ausência de LY294002 e SB202190.

Verificar os efeitos do IGF-I na regulação da expressão dos transcritos *PHLDA1* e *PAWR* na linhagem de células de câncer de mama MCF-7 após a supressão da expressão da integrina $\beta 1$ pela técnica de RNAi.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura celular

A linhagem de células derivada de adenocarcinoma de mama MCF-7 foi cultivada em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis – EUA) com antibiótico-antimicótico contendo 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina e 0,25µg/mM de fungizona (GIBCO, Gainthorsburg – EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (GIBCO, Gainthorsburg – EUA) e mantida em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂. Para realização dos tratamentos as células foram mantidas por 48h em meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol e com 5% de FBS tratado com carvão dextrana (para o tratamento do FBS, 100ml de FBS foram misturados com 1,25% de carvão dextrana e ficou sob agitação por 1h a 4°C; a mistura foi centrifugada a 10.000 *g* por 25 minutos a 4°C e o sobrenadante filtrado em papel de filtro comum e 3 vezes em membrana de 0,22µm; o tratamento do FBS resulta na retirada de fatores de crescimento e mais de 90% de esteróides livres presentes no soro – Darbre et al., 1983). Após as 48h, as células foram tratadas com 10nM de 17β-estradiol (E2) (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis – EUA) por 2, 6 e 24 horas ou com 6,25nM, 12,5nM e 50nM de IGF-I (Sigma, Chemical Corporation, Saint Louis – EUA) por 0,5, 1,5, 3, 6, 12 e 24 horas, para determinar os tempos de tratamento e concentração que exercem o maior efeito

sobre a expressão dos genes *PHLDA1* e *PAWR*. Em seguida, as células mantidas por 48h em meio RPMI sem vermelho de fenol e em soro tratado foram tratadas por 1 hora com 1 μ M de fulvestranto (ICI-182.780) (Tocris, Ellisville – EUA), 30 μ M de LY294002 (Calbiochem, San Diego – EUA) ou 30 μ M de SB202190 (Calbiochem, San Diego – EUA), e então com E2 ou IGF-I pelos tempos apropriados.

3.2 Interferência de RNA (RNAi)

Células MCF-7 foram cultivadas até atingirem uma confluência de 30%. Então, foram incubados 5 μ l de LipofectaminaTM 2000 (Invitrogen, Carlsbad – EUA) com 245 μ l de meio RPMI sem antibiótico por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 250 μ l de meio RPMI sem antibiótico contendo 1 μ l de siRNA para integrina β 1 (100pmol/ μ l) (Dharmacon, Chicago – EUA) ou 1 μ l de siRNA controle negativo (100pmol/ μ l) (Dharmacon, Chicago – EUA), e a mistura foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, os 500 μ l de mistura foram adicionados às células MCF-7 em cultura com 2ml de meio RPMI sem antibiótico e sem FBS. Após 6 horas, foi adicionado 10% de FBS e as células foram cultivadas nessas condições por 24h, 48, 72h e 96h. Ou, alternativamente, o meio de cultura foi trocado por meio RPMI sem vermelho de fenol suplementado com 5% de FBS tratado 24h após a transfecção; as células foram mantidas nessa condição por 48h; e então foram

tratadas com IGF-I na concentração e tempo adequados, até um total de 96 horas após a transfecção. O silenciamento da integrina $\beta 1$ foi confirmado por PCR em tempo real e por Western Blot.

3.3 Extração de RNA pelo método de Chomczynski e Sacchi (1987)

Após os tratamentos, as células em cultura foram lavadas três vezes com solução PBS (contendo 139mM de NaCl, 2,7mM de KCl, 8,1mM de Na_2HPO_4 , 1,5mM de KH_2PO_4) e, então, foi adicionado 700 μl de solução D gelada (4M de isotiocianato de guanidina, 25mM de citrato de sódio pH 7,0, 0,5% de sarcosil e 0,1M de β -mercaptoetanol). Após a lise total das células a solução foi transferida para um microtubo de 2ml e foram adicionados seqüencialmente 70 μl de acetato de sódio 2M, pH 4,0; 700 μl de fenol pH 5,0-6,0; e 140 μl de clorofórmio-álcool isoamílico (na proporção 49:1). Após a adição de cada solução a mistura foi homogeneizada por inversão. A suspensão final foi agitada vigorosamente por 10 segundos e deixada em banho de gelo por 15 minutos. Então, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 10.000 g a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e precipitada com 1ml de isopropanol a -20°C por 16 horas. Após este período, o tubo foi centrifugado a 10.000 g , a 4°C por 20 minutos. O precipitado resultante foi seco e ressuspenso em 150 μl de solução D. Então, foi transferido para um microtubo de 1,5ml e precipitado com 150 μl de isopropanol por 16 horas a -20°C. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 g e a 4°C e o precipitado resultante foi

lavado com 150µl de etanol 75% e centrifugado novamente a 10.000 *g* por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, o RNA precipitado foi seco e ressuspensão em volume adequado de água livre de RNase (Invitrogen, Carlsbad – EUA) e mantido a -70°C.

A concentração do RNA extraído foi determinada por leitura espectrofotométrica a 260nm. Para verificar a integridade das amostras, 1µl de RNA foi adicionado a 4µl de tampão de aplicação (52,8% de formamida deionizada, 10,5% de MOPS, 16,9% de formaldeído, 7,0% de glicerol e 5,6% de bromofenol blue) e a 3µl de água livre de RNase, e a mistura aquecida a 65°C por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram deixadas em gelo por 2 minutos e foi adicionado 1µl de brometo de etídio (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis – EUA). Então, foram aplicadas em gel de agarose 1% com 10% de MOPS 10X e 5,1% de formaldeído 37%, e submetidas a eletroforese.

3.4 Tratamento do RNA com DNase

Alíquotas de 10µg de RNA total foram tratadas com enzima DNaseI RNase-free 1U/µl (Promega, Madison – EUA) por 60 minutos a 37°C. O RNA foi precipitado com 125µL de etanol absoluto e 5,2µL de solução de acetato de sódio 2M, pH 4, a -20°C por 16 horas. As amostras foram, então, centrifugadas a 11.000 *g*, a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o RNA lavado com 200µl de etanol 75%. As amostras foram centrifugadas novamente

a 10.000 *g*, a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. O RNA foi seco e ressuspenso em 50µl de água livre de DNase e RNase.

3.5 RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

O cDNA foi sintetizado a partir de 10µg do RNA total extraído utilizando-se o kit High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, Foster City – EUA). Para 10µg de RNA foram utilizados 10µl de 10x RT Buffer, 4µl de 25x dNTP, 10µl de 10x Random Primers, 250 unidades da enzima Multiscribe RT e 100 unidades da enzima RNase OUT Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad – EUA). A reação ocorreu a 25°C por 10 minutos e em seguida a 42°C por 2 horas. Então, o cDNA sintetizado foi mantido a -70°C.

Para verificar a qualidade e a integridade do cDNA sintetizado, foi realizada uma reação de PCR (35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, mais um passo final de extensão de 72°C por 5 minutos) para os genes *β-microglobulina* e *GADPH* com 0,15µl de cada oligonucleotídeo numa concentração de 20µM, 2,5µl de tampão para PCR 10x (500nM de KCl, 100nM de Tris HCL, pH 8,3, 1mg/ml de gelatina e 15mM de MgCl₂), 2,5µl de dNTP 1250µM (Amersham Biosciences, Nova Jersey – EUA), 0,15µl de taq DNA polimerase 5U/µl (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad – EUA) e 2,5µl de cDNA diluído 1:10, no termociclador PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City – EUA). O produto final da reação foi

analisado em gel de agarose 2% em TBE 1x (89 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA, pH 8,5) com 2 µl de brometo de etídio.

As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados foram: *GAPDH* forward: 5'-CCT CCA AAA TCA AGT GGG GCG-3', reverse: 5'-GGG GCA GAG ATG ATG ACC CTT-3'; *β-microglobulina* forward: 5'-ATC CAG CGT ACT CCA AAG ATT CAG-3', reverse: 5'-AAA TTG AAA GTT AAC TTA TGC ACG C-3'

3.6 Real time PCR (qPCR)

A quantificação relativa dos transcritos diferencialmente expressos foi feita por PCR em tempo real utilizando oligonucleotídeos específicos para os transcritos dos genes *PHLDA1* e *PAWR*. Foram utilizados 12,5µl do kit Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City - EUA), 2,5µl do cDNA diluído 1:10 e 0,375µl de 20µM da seqüência forward e 0,225µl de 20µM da seqüência reverse do oligonucleotídeo para *PHLDA1*, ou 0,375µl de 2µM da seqüência forward e 0,375µl de 20µM da seqüência reverse do oligonucleotídeo para *PAWR*, ou 0,375µl de 20µM das seqüências forward e reverse dos oligonucleotídeos para *GAPDH*, *IGFR* ou *ITGB1*, para um volume final de 25µl. A reação de amplificação ocorreu sob as seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 55°C por 1 minuto. A amplificação e detecção dos fragmentos amplificados foi feita utilizando-se o GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied

Biosystems, Foster City - EUA). As reações foram feitas em duplicata para cada amostra e o gene utilizado como referência foi o *GADPH*.

A expressão relativa foi calculada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde Ct é o ciclo de início de quantificação do transcrito, ΔCt é o Ct do gene de interesse *PHLDA1* ou *PAWR* menos o Ct do gene referência (*GAPDH*), $\Delta\Delta Ct$ é o ΔCt médio da amostra de interesse menos ΔCt médio da amostra referência (amostra de célula mantida em soro normal ou transfectada com siRNA controle).

As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados foram: *PHLDA1* forward: 5'-CCA CAT CCA CAT CCA CAC TCT-3', reverse: 5'-AGG TGC TGC GGA GAA GCC GGT-3'; *PAWR* forward: 5'-CCA GAG AAG GGC AAG AGC TCG G-3', reverse: 5'-ATT GCA TCT TCT CGT TTC CGC-3'; *IGFR* forward: 5'-ACG TTC TTT CAG CAT CGA ACT-3', reverse: 5'-TAC TTC CTG ATG GGG ATT TTG-3'; *ITGB1* forward: 5'-TTC TTC CTG GAC TAT TGA AAT C-3'; reverse: 5'-AGA AAC TCT CAT CAT GCT CAT T-3'.

3.7 Western blot

Após os tratamentos, as células foram lavadas duas vezes com PBS e solubilizadas com tampão de lise (contendo 50mM de pirofosfato de sódio, 50mM de fosfato de sódio, 5mM de cloreto de sódio, 5mM de EDTA dissódico, 5mM de EGTA, 10mM de HEPES, 0,5% de Triton X100, 2mM de ortovanadato de sódio, 1mM de PMSF e 1µg/ml de aprotinina). A mistura foi deixada em gelo

por 15 minutos (com agitação a cada 5 minutos) e centrifugada a 17.000 *g* e 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo (o precipitado foi descartado) e a concentração protéica foi determinada através do método de Bradford (Pierce, Rockford – EUA).

20µg ou 50µg de proteína das amostras foi desnaturada com 6 µl de tampão de Laemmli (contendo 7,5% de Tris 2M – pH 6,8, 50% de SDS 10%, 5g de azul de bromofenol, 26% de glicerol e 16,5% de β-mercaptoetanol) a 95°C por 5 minutos. As amostras foram separadas por eletroforese a 100V por 2 horas em gel de SDS-PAGE 7,5% ou 10%. Foi utilizado o tampão de corrida Tris-Glicina com 10% de SDS. As proteínas foram, então, transferidas para membranas de nitrocelulose por eletroforese (15 V por 45 minutos) utilizando tampão Tris-Glicina com 2% de metanol no Trans-Blot Semi-Dry (BioRad, Hercules – EUA). As membranas foram coradas com Ponceau S (controle da transferência), lavadas com água destilada e bloqueadas em solução de 5% de leite desnatado em TBS-t (tampão TBS com 0,1% de tween 20) sob agitação, por 1 hora a temperatura ambiente. Então, foram lavadas com TBS-t por dez minutos e incubadas com o anticorpo primário diluído em 3% de albumina bovina (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis – EUA) em TBS-t a 4°C por 16 horas (anti-integrina β1 1:1000, anti-β-actina 1:1000, anti-ERα 1:500 ou anti-PHLDA1 1:200). Em seguida, foram lavadas três vezes por dez minutos com TBS-t e incubadas com o anticorpo secundário apropriado associado a

peroxidase (diluído 1:1000 em 3% de albumina bovina em TBS-t). O anticorpo anti- β -actina foi utilizado para a normalização dos resultados.

A detecção das proteínas na membrana foi realizada por quimioluminescência com o kit Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Pierce, Rockford – EUA) por 10 minutos a temperatura ambiente. E a revelação foi realizada com exposição da membrana a filme de raio-X (AGFA – Gevaert Argentina SA, Florencio Valera – Argentina) por 15 a 30 minutos a temperatura ambiente.

3.8 Análise Estatística

Os resultados foram analisados por teste t (Student), para amostras não pareadas, com o programa Microsoft® Office Excel® 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, EUA). Foram considerados valores significativamente diferentes, aqueles com $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do tratamento com 17 β -estradiol (E2) e ICI 182.780 (ICI) sobre a expressão dos transcritos dos genes *PHLDA1* e *PAWR*

Dados do laboratório mostraram que não houve diferença significativa na expressão dos genes *PHLDA1* e *PAWR* após tratamento das células com E2 nas concentrações 10^{-10} M (concentração fisiológica), 10^{-9} M ou 10^{-8} M (concentração farmacológica) de E2. Então, a concentração 10^{-8} M foi a escolhida para a continuação dos tratamentos por ser a mais utilizada na literatura.

Para verificar se o pré-tratamento com ICI por 1 hora seria suficiente para inativar o ER e induzir sua degradação, foi realizado um western blot para ER α com amostras de MCF-7 tratadas com E2 (10nM) por 1:30h, pré-tratadas com ICI (1 μ M) por 1h seguido por E2 (10nM) por 1:30h, ou tratadas com ICI (1 μ M) por 1:30h e 24h. Como se pode observar na figura 6A, o tratamento com E2 leva a uma diminuição de cerca de 2 vezes nos níveis de expressão do receptor ER α em relação ao ST, o pré-tratamento com ICI seguido por E2 leva a uma inibição de 5 vezes na expressão do receptor em relação ao ST, e o tratamento com ICI sozinho reduz a expressão do ER cerca de 7 vezes em relação do ST.

Esse resultado indica que o tempo de 1 hora de pré-tratamento com ICI é suficiente para levar à degradação do ER α .

Em seguida, as células MCF-7 foram tratadas com E2 (10nM), ICI (1 μ M) e ICI (1 μ M) por 1 hora seguido por E2 (10nM) por 2, 6 e 24 horas para determinar se a expressão dos genes *PHLDA1* e *PAWR* é regulada pelo E2, se essa regulação é via ER, e em qual tempo os tratamentos apresentam maior efeito sobre a regulação desses genes.

A expressão do *PHLDA1* não sofreu alteração significativa nas células mantidas em ST em relação às mantidas em SN (Figura 6B). Após tratamento com E2 foi observada uma indução na expressão desse gene em relação ao ST. Os tratamentos por 6 e 24h apresentaram aumento significativo do *PHLDA1* (2,25 $\pm$ 0,912 vs. 0,78 $\pm$ 0,189, $p\leq 0,05$; 1,67 $\pm$ 0,537 vs. 0,78 $\pm$ 0,189, $p\leq 0,05$, respectivamente), e o tempo de 6h foi o que resultou em maior indução desse gene. Os tratamentos com ICI inibiram a expressão do *PHLDA1* em relação aos tratamentos com E2 (ICI-2h vs. E2-2h: 0,36 $\pm$ 0,086 vs. 1,61 $\pm$ 0,671, $p\leq 0,05$; ICI-6h vs. E2-6h: 0,35 $\pm$ 0,074 vs. 2,25 $\pm$ 0,912, $p\leq 0,05$), e em relação ao ST ($p\leq 0,05$). O pré-tratamento por 1h com ICI, seguido pelo tratamento com E2 por 2h e 6h resultou em inibição da resposta ao hormônio, com redução significativa na expressão do *PHLDA1* em relação ao tratamento com E2 (ICI+E2-2h vs. E2-2h: 0,50 $\pm$ 0,162 vs. 1,61 $\pm$ 0,671, $p\leq 0,05$; ICI+E2-6h vs. E2-6h: 0,58 $\pm$ 0,260 vs. 2,25 $\pm$ 0,912, $p\leq 0,05$). Já o pré-tratamento por 1h com ICI, seguido pelo tratamento com E2 por 24h resultou numa tendência de diminuição, não

significativa, na expressão do RNAm do *PHLDA1* em relação ao tratamento apenas com E2 por 24h.

A expressão do *PAWR* sofreu uma indução significativa ($p \leq 0,05$) de aproximadamente 2 vezes nas células mantidas em ST em relação às mantidas em SN (Figura 6C). Os tratamentos com E2 inibiram a expressão do *PAWR* em relação ao ST, e o tempo de maior inibição foi o de 24 horas ($1,15 \pm 0,126$ vs. $2,12 \pm 0,165$, $p \leq 0,05$). A expressão do *PAWR* após 2h e 6h de tratamento com ICI e após pré-tratamento com ICI por 1h seguido de E2 por 2h e 6h não apresentou diferença em relação aos tratamentos com E2. Porém, após tratamento com ICI por 24h e pré-tratamento por 1h com ICI seguido por E2 por 24 horas, a expressão deste gene sofreu uma indução significativa em relação ao tratamento com E2 ($5,46 \pm 0,201$ vs. $1,15 \pm 0,126$, $p \leq 0,05$; $4,09 \pm 0,128$ vs. $1,15 \pm 0,126$, $p \leq 0,05$, respectivamente) e em relação ao ST ($5,46 \pm 0,201$ vs. $2,12 \pm 0,165$, $p \leq 0,05$; $4,09 \pm 0,128$ vs. $2,12 \pm 0,165$, $p \leq 0,05$, respectivamente).

Portanto, os melhores tempos de tratamento com E2, ICI e ICI mais E2 para avaliar o efeito do E2 sobre a expressão dos transcritos dos genes *PHLDA1* e *PAWR* são de 6h e 24h, respectivamente.

4.2 Efeito do tratamento com IGF-I sobre a expressão dos transcritos dos genes *PHLDA1* e *PAWR*

Com o objetivo de avaliar o efeito do IGF-I na expressão relativa dos genes *PHLDA1* e *PAWR*, as células MCF-7 foram tratadas com 50nM de IGF-I por 0,5, 1,5, 3, 6, 12 e 24 horas.

As células mantidas em ST não apresentaram alteração significativa na expressão do *PHLDA1* em relação às mantidas em SN (Figura 7A). O tratamento com IGF-I resultou em indução tempo dependente na expressão dos transcritos de *PHLDA1* nas células MCF-7. Após 1,5h ($5,94 \pm 0,786$), 3h ($6,75 \pm 2,970$) e 6h ($3,60 \pm 0,202$) de tratamento com IGF-I houve aumento significativo na expressão do *PHLDA1* em relação às células mantidas em ST ($1,62 \pm 0,464$) ($p \leq 0,05$). Após 12h e 24h de tratamento, a expressão foi semelhante à observada no ST e no SN.

A expressão do gene *PAWR* (Figura 7B) aumentou aproximadamente 3,5 vezes nas células mantidas em ST, em relação às mantidas em SN ($p \leq 0,05$). O tratamento com IGF-I também resultou em resposta tempo dependente para a expressão do *PAWR*. Após 30 minutos e 1,5h de tratamento com IGF-I, o *PAWR* apresentou uma tendência de aumento de expressão em relação ao ST. Com 3h de tratamento, a expressão do *PAWR* foi semelhante à do ST. A partir de 6h a expressão foi significativamente menor que a do ST e diminuiu até chegar ao nível de expressão observado no SN (IGF-6h vs. ST: $1,50 \pm 0,593$ vs. $3,76 \pm 0,766$, $p \leq 0,05$; IGF-12h vs. ST: $1,17 \pm 0,433$ vs. $3,76 \pm 0,766$, $p \leq 0,05$; IGF-

24h vs. ST: $1,11 \pm 0,328$ vs. $3,76 \pm 0,766$, $p \leq 0,05$). Portanto, com esse experimento, foi possível determinar que o IGF-I regula a expressão dos genes *PHLDA1* e *PAWR*, e que os tempos de tratamento com IGF-I que mais afetam a expressão dos transcritos do *PHLDA1* e do *PAWR* são 1:30h e 24h, respectivamente.

O próximo experimento realizado teve como objetivo determinar qual concentração de IGF-I deveria ser usada para se obter o melhor efeito sobre a expressão dos genes *PHLDA1* e *PAWR*. As células MCF-7 foram tratadas com IGF-I nas concentrações 6,25nM, 12,5nM e 50nM por 1:30h.

Os resultados obtidos, representados na figura 8, mostram que a expressão do gene *PHLDA1* sofreu uma indução significativa, em relação ao ST, após tratamento das células com 6,25nM ($1,78 \pm 0,453$ vs. $0,78 \pm 0,131$, $p \leq 0,05$), 12,5nM ($2,72 \pm 0,578$ vs. $0,78 \pm 0,131$, $p \leq 0,05$) e 50nM de IGF-I ($3,23 \pm 0,892$ vs. $0,78 \pm 0,131$, $p \leq 0,05$) (Figura 8A). A expressão do gene *PAWR* não sofreu alteração após os tratamento com 6,25nM, 12,5nM e 50nM de IGF-I, em relação ao ST (figura 8B).

Como a diferença na expressão do *PHLDA1* após tratamento com 12,5nM e com 50nM de IGF-I é muito pequena, foi determinado que nos próximos experimentos as células seriam tratadas com 12,5nM de IGF-I.

4.3 Interação entre IGF-I e ER sobre a expressão dos transcritos dos genes *PHLDA1* e *PAWR*

Para avaliar a possível interação entre o IGF-I e o ER na regulação dos genes *PHLDA1* e *PAWR*, as células MCF-7 foram tratadas com IGF-I (12,5nM), E2 (10nM), IGF-I (12,5nM) mais E2 (10nM), ou por 1h com ICI (1μM) seguido por IGF-I (12,5nM) por 1:30h, 6h e 24h,

Os tratamentos com E2, IGF-I e IGF-I mais E2 por 1:30h e 6h resultaram em aumento significativo na expressão de *PHLDA1* em relação ao ST ($p \leq 0,05$) (Figura 9A). Porém, não foi observado sinergismo entre IGF-I e E2 após 1:30h e 6h de tratamento. Os tratamentos concomitantes de E2 e IGF-I por 1:30h e 6h resultaram em expressão de *PHLDA1* semelhante à observada após tratamento com IGF-I sozinho pelos mesmos tempos (IGF+E2-1:30h vs. IGF-1:30h: $4,36 \pm 1,032$ vs. $4,81 \pm 1,334$; IGF+E2-6h vs. IGF-6h: $4,00 \pm 0,333$ vs. $3,60 \pm 0,202$). O pré-tratamento por 1h com ICI seguido por IGF-I por 1:30h resultou em expressão gênica de *PHLDA1* significativamente maior do que a observada no ST ($p \leq 0,05$), e semelhante à observada nas amostras tratadas com IGF-I sozinho, ou com E2 mais IGF-I. E o tratamento com ICI sozinho por 1:30h resultou em expressão de *PHLDA1* semelhante à do ST e significativa menor que a do IGF-I, IGF mais E2 e ICI mais IGF ($p \leq 0,05$).

Para verificar se o efeito dos tratamentos com E2 e IGF-I observado na expressão dos transcritos do *PHLDA1* se reflete na expressão da proteína *PHLDA1*, foi realizado um western blot com amostras de MCF-7 mantidas em

ST e tratadas com E2 (10nM) ou IGF-I (12,5nM) por 1:30h. O tratamento das células MCF-7 com E2 por 1:30h apresentou um aumento de 3 vezes na expressão de PHLDA1 em relação ao ST (Figura 9B). A expressão de PHLDA1 observada após tratamento com IGF-I por 1:30h foi 6,5 vezes maior que a observada no ST e 5 vezes maior que a observada após tratamento com E2. Porém, assim como observado com a expressão gênica, não ocorreu sinergismo entre E2 e IGF-I para a expressão protéica do PHLDA1. O tratamento concomitante de E2 e IGF-I por 1:30h resultou em expressão protéica de PHLDA1 igual à observada após tratamento com IGF-I sozinho por 1:30h, e menor que a observada após tratamento com E2 sozinho por 1:30h.

Os tratamentos com E2, IGF-I e IGF-I mais E2 por 24h resultaram em diminuição significativa na expressão de *PAWR* em relação ao ST ($p \leq 0,05$) (Figura 9C). Mas diferentemente do que ocorreu com a expressão do *PHLDA1*, o tratamento por 24h com IGF-I apresentou sinergismo com o E2 resultando em diminuição significativa na expressão do gene *PAWR* em relação aos tratamentos com IGF-I e E2 sozinhos ($0,61 \pm 0,128$ vs. $1,09 \pm 0,166$, $p \leq 0,05$; $0,61 \pm 0,128$ vs. $1,50 \pm 0,345$, $p \leq 0,05$, respectivamente). O pré-tratamento por 1h com ICI seguido por IGF-I por 24h não alterou a expressão do *PAWR* em relação ao IGF-I sozinho, mas foi significativamente maior que a observada após tratamento concomitante de E2 e IGF ($1,08 \pm 0,222$ vs. $0,61 \pm 0,128$, $p \leq 0,05$). O tratamento com ICI sozinho por 24h resultou em expressão de *PAWR* semelhante à observada no ST, e maior do que a observada após tratamento com E2 ($2,70 \pm 0,289$ vs. $1,50 \pm 0,345$, $p \leq 0,05$), IGF-I ($2,70 \pm 0,289$ vs.

1,13±0,148, $p\leq 0,05$), IGF mais E2 (2,70±0,289 vs. 0,61±0,128, $p\leq 0,05$) e ICI mais IGF-I (2,70±0,289 vs. 1,08±0,222, $p\leq 0,05$).

Como o tratamento com IGF-I mais E2 apresentou efeito sinérgico sobre o controle da expressão do PAWR, e como o pré-tratamento com ICI não interferiu no efeito do IGF-I, foi analisado o efeito do E2 sobre a expressão do gene IGFR (gene que codifica para o receptor IGF-IR). O nível de expressão do IGF-IR (receptor de IGF-I) nas células tratadas com E2 por 1:30h apresenta uma leve tendência de aumento em relação ao ST, porém não significativa (Figura 10). Após 24h de tratamento com E2, a expressão do IGFR é igual à observada no ST.

4.4 Determinação das vias de sinalização através das quais o IGF-I regula a expressão dos transcritos dos genes *PHLDA1* e *PAWR*

Para determinar por qual via o IGF-I altera a expressão dos genes *PHLDA1* e *PAWR*, as células MCF-7 foram tratadas por 1:30h e 24h com IGF-I (12,5nM) e com o inibidor da PI-3K, LY294002 (LY, 30μM), ou com o inibidor da p38MAPK, SB202190 (SB, 30μM).

A expressão do gene *PHLDA1* sofreu um aumento significativo após tratamento por 1:30h com IGF-I em relação ao ST (4,09±0,711 vs. 1,18±0,369, $p\leq 0,05$) (Figura 11A). Os pré-tratamentos por 1h com os inibidores (LY ou SB) e então com IGF-I por 1:30h não afetaram o estímulo do IGF-I sobre a expressão

do *PHLDA1* em relação ao tratamento com IGF-I sozinho ($3,33 \pm 0,117$ vs. $4,09 \pm 0,711$; $3,62 \pm 0,461$ vs. $4,09 \pm 0,711$). E os tratamentos com os inibidores sozinhos por 1:30h resultaram em expressão do *PHLDA1* semelhante à do ST.

O gene *PAWR* sofreu uma diminuição significativa na sua expressão, após tratamento com IGF-I por 24h em relação ao ST ($1,13 \pm 0,148$ vs. $3,70 \pm 1,255$, $p \leq 0,05$) (Figura 11B). O pré-tratamento por 1h com LY seguido por tratamento com IGF-I por 24h inibiu o efeito do IGF-I sobre a expressão do *PAWR*, resultando em aumento significativo na expressão deste gene em relação ao tratamento com IGF-I ($5,86 \pm 0,480$ vs. $1,13 \pm 0,148$, $p \leq 0,05$), assim como em relação ao ST ($5,86 \pm 0,480$ vs. $3,70 \pm 1,255$, $p \leq 0,05$). Efeito semelhante foi observado após o tratamento com LY sozinho, aumento significativo na expressão do *PAWR* em relação ao tratamento com IGF-I por 24h ($8,59 \pm 0,987$ vs. $1,13 \pm 0,148$, $p \leq 0,05$) e ao ST ($8,59 \pm 0,987$ vs. $3,70 \pm 1,255$, $p \leq 0,05$). O pré-tratamento por 1h com SB seguido por IGF-I por 24h e o tratamento com SB sozinho por 24h resultaram em aumento significativo na expressão do *PAWR* em relação ao tratamento com IGF por 24h ($1,77 \pm 0,328$ vs. $1,13 \pm 0,148$, $p \leq 0,05$; $2,54 \pm 0,479$ vs. $1,13 \pm 0,148$, $p \leq 0,05$, respectivamente). Porém, o pré-tratamento com SB não inibiu completamente o efeito do IGF-I, pois a expressão do *PAWR* foi significativamente menor que a observada no ST ($1,77 \pm 0,328$ vs. $3,70 \pm 1,255$, $p \leq 0,05$)

4.5 Efeito da integrina $\beta 1$ sobre a expressão dos transcritos dos genes *PHLDA1* e *PAWR*

Para avaliar o efeito da integrina $\beta 1$ na expressão dos genes *PHLDA1* e *PAWR* pelas células MCF-7, foi utilizada a técnica de siRNA para inibir a expressão da integrina $\beta 1$.

Para a padronização da técnica de siRNA para integrina $\beta 1$, células MCF-7 foram transfectadas com 40nM de siRNA para integrina $\beta 1$ (si $\beta 1$) ou 40nM de siRNA controle negativo (siC) e mantidas em cultura por 48 horas após a transfecção. Então, foi verificado o nível de inibição da expressão dos transcritos do gene *ITGB1* (gene que codifica para a proteína integrina $\beta 1$) e da proteína integrina $\beta 1$.

A transfecção com siC não alterou a expressão do RNAm do gene *ITGB1* e da proteína integrina $\beta 1$ (Figura 12A e B). Após transfecção com si $\beta 1$, a expressão de *ITGB1* sofreu inibição de aproximadamente 80% em relação ao siC (Figura 12A), e a expressão da integrina $\beta 1$ foi indetectável (Figura 12B).

Para determinar quanto tempo dura a inibição gênica e protéica da integrina $\beta 1$ após transfecção com o siRNA, as células foram transfectadas com siC e si $\beta 1$ e mantidas em cultura por 24h, 48h, 72h e 96h.

As células expressaram 65% menos RNAm de *ITGB1* após 24h da

transfecção com siβ1, em relação ao siC. A maior inibição na expressão deste gene se deu após 48h de transfecção com o siβ1 (90% de inibição). Depois de 72h, a expressão do *ITGB1* foi 80% menor que a do siC, e com 96h de exposição a inibição foi de 65% (Figura 13A).

Após 24h de transfecção com siβ1 não houve redução na expressão da proteína integrina β1 (Figura 13B). Mas após 48h, 72h e 96h de transfecção com siβ1 a expressão protéica da integrina β1 foi indetectável.

Esse experimento também foi utilizado para determinar o efeito da integrina β1 sobre a expressão dos transcritos dos genes *PHLDA1* e *PAWR*. Como se pode observar na figura 14A, a expressão dos transcritos do *PHLDA1* diminui de forma tempo dependente nas células transfectadas com siβ1, a partir de 24h de transfecção, até voltar ao mesmo nível observado nas células transfectadas com siC após 96h de transfecção. A maior inibição na expressão do *PHLDA1*, de aproximadamente 65%, foi obtida após 48h de transfecção com siβ1.

A expressão dos transcritos do *PAWR* sofreu inibição de 50% após 24h de transfecção com siβ1, em relação à transfecção com siC (Figura 14B). Essa inibição foi mantida até 72h depois da transfecção com siβ1, em relação ao siC. E após 96h de transfecção com siβ1, a expressão do *PAWR* voltou ao mesmo nível observado nas células transfectadas com siC.

4.6 Interação entre o IGF-I e a integrina $\beta 1$ sobre a expressão dos transcritos dos genes *PHLDA1* e *PAWR*

Para determinar a ocorrência de interação entre o IGF-I e a integrina $\beta 1$ na regulação dos genes *PHLDA1* e *PAWR*, as células MCF-7 foram transfectadas com siC ou com si $\beta 1$ e 24h após a transfecção, o meio de cultura foi trocado por meio RPMI sem vermelho de fenol suplementado com 5% de FBS tratado. As células foram mantidas nessa condição por 48h, e então tratadas com IGF-I 12,5nM por 1:30h e 24h.

A expressão do *ITGB1* apresentou tendência de aumento, em relação ao ST, nas células não transfectadas com siRNA tratadas com IGF-I por 1:30h e retornou ao nível do ST após 24h de tratamento com IGF-I (Figura 15A). O mesmo não foi observado com os níveis de expressão da proteína. Não foi observada alteração na expressão protéica da integrina $\beta 1$ na células não transfectadas mantidas em SN, ST, ou tratadas com IGF-I por 1:30h e 24h (Figura 15C).

A transfecção com si $\beta 1$ resultou em 80% de inibição da expressão do *ITGB1* em relação à transfecção com siC (Figura 15B). O tratamento com IGF-I por 1:30h ou 24h não interferiu na inibição da expressão da integrina $\beta 1$ nas células transfectadas com si $\beta 1$ em relação às transfectadas com siC. A inibição do *ITGB1* nas células transfectadas com si $\beta 1$ e tratadas com IGF-I por 1:30h foi de 65%, em relação às transfectadas com siC e tratadas com IGF-I por 1:30h.

Nas células transfectadas com si β 1 e tratadas com IGF-I por 24h, a inibição do ITGB1 foi de 80%, em relação às transfectadas com siC e tratadas com IGF-I por 24h.

Já a expressão protéica da integrina β 1 foi inibida completamente após a transfecção com si β 1 em relação à transfecção com siC (Figura 15C). Os tratamentos com IGF-I por 1:30h e 24h nas células transfectadas com si β 1 não interferiram na inibição protéica da integrina β 1 pelo siRNA, em relação às células transfectadas com siC e tratadas com IGF-I pelos mesmos tempos.

O tratamento com IGF-I por 1:30h e 24h não alterou a expressão do gene *IGFR* (Figura 16A). Da mesma forma, a inibição da integrina β 1 não influencia na expressão do *IGFR* (Figura 16B). O tratamento com IGF-I por 1:30h nas células transfectadas com siC ou si β 1 resultou em inibição significativa (cerca de 1,3 vez, $p \leq 0,05$) na expressão do *IGFR*, em relação às células transfectadas com siC e não tratadas com IGF-I. O tratamento com IGF-I por 24h nas células transfectadas com siC ou si β 1 também resultou em inibição significativa na expressão do *IGFR*, em relação às células transfectadas com siC (cerca de 2 vezes, $p \leq 0,05$) ou si β 1 (cerca de 2,5 vezes, $p \leq 0,05$) e não tratadas com IGF-I.

Houve diminuição significativa ($p \leq 0,05$) de cerca de 1,5 vez na expressão do *PHLDA1* após a transfecção com si β 1, em relação ao siC (Figura 17A). A expressão dos transcritos do *PHLDA1* foi semelhante entre as células transfectadas com siC e si β 1 e tratadas com IGF-I por 1:30h, e foi significativamente maior nessas células quando comparadas às células apenas transfectadas com siC (cerca de 1,8 e 1,6 vez, respectivamente, $p \leq 0,05$,) ou

si β 1 ($1,83 \pm 0,331$ vs. $0,64 \pm 0,162$, $p \leq 0,05$; $1,64 \pm 0,346$ vs. $0,64 \pm 0,162$, $p \leq 0,05$, respectivamente), sem tratamento.

A expressão do gene *PAWR* diminuiu significativamente nas células transfectadas com si β 1 em relação às transfectadas com siC (aproximadamente 1,8 vez, $p \leq 0,05$) (Figura 17B). O tratamento com IGF-I por 24h nas células transfectadas com siC e si β 1 resultou em diminuição significativa na expressão do *PAWR* comparada à expressão nas células transfectadas com siC apenas (respectivamente 2,3 vezes, $p \leq 0,05$, e 4,2 vezes, $p \leq 0,05$). O tratamento com IGF-I por 24h, nas células transfectadas com si β 1, resultou em uma tendência de diminuição da expressão de *PAWR*, quando comparada à expressão nas células transfectadas com si β 1 apenas ou transfectadas com siC e em seguida tratadas com IGF-I por 24h, porém essa diferença não foi significativa.

Figura 6: Efeito do E2 e do ICI na expressão dos transcritos dos genes *PHLDA1* (**A**) e *PAWR* (**B**) e na expressão protéica do ERα (**C**). Os transcritos dos genes *PHLDA1* e *PAWR* foram dosados por PCR em tempo real nas células MCF-7 mantidas em SN, ST ou tratadas com E2 (10nM), ICI (1μM) e pré-tratadas por 1h com ICI (1μM) seguido de E2 (10nM) por 2, 6 e 24 horas. Os valores representam a média de três experimentos, e as barras, o desvio padrão. ** p≤0,05 em relação ao SN; * p≤0,05 em relação ao ST; + p≤0,05 em relação ao E2 pelos respectivos tempos. A expressão protéica do ERα e da β-actina (utilizada como controle de massa) foi avaliada por western blot em amostras de MCF-7 mantidas em ST, tratadas com E2 (10nM) por 1:30h, pré-tratadas por 1h com ICI (1μM) seguido de E2 (10nM) por 1:30h, ou tratadas com ICI (1μM) por 1:30h ou 24h.

Figura 7: Efeito do IGF-I sobre a expressão relativa dos transcritos dos genes *PHLDA1* (A) e *PAWR* (B) em diferentes tempos. A expressão relativa dos transcritos dos genes *PHLDA1* e *PAWR* foi dosada por PCR em tempo real nas células MCF-7 mantidas em SN, ST ou tratadas com IGF-I (50nM) por 0,5, 1,5, 3, 6, 12 e 24 horas. Os valores representam a média de três experimentos, e as barras, o desvio padrão. ** $p \leq 0,05$ em relação ao SN; * $p \leq 0,05$ em relação ao ST.

Figura 8: Efeito de diferentes concentrações de IGF-I sobre a expressão relativa dos transcritos dos genes *PHLDA1* (A) e *PAWR* (B). A expressão relativa dos transcritos dos genes *PHLDA1* e *PAWR* foi dosada por PCR em tempo real nas células MCF-7 mantidas em SN, ST ou tratadas com IGF-I 6,25nM, 12,5nM ou 50nM por 1,5 hora. Os valores representam a média de três experimentos, e as barras, o desvio padrão. ** $p \leq 0,05$ em relação ao SN, * $p \leq 0,05$ em relação ao ST.

Figura 9: Efeito da interação entre as vias do E2 e do IGF-I sobre a expressão relativa dos transcritos dos genes *PHLDA1* (**A**) e *PAWR* (**C**) e sobre a expressão protéica de PHLDA1 (**B**). A expressão relativa dos transcritos dos genes *PHLDA1* e *PAWR* foi dosada por PCR em tempo real nas células MCF-7 mantidas em SN ou ST, tratadas com IGF-I 12,5nM, E2 10nM, IGF-I (12,5nM) mais E2 (10nM) e pré-tratadas por 1h com ICI (1μM) seguido por IGF-I (12,5nM) por 1,5, 6 ou 24 horas. Os valores representam a média de três experimentos, e as barras, o desvio padrão. ** $p \leq 0,05$ em relação ao SN, * $p \leq 0,05$ em relação ao ST, + $p \leq 0,05$ em relação ao E2, # $p \leq 0,05$ em relação ao IGF, † $p \leq 0,05$ em relação ao ICI + IGF. A expressão protéica de PHLDA1 foi avaliada por western blot para PHLDA1 e β-actina (controle de massa) em amostras de MCF-7 mantidas em ST, ou tratadas com E2 (10nM), IGF-I (12,5nM) e E2 (10nM) mais IGF-I (12,5nM) por 1:30h.

Figura 10: Efeito do E2 sobre a expressão relativa dos transcritos do gene *IGFR*. A expressão relativa dos transcritos do gene *IGFR* foi dosada por PCR em tempo real nas células MCF-7 mantidas em SN ou ST, tratadas com E2 (10nM) por 1,5 ou 24 horas. Os valores representam a média de três experimentos, e as barras, o desvio padrão. ** $p \leq 0,05$ em relação ao SN, * $p \leq 0,05$ em relação ao ST, + $p \leq 0,05$ em relação ao E2.

Figura 11: Avaliação das vias de sinalização responsáveis pelo efeito do IGF-I sobre a expressão relativa dos transcritos dos genes *PHLDA1* (A) e *PAWR* (B). A expressão relativa dos transcritos dos genes *PHLDA1* e *PAWR* foi dosada por PCR em tempo real nas células MCF-7 mantidas em SN, ST, tratadas com IGF-I (12,5nM), ou pré-tratadas por 1h com LY294002 (30µM) ou SB202190 (30µM) seguidos por IGF-I (12,5nM) por 1:30h ou 24h. Os valores representam a média de três experimentos, e as barras, o desvio padrão. ** $p \leq 0,05$ em relação ao SN; * $p \leq 0,05$ em relação ao ST; + $p \leq 0,05$ em relação ao IGF; # $p \leq 0,05$ em relação ao IGF+LY.

Figura 12: Nível de expressão da integrina $\beta 1$ após 48h de transfecção de siRNA controle negativo (siC) ou siRNA para integrina $\beta 1$ (si $\beta 1$) nas células MCF-7. **A:** A expressão relativa dos transcritos do gene *ITGB1* foi dosada por PCR em tempo real nas células MCF-7 mantidas em SN, transfectada com siC ou transfectada com si $\beta 1$. Os valores representam um experimento. **B:** Avaliação da expressão protéica da integrina $\beta 1$ e da β -actina por western blot em amostras de MCF-7 mantidas em SN, transfectada com siC, transfectada com si $\beta 1$ e em amostra de MDA-MB-231 (utilizada como controle positivo). Banda superior da integrina $\beta 1$: 130kDa, proteína não reduzida; Banda inferior da integrina $\beta 1$: 115kDa, proteína reduzida.

Figura 13: Expressão da integrina $\beta 1$ após 24h, 48h, 72h e 96h de transfecção de siRNA controle negativo (siC) ou siRNA para integrina $\beta 1$ (si $\beta 1$) nas células MCF-7. **A:** A expressão relativa dos transcritos do gene *ITGB1* foi dosada por PCR em tempo real nas células MCF-7 mantidas em SN ou após 24h, 48h, 72h e 96h da transfecção com siC ou si $\beta 1$. Os valores representam um experimento. **B:** Avaliação da expressão protéica da integrina $\beta 1$ e da β -actina (controle de massa) por western blot em amostras de MCF-7 mantidas em SN ou após 24h, 48h, 72h e 96h da transfecção com siC ou si $\beta 1$.

Figura 14: Expressão dos transcritos de *PHLDA1* e *PAWR* após 24h, 48h, 72h e 96h de transfecção de siRNA controle negativo (siC) ou siRNA para integrina $\beta 1$ (si $\beta 1$) nas células MCF-7. A expressão relativa dos transcritos dos genes *PHLDA1* (A) e *PAWR* (B) foi dosada por PCR em tempo real nas células MCF-7 mantidas em SN ou após 24h, 48h, 72h e 96h da transfecção com siC ou si $\beta 1$. Os valores representam um experimento.

Figura 15: Expressão gênica e protéica da integrina $\beta 1$ após transfecção de siRNA controle negativo (siC) ou siRNA para integrina $\beta 1$ (si $\beta 1$) seguida por tratamento com IGF-I nas células MCF-7. A expressão relativa dos transcritos do gene *ITGB1* foi dosada por PCR em tempo real nas células MCF-7 mantidas em SN, ST ou tratadas com IGF-1 (12,5nM) por 1:30h e 24h (**A**) e nas MCF-7 após 96h da transfecção com siC ou si $\beta 1$, ou tratadas com IGF-I (12,5nM) por 1:30h e 24h após 72h da transfecção com siC ou si $\beta 1$ (**B**). Os valores representam a média de três experimentos, e as barras, o desvio padrão. ** $p < 0,05$ em relação ao SN; * $p < 0,05$ em relação ao siC respectivo. **C:** Avaliação da expressão protéica da integrina $\beta 1$ e da β -actina (controle de massa) por western blot em amostras de MCF-7 mantidas em SN, ST, tratadas com IGF-1 (12,5nM) por 1:30h e 24h, após 96h da transfecção com siC ou si $\beta 1$, ou tratadas com IGF-I (12,5nM) por 1:30h e 24h após 72h da transfecção com siC ou si $\beta 1$.

Figura 16: Expressão dos transcritos do gene *IGFR* após transfecção de siRNA controle negativo (siC) ou siRNA para integrina $\beta 1$ (si $\beta 1$) seguida por tratamento com IGF-I nas células MCF-7. A expressão relativa dos transcritos do gene *IGFR* foi dosada por PCR em tempo real nas células MCF-7 mantidas em SN, ST ou tratadas com IGF-1 (12,5nM) por 1:30h e 24h (A) e nas MCF-7 após 96h da transfecção com siC ou si $\beta 1$, ou tratadas com IGF-I (12,5nM) por 1:30h e 24h após 72h da transfecção com siC ou si $\beta 1$ (B). Os valores representam a média de três experimentos, e as barras, o desvio padrão. * $p < 0,05$ em relação ao siC; + $p < 0,05$ em relação ao si $\beta 1$.

Figura 17: Efeito da integrina $\beta 1$ e interação entre o IGF-I e a integrina $\beta 1$ sobre a expressão relativa dos transcritos dos genes *PHLDA1* (**A**) e *PAWR* (**B**). A expressão relativa dos transcritos dos genes *PHLDA1* e *PAWR* foi dosada por PCR em tempo real nas células MCF-7 após 96h da transfecção com siC ou siβ1, ou tratadas com IGF-I (12,5nM) por 1:30h e 24h após 72h da transfecção com siC ou siβ1. Os valores representam a média de três experimentos, e as barras, o desvio padrão. * $p \leq 0,05$ em relação ao siC; + $p \leq 0,05$ em relação ao siβ1. **C:** Avaliação da expressão protéica da integrina $\beta 1$ e da β -actina (controle de massa) por western blot em amostras de MCF-7 após 96h da transfecção com siC ou siβ1, ou tratadas com IGF-I (12,5nM) por 1:30h e 24h após 72h da transfecção com siC ou siβ1.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

As vias de sinalização ativadas pelas integrinas, fatores de crescimento e estrógenos são essenciais para a manutenção da homeostase de crescimento e diferenciação da glândula mamária, por controlar proliferação e sobrevivência celular. Mais especificamente, as vias de sinalização do ER, do IGF-I e da integrina $\beta 1$ são importantes no desenvolvimento do câncer de mama. Além disso, interações entre essas vias já foram descritas em células de câncer de mama e em outros sistemas celulares. Em tumores de mama e em linhagens de células tumorais de mama ER-positivas, a co-expressão de ER α e IGF-IR resulta em sinergismo entre E2 e IGF-I na estimulação da proliferação celular (Mawson et al., 2005; Sisci, Surmacz, 2007). Já interações entre IGF-IR e integrina $\beta 1$ controlam adesão, migração e proliferação em diferentes linhagens celulares (Tai et al., 2003; Goel et al., 2004; Goel et al., 2005).

A homeostase tecidual é adquirida e mantida pelo balanço entre sinais de proliferação e morte celular, os quais se encontram freqüentemente alterados em diversas patologias, como no câncer. A apoptose é fundamental na manutenção da quantidade adequada de células em um organismo, e de acordo com Hanahan e Weinberg (2000) a resistência à apoptose é uma das 6 características adquiridas pela célula durante a transformação maligna. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar a possível interação entre o ER, o IGF-I e a integrina $\beta 1$ na regulação da expressão dos transcritos de dois genes

relacionados com apoptose, o *PHLDA1* e o *PAWR*, nas células de câncer de mama MCF-7.

O tratamento das células MCF-7 com E2, IGF-I ou siRNA para integrina $\beta 1$ mostrou que o *PHLDA1* é regulado pelos três fatores, porém não foi observada interação entre as três vias na regulação deste gene. Foi verificado que o aumento da expressão dos transcritos de *PHLDA1* causado pelo E2 depende da ativação do ER, mas não foi possível determinar a via responsável pelo mesmo efeito causado pelo IGF-I.

A expressão dos transcritos de *PAWR* foi inibida pelos tratamentos com E2 e com IGF-I em MCF-7. O efeito do tratamento com E2 sobre a expressão do *PAWR* depende da ativação do ER pelo E2, e o efeito do tratamento com IGF-I ocorre através da ativação da via da PI3-K e em parte através da ativação da via da p38MAPK. Assim como observado para a expressão do *PHLDA1*, a repressão da expressão da integrina $\beta 1$ causa uma diminuição na expressão do RNAm do *PAWR*, portanto a integrina $\beta 1$ possui um papel na regulação da expressão desses genes. Por fim, o efeito do tratamento com IGF-I sobre a expressão do *PAWR* não foi dependente da ativação do ER pelo IGF-I, mas foi observado sinergismo no tratamento simultâneo com E2 e IGF-I por 24h na regulação da expressão desse gene. O tratamento conjunto com E2 e IGF-I resultou em diminuição maior na expressão do *PAWR* quando comparada à observada após os tratamentos com E2 e IGF-I sozinhos. Esse sinergismo pode ser resultado de um aumento na expressão protéica de IGFR, pois foi observada uma tendência ao aumento na expressão gênica de *IGFR* nas

células tratadas com E2 por 1:30h. É possível que esse pequeno aumento observado tenha sido suficiente para aumentar o nível de proteína expressa resultando em uma resposta mais intensa ao tratamento com IGF-I

A regulação do *PHLDA1* pelo E2 através da ativação do ER era um resultado esperado devido à presença de uma palíndrome imperfeita de ERE, diversas meias palíndromes de ERE e um sítio AP-1 e três SP-1 na região promotora desse gene (Marchiori et al., in press). No entanto, a regulação positiva pelo E2 parece ser contraditória com a função pró-apoptótica descrita para o *PHLDA1* na literatura e com o efeito de proliferação induzido pelo ER. Ainda não existem trabalhos na literatura descrevendo a função do *PHLDA1* no câncer de mama, no entanto, Nagai et al. (2007) relataram que pacientes com tumor de mama positivo para *PHLDA1* tem melhor prognóstico do que pacientes com tumor *PHLDA1* negativo, resultado que sugere efeito pró-apoptótico de *PHLDA1* em tumor de mama. Portanto, é possível que o aumento da expressão do *PHLDA1* pela ativação do ER seja um efeito protetor contra um estímulo proliferativo exacerbado iniciado pelo próprio ER.

A regulação positiva pelo IGF-I sobre a expressão dos transcritos de *PHLDA1* também é aparentemente contraditória, já que um dos efeitos da ativação do IGF-IR pelo IGF-I é a inibição da apoptose, principalmente através da via PI3-K/Akt (Ryan, Goss, 2008).

O efeito de inibição do *PHLDA1* e do *PAWR* pela supressão da integrina $\beta 1$ é tempo dependente e foi rapidamente revertido por fatores presentes no

FBS. Após 96h de transfecção, a expressão dos dois genes nas células mantidas em SN e transfectadas com si β 1 foi igual à expressão nas transfectadas com siC; porém, nas células mantidas em ST, a expressão do *PHLDA1* e do *PAWR* após 96h de transfecção com si β 1 foi menor do que após 96h de transfecção com siC.

O efeito da integrina β 1 sobre a expressão dos transcritos do *PHLDA1* e do *PAWR* parece ser contraditório devido à função pró-apoptótica desses genes. Como uma das principais funções da integrina β 1 na mama é a indução de proliferação (White et al., 2004; Li et al., 2005), não é esperado que ela induza a expressão de genes pró-apoptóticos, como descrito aqui. Porém, já foi visto que a inibição da expressão ou da função da integrina β 1 em glândula mamária normal e em tumor de mama causa bloqueio na proliferação sem indução de apoptose (White et al., 2004; Li et al., 2005), dados que corroboram o resultado descrito de inibição da expressão de *PHLDA1* e *PAWR* após inibição da expressão da integrina β 1.

A diminuição da concentração de fatores tróficos do soro nas células MCF-7 (mantidas em ST) causou um aumento de até 4 vezes na expressão dos transcritos de *PAWR*, e o tratamento com E2 inibiu o nível dessa expressão para o mesmo observado nas células mantidas em SN, assim como observado por Chan et al. (1999) em neurônios do hipocampo em cultura. A inibição da expressão do gene *PAWR* pela ativação do ER condiz com o efeito proliferativo de ER e a função pró-apoptótica de *PAWR*, apesar de já ter sido mostrado que

as células MCF-7 são resistentes à apoptose causada por PAWR (El-Guendy et al., 2003).

A inibição da expressão do *PAWR* pelo tratamento com IGF-I é condizente com a função pró-apoptótica de *PAWR* e com a função proliferativa e anti-apoptótica de IGF-I. Ainda, a regulação da expressão do *PAWR* pelo IGF-I via PI3-K/Akt complementa os dados da literatura que descrevem a inativação de PAWR por ligação à proteína 14-3-3 após fosforilação de PAWR por Akt (Goswami et al., 2005). Por outro lado, a inibição do *PAWR* por IGF-I através da ativação da via da p38MAPK pode parecer inesperado a princípio, pois esta via é frequentemente implicada na indução de apoptose como resposta a diversos agentes em vários sistemas, inclusive nas células MCF-7 (Xia et al., 1995; Lei et al., 2007). Porém, já foi mostrado que a via da p38MAPK também medeia os efeitos anti-apoptóticos do IGF-I em células PC-12 e NIH3T3 (Wu et al., 2004; Toyoshima et al., 2004).

Diversos trabalhos já descreveram interação entre as vias de integrinas e fatores de crescimento (Miyamoto et al., 1996; Schneller et al., 1997; Wang et al., 1998; Tai et al., 2003; Goel et al., 2004; Goel et al., 2005). Foi descrito que as interações entre integrina $\beta 1$ e IGF-I, em células de linhagem tumoral de próstata e de mieloma múltiplo, regulam adesão e proliferação celular (Tai et al., 2003; Goel et al., 2004; Goel et al., 2005). Além disso, Wang et al. (1998) relataram diferença na interação entre as vias da integrina $\beta 1$ e do EGFR em linhagens de células tumorais de mama quando cultivadas em monocamada (2D) e em Matrigel (3D). A inibição específica da atividade de um ou de outro

receptor resultou em inibição concomitante na expressão dos dois receptores quando as células eram cultivadas em 3D, efeito esse não observado quando a cultura foi feita em 2D. Portanto, é possível que exista interação entre IGF-I e integrina $\beta 1$ em MCF-7, mas que essa interação regule outra função que não apoptose, já que a expressão do *PHLDA1* não sofreu alteração nas células transfectadas com siRNA para integrina $\beta 1$ e tratadas com IGF-I, quando comparadas às transfectadas com siRNA controle e tratadas com IGF-I, e a expressão do *PAWR* sofreu uma leve inibição (não significativa) nas células transfectadas com si $\beta 1$ e tratadas com IGF-I em relação às transfectadas com siC e tratadas com IGF-I. Além disso, também é possível que a interação ocorra apenas quando as células MCF-7 se encontrarem organizadas espacialmente em uma matriz de membrana basal (cultura 3D), assim como visto por Wang et al. (1998).

A interação entre fatores de crescimento e ER resulta em sinergismo entre as vias de sinalização com promoção da progressão do ciclo celular. Em células MCF-7, foi descrito que a interação entre E2 e IGF-I estimula a progressão do ciclo celular em parte pelo efeito cumulativo sobre o aumento da expressão de c-Myc e ciclina D1 (Mawson et al., 2005). Portanto, o efeito sinérgico entre E2 e IGF-I inibindo a expressão de *PAWR* pode ser uma resposta que garante a prevalência do efeito proliferativo dessas vias.

Os resultados obtidos para a regulação do *PHLDA1* após os tratamentos das células MCF-7 são aparentemente contraditórios com relação à função do *PHLDA1* descrita na literatura.

O *PHLDA1* foi primeiramente descrito como essencial para a expressão de Fas e apoptose induzida por ativação de células T murinas *in vitro* (Park et al., 1996). Foi visto que o gene homólogo de rato tem sua expressão induzida por fator de crescimento de fibroblasto e causa apoptose em células neuronais do hipocampo (Gomes et al., 1999). Neef et al. (2002) verificaram a presença de *PHLDA1* em nevi benignos e down-regulação progressiva da proteína em lesões melanocíticas primárias e metastáticas. Além disso, eles observaram que a transfecção de *PHLDA1* em linhagens de melanoma e células epiteliais de rim causou aumento no nível de apoptose basal dessas células. Assim, sugeriram que a expressão de *PHLDA1* em nevi *in vivo* contribuiria para a natureza benigna desses tumores com controle de proliferação e sensibilidade a apoptose, e que a progressiva perda de expressão dessa proteína durante a transformação maligna contribuiria para a perda dessas características no melanoma.

Diferentemente desses estudos, Toyoshima et al. (2004) relataram que o *PHLDA1* medeia os efeitos anti-apoptóticos do IGF-I. Eles observaram que em células NWTb3 (células NIH-3T3 que superexpressam IGF-IR) o tratamento com IGF-I causa aumento de expressão gênica e protéica do *PHLDA1* e que esse aumento ocorre através da ativação da via p38MAPK. Eles também observaram que a supressão da expressão de *PHLDA1* por siRNA anula o efeito protetor do IGF-I contra apoptose e resulta em aumento na taxa de apoptose basal nas células, independente da presença de IGF-I no soro. Devido à regulação semelhante do IGF-I sobre a expressão do *PHLDA1* nas

células NWTb3 e nas MCF-7, é possível que o *PHLDA1* também apresente efeito de proteção contra apoptose em MCF-7. Mas também é possível que o estímulo da expressão do *PHLDA1* pelo IGF-I seja um efeito protetor contra um aumento exagerado na proliferação causado pelo IGF-I.

Em células endoteliais vasculares, o aumento da expressão de *PHLDA1* causa mudanças na conformação celular, diminuição na adesão e morte celular por perda de adesão (*anoikis*) (Hossain et al., 2003). Foi visto ainda, que a inibição do integrina $\beta 1$ em diversas linhagens celulares de câncer de mama e em tumores de mama in vivo resultou em diminuição de proliferação (Weaver et al., 1997; Park et al., 2006) e aumento de apoptose (Park et al., 2006). Porém, outros trabalhos mostraram que a inibição da expressão ou da função da integrina $\beta 1$ em glândula mamária normal e em tumor de mama causa bloqueio na proliferação sem indução de apoptose (White et al., 2004; Li et al., 2005). Conseqüentemente, a inibição da expressão da integrina $\beta 1$ nas células MCF-7 deveria, de acordo com os resultados descritos anteriormente, causar um aumento na expressão dos transcritos de *PHLDA1*, se a função do *PHLDA1* fosse realmente causar apoptose ou *anoikis* em célula MCF-7. Porém, não foi realizado nenhum experimento neste trabalho mostrando se a supressão da expressão da integrina $\beta 1$ interferiu na adesão ou na taxa de apoptose dessas células. Portanto, não é possível afirmar se a diminuição observada na expressão gênica de *PHLDA1* após a inibição da expressão da integrina $\beta 1$ é devida a função anti-apoptótica nas células MCF-7 em cultura, ou pró-

apoptótica. Nesse caso, a expressão aumentada de *PHLDA1* serviria como proteção contra estímulo proliferativo da integrina $\beta 1$ nas células MCF-7.

Como ainda não foi descrita a função do gene *PHLDA1* nas células de mama normais ou tumorais, só é possível especular quanto à coerência dos resultados obtidos neste trabalho e a possível função do *PHLDA1* no sistema estudado. Portanto, pode-se concluir que, nas células MCF-7 cultivadas em monocamada, ER e IGF-I regulam positivamente a expressão dos transcritos de *PHLDA1*, a integrina $\beta 1$ participa da regulação da expressão do *PHLDA1* e não existe interação entre ER e IGF-I, ou entre IGF-I e integrina $\beta 1$.

Os resultados obtidos para a regulação do *PAWR* após os tratamentos das células MCF-7 são compatíveis com a função do *PAWR* descrita na literatura e corroboram o modelo proposto de sinalização por *PAWR*.

O gene *PAWR* foi primeiramente descrito como um gene induzido por apoptose em células de próstata dependentes ou não de andrógeno (Sells et al., 1994). Sua expressão já foi relatada em diversos tecidos e linhagens celulares normais, com localização principalmente citoplasmática (Sells et al., 1997; Boghaert et al., 1997; El-Guendy et al., 2003; Gurumurthy et al., 2005), e em muitas amostras de tecidos e linhagens de células tumorais, com localização citoplasmática e nuclear (Boghaert et al., 1997; Cook et al., 1999; El-Guendy et al., 2003; Gurumurthy et al., 2005).

A indução do *PAWR* é um sinal inicial do processo de apoptose. A proteína PAWR sensibiliza as células a diversos estímulos apoptóticos (como

elevação de cálcio intracelular, $\text{TNF}\alpha$, doxorrubicina, retirada de fatores de crescimento do soro), mas a indução de sua expressão apenas não é suficiente para a indução da apoptose (Sells et al., 1997). O mecanismo de ação pró-apoptótico da PAWR é complexo e envolve interação de PAWR com diversas proteínas relacionadas com sobrevivência celular.

A indução direta de apoptose por PAWR depende da translocação de Fas/FasL para a membrana plasmática e concomitante inibição de NF- κ B. Parte do mecanismo de indução de apoptose por PAWR em células de câncer de próstata andrógeno-independentes é a translocação, induzida por PAWR, de Fas/FasL para a membrana, por um mecanismo ainda não esclarecido (Chakraborty et al., 2001). Além disso, resultados de diversos estudos sugerem que PAWR inibe as duas vias de ativação de NF- κ B (induzidas por $\text{TNF}\alpha$ e Ras), resultando assim na inibição da sua atividade e conseqüente indução de apoptose. A interação do domínio zíper de leucina de PAWR com o domínio de dedos de zinco das aPKCs (λ 1PKC e ζ PKC) causa inibição na atividade dessas quinases (Diaz-Meco et al., 1996), que participam da sinalização da PI3-K (Akimoto et al., 1996), e indução de apoptose (Diaz-Meco et al., 1996). Diaz-Meco et al. (1999) reportaram, então, que a expressão de PAWR bloqueia a ativação de IKK e NF- κ B mediada por $\text{TNF}\alpha$ e que a inibição das aPKCs é essencial para esse bloqueio. Também foi observado que a expressão de PAWR em células NIH3T3 transfectadas com o oncogene Ras inibiu a atividade

transcricional de NF- κ B ativada por Ras e foi suficiente para indução de apoptose (Nalca et al., 1999).

A translocação de PAWR para o núcleo é essencial para a indução de apoptose e inibição da atividade transcricional de NF- κ B (El-Guendy et al., 2003). Nesse trabalho, El-Guendy et al. relataram a descoberta de um domínio em PAWR que causa apoptose especificamente em células tumorais. Esse domínio, denominado SAC (“Selective for Apoptosis induction in Cancer cells”), é essencial e suficiente para migrar para o núcleo, translocar Fas/FasL para a membrana plasmática, ativar a via de morte da Fas, inibir a atividade de NF- κ B, e induzir apoptose em diversos tipos de células tumorais sensíveis ou resistentes à PAWR selvagem.

Em seguida, Gurumurthy et al. (2005) relataram que tanto a translocação de Fas/FasL para a membrana, quanto a inibição de NF- κ B por PAWR dependem da fosforilação do resíduo T155 da PAWR, localizado no domínio SAC. Esse resíduo é fosforilado pela enzima PKA, cuja atividade se encontra aumentada em diversas linhagens de células tumorais comparada com seus “pares” normais, daí a indução de apoptose por SAC apenas nas células tumorais. Porém, apenas a fosforilação desse resíduo na PAWR selvagem não é capaz de induzir apoptose em algumas linhagens tumorais, mais especificamente, naquelas incapazes de translocar PAWR para o núcleo. Isso porque PAWR é fosforilada por Akt no resíduo S249, localizado fora do domínio SAC, e uma vez fosforilada nesse domínio ela é seqüestrada pela proteína 14-3-3 no citoplasma (Goswami et al., 2005). A inibição de Akt por PTEN resultou

em indução de apoptose dependente da expressão de PAWR em células tumorais de próstata. Como células tumorais geralmente apresentam atividade elevada de Akt devido a perda de PTEN, expressão de oncogenes, ou sinalização de fatores de crescimento exacerbada, a inibição de PAWR por Akt promove a sobrevivência dessas células (Goswami et al., 2005). É provável que seja esse o mecanismo de resistência à apoptose induzida por PAWR em algumas linhagens celulares, como na MCF-7. De fato foi relatado que células tumorais hormônio dependentes, entre elas a MCF-7, são incapazes de translocar PAWR selvagem para o núcleo, independente da atividade elevada de PKA (e conseqüente nível de fosforilação de T155 em PAWR) (El-Guendi et al., 2003).

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho, de inibição da expressão de *PAWR* por IGF-I e por E2, duas vias que regulam proliferação e sobrevida, corroboram os dados da literatura de função pró-apoptótica da proteína PAWR.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

- O E2 induz, via ER, a expressão dos transcritos do *PHLDA1* e reprime a expressão dos transcritos do *PAWR*
- A expressão dos transcritos do *PHLDA1* é regulada positivamente, e a dos transcritos do *PAWR* é regulada negativamente pelo IGF-I
- O IGF-I reprime a expressão do *PAWR* através das vias PI3-K e p38MAPK
- Existe sinergismo entre o E2 e o IGF-I na repressão da expressão do gene *PAWR*
- A integrina $\beta 1$ participa da regulação dos transcritos dos genes *PHLDA1* e *PAWR*
- Não ocorre interação entre as vias de sinalização do IGF-I e do ER, ou do IGF-I e da integrina $\beta 1$ na regulação da expressão do gene *PHLDA1*

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

- Adams JC, Watt FM. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development*. 1993;117:1183-98.
- Akimoto K, Takahashi R, Moriya S, Nishioka N, Takayanagi J, Kimura K, Fukui Y, Osada S-I, Mizuno K, Hirai S-I, Kazanietz A, Ohno S. EGF or PDGF receptors activate atypical PKC δ through phosphatidylinositol 3-kinase. *EMBO J*. 1996;15:788–98.
- Alford D, Taylor-Papadimitriou J. Cell adhesion molecules in the normal and cancerous mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1996;1:207-18.
- Allred DC, Mohsin SK, Fuqua SAW. Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. *Endocr Relat Cancer*. 2001;8:47-61.
- Altucci L, Addeo R, Cicatiello L, Dauvois S, Parker MG, Truss M, Beato M, Sica V, Bresciani F, Weisz A. 17 β -Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells. *Oncogene*. 1996;12(11): 2315-24.
- Anderson E. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res*. 2002;4:197-201.

Arnold SF, Obourn JD, Jaffe H, Notides AC. Phosphorylation of the human estrogen receptor on tyrosine 537 in vivo and by src family tyrosine kinases in vitro. *Mol Endocrinol.* 1995;9:24-33.

Bartucci M, Morelli C, Mauro L, Ando' S, Surmacz E. Differential insulin-like growth factor I receptor signaling and function in estrogen receptor (ER)-positive MCF-7 and ERnegative MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001;61:6747-54.

Björnström L, Sjöberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol.* 2005;19(4):833-42.

Boghaert ER, Sells SF, Walid AJ, Malone P, Williams NM, Weinstein MH, Strange R, Rangnekar VM. Immunohistochemical analysis of the proapoptotic protein Par-4 in normal rat tissues. *Cell Growth Differ.* 1997;8(8):881-90.

Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol.* 2003;200(4):423-8.

Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, Picard D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J.* 1996;15:2174-83.

Campagnoli C, Clavel-Chapelon F, Kaaks R, Peris C, Berrino F. Progestins and progesterone in hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005a;96:95-108.

Campagnoli C, Abbà C, Ambroggio S, Peris C. Pregnancy, progesterone and progestins in relation to breast cancer risk. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005b;97:441-50.

Cardiff RD, Anver MR, Gusterson BA, Hennighausen L, Jensen RA, Merino MJ, Rehm S, Russo J, Tavassoli FA, Wakefield LM, Ward JM, Green JE. The mammary pathology of genetically engineered mice: the consensus report and recommendations from the Annapolis meeting. *Oncogene.* 2000;19:966-7.

Chakraborty M, Qiu SG, Vasudevan KM, Rangnekar VM. Par-4 drives trafficking and activation of Fas and FasL to induce prostate cancer cell apoptosis and tumor regression. *Cancer Res.* 2001;61:7255–7263.

Chan SL, Tammariello SP, Estus S, Mattson M P. Prostate apoptosis response-4 mediates trophic factor withdrawal-induced apoptosis of hippocampal neurons: actions prior to mitochondrial dysfunction and caspase activation. *J Neurochem.* 1999;73(2):502-12.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;192:156-9.

Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science.* 1995;268(5208):233-9.

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;18:1205-8.

Curtis SW, Washburn T, Sewall C, DiAugustine R, Lindzey J, Couse JF, Korach KS. Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:12626–30.

De Bessa SA. *Efeito do 17 β -estradiol na expressão dos genes HNRPK, PAWR, RBBP4, ATRX e TLN1 na linhagem celular de câncer de mama MCF-7* [dissertação]. São Paulo: Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo; 2004.

Diaz-Meco MT, Lallena MJ, Monjas A, Frutos S, Moscat J. Inactivation of the inhibitory κ B protein kinase/Nuclear factor κ B pathway by Par-4 expression potentiates tumor necrosis factor α -induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1999;274(28):19606-12.

Diaz-Meco MT, Municio MM, Frutos S, Sanchez P, Lozano J, Sanz L, Moscat J. The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell*. 1996;86:777-86.

Dowsett M, Nicholson RI, Pietras RJ. Biological characteristics of the pure antiestrogen fulvestrant: overcoming endocrine resistance. *Breast Cancer Res Treat*. 2005;93:S11-S18.

Dunn SE, Ehrlich M, Sharp NJ, Reiss K, Solomon G, Hawkins R, Baserga R, Barrett JC. A dominant negative mutant of the insulin-like growth factor-I receptor inhibits the adhesion, invasion, and metastasis of breast cancer. *Cancer Res*. 1998;58:3353-61.

Dupont J, Pierre A, Froment P, Moreau C. The insulin-like growth factor axis in cell cycle progression. *Horm Metab Res*. 2003;35(11-12):740-50.

El-Guendy N, Zhao Y, Gurumurthy S, Burikhanov R, Rangnekar VM. Identification of a unique core domain of par-4 sufficient for selective apoptosis induction in cancer cells. *Mol Cell Biol*. 2003;23:5516–5525.

El-Guendy N, Rangnekar VM. Apoptosis by Par-4 in cancer and neurodegenerative diseases. *Exp Cell Res*. 2003;283(1):51-66.

Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2007. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>

Foster JS, Wimalasena J. Estrogen regulates activity of cyclin-dependent kinases and retinoblastoma protein phosphorylation in breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 1996;10:488-98.

Foster JS, Henley DC, Ahamed S, Wimalasena J. Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer. *Trends Endocrinol Metab*. 2001;12:320-7.

Fournier A, Berrino F, Riboli E, Avenel V, Clavel-Chapelon F. Breast cancer risk in relation to different types of hormone replacement therapy in the E3N-EPIC cohort. *Int J Cancer*. 2005;114:448-54.

Fournier B, Gutzwiller S, Dittmar T, Matthias G, Steenbergh P, Matthias P. Estrogen receptor (ER)-alpha, but not ER-beta, mediates regulation of the insulin-like growth factor I gene by antiestrogens. *J Biol Chem*. 2001;276(38):35444-9.

Frank D, Mendelsohn CL, Ciccone E, Svensson K, Ohlsson R, Tycko B. A novel pleckstrin homology-related gene family defined by *lpl/Tssc3*, *TDAG51*, and

Tih1: tissue-specific expression, chromosomal location, and parental imprinting.

Mamm Genome. 1999;10:1150-9.

Ganz PA. Breast cancer, menopause, and long-term survivorship: critical issues for the 21st century. *Am J Med*. 2005;118(128):136S-141S.

Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*. 1999;285(5430):1028-32.

Givant-Horwitz V, Davidson B, Reich R. Laminin-induced signaling in tumor cells. *Cancer Lett*. 2005;223(1):1-10.

Goalstone ML, Draznin B. What does insulin do to Ras? *Cell Signal*. 1998;10(5):297-301.

Goel HL, Fornaro M, Moro L, Teider N, Rhim JS, King M, Languino LR. Selective modulation of type 1 insulin-like growth factor receptor signaling and functions by β_1 integrins. *J Cell Biol*. 2004;166:407-18.

Goel HL, Breen M, Zhang J, Das I, Aznavoorian-Cheshire S, Greenberg NM, Elgavish A, Languino LR. β_1A integrin expression is required for type 1 insulin-like growth factor receptor mitogenic and transforming activities and localization to focal contacts. *Cancer Res*. 2005;65(15):6692-700.

Gomes I, Xiong W, Miki T, Rosner MR. A proline- and glutamine-rich protein promotes apoptosis in neuronal cells. *J Neurochem*. 1999;73:612-22.

Goswami A, Burikhanov R, de Thonel A, Fujita N, Goswami M, Zhao Y, Eriksson JE, Tsuruo T, Rangnekar VM. Binding and phosphorylation of Par-4 by Akt is essential for cancer cell survival. *Mol Cell*. 2005;20:33-44.

Gurumurthy S, Goswami A, Vasudevan KM, Rangnekar VM. Phosphorylation of Par-4 by protein kinase A is critical for apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2005;25(3):1146-61.

Guvacova MA, Surmacz E. Overexpressed IGF-I receptors reduce estrogen growth requirements, enhance survival and promote cell-cell adhesion in human breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 1997;231:149-62.

Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem.* 2001;276(40):36869-72.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.

Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, Rosner B, Speizer FE, Pollak M. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet.* 1998;351(9113):1393-6.

Hansen RK, Bissell MJ. Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones. *Endocr Relat Cancer.* 2000;7:95-113.

Hardman JG, Gilman AG, Limbird LE. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th ed. Nova York: McGraw Hill - Health Professions Division; 1996.

Hayashida N, Inouye S, Fujimoto M, Tanaka Y, Izu H, Takaki E, Ichikawa H, Rho J, Nakai A. A novel HSF1-mediated death pathway that is suppressed by heat shock proteins. *EMBO J.* 2006;25:4773-83.

Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen-receptors: How do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 2007;87:905-31.

Helle SI. The insulin-like growth factor system in advanced breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2004;18(1):67-79.

Hossain GS, Van Thienen JV, Werstuck GH, Zhou J, Sood SK, Dickhout JG, De Koning AB, Tang D, Wu D, Falk E, Poddar R, Jacobsen DW, Zhang K, Kaufman RJ, Austin RC. TDAG51 is induced by homocysteine, promotes detachment-mediated programmed cell death, and contributes to the development of atherosclerosis in hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem.* 2003;278(32):30317-27.

Howell A. Pure oestrogen antagonists for the treatment of advanced breast cancer. *Endocr Rel Cancer.* 2006;13:689-706.

Howlett AR, Bissell MJ. The influence of tissue microenvironment (stroma and extracellular matrix) on the development and function of mammary epithelium. *Epithelial Cell Biol.* 1993;2:79-89.

Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev.* 1999;20(6):761-87.

Joel PB, Smith J, Sturgill TW, Fisher TL, Blenis J, Lannigan DA. pp90^{rsk1} regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Mol Cell Biol.* 1998;18(4):1978-84.

Jones RA, Campbell CI, Gunther EJ, Chodosh LA, Petrik JJ, Khokha R, Moorehead RA. Transgenic overexpression of IGF-IR disrupts mammary ductal morphogenesis and induces tumor formation. *Oncogene.* 2007;26:1636-44.

Jordan VC. SERMs: meeting the promise of multifunctional medicines. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(5):350-6.

Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*. 1995;270:1491-4.

Katzenellenbogen JA, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS. Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones. *Mol Endocrinol*. 1996;10:119-31.

Kim B, Feldman EL. Differential regulation of focal adhesion kinase and mitogen-activated protein kinase tyrosine phosphorylation during insulin-like growth factor-I-mediated cytoskeletal reorganization. *J Neurochem*. 1998;71:1333-6.

Klotz DM, Hewitt SC, Ciana P, Raviscioni M, Lindzey JK, Foley J, Maggi A, DiAugustine RP, Korach KS. Requirement of estrogen receptor-alpha in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk. *J Biol Chem*. 2002;277:8531-8537.

Koda M, Sulkowski S, Garofalo C, Kanczuga-Koda L, Sulkowska M, Surmacz E. Expression of the insulin-like growth factor-I receptor in primary breast cancer and lymph node metastases: correlations with estrogen receptors alpha and beta. *Horm Metab Res*. 2003;35(11-12):794-801.

Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. Functional Domains of the Human Estrogen Receptor. *Cell*. 1987;51:941-51.

Kyprianou N, English HF, Davidson NE, Isaacs JT. Programmed cell death during regression of the MCF-7 human breast cancer following estrogen ablation. *Cancer Res.* 1991;51(1):162-6.

LaCroix AZ. Estrogen with and without progestin: benefits and risks of short-term use. *Am J Med.* 2005;118(12B):79S-87S.

Lannigan DA. Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids.* 2003;68:1-9.

Le Goff P, Montano MM, Schodin DJ, Katzenellenbogen BS. Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *J Biol Chem.* 1994;269:4458-66.

Lee AV, Jackson JG, Gooch JL, Hilsenbeck SG, Coronado-Heinsohn E, Osborne CK, Yee D. Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression *in vitro* and *in vivo*. *Mol Endocrinol.* 1999;13:787-96.

Lei X, Yang J, Nichols RW. Abrogation of TGF β signaling induces apoptosis through the modulation of MAP kinase pathways in breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 2007;313(8):1687-95.

Li N, Zhang Y, Naylor MJ, Schatzmann F, Maurer F, Wintermantel T, Schuetz G, Mueller U, Streuli CH, Hynes NE. β 1 integrins regulate mammary gland proliferation and maintain the integrity of mammary alveoli. *EMBO J.* 2005;24:1942-53.

Marchiori AC, Casolari DA, Nagai MA. Transcriptional up-regulation of PHLDA1 by 17 β -estradiol in MCF-7 breast cancer cells. *Braz J Med Biol Res.* 2008;41, in press.

Martin A-M, Weber BL. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:1126-35.

Mauro L, Salerno M, Morelli C, Boterberg T, Bracke M, Surmacz E. Role of the IGF-I receptor in the regulation of cell-cell adhesion: Implications in cancer development and progression. *J Cell Physiol.* 2003;194:108-16.

Mawson A, Lai A, Carroll JS, Sergio CM, Mitchell CJ, Sarcevic B. Estrogen and insulin/IGF-I cooperatively stimulate cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells through differential regulation of c-Myc and cyclin D1. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;229:161-73.

McPherson K, Steel CM, Dixon JM. Breast Cancer – Epidemiology, Risk Factors and Genetics. *BMJ.* 2000;321:624-8.

Mirante CK, Brugge JS. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol.* 2002;4:83-90.

Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, Yamada KM. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol.* 1996;135(6):1633-42.

Mohsin SK, Hilsenbeck SG, Allred DC Estrogen receptors and growth control in premalignant breast disease. *Modern Pathology*. 2000;**13**:28A (Abstract No. 145).

Muschler J, Lochter A, Roskelley CD, Yurchenco P, Bissell MJ. Division of labor among the $\alpha 6\beta 4$ integrin, $\beta 1$ integrins, and E3 laminin receptor to signal morphogenesis and β -casein expression in mammary epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 1999;10(9):2817-28.

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

Nagai MA, Ros N, De Bessa SA, Neto MM, Miracca EC, Brentani MM. Differentially expressed genes and estrogen receptor status in breast cancer. *Int J Oncol*. 2003;23(5):1425-30.

Nagai MA, Fregnani JH, Netto MM, Brentani MM, Soares FA. Down-regulation of PHLDA1 gene expression is associated with breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;106(1):49-56.

Nalca A, Qiu SG, El-Guendy N, Krishnan S, Rangnekar VM. Oncogenic Ras sensitizes cells to apoptosis by Par-4. *J Biol Chem*. 1999;274:29976–29983.

Neef R, Kuske MA, Prols E, Johnson JP. Identification of the human PHLDA1/TDAG51 gene: down-regulation in metastatic melanoma contributes to apoptosis resistance and growth deregulation. *Cancer Res*. 2002;62(20):5920-9.

Nilsson S, Makelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson J-A. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*. 2001;81(4):1535-65.

Oesterreich S, Zhang P, Guler RL, Sun X, Curran EM, Welshons WV, Osborne CK, Lee AV. Re-expression of estrogen receptor α in estrogen receptor α -negative MCF-7 cells restores both estrgoen and insulin-like growth factor-mediated signaling and growth. *Cancer Res.* 2001;61:5771-7.

O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol.* 2004;18:1859-75.

Park CG, Lee SY, Kandala G, Choi Y. A novel gene product that couples TCR signaling to Fas(CD95) expression in activation-induced cell death. *Immunity.* 1996;4(6):583-91.

Park CC, Zhang H, Pallavicini M, Gray JW, Baehner F, Park CJ, Bissell MJ. β 1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo. *Cancer Res.* 2006;66(3):1526-35.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55:74–108.

Parkin DM, Fernandez LMG. Use of Statistics to Access the Global Burden of Breast Cancer. *Breast J.* 2006;12(suppl. 1):S70-S80.

Pavelic K, Buković D, Pavelić J. The role of insulin-like growth factor 2 and its receptors in human tumors. *Mol Med.* 2002;8(12):771-80.

Peck JD, Hulka BS, Poole C, Savitz DA, Baird D, Richardson BE. Steroid hormone levels during pregnancy and incidence of maternal breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11:361-8.

Pollak M. Insulin-like growth factor physiology and cancer risk. *Eur J Cancer*. 2000;36:1224-8.

Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:505-18.

Rinderknecht E, Humbel RE. Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities: evidence for structural homology with insulin B chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(12):4379-81.

Rinderknecht E, Humbel RE. Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(7):2365-9.

Ryan PD, Goss PE. The emerging role of the insulin-like growth factor pathway as a therapeutic target in cancer. *Oncologist*. 2008;13:16-24.

Sachdev D, Yee D. The IGF system and breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2001;8:197-209.

Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R. Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA*. 2000;283:485-91.

Schneller M, Vuori K, Ruoslahti E. $\alpha V\beta 3$ integrin associates with activated insulin and PDGF β receptors and potentiates the biological activity of PDGF. *EMBO J*. 1997;16(18):5600-7.

Schor APT, Carvalho FM, Kemp C, Silva IDC, Russo J. S100P calcium-binding protein expression is associated with high-risk proliferative lesions of the breast. *Oncol Rep.* 2006;15:3-6.

Sells SF, Wood DPJr, Joshi-Barve SS, Muthukumar S, Jacob RJ, Crist SA, Humphreys S, Rangnekar VM. Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells. *Cell Growth Differ.* 1994;5(4):457-66.

Sells SF, Han SS, Muthukkumar S, Maddiwar N, Johnstone R, Boghaert E, Gillis D, Liu G, Nair P, Monnig S, Collini P, Mattson MP, Sukhatme VP, Zimmer SG, Wood DPJr, McRoberts JW, Shi Y, Rangnekar VM. Expression and function of the leucine zipper protein Par-4 in apoptosis. *Mol Cell Biol.* 1997;17(7):3823-32.

Shekhar MPV, Pauley R, Heppner G. Extracellular matrix-stromal cell contribution to neoplastic phenotype of epithelial cells in the breast. *Breast Cancer Res.* 2003;5(3):130-5.

Shepherd PR, Withers D, Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J.* 1998;333:471-90.

Shoker BS, Jarvis C, Sibson DR, Walker C, Sloane JP. Oestrogen receptor expression in the normal and precancerous breast. *J Pathol.* 1999;188(3):237-44.

Sisci D, Surmacz E. Crosstalk between IGF signaling and steroid hormone receptors in breast cancer. *Curr Pharm Des.* 2007;13:1-13.

Sommer S, Fuqua SAW. Estrogen Receptor and Breast Cancer. *Semin Cancer Biol.* 2001;11:339-52.

Song RX-D, Fan P, Yue W, Chen Y, Santen R J. Role of receptor complexes in the extranuclear actions of estrogen receptor α in breast cancer. *Endocrine-Rel Cancer*. 2006;13:S3-S13.

Spiers V, Walker RA. New perspectives into the biological and clinical relevance of oestrogen receptors in the human breast. *J Pathol*. 2007;211:499-506.

Stewart AJ, Johnson MD, May FE, Westley BR. Role of insulin-like growth factors and the type I insulin-like growth factor receptor in the estrogen-stimulated proliferation of human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 1990;265(34):21172-8.

Stoll BA. Oestrogen/insulin-like growth factor-I receptor interactions in early breast cancer: clinical implications. *Ann Oncol*. 2002;13:191-6.

Streuli C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11:634-40.

Surmacz E, Bartucci M. Role of Estrogen Receptor α in Modulating IGF-I Receptor Signaling and Function in Breast Cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2004;23(3):5-14.

Tai YT, Podar K, Catley L, Tseng YH, Akiyama M, Shringarpure R, Burger R, Hideshima T, Chauhan D, Mitsiades N, Richardson P, Munshi NC, Kahn CR, Mitsiades C, Anderson KC. Insulin-like growth factor-I induces adhesion and migration in human multiple myeloma cells via activation of β_1 -integrin and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. *Cancer Res*. 2003;63:5850-8 .

Toyoshima Y, Karas M, Yakar S, Dupont J, Helman L, Leroith D. TDAG51 mediates the effects of insulin-like growth factor I (IGF-I) on cell survival. *J Biol Chem*. 2004;279(24):25898-904.

Wakeling AE, Dukes M, Bowler J. A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res*. 1991;51:3867-73.

Wang F, Weaver VM, Petersen OW, Larabell CA, Dedhar S, Briand P, Lupu R, Bissell MJ. Reciprocal interactions between β 1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:14821-6.

Weaver VM, Petersen OW, Wang F, Larabell CA, Briand P, Damsky C, Bissell MJ. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol*. 1997;137(1):231-45.

Weigel NL, Zhang Y. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *J Mol Med*. 1998;76:469-79.

White R, Parker MG. Molecular Mechanisms of Steroid Hormone Action. *Endocr Relat Cancer*. 1998;5:1-14.

White DE, Kurpios NA, Zuo D, Hassell JA, Blaess S, Mueller U, Muller WJ. Targeted disruption of β 1-integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction. *Cancer Cell*. 2004;6:159-70.

Woodward TL, Lu H, Haslam SZ. Laminin inhibits estrogen action in human breast cancer cells. *Endocrinology*. 2000;141:2814-21.

Wu Y, Karas M, Dupont J, Zhao H, Toyoshima Y, Le Roith D. Multiple signaling pathways are involved in the regulation of IGF-I receptor inhibition of PTEN-enhanced apoptosis. *Growth Horm IGF Res*. 2004;14:52-8.

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 1995;270:1326-31.

Yu H, Jin F, Shu XO, Li BD, Dai Q, Cheng JR, Berkel HJ, Zheng W. Insulin-like growth factors and breast cancer risk in Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002;11(8):705-12.

Zhang S, Li X, Burghardt R, Smith R 3rd, Safe SH. Role of estrogen receptor (ER) alpha in insulin-like growth factor (IGF)-I-induced responses in MCF-7 breast cancer cells. *J Mol Endocrinol*. 2005;35(3):433-47.