UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

IRINA GUEROLDOVNA BOBROVNITCHAIA

**Efeito da hipóxia na expressão de PAR-4 (*Prostate Apoptosis
Response-4*) em linhagens celulares de câncer de mama**

**São Paulo
2014**

IRINA GUEROLDOVNA BOBROVNITCHAIA

Efeito da hipóxia na expressão de PAR-4 (*Prostate Apoptosis Response-4*) em linhagens celulares de câncer de mama

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

Programa: Oncologia

Orientador: Dra. Maria Aparecida Nagai

**São Paulo
2014**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho principalmente aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado, me dando apoio e segurança em todos os momentos da minha vida. A presente dissertação também é deles!

Ao meu namorado, Rafael, que, apesar de ter entrado na minha vida recentemente, me deu todo o apoio e amor. Obrigada por estar ao meu lado.

Aos meus amigos e colegas.

Obrigada a todos

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Aparecida Nagai, pela oportunidade de realizar o presente trabalho sob a sua orientação.

Aos colegas de laboratório pela ajuda.

À Dona Myrian por ter me acolhido na sua casa desde que cheguei a São Paulo.

Ao meu namorado Rafael pelo amor, carinho e aventuras que fizeram os últimos dois anos muito melhores.

A toda a família Graciano Gonzaga que me recebeu como parte dela.

Aos meus pais, que sempre me incentivaram, guiaram e apoiaram, pelo amor que a mim dedicam.

A todos os profissionais que me ajudaram durante esta jornada.

Ao departamento de Oncologia da FMUSP.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro do presente estudo.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos
de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que
parecia impossível”*

Charles Chaplin

RESUMO

Bobrovnitchaia, IG. *Efeito da Hipóxia na Expressão de PAR-4 (Prostate Apoptosis Response-4) em Linhagens Celulares de Câncer de Mama* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

O câncer de mama é a neoplasia de maior ocorrência na população feminina. É uma doença hormônio-dependente com etiologia complexa e multifatorial. O câncer de mama invasivo é uma das principais causas da morbidade e mortalidade de mulheres no mundo. O desenvolvimento e a progressão de câncer de mama estão associados com acúmulo de várias alterações genéticas e epigenéticas, que resultam na expressão gênica diferencial entre células normais e tumorais. A hipóxia pode ser considerada uma das características principais de tumores sólidos e uma força motriz para a sobrevivência das células tumorais e progressão maligna. O gene supressor de tumor *PAWR* (PKC apoptosis WT1 regulator; também denominado PAR-4, prostate apoptosis response-4) tem importante papel na apoptose tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca e pode ser considerado um alvo para a terapia seletiva de células tumorais uma vez que a expressão de PAR-4 aumenta a sensibilidade da maioria das células de câncer a um segundo estímulo apoptótico. Alguns estudos, incluindo os de nosso grupo, têm mostrado o envolvimento de PAR-4 em câncer de mama e seu papel como fator prognóstico e preditivo de resposta a quimioterapia. No entanto, pouco é conhecido sobre o papel funcional deste gene ou os mecanismos envolvidos na regulação da expressão de PAR-4 na glândula mamária e no processo de tumorigênese da mama. No presente trabalho investigamos os efeitos da hipóxia na expressão de PAR-4 nas linhagens celulares MCF10A, MCF7 e MDA-MB-231. Para isto, as células foram

incubadas por períodos de 30 minutos, 1, 2, 6 ou 24 horas em ambiente controlado com 5 % CO₂, 95% N₂ e 0.2% O₂. A expressão de Par-4 foi avaliada quanto aos transcritos, por PCR em Tempo Real e quanto à expressão protéica, por western blot. Observamos que a baixa concentração de oxigênio diminui a expressão do mRNA de PAR-4, em tempos de 6 e 24 horas, nas linhagens MCF10A e MCF7 e no tempo de 24h nas células MDA-MB-231. Já quando os níveis protéicos de Par-4 foram analisados não foi observada diferença significativa nessas células após exposição à condição de hipóxia. A expressão do gene *NDRG1*, a qual se encontra aumentada em condições de hipóxia, foi utilizada como controle. Nossos dados sugerem que a expressão dos transcritos do gene supressor de tumor PAR-4 é inibida pelos mecanismos celulares de sobrevivência celular ativados durante a hipóxia.

Descritores: neoplasias da mama, hipóxia, PAR-4, expressão gênica, linhagem celular tumoral

ABSTRACT

Bobrovnitchaia, IG. *Hypoxia effect on PAR-4 (Prostate Apoptosis Response-4) expression in Breast Cancer cell lines* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014

Breast cancer has the highest incidence rate of all malignant neoplasias affecting women. It is a hormone dependent disease with complex and multifactorial etiology. Invasive breast cancer is one of the principal causes of women morbidity and mortality in the world. Breast cancer development and progression are associated with accumulation of various genetic and epigenetic alterations, which result in differential gene expression among normal and tumor cells. Hypoxia could be considered one of the principal hallmarks of solid tumors and the driving force for the tumor cell survival and malignant progression. The tumor suppressor gene *PAWR* (PKC apoptosis WT1 regulator; also known as PAR-4, prostate apoptosis response-4) has an important role in apoptosis either by intrinsic or extrinsic pathways and could be considered as a target for selective therapy of tumor cells. Some studies, including of our group, have shown the PAR-4 involvement in breast cancer and its role as prognostic and predictive factor in response to chemotherapy. However, little is known about functional role of this gene or the mechanisms involved in PAR-4 expression regulation in mammary gland and in breast tumorigenesis process. In the present study we evaluated the hypoxia effects on PAR-4 expression in MCF10A, MCF7 and MDA-MB-231 cell lines. Therefore, the cells were incubated for time periods of 30 minutes, 1, 2, 6 or 24 hours under controlled environment with 5 % CO₂, 95% N₂ e 0.2% O₂. PAR-4 expression was evaluated for transcripts, by Real Time PCR, and for protein expression, by western blot. We

observed that low oxygen concentration decreases *PAR-4* mRNA expression, in periods of 6 and 24 hours, in MCF10A and MCF7 cell lines and in the period of 24 hours in MDA-MB-231 cells. However, when the Par-4 protein levels were evaluated, no significant difference was observed in these cells after incubation under hypoxic conditions. *NDRG1* gene expression, which is increased under hypoxia, was used as a control. Our data suggest that the expression of tumor suppressor gene *PAR-4* transcripts is inhibited by cell survival mechanisms activated during hypoxia.

Descriptors: breast neoplasms, hypoxia, PAR-4, gene expression, tumor cell line

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estimativa 2014.....	21
Figura 2 – Subtipos moleculares de câncer de mama.....	26
Figura 3 – Anatomia da mama.....	29
Figura 4 – Estágios de desenvolvimento da glândula mamária e do câncer de mama.....	32
Figura 5 – Hipóxia intratumoral e simbiose metabólica.....	37
Figura 6 – Esquema da regulação de HIF-1 α	38
Figura 7 – Esquema representativo dos domínios funcionais da proteína Par-4.....	43
Figura 8 – Esquema do modelo atual do mecanismo de ação de Par-4.....	45
Figura 9 – Regulação de Par-4 por Akt.....	47
Figura 10 – Sistemas de incubação de hipóxia.....	54
Figura 11 – Efeito da hipóxia na expressão de PAR-4 nas linhagens celulares MCF10A, MCF7 e MDA-MB-231.....	65
Figura 12 – Efeito da hipóxia na expressão de NDRG1 nas linhagens celulares MCF10A, MCF7 e MDA-MB-231.....	66
Figura 13 – Efeito da hipóxia na expressão de PAR-4 em MCF7 incubada em câmara de hipóxia e em H35 Hypoxystation.....	68
Figura 14 – Efeito da hipóxia na expressão de NDRG1 em MCF7 incubada em câmara de hipóxia e em H35 Hypoxystation.....	69

Figura 15 – Efeito da hipóxia na expressão de PAR-4 em MCF10A e MCF7 incubada em câmara de hipóxia por 30 minutos, 1 hora e 2 horas em câmara de hipóxia.....71

Figura 16 – Efeito da hipóxia na expressão de NDRG1 em MCF10A e MCF7 incubada em câmara de hipóxia por 30 minutos, 1 hora e 2 horas em câmara de hipóxia.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos utilizados nas hibridizações do Western-blot.....	61
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
AKT	Homólogo ao oncogene viral v-akt de tiomona murino
AMPK	<i>5' adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
Bax	Proteína X associada a Bcl2
Bcl-2	Célula B de linfoma 2
BSA	Albumina bovina sérica
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
c-myc	Oncogene homólogo a mielocitomatose viral v-myc
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	<i>Threshold Cycle</i>
DCIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
DISC	<i>Death-inducing signalling complex</i>
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	2'desoxirribonucleotídeos 5' trifosfato
E2	17β-estradiol

EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
ErbB2	Receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano
EUA	Estados Unidos da América
FADD	Domínio de morte associado à via Fas
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GRP78	Proteína de 78 kDa regulada por glicose
H ⁺	Gás hidrogênio
HER2	Receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano
HIF-1	Fator induzido por hipóxia 1
HPRT1	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1
HRE	Elemento responsivo a hipóxia
IFN- γ	Interferon gamma
IGF-1	Fator de crescimento do tipo insulina I
IGF1R	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
kDa	Kilodalton
KRAS	<i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
M	Molar
MAPK	Proteína quinase mitógeno-ativa
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
ml	Mililitro

mM	Milimolar
MOPS	Ácido propanesulfônico-3 [N-morfolino]
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
N ₂	Nitrogênio
NDRG1	<i>N-myc downstream regulated gene 1</i>
NF-κB	Fator nuclear do gene <i>enhancer</i> do peptide leve kappa nas células B1
NLS	Sequência de localização nuclear
O ₂	Oxigênio
p53	Proteína citoplasmática de massa molecular 53 kDa
Par-4	<i>Prostate apoptosis response-4</i>
PAWR	<i>PRKC, apoptosis, WTI, regulator</i>
pb	Pares de base
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDK1	<i>3-phosphoinositide dependent protein kinase-1</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PMSF	Fenilmetilsulfonilflorideo
PTEN	Gene fosfatase e tensina homóloga
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RE	Receptor de estrógeno

RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies oxigênio reativos
RP	Receptor de progesterona
RPL13	Proteína ribossomal L13
rpm	Rotações por minuto
SAC	Domínio seletivo de indução de apoptose em células de câncer
TDLU	Unidade terminal ducto-lobular
TGF- β	Fator de crescimento de transformação β
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TP53	Gene da proteína citoplasmática de massa molecular 53 kDa
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
UV	Ultra violeta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor de fator de crescimento endotelial vascular
VHL	Supressor tumoral Von Hippel-Lindau
WHO	Organização mundial de saúde
WT1	<i>Wilms Tumor 1</i>
Δ	Delta

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	19
1.1 - Câncer de Mama.....	20
1.2 - Desenvolvimento e maturação da glândula mamária.....	27
1.3- Hipóxia.....	34
1.4 - NDRG1 e hipóxia.....	39
1.5 - Prostate Apoptosis Response-4 (PAR-4).....	41
 2 - OBJETIVOS.....	 49
2.1 - Objetivo Geral.....	50
2.2 - Objetivos Específicos.....	50
 3 - MATERIAIS & MÉTODOS.....	 51
3.1 - Cultura de Células.....	52
3.2 - Condições de Normóxia e Hipóxia.....	53
3.3 - Extração de RNA.....	54
3.4 - Tratamento do RNA com DNase.....	56
3.5 - PCR em Tempo Real.....	57
3.6 - Extração de proteínas.....	59
3.7 - Western blot.....	60
3.8 - Densitometria.....	61
3.9 - Análise Estatística.....	62
3.10 - Considerações éticas.....	62

4 - RESULTADOS.....	63
4.1 - Efeito da hipóxia na expressão dos genes <i>PAR-4</i> e <i>NDRG1</i> nas linhagens celulares MCF10A, MCF7 e MDA-MB-231 incubadas em câmara de hipóxia.....	64
4.2 - Análise da hipóxia na expressão dos genes <i>PAR-4</i> e <i>NDRG1</i> na linhagem celular MCF7 utilizando câmara de hipóxia e H35 Hypoxystation.....	67
4.3 - Efeito da hipóxia na expressão dos genes <i>PAR-4</i> e <i>NDRG1</i> nas linhagens celulares MCF10A e MCF7 incubadas em câmara de hipóxia por tempos curtos.....	70
 5 – DISCUSSÃO.....	73
 6 – BIBLIOGRAFIA.....	78

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – CÂNCER DE MAMA

Câncer é um termo utilizado para designar um conjunto de mais de 100 doenças associadas ao crescimento desordenado das células (Instituto Nacional de Câncer – INCA; www.inca.gov.br/estimativa/2014). De acordo com as estimativas da Agência Internacional para Pesquisas sobre Câncer (World cancer report / edited by Peter Boyle and Bernard Levin, 2008), houve aproximadamente 12,7 milhões de novos casos de câncer em 2008 em todo o mundo, com estimativa de um total de 7,6 milhões de mortes pela doença. Até o ano 2030, estima-se que a incidência de novos casos de câncer aumente para 21,4 milhões, com aproximadamente 13,2 milhões de mortes (American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 2nd edition 2008).

Dentre os cânceres mais incidentes está o câncer de mama, o qual é a neoplasia mais comum e a principal causa de morbidade e mortalidade entre as mulheres no mundo. Segundo Jemal e colaboradores (2011), baseado nas estatísticas de GLOBOCAN 2008, é estimado 1.38 milhões de novos casos de câncer de mama (aproximadamente 23 % da incidência total de cânceres) e 458,400 mortes pela doença em 2008 no mundo.

Apesar do câncer de mama ser uma doença tratável e com prognóstico relativamente bom, as taxas de mortalidade continuam elevadas no Brasil, já que a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. Assim, a estimativa do Instituto Nacional de Câncer em 2014 (Anon, 2014), é de mais de 57 mil novos casos de câncer de mama para o ano de 2014, sendo esta a segunda neoplasia mais frequente no país depois do câncer de pele não-melanoma (Fig. 1).

Localização Primária	Casos Novos	%
Mama feminina	57.120	20,8%
Cólon e Reto	17.530	6,4%
Colo do útero	15.590	5,7%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Estômago	7.520	2,7%
Corpo do útero	5.900	2,2%
Ovário	5.680	2,1%
Linfoma não-Hodgkin	4.850	1,8%
Leucemias	4.320	1,6%
Sistema Nervoso Central	4.130	1,5%
Cavidade Oral	4.010	1,5%
Pele Melanoma	2.930	1,1%
Esôfago	2.770	1,0%
Bexiga	2.190	0,8%
Linfoma de Hodgkin	880	0,3%
Laringe	770	0,3%
Todas as Neoplasias sem pele*	190.520	
Todas as Neoplasias	274.230

Figura 1 – Estimativa 2014. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes em mulheres estimados para 2014, exceto pele não melanoma (adaptado de Incidência de Câncer no Brasil, 2014 – INCA)

O câncer de mama é uma neoplasia predominantemente feminina e a sua etologia é complexa. Há influências tanto do meio ambiente quanto dos fatores genéticos. O tempo de exposição aos hormônios esteroídicos, especialmente estrógenos e andrógenos, influência no desenvolvimento da carcinogênese mamária, ou seja, a menarca precoce e/ou a menopausa tardia, nuliparidade, o uso de contraceptivos orais e a terapia de reposição hormonal são vistos como principais fatores de risco associados ao desenvolvimento da doença. Outro fator importante no desenvolvimento de câncer de mama é a idade da paciente, em mulheres jovens os tumores são mais agressivos. O papel das gestações é complexo, porém, quanto menor a idade na primeira gestação a termo, maior é a proteção em longo prazo. Contudo, os fatores genéticos continuam

sendo o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama (Ellsworth et al. 2010; Trichopoulos et al. 2008).

Existe uma relação bem estabelecida entre a ocorrência do câncer e a existência de alterações genéticas, sendo que estas, na sua maioria, são somáticas, porém, em 4-10 % dos tumores há predisposição genética. As alterações genéticas observadas ao longo da transformação maligna são várias: deleções cromossômicas, translocações, amplificações e rearranjos, duplicações ou aneuploidia, e mutações pontuais, levando ao acúmulo de mudanças genéticas adicionais combinadas com expansão clonal e seleção. No entanto, a ativação ou inibição de somente um oncogene ou gene supressor de tumor, respectivamente, não é suficiente para converter um fenótipo normal da célula para o tumoral, tornando o câncer uma doença de múltiplos eventos mutacionais diferentes (Lerebours & Lidereau, 2002; Polyak, 2007).

Nos seus trabalhos publicados em 2000 e 2011, Hanahan e Weinberg afirmam que as células normais evoluem progressivamente para o estado neoplásico, adquirindo seis alterações essenciais, cuja base é a diversidade genética, gerada pela instabilidade genômica. As seis características adquiridas são: autossuficiência em sinais proliferativos, insensibilidade a sinais proliferativos, evasão de apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese contínua, invasão tecidual e metástase. Progresso conceitual da última década adicionou mais duas alterações que contribuem para o desenvolvimento do câncer: reprogramação do metabolismo energético e evasão da destruição pelo sistema imune.

As mudanças sequenciais que levam à transformação, conhecidas como *Hallmarks of Cancer*, envolvem alterações celulares autônomas ao nível genético e metabólico,

juntamente com mudanças não autônomas na interação das células com o estroma circundante (Avni et al. 2011).

A história natural do câncer de mama envolve progressão através de estágios patológicos e clínicos, começando com hiper-proliferação ductal, com subsequente evolução em carcinomas *in situ* e invasivo, e finalmente em doença metastática. Durante a transição de *in situ* para o câncer de mama invasivo, células tumorais proliferativas dentro de ductos intactos recrutam várias células estromais e proteínas da matriz extracelular para fora dos ductos e induz secreção de proteases tais como matriz metaloproteinases, levando a degradação da membrana basal e subsequente invasão das células tumorais no estroma (Lanigan et al. 2007; Polyak, 2007).

Tumores, inclusive o câncer de mama, são caracterizados pela sua grande heterogeneidade e variabilidade histopatológica. Durante muito tempo o diagnóstico patológico convencional, como o tamanho do tumor, grau de malignidade e disseminação metastática, tem sido o “padrão ouro”. No entanto, estes parâmetros não são suficientes para decidir por uma terapia individualizada para as pacientes, como tem mostrado o acompanhamento ao longo prazo de pacientes com o mesmo subtipo patológico, os quais frequentemente têm respostas diferentes a terapias. A resposta ao tratamento não é determinada pelos fatores prognósticos anatômicos, tais como tamanho do tumor e status nodal, mas sim pelas características moleculares intrínsecas dos tumores que podem ser investigadas por métodos moleculares. Assim, há a necessidade de pesquisar outras formas mais exatas e sofisticadas de classificação dos tumores e de estratificação das pacientes para tratamentos mais apropriados (Gruver et al. 2011; Raica et al. 2009; Reis-filho & Pusztai, 2011; Rojo et al. 2007) .

Melhora significativa na classificação dos tumores de mama foi obtida na última década, através das pesquisas de novos marcadores. O trabalho pioneiro de Perou e colaboradores (2000) utilizou análise de cDNA *microarrays* para determinar que existem subtipos de câncer de mama com diferentes padrões de expressão gênica e diferentes prognósticos, os quais persistem no tumor primário assim como na metástase. Assim, foi possível classificar o câncer de mama nos seguintes subgrupos moleculares: Receptor de Estrógeno positivo (RE+), caracterizado pela alta expressão de vários genes expressos em células luminais de mama; super-expressor de HER2/ErbB2 (Receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano); tipo basal e tipo normal. Porém, estudos posteriores (Sørli et al. 2001) subdividiram os tumores RE+ em luminal A e luminal B (Fig. 2). O tumor do tipo luminal A expressa RE (receptor de estrógeno), e pode ou não apresentar positividade do Receptor de Progesterona (RP), mas possui expressão negativa de HER-2/ErbB2; é de baixo grau histológico, bem diferenciado e com poucas mitoses. O grupo luminal B possui o mesmo padrão de expressão de RE/RP, mas co-expressa os genes ligados à proliferação celular, pode expressar HER-2/ErbB2; é histologicamente menos diferenciado, com maior índice proliferativo e responde pior ao tratamento com anti-estrógenos. Os tipos luminal A e luminal B apresentam bom prognóstico, no entanto o tipo luminal B carrega um pior prognóstico de sobrevida. Os tumores com aumento de expressão de HER-2/ErbB2 possuem expressão positiva para HER-2/ErbB2, e amplificação do número de cópias deste gene; apresentam expressão negativa do RE/RP. Os carcinomas mamários que possuem aumento de expressão de HER-2/ErbB2 têm comportamento biológico agressivo, o que resulta em alta taxa de recorrência após o tratamento inicial, curta sobrevida livre da doença e um pior prognóstico. O subtipo basal não expressa ou tem baixa expressão de receptores

hormonais (RE/RP) e HER-2/ErbB2 e expressa proteínas comumente presentes nas células progenitoras ou células basais/luminais. Alguns tumores basais são de alto grau histológico ou agressivos. O subgrupo tipo normal expressa genes dos tecidos mesenquimais da mama e são frequentemente triplo-negativos (Brenton et al. 2005; Nielsen et al. 2004). Recentes estudos, de genômica e transcriptômica em grande escala, revelaram novos subgrupos de câncer de mama, demonstrando e comprovando ainda mais a grande heterogeneidade do câncer de mama e evidenciando a necessidade da busca por novos biomarcadores, no entanto, a predominância dos tumores RE+ como os de melhor prognóstico e os tumores HER2/ErbB2+ como os de pior prognóstico se manteve (Cancer & Atlas 2012; Curtis et al. 2012).

Figura 2 – Subtipos moleculares de câncer de mama. As amostras dos tumores foram divididas em cinco subtipos baseados em diferenças na expressão genica. O dendrograma mostra cinco subtipos de tumores: luminal A, azul escuro; luminal B, laranja; normal, verde; tipo basal, vermelho; e HER2/ErbB2, rosa (modificado de Sørli et al. 2001)

Nos últimos anos, vários estudos foram realizados visando identificar alterações genéticas nos tumores que possam ser utilizadas como marcadores no câncer de mama, no entanto, foram poucos os biomarcadores identificados, podendo ser citados o HER2, Receptor de Estrogeno, IGF1R, PI3K/AKT, mTOR, AMPK e as moléculas das vias de sinalização de angiogênese, os quais se mostraram eficazes na rotina clínica.

Nosso grupo busca identificar outros biomarcadores que possam ser efetivos na identificação de câncer de mama. Em 2004, Nagai e colaboradores identificaram diversos genes diferencialmente expressos em tumores de mama na presença e ausência dos receptores de estrôgeno e progesterona. A partir deste trabalho, o grupo tem avaliado alguns genes com potencial para ser utilizado como biomarcadores em câncer de mama, dentre eles o Par-4, descrito no presente trabalho.

1.2 - DESENVOLVIMENTO E MATURAÇÃO DA GLÂNDULA MAMÁRIA

A glândula mamária é derivada da epiderme e é a principal característica que distingue os mamíferos dos outros animais. Durante o desenvolvimento embriológico existe o crescimento e diferenciação da mama tanto em homens quanto em mulheres. O epitélio mamário se desenvolve numa elaborada rede de ductos ramificados os quais maximizam a área de superfície dentro de um volume limitado. À nascença, as glândulas mamárias masculina e feminina, são iguais e consistem em dois componentes: o epitélio ductal glandular e o tecido conjuntivo periductal. Na vida pós-natal, nos homens, há geralmente pouco desenvolvimento adicional e a glândula continua rudimentar. Nas mulheres, a glândula mamária sofre constantes modificações durante seu desenvolvimento, apresentando grande capacidade de remodelamento e regeneração, que estão correlacionadas com a idade e são reguladas por hormônios que influenciam funções reprodutivas. O desenvolvimento da glândula ocorre em três fases distintas e diferencialmente reguladas: embrionária, púbere e adulta, sendo que a mama é o único órgão que sofre a maior parte do seu desenvolvimento após o nascimento (Fig.. 3). Próximo dos 20 anos de idade a mama atinge seu desenvolvimento maior, e próximo dos 40 anos começam as mudanças de atrofia. Durante cada ciclo menstrual, ocorrem mudanças estruturais na mama sob a influência das mudanças nos níveis de hormônios ovarianos. Nas mamas femininas a produção de progesterona na fase luteínica leva ao desenvolvimento dos ácinos, o que não acontece no homem. O estrogênio induz hiperplasia epitelial ductal, ramificação e alongamento dos ductos, proliferação dos fibroblastos periductais e aumento da vascularização. Grandes

mudanças ocorrem não somente na atividade funcional da mama, mas também na quantidade de tecido glandular durante a gestação e lactação. A secreção e produção do leite são induzidas pela prolactina da glândula pituitária e por somatotropina da placenta. Com as mudanças no ambiente hormonal que ocorre na menopausa, os componentes glandulares da mama regridem e são repostos pela gordura e tecido conectivo (Gjorevski & Nelson, 2011; Bland & Copeland, 2004).

Figura 3 – Anatomia da mama. **A.** Anatomia da glândula mamária. Cada glândula contém 15 a 20 lóbulos, sendo que cada lóbulo contém uma série de ductos ramificados revestidos por uma camada de células epiteliais; **B.** Imagem ilustrativa de imunohistoquímica dos ductos cercados por uma camada de células mioepiteliais com propriedades contráteis, as que drenam o leite para o mamilo durante o período da lactação. Os ductos glandulares estão incorporados no estroma (composto de adipócitos, fibroblastos, vasos sanguíneos, etc); **C.** Imagem imunohistoquímica característica de tecido tumoral da mama; **D.** Morfologia terminal, dos ductos e componentes do estroma circundante (Modificado e adaptado de Ali & Coombes, 2002; Hebner et al. 2008)

O desenvolvimento e a função da glândula mamária são estimulados por uma variedade de hormônios, incluindo os esteroides sexuais, prolactina, oxitocina, cortisol, hormônios da tireoide e hormônios de crescimento. O estrogênio possui potencial efeito

mitótico (carcinogênico) no epitélio além de iniciar o desenvolvimento ductal, ele também aumenta o número de receptores de estrógeno e progesterona nas células epiteliais. A progesterona é responsável pela diferenciação de células epiteliais e leva ao desenvolvimento lobular, podendo também reduzir a ligação do estrógeno no epitélio mamário e limitar a proliferação do sistema tubular. Prolactina aumenta o número de receptores de estrógeno e células epiteliais e atua sinergicamente com o estrógeno no desenvolvimento ductal e com progesterona no desenvolvimento lóbulo-alveolar. A prolactina também é o hormônio primário de estímulo para lactogênese durante a gestação e no período pós-parto; prolactina estimula a diferenciação de células produtoras de leite na mama e a síntese dos componentes do leite (Bland & Copeland, 2004).

O crescimento epitelial da mama é hormônio-dependente e começa na puberdade, quando a glândula virgem se desenvolve em estruturas proliferativas chamadas unidades terminais de ducto lóbulo-alveolar (*Terminal ductal lobulo-alveolar units* - TDLU), as quais crescem e se ramificam para formar a árvore ductal do epitélio maduro. O ducto mamário maduro consiste de uma camada externa de células mioepiteliais adjacentes a matriz extracelular e uma camada interna de células epiteliais luminais as quais circundam o lúmen. A árvore epitelial de ductos é envolta pela membrana basal e inserida dentro de um estroma. Assim, um único microambiente influencia a homeostase do tecido mamário através de hormônios, fatores solúveis, estroma, estresse e força física (Gjorevski & Nelson, 2011; Hebner et al. 2008; Lanigan et al. 2007).

O desenvolvimento da mama durante a puberdade envolve a invasão das estruturas epiteliais ductais no estroma circundante de uma forma direcionada, com recrutamento

de fibroblastos, células do sistema imune e dos componentes da matriz extracelular ao redor das TDLU, e diminuição da membrana basal (Lanigan et al. 2007).

Durante a sua existência, o epitélio, como também os fibroblastos, macrófagos e adipócitos, irá passar por vários ciclos de proliferação e morte celular durante a gestação, lactação e involução. Vários dos mecanismos de sinalização que controlam a invasão inicial da gordura pelo epitélio, e regulam sua plasticidade contínua podem ser danificados por células tumorais para suportar seu crescimento aberrante e sua progressão através da invasão (Fig. 4) (Lanigan et al. 2007).

Figura 4 – Estágios de desenvolvimento da glândula mamária e do câncer de mama. Esquema dos diferentes estágios da glândula mamária e do desenvolvimento do câncer de mama, com exemplos de algumas moléculas sinalizadoras envolvidas. Os ductos normais de mama são compostos da membrana basal e da camada de células luminais epiteliais e mioepiteliais. As células compoendo o estroma incluem leucócitos, fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais. Em carcinomas *in situ* as células mioepiteliais são epigeneticamente e fenotipicamente alteradas e seu número diminui, potencialmente devido à degradação da membrana basal. Ao mesmo tempo, ocorre aumento de fibroblastos de estroma, miofibroblastos, linfócitos, e células endoteliais. Perda de células mioepiteliais e da membrana basal resulta em carcinomas invasivos, nos quais as células tumorais podem invadir tecidos adjacentes e podem migrar para outros órgãos, levando a metástase (Lanigan et al. 2007)

A glândula mamária possui uma arquitetura muito bem organizada e funcional de células epiteliais e estromais cercadas pelos componentes da matriz extracelular (MEC) e seu desenvolvimento e manutenção dependem de um complexo sistema de comunicação, incluindo interações célula-célula e célula-MEC, as quais levam à formação de ductos e ácinos. Visto isso, o nosso grupo avaliou a morfogênese mamária utilizando células mamárias normais, MCF10A, em cultura 3D, onde elas podem seguir o processo morfogênico acinar que inclui proliferação, diferenciação e morte celular. As células em 3D formam estruturas acinares bem organizadas as quais, em contato com os

componentes da MEC adquirem polaridade apicobasal, levando a redução na proliferação celular e morte das células no interior do ácino. No entanto, células tumorais derivadas de adenocarcinomas da mama continuam mantendo a capacidade de proliferação, formando esferoides sólidos ou massas celulares desordenadas. O desenvolvimento da glândula mamária, a lactação e a involução envolvem o processo da apoptose, assim, mudanças no microambiente celular que reduzem fatores de sobrevivência tais como baixo acesso aos nutrientes, hipóxia e perda de contato com a membrana basal contribuem para a morte das células no interior do ácino, levando à formação do lúmen. A apoptose seletiva ou autofagia são os maiores processos envolvidos na remoção seletiva de células centralmente localizadas no esferoide, levando à formação do lúmen acinar. A expressão de PAR-4 pode aumentar a sensibilidade da maioria das células cancerosas à apoptose, especialmente linhagens celulares hormônio independentes, incluindo células de câncer de mama. No presente estudo foi visto que durante a morfogênese acinar das células MCF10A em cultura 3D o PAR-4 estava diferencialmente expresso, mostrando a existência de atividade apoptótica no interior dos acinos (de Bessa Garcia et al. 2010a).

1.3- HIPÓXIA

Hipóxia é a condição na qual o oxigênio está privado e o suprimento adequado de energia é deficiente (Höckel & Vaupel 2001). Hipóxia pode ser considerada uma das características centrais do câncer e uma força motriz fundamental da progressão maligna. Deficiência em oxigênio é um estresse central do microambiente tumoral que surge como consequência da expansão dos tumores sólidos pela proliferação exacerbada das células cancerosas e baixo suprimento vascular (Avni et al. 2011). Durante o crescimento tumoral aumenta o comprometimento do suprimento sanguíneo que geralmente resulta em tensão de oxigênio no tumor de 0-20 mmHg, comparado com 24-66 mmHg em tecidos humanos normais (Knowles & Harris, 2001). É difícil definir o limiar da concentração de oxigênio durante a hipóxia, pois cada tecido possui sua própria variação de oxigênio, por exemplo, no tecido normal mamário o limiar é de 8-10 mmHg, 1.3 % O₂ e 65 % pO₂ (Höckel & Vaupel, 2001).

Hipóxia é uma condição difícil tanto para células malignas quanto para células normais, no entanto, as células tumorais podem sofrer mudanças gênicas as quais lhe permitem sobreviver e propagar mesmo em condições de pouco oxigênio. Quando as células tumorais se tornam hipóxicas, a expressão genica é alterada, possuindo um papel vital na regulação de angiogênese, invasão do sistema imune, instabilidade genética, metástase e invasão, metabolismo, resistência ao tratamento e manutenção de células tronco. Hipóxia pode induzir morte celular programada (apoptose) em células normais e neoplásicas. A transformação oncogênica das células (transfecção com genes do papilomavirus humano E6/E7 ou genes c-myc) aumenta sua susceptibilidade a apoptose

induzida por hipóxia. O nível de p53 em células aumenta sob condições de hipóxia, o que induz apoptose pela via que envolve Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*) e caspase-9 como efetores *downstream*. Contudo, hipóxia também inicia vias de apoptose independentes de p53 envolvendo *HIF-1* (*Hypoxia Inducible Factor-1*), genes da família *BCL-2* e outros genes ainda não identificados. Mudanças induzidas na proteômica pela hipóxia levam a parada do ciclo celular, diferenciação, apoptose e necrose, e podem explicar recorrências tardias, micro-metastases dormentes e crescimento retardado das grandes massas tumorais (Höckel & Vaupel, 2001).

O principal mecanismo pelo qual células cancerosas se adaptam ao microambiente hipóxico é através da ativação dos fatores induzidos por hipóxia (HIFs) (Wong 2012). *HIF-1* regula a expressão de genes que mediam respostas adaptativas. Toda a cascata transcricional de *HIF-1* está envolvida na inflamação, pois durante o crescimento do tumor sólido ocorrem alterações no suprimento de oxigênio e de nutrientes levando as células à necrose, a qual, por sua vez, libera mediadores pro-inflamatórios (Mamlouk & Wielockx, 2012; Rohwer et al. 2012).

A hipóxia influencia vários aspectos da biologia dos tumores e suas respostas a terapias. Inicialmente, hipóxia surge por causa da limitação da difusão do oxigênio em tumores primários avasculares ou suas metástases, mas a microvasculatura do tumor (induzida em parte como resposta a hipóxia) é altamente anormal e frequentemente falha em retificar a deficiência de oxigênio (Fig. 5). A hipóxia persistente reflete a desorganização espacial da rede vascular do tumor, levando a distâncias intercapilares frequentes além da área de difusão do oxigênio. Além da hipóxia limitada pela difusão, fluxo sanguíneo temporariamente instável nas redes microvasculares do tumor também leva a flutuação da hipóxia limitada pela perfusão (Wilson & Hay, 2011).

Hipóxia é conhecida por induzir instabilidade genica, além de prover uma importante pressão seletiva o que resulta no aumento da agressividade do tumor e sua resistência a apoptose. A hipóxia também protege as células da radiação e quimioterapia, e tem sido associada a um pior prognóstico. As células tumorais em expansão, quando em hipóxia, induzem a expressão de vias moleculares importantes que promovem a sobrevivência celular, a angiogênese, a disseminação do tumor, a apoptose e a resistência às terapias (Avni et al. 2011).

Os muitos efeitos da hipóxia na biologia do tumor incluem: seleção do genótipo favorecendo sobrevivência sob injúria de hipóxia-re-oxigenação (tais como mutações em TP53); mudanças pro-sobrevivência na expressão genica que suprime apoptose e suporta autofagia; e o balanço anabólico no metabolismo central. Hipóxia também aumenta sinalização mediada pelo receptor tirosina quinase, angiogênese tumoral, transição do epitélio para mesênquima, invasão e metástase, além da supressão da reativação do sistema imune. Hipóxia também contribui para a perda na estabilidade genômica através da geração aumentada de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a diminuição das vias de reparo de DNA (Wilson & Hay, 2011).

Durante a hipóxia, há deficiência na produção eficiente de ATP (Adenosina trifosfato), assim, ocorre uma mudança da via respiratória para a glicólise anaeróbica. Isso está associado aos altos níveis de consumo de glicose característica dos tecidos de tumores sólidos e é necessária para manter tanto o suprimento de precursores das vias anabólicas (lipídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos, etc) quanto dos níveis celulares da produção de ATP dentro do ambiente de estresse (Knowles & Harris, 2001). O esquema representativo do modelo de hipóxia intratumoral está representado na figura 5.

Figura 5 – Hipóxia intratumoral e simbiose metabólica. Tumores são caracterizados por gradientes dos níveis de O_2 , baseado na distância das células tumorais do vaso sanguíneo funcional. No esquema, células tumorais ao redor do vaso sanguíneo estão bem oxigenadas, enquanto células tumorais mais distantes do vaso estão pouco oxigenadas e expressam altos níveis de HIF-1. HIF-1 induz expressão de proteínas que aumentam a captação de glicose; conversão de glicose a piruvato; geração de lactato e H^+ ; e efluxo destas moléculas para fora da célula. Dois moles de lactato são produzidos para cada mol de glicose consumida pela célula hipóxica. O aumento no metabolismo glicolítico está associado com distribuição reduzida do substrato para a mitocôndria (através da ação da PDK1) e reduzida massa mitocondrial (Semenza, 2008)

Vários oncogenes e genes supressores de tumor estão envolvidos na mudança metabólica da fosforilação oxidativa para glicólise nas células tumorais, tais como *myc*, NF- κ B, Akt/PKB, EGF, IGF- I, PI3K, mTOR, KRAS, AMPK, e fator indutor de hipóxia 1 (HIF-1). A maioria destes oncogenes tem sido mostrada estimulando genes

codificantes para proteínas que medeiam glicólise e glutaminólise. O componente principal na adaptação celular é o fator de transcrição HIF-1 α , o qual geralmente é controlado pela concentração de oxigênio celular através das prolin hidroxilases e do complexo de von Hippel-Lindau (Fig. 6) (Hirschhaeuser et al. 2011).

Figura 6 – Esquema da regulação de HIF-1. A. Em normóxia, HIF-1 α é hidroxilado (OH) por PHD1, 2 e 3 na presença de O₂, Fe²⁺, 2-oxoglutarato e ascorbato. HIF-1 α hidroxilado é reconhecido pela VHL que, em conjunto com ubiquitina ligase (Ub), marca HIF-1 α com poliubiquitina, o que permite seu reconhecimento por proteossomos e subsequente degradação; B. Em hipóxia, a hidroxilação por prolinas é inibida. VHL não se liga mais ao HIF-1 α , o que leva ao acúmulo de HIF-1 α e sua translocação para o núcleo, onde HIF-1 α dimeriza com HIF-1 β , se liga aos HRE dentro dos promotores dos genes alvo (Carroll & Ashcroft, 2005)

1.4- NDRG1 E HIPÓXIA

Outro gene com forte relação com hipóxia é o *NDRG1* (*N-myc downstream-regulated gene*), também conhecido como *Drg1*, *Cap43*, *Rit42*, *RTP* e *PROXY-1*. Inicialmente, NDRG1 foi descrito como proteína de resposta ao estresse envolvida em eventos de diferenciação celular em resposta à homocisteína. NDRG1 tem sido identificado como supressor de metástases em tumores de próstata, colón e mama. Segundo a literatura, a hipóxia induz o gene *NDRG1* e o fator de transcrição HIF-1 está envolvido na sua regulação, no entanto, outras vias independentes de HIF-1 atuam na indução deste gene quando em hipóxia crônica. NDRG1 também pode ser regulado por vias dependentes de *TP53*, assim como por mielocitomatose derivada de neuroblastoma, além de outros fatores, tanto ao nível transcricional como translacional, e através de estabilidade do RNA mensageiro (Cangul, 2004; Ellen et al. 2008).

O gene *NDRG1* foi mapeado no cromossomo 8q24.3, possuindo aproximadamente 60 Kb de comprimento. Este gene codifica para o RNA mensageiro (mRNA) de 3.0 Kb que codifica uma proteína de 43 kDa (composta de 394 aminoácidos) altamente conservada entre os organismos multicelulares. *NDRG1* contém ilhas CpG no seu promotor e pode assim ser regulado por metilação (Sun et al. 2013). A localização de NDRG1 é predominantemente citoplasmática, estando presente nos tecidos em resposta aos sinais de estresse celular (Cangul, 2004; Ellen et al. 2008).

O estudo de NDRG1 começou com a sua identificação como gene de resposta ao stress responsivo a homocisteína em células endoteliais umbilicais humanas. Em seguida, NDRG1 foi visto sendo regulado por androgênio em células de

adenocarcinoma de próstata. Logo, *NDRG1* foi descrito como gene regulado por hipóxia cuja expressão é induzida por hipóxia ou níquel, indicando novamente que *NDRG1* funciona como gene de resposta ao stress. Aumento da expressão, HIF-1 dependente e independente, de *NDRG1* em resposta a hipóxia é observado em células cancerosas (Melotte et al. 2010).

O gene *NDRG1* é um dos membros da família de *NDRG* humanos, a qual compreende *NDRG2*, *NDRG3* e *NDRG4* os quais compartilham 53-64% de homologia um com o outro. mRNA de *NDRG1* é simultaneamente expresso na maioria dos tecidos humanos, mas seus níveis são altos em tecidos de próstata, cérebro, rins, placenta e intestino. No entanto, a proteína *NDRG1* é principalmente encontrada em células epiteliais, o que pode sugerir que ela possui uma função específica. Já *NDRG2* é fortemente expressa no cérebro, coração, musculo esquelético e cordão espinal, enquanto sua expressão em outros órgãos é fraca. O gene *NDRG3* é expresso em todos os órgãos, mas é mais abundante nos testículos. O gene *NDRG4* é unicamente expresso no cérebro e coração (Sun et al. 2013).

A expressão do gene *NDRG1* é regulada por compostos de níquel, cobalto, hipóxia, stress oxidativo, vitaminas A e D, ésteres de forbol, esteroides, drogas alvo de histona deacetilase, homocisteína, β -mercaptoetanol, tunicamicina, lisofosfatidilcolina, retinoides sintéticos, oncogenes (N-myc/c-myc), genes supressores de tumor (p53 e von Hippel-Lindau) e componentes que promovem diferenciação celular (Sun et al. 2013).

De acordo com o trabalho publicado por Cangul (2004) e colaboradores, hipóxia aumenta a expressão de *NDRG1* levando a sua super-expressão em vários tipos de câncer. Foi visto também que este gene possui dois elementos responsivos a hipóxia

(HRE) na sua sequência não codificante entre 13776 e 7503pb (Kitowska & Pawełczyk, 2010).

Visto os dados referentes ao NDRG1, sua função na célula e sua resposta a baixos níveis de oxigênio, esta proteína foi escolhida como controle endógeno do efeito da hipóxia no presente trabalho.

1.5- Prostate Apoptosis Response – 4 (PAR-4)

Pesquisas têm sido realizadas a fim de identificar características específicas do tumor, através do uso de marcadores moleculares, que permitam selecionar pacientes para tratamentos específicos e individualizados além do maior conhecimento sobre a biologia e progressão tumoral (Li et al. 2010; Marinho et al. 2008; Nielsen et al. 2004; Voduc et al. 2010).

A homeostase tecidual é mantida pelo equilíbrio entre as vias de sinalização, responsáveis pela proliferação e morte celulares. Alterações neste equilíbrio contribuem para o processo de formação de tumor. Dentre as vias de sinalização celular, a via de PI3K/AKT [*phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine kinase (protein kinase B)*] possui um papel chave na sobrevivência, diferenciação e proliferação celular, especialmente na regulação do crescimento de células malignas em câncer de mama (Liu et al. 2009; Sen et al. 2003).

Trabalho de Goswami (2005) e colaboradores descreve que AKT se liga a proteína pro-apoptótica Par-4 (*Prostate Apoptosis Response-4 protein*) através do domínio zíper de leucina e fosforila Par-4 para inibir apoptose em células cancerosas. AKT, então, pode ser considerada uma parceira de ligação que impacta a atividade de Par-4 em células cancerosas (Zhao & Rangnekar, 2008).

O gene Par-4 foi inicialmente identificado por Sells (1994) e colaboradores, como um gene apoptótico, regulado positivamente em resposta a elevada concentração intracelular de Ca^{2+} em células de câncer de próstata de rato andrógeno-independentes AT-3 tratadas com ionmicina. Alguns anos depois, outros trabalhos (Boghaert et al., 1997; Johnstone et al., 1996; Sells et al., 1997) relataram que o produto do gene *PAR-4*, em humanos, é uma proteína de aproximadamente 40 kDa, composta por 342 aminoácidos. Mais tarde, Johnstone (1998) e colaboradores identificaram que o gene humano *PAR-4* está localizado no braço curto do cromossomo 12q21. Este gene, atualmente denominado *PAWR* (*PKC apoptosis WTI regulator*), é estruturado em sete éxons e seis íntrons, e ocupa 99.06 kB de DNA genômico (Zhao & Rangnekar, 2008).

Figura 7 – Esquema representativo dos domínios funcionais da proteína Par-4: duas sequências de localização nuclear na região N-terminal - NLS1 (entre os aminoácidos 20 e 25) e NLS2 (entre os aminoácidos 137 e 153); domínio zíper de leucina na região C-terminal (entre os aminoácidos 290 e 332); sítios de fosforilação por quinases S154 e T155 e domínio SAC (entre os aminoácidos 137 e 195) (Modificado de Gurumurthy et al. 2005)

Alguns dos domínios funcionais conservados de Par-4 incluem duas sequências de localização nuclear (NLS) na região N-terminal; um domínio zíper de leucina abrangendo 290-332 resíduos de aminoácidos na região C-terminal e uma sequência de exportação nuclear na região C-terminal. A proteína também possui vários sítios consenso para fosforilação por quinases como as proteínas quinases A e C. Estes domínios são importantes na regulação, localização, dimerização e modificação pós-traducional da proteína Par-4. A proteína Par-4 é amplamente expressa, estando presente em diversos tecidos e tipos celulares em humanos, camundongos, cavalos, etc(El-Guendy & Rangnekar, 2003; El-Guendy et al. 2003; Zhao & Rangnekar, 2008).

As células que são resistentes à apoptose por Par-4 sozinho, no entanto, são estimuladas por este para a ação de outros estímulos pro-apoptóticos tais como retirada dos fatores de crescimento, TNF, radiação ionizante, aumento de cálcio intracelular, ou

aqueles envolvidos em doenças neurodegenerativas tais como Alzheimer, Parkinson, etc. (El-Guendy & Rangnekar, 2003).

Existem diversos mecanismos pelos quais Par-4 pode exercer o seu papel apoptótico. Um destes mecanismos é a translocação de Fas e FasL para a membrana plasmática, onde ocorre a ligação de Fas com FasL, levando a formação do complexo de sinalização indutor de morte (*Death-Inducing Signalling Complex – DISC*), ativando a via apoptótica FasL-Fas-FADD-caspase-8 (Chakraborty et al. 2001). Par-4 também pode inibir ζ PKC, resultando na ativação de p38 MAPK e indução de apoptose. Outro mecanismo de ação de Par-4 é através da inibição da expressão do gene pro-apoptótico *BCL-2* através da interação com seu promotor via WT1 (*Wilms' Tumor 1*), no núcleo (Fig. 8) (El-Guendy & Rangnekar, 2003).

Burikhanov (2009) e colaboradores relataram que Par-4 também possui uma via extrínseca de apoptose onde este é espontaneamente secretado tanto por células normais quanto por células cancerosas em cultura. A via de Par-4 extracelular é ativada pela ligação de Par-4 a proteína de resposta ao stress, GRP78 (*Glucose-Regulates Protein-78*), expressa na superfície de células cancerosas. A interação de Par-4 extracelular com GRP78 da superfície celular leva a apoptose por stress de RE (Retículo endoplasmático) e ativação da via FADD-Caspase-8-Caspase-3. A apoptose induzida por TRAIL, uma proteína pro-apoptótica, também é dependente da sinalização de Par-4 extracelular via GRP78 de superfície celular.

Um trabalho recente de Chaudhry (2012) e colaboradores relatou que Par-4 é o substrato fisiológico da caspase-3 durante apoptose induzida por cisplatina em várias linhagens celulares normais e tumorais. Sendo que a clivagem de Par-4 pela caspase 3 gera um fragmento C-terminal de aproximadamente 25 kDa, induzindo seu acúmulo no núcleo e a apoptose.

Figura 8 – Esquema do modelo atual do mecanismo de ação de Par-4. Par-4 afeta múltiplas vias regulando sobrevivência celular tanto no citoplasma quanto no núcleo. No citoplasma, Par-4 aumenta a translocação de Fas e FasL para a membrana, bloqueia a função de ζ PKC e inibe a expressão de Bcl-2. No núcleo, Par-4 inibe a translocação de NF- κ B, além de inibir a expressão de Bcl-2 pela interação com WT1 (El-Guendy & Rangnekar, 2003)

A proteína Par-4 possui uma forte correlação entre a sua localização intracelular e sua função apoptótica. No trabalho de El-Guendy (2003) e colaboradores foi visto que a presença nuclear de Par-4 estava correlacionada com a sua habilidade de induzir apoptose, assim como foi notado que os níveis de Par-4 são geralmente maiores em células em apoptose. Na maioria das células cancerosas, Par-4 ectópico é rapidamente

translocado para o núcleo, já em células normais, Par-4 ectópico é predominantemente localizado no citoplasma e não induz apoptose a menos que haja um segundo sinal apoptótico. Par-4 não induz apoptose em linhagens celulares dos tumores de mama e próstata, MCF7 e LNCaP, respectivamente, onde a sua localização é descrita como primariamente citoplasmática (Gurumurthy & Rangnekar 2004). Isto implica que Par-4 endógeno deva ser inativa, e seu potencial apoptótico desencadeado em resposta a estímulos apoptóticos (retirada de fator de crescimento, Ca^{2+} , TNF, UV, radiação γ , ou INF- γ) (Goswami et al. 2005; Zhao & Rangnekar, 2008). O estudo de Goswami (2005) e colaboradores demonstrou que quinase de sobrevivência de célula, AKT (ou proteína quinase B), se liga à Par-4 endógena e a inativa por fosforilação. A ligação e fosforilação de Par-4 pela AKT faz desta um substrato para a proteína chaperona 14-3-3, a qual efetivamente sequestra Par-4 no citoplasma (Fig. 9). Segundo Zhao & Rangnekar (2008), isto pode explicar porque Par-4 endógeno por si só não causa apoptose. A via de PI3K/AKT está envolvida no mecanismo anti-apoptótico em várias células cancerosas, e sua atividade é elevada em câncer devido à perda de função do gene supressor tumoral PTEN e/ou a ativação positiva da via de PI3K.

Figura 9 – Regulação de Par-4 por Akt. Inativação de Par-4, essencial para sobrevivência de células cancerosas. **A.** Akt1 ativado por PI3K possui papel principal na sobrevivência celular. **B.** Fosforilação de Par-4 por Akt ativado sinaliza para a ligação da chaperona 14-3-3 ao Par-4 e consequente sequestro de Par-4 no citoplasma, levando a sobrevivência da célula; enquanto que, quando Akt está inativo, não ocorre a fosforilação de Par-4, permitindo sua translocação para o núcleo, levando a apoptose (Goswami et al. 2005)

Poucos são os trabalhos avaliando o papel de Par-4 em câncer de mama. A maior parte dos estudos ainda é realizada em tumores de próstata utilizando cultura de células (Sells et al. 1997; Goswami et al. 2005) ou camundongos geneticamente modificados (Garcia-Cao et al. 2003). Outros trabalhos avaliam a função de Par-4 em células de carcinoma renal (Cook et al. 1999), em leucemia linfocítica (Boehrer et al. 2001), em tumores pancreáticos (Ahmed et al. 2008), entre outros órgãos.

Estudos recentes do nosso grupo (Nagai et al. 2010; de Bessa Garcia et al. 2010b) mostraram, pela primeira vez, evidências de que Par-4 é diferencialmente expresso durante o processo da morfogênese acinar da linhagem celular MCF10A na cultura celular 3D, sugerindo seu papel no processo da morfogênese da glândula mamária. Além disso, observamos que a redução da expressão da proteína Par-4 está associada a um pior prognóstico em câncer de mama; e que este tipo de regulação é um fator de pior prognóstico associado no câncer de mama do tipo luminal A, sugerindo uma associação funcional entre a presença do receptor de estrógeno (RE) e expressão de Par-4. Recentemente, investigando os mecanismos de regulação da expressão do gene *PAR-4* em células MCF7, mostramos que a expressão de Par-4 é regulada negativamente por E2 (estradiol) e IGF-1 em linhagens celulares de câncer de mama MCF7, sugerindo que esta regulação contribui para a sobrevivência celular promovida por estes fatores mitogênicos (Casolari et al. 2011).

No presente estudo tivemos como objetivo avaliar o efeito da hipóxia na expressão de PAR-4 em células epiteliais mamárias MCF10A e em células de câncer de mama MCF7 e MDA-MB-231.

2 - OBJETIVOS

1 – OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da hipóxia na expressão do gene supressor de tumor PAR-4 em linhagens celulares de câncer de mama.

2.2 – OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Avaliar os efeitos da hipóxia nos níveis de expressão das proteínas Par-4 e NDRG1 em linhagens celulares MCF10A, MCF7 e MDA-MB-231 por western blot.
2. Avaliar os efeitos da hipóxia nos níveis de expressão dos transcritos de PAR-4 e NDRG1 em linhagens celulares MCF10A, MCF7 e MDA-MB-231 por PCR em tempo real.

3 - Materiais & Métodos

3.1 – Cultura de células

As células epiteliais normais de mama MCF10A e as células tumorais MCF7 e MDA-MB-231 foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC-Rockville, MD). Estas células já fazem parte do banco de linhagens celulares do Laboratório de Genética Molecular de Câncer da Disciplina de Oncologia da FMUSP. A linhagem MCF10A é derivada de células epiteliais de mama. São células não transformadas que sofreram imortalização espontânea, provenientes de uma paciente de 36 anos de idade com alterações fibrocísticas. Estas células exibem várias características de célula epitelial de mama normal, tais como perda de tumorigenicidade, perda de crescimento independente de ancoragem e dependência de fatores de crescimento e hormônios para sua proliferação e sobrevivência (Soule *et al*, 1990). As células MCF10A foram cultivadas em meio F12 (Ham's Nutrient Mixture) e DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Invitrogen, Carlsbad, EUA) (1:1) suplementado com 10 % de soro de cavalo, insulina (5 µg/µL), EGF (0,02 µg/µL), hidrocortisona (0,5 µg/µL) e toxina colérica (0,1 µg/mL). A linhagem celular MCF7, derivada de adenocarcinoma de mama e RE-positiva (expressando cerca de 70 fmol/mg da proteína) e a linhagem celular MDAMB231, derivada de sítio metastático de adenocarcinoma, e RE-negativa, foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, EUA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Gibco, Gainsburg, EUA). As três linhagens foram mantidas nos meios específicos contendo antibiótico-antimicótico nas concentrações de 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 0,25 µg/ml de fungizona (Gibco, Gainsburg, EUA). As células foram mantidas em estufa (Thermo

Electron Corporation, Marietta, EUA) a 37 °C sob atmosfera de 5 % de CO₂ e 20 % de O₂.

3.2 - Condições de Normóxia e Hipóxia

Em normóxia, as células MCF10A, MCF7 e MDAMB231 foram cultivadas em placas de 6 poços com 1x10⁵ células/poço em estufa a 37 °C, 5 % de CO₂ e 20 % O₂ por 24 horas. Para a condição de hipóxia, as células MCF10A, MCF7 e MDAMB231 foram cultivadas em placa de 6 poços com 1x10⁵ células/poço em estufa a 37 °C, por períodos de 6 e 24 horas, em câmaras de hipóxia (*Modular Incubator Chamber*, modelo MIC 101, *Billups-Rothenberg Inc.*, California, USA), regulada a 5 % de CO₂, 95 % de N₂ e 0,2 % de O₂. A concentração de oxigênio no interior das câmaras de hipóxia foi medida utilizando dispositivo de detecção monogás O₂ Dräger Pac® 5500 (Draeger Safety UK Ltd., Blyth).

As células MCF7 também foram cultivadas em placa de 6 poços com 1x10⁵ células/poço em estufa a 37°C, por períodos de 6 e 24 horas e expostas às condições de hipóxia no sistema de cultura celular H35 Hypoxystation (Don Whitley Scientific Ltd., West Yorkshire, UK) a 5 % CO₂ e 1 % O₂.

Figura 10 – Sistemas de incubação de hipóxia. (A) Câmara de *Hypoxia Modular Incubator Chamber MIC-101*, Billups-Rothenberg, regulada a 5 % de CO₂, 95 % de N₂ e aproximadamente 0.2 % de O₂ e (B) H35 Hypoxystation (Don Whitley Scientific Ltd., West Yorkshire, UK), regulada a 5 % CO₂ e 1 % O₂.

3.3 – Extração de RNA

As células mantidas em normóxia ou hipóxia foram lavadas duas vezes com solução PBS 1 vez e, em seguida, incubada com Trypsin-EDTA 0,05 % (Gibco – Invitrogen) por 5 min para o descolamento das células do substrato de plástico. A solução de células em tripsina foi transferida para um tubo *falcon* 15 ml e centrifugada a 2000 rpm por 1 min. O pellet foi ressuscitado em PBS 1 vez para posterior extração de RNA e proteínas.

O RNA total das células foi extraído de acordo com o método descrito por Chomezynski & Sacchi (1987), baseado em Isotiocionato de Guanidina e Fenol-Clorofórmio. A solução de células em PBS foi centrifugado a 2000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante descartado. Ao *pellet* formado foram adicionados 350,0 µl de solução D

gelada (isotiocianato de guanidina 4,0 M; citrato de sódio 25,0 mM pH 7,0; sarcosil 0,5% e β -mercaptoetanol 0,1 M). Em seguida, foram adicionados 70 μ l de acetato de sódio 2,0 M, pH 4,6; 350 μ l de fenol pH 5,0-6,0; e 175 μ l clorofórmio-álcool isoamílico (49:1). Após a adição de cada solução a mistura era homogeneizada por inversão. A suspensão final foi agitada vigorosamente por 10 segundos e deixada em banho de gelo por 15 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C. A fase aquosa sobrenadante foi cuidadosamente transferida para um novo tubo, evitando a retirada da interfase e da fase inferior. Em seguida a amostra foi precipitada com igual volume de isopropanol a -20°C *overnight*. Após este período, a amostra foi novamente centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos a 4°C e o precipitado resultante foi dissolvido em 150,0 μ l de solução D e precipitado com 170,0 μ l de isopropanol a -20°C *overnight*. Os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi lavado com 150,0 μ l de etanol 75% e centrifugado novamente por 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, seco e dissolvido em 10,0 μ l de água livre de RNase/DNase (Gibco, Gainthersburg, EUA).

A concentração e a pureza do RNA extraído foi determinada por leitura espectrofotométrica a 260/280 nm em *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific, Wilmington, USA). A pureza do RNA foi avaliada pela proporção 260/280 nm, que deve ficar entre 1.8 e 2,0. A qualidade (integridade) do material foi analisada em gel de agarose 1% contendo formaldeído. Para a eletroforese, 1,0 μ l das amostras de RNA foram diluídas em 3,0 μ l de H₂O livre de RNase/DNase e 4,0 μ l de tampão de aplicação (75,0 μ l de formamida deionizada; 24,0 μ l de formaldeído; 15,0 μ l de MOPS 10X; 10,0 μ l de glicerol; 10,0 μ l H₂O livre de RNase/DNase e 8,0 μ l de azul de

bromofenol 5%). A mistura foi incubada por 15 minutos a 65°C e 2 minutos em banho de gelo, em seguida, foi adicionado 1,0 µl de brometo de etídeo (1,0 mg/ml) por amostra. O volume total da mistura (aproximadamente 9,0 µl) foi aplicado no gel e a corrida foi realizada em tampão MOPS (MOPS 0,02 M; acetato de sódio 5,0 mM; EDTA 0,1 mM; pH 7,0) a 60V por aproximadamente 40 minutos.

3.4 – Tratamento do RNA com *DNase*

Após análise da integridade do RNA, alíquotas de RNA total (3,0 µg) foram tratadas com a enzima *RQ1 RNase-free DNase* (volume igual a 30% da concentração de RNA) (1 U/µl – Promega, Madison, USA) por 60 minutos a 37°C. Em seguida o RNA foi precipitado com etanol absoluto (2,5x volume) e 3,0 µl de acetato de sódio (0,2 M pH 4,0 – 4,6) e incubado a -20°C overnight. Após este período, o RNA foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi lavado com 200,0 µl de etanol 75%, novamente centrifugado a 10.000 rpm por 20 e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi seco em dissecador a vácuo por 10 minutos para retirada total do etanol e, em seguida, ressuspendido em 12,5 µl H₂O livre de *RNase/DNase* (GIBCO, Gainthersburg, USA).

3.5 – PCR em Tempo Real

Para a realização da técnica de PCR em Tempo Real foi feita a síntese de cDNA com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems, Warrington, UK), seguindo as instruções do fabricante. Foi preparada uma mistura contendo dNTPs, iniciadores randômicos, transcriptase reversa e inibidor de RNase (1 U/ μ l de *RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor* – Invitrogen Life Technologies, Califórnia, USA) e adicionada ao igual volume de RNA previamente tratado com *DNase I*. A reação de síntese de cDNA foi feita a 25°C por 10 minutos seguida de 2 horas a 42°C. A eficiência da síntese de cDNA foi verificada através de reações em cadeia de polimerase (PCR), utilizando as moléculas de cDNA sintetizadas como molde, pares de iniciadores (oligonucleotídeos) específicos para o gene constitutivo GAPDH (0,16 μ M) e β -2-microglobulina (0,20 μ M). As reações foram realizadas utilizando-se 2,5 μ l de cDNA (diluído 1:10); 125,0 μ M de dNTPs (Amersham Biosciences, New Jersey, USA); 50,0 mM KCl; 10,0 mM de Tris-HCl pH 8,3; 0,1 mg/ml de gelatina; 1,5 mM $MgCl_2$ e 0,75 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, California, USA) em um volume final de reação de 25 μ l. As amostras foram amplificadas em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) por 35 ciclos, sendo que cada ciclo corresponde a: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 75°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram diluídos em tampão *Type II* e submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose 2,0% (contendo 0,8 μ g/ml de brometo de etídeo), utilizando-se como padrão de peso molecular o marcador de 100 pb.

A quantificação relativa dos transcritos diferencialmente expressos foi feita por PCR em tempo real utilizando cDNAs provenientes das amostras de RNA das células em normóxia e em hipóxia, oligonucleotídeos específicos desenhados para os transcritos a serem analisados e o kit *SYBR Green PCR Reagent* (PE Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação e detecção dos produtos de PCR foram realizadas utilizando-se o *ABI 7500 Detection System* (Perkin Elmer). Os iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa *Primer3* e *Amplify 1.2* para gerar produtos específicos entre 100 e 150 pb. A geração de produtos específicos foi monitorada para cada par de iniciadores em gel de agarose 2%. As condições de reação para cada iniciador foram definidas após testes com diferentes diluições de cDNAs e diferentes concentrações de iniciadores. As reações foram feitas em duplicata para cada amostra e sempre em placa contendo um gene normalizador. No presente estudo foram analisados quatro genes constitutivos (BAT, GAPDH, HP e RL13) quanto a sua variação nas condições de normóxia e hipóxia. Para isso, foram utilizados os cDNAs sintetizados a partir de RNAs das linhagens celulares MCF10A e MCF7 submetidas a condições de normóxia e hipóxia de 6 e 24 horas. Foram realizadas reações de RTqPCR com os genes constitutivos e os genes alvo (PAWR e NDRG1) e os dados obtidos foram analisados no software DataAssist v 3.01 (Applied Biosystems), sendo escolhido o gene normalizador do estudo aquele com o menor variação e menor valor de *Score*.

A expressão relativa foi calculada por $2^{-\Delta\Delta C_t}$ onde:

Ct = ciclo de início de quantificação do transcrito;

ΔC_t = Ct do gene de interesse menos o Ct do gene referência;

$\Delta\Delta C_t$ = ΔC_t médio da amostra de interesse menos ΔC_t médio da amostra referência.

3.6 – Extração de proteínas

As células mantidas em normóxia e hipóxia foram lavada duas vezes com PBS e tripsinizadas, como descrito no tópico 3.3. O pellet celular foi então incubado em 70,0 µl de tampão de lise (50,0 mM de pirofosfato de sódio; 50,0 mM de fosfato de sódio; 5,0 mM de cloreto de sódio; 5,0 mM de EDTA dissódico; 5,0 mM de EGTA; 10,0 mM de HEPES; 0,5 % de Triton-X100; 2,0 mM de Ortovanadato de sódio; 1,0 mM de PMSF e 2,0 mM de inibidores de proteases (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, USA)) por 20 minutos no gelo (com agitação a cada 5 minutos) e centrifugado a 13.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante correspondente ao extrato protéico foi transferido para um novo tubo e a concentração protéica determinada através do método de Bradford (Pierce, Rockford – USA). Este método de quantificação de proteínas utiliza uma curva padrão com diluições seriadas de albumina (componente do kit *Coomassie Plus – The Better Bradford Assay™ Kit*, Pierce, Rockford, USA) nas concentrações de 0 a 2,0 mg/ml e as proteínas extraídas diluídas 10 vezes. Foram pipetados 5,0 µl das diluições de albumina assim como 5,0 µl dos extratos protéicos a serem quantificados, todos em duplicata. Em seguida, foram adicionados 295,0 µl do *Coomassie Plus – The Better Bradford Assay™ Kit* (Pierce, Rockford, USA) em cada poço e a placa foi incubada ao abrigo da luz por 10 minutos a temperatura ambiente. A leitura da placa foi feita a 595 nm no leitor de placas *Biotrak II Plate Reader* (Amersham Biosciences, Cambridge, England). Os valores das absorbâncias da curva padrão de albumina foram plotados em um gráfico e as concentrações das proteínas determinadas a partir da equação da reta da curva padrão.

3.7 – Western-blot

Os extratos protéicos aliqüotados na concentração de 30,0 µg foram desnaturados a 95 °C por 5 minutos com tampão de Laemmli 6X (7,5% Tris 2,0 M pH 6,8; 0,5 % SDS; 5 % azul de bromofenol; 26 % glicerol; 16,5 % de β-mercaptoetanol), em um volume apropriado para a concentração final de 1X. Em seguida, as amostras foram separadas por eletroforese em gel de SDS-PAGE 10 % em tampão de corrida Tris-Glicina (3,0 g/l Tris-Base; 14,5 g/l Glicina; 0,1 % de SDS). A corrida foi realizada a 80 V durante 20 minutos e posteriormente 120 V por mais 60 minutos. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Pierce, Rockford - USA) por 50 minutos a 15 V, utilizando tampão de transferência (48,0 Mm Tris; 39,0 mM Glicina, 0.00375 % SDS e 20 % de metanol) no *Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell* (BioRad, Hercules – USA). As membranas foram bloqueadas em solução de 5 % de leite desnatado em TBS-T (2,42 g/l Tris-Base; 8,0 g/l NaCl; acrescidos de 0,1 % de Tween-20 (MP Biomedicals, LLC, Ohio - USA)), sob agitação, *overnight* a 4 – 8 °C. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo primário na titulação adequada em 5 % de leite desnatado em TBS-T por 1 hora a temperatura ambiente. Após sequência de lavagens (três vezes por 5 minutos com TBS-T e uma vez por 10 minutos com TBS), as membranas foram incubadas por 1:30 horas a temperatura ambiente com o anticorpo secundário apropriado associado à peroxidase (diluído em 5 % de leite desnatado em TBS-T). O anticorpo anti-actina foi utilizado como controle de massa. A detecção das proteínas na membrana foi realizada por quimiluminescência com o kit *Western Lightning® Plus-ECL* (PerkinElmer, Waltham, USA) a temperatura ambiente no *ImageQuant LOS 4000* (GE).

Tabela 1 – Anticorpos utilizados nas hibridizações do Western-blot

Anticorpo	Empresa/Código	Diluição	Diluição do Anticorpo Secundário
Anti- β -actina	Millipore	1:2000	Mouse
	(MAB1501R)		1:10000
Anti-Par-4	Abcam (ab5787)	1:1000	Rabbit
			1:10000
Anti-NDRG1	Origene (TA302840)	0,3 μ g/ml	Goat
			1:5000

3.8 - Densitometria

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

3.9 – Análise estatística

Os resultados dos ensaios com cultura de células foram analisados pelo teste *one-way ANOVA* utilizando o programa GraphPad Prisma 5.0 para Windows (GraphPad Software Inc., EUA) e os valores de p calculados utilizando o teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significantes.

3.10 – Considerações éticas

O presente projeto de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo de Pesquisa N° 146/11), em sessão de 27/04/2011.

4 - RESULTADOS

4. Resultados

4.1 – Efeito da hipóxia na expressão dos genes *PAR-4* e *NDRG1* nas linhagens celulares MCF10A, MCF7 e MDA-MB-231 utilizando câmara de hipóxia

No presente trabalho avaliamos os efeitos de diferentes tempos de exposição à hipóxia na modulação da expressão do gene *PAR-4* nas linhagens celulares MCF10A, MCF7 e MDA-MB-231. Para isto, células MCF10A, MCF7 e MDA-MB-231 foram mantidas por 30 minutos, 1, 2, 6 ou 24 horas em câmara de hipóxia e a expressão de mRNA e proteína determinada como descrito nos Materiais e Métodos. Para o controle do efeito da hipóxia avaliamos a expressão do gene *NDRG1*, o qual foi visto na literatura ser um eficiente marcador molecular de hipóxia.

Os resultados do efeito da hipóxia na modulação da expressão de *PAR-4* nos tempos de 6 e 24 horas nas células MCF10A, MCF7 e MDA-MB-231 são apresentados na Figuras 11. Como pode ser observado nas Figuras 11A e 11C, nas células MCF10A e MCF7 mantidas em condições de hipóxia a expressão da proteína *Par-4* não apresentou alteração significativa quando comparada com as células mantidas em condições de normóxia (controle). Entretanto, células MDA-MB-231 (Figura 11E) mantidas em hipóxia apresentaram expressão de *Par-4* reduzida em comparação as células controle ($p < 0,05$). Redução significativa na expressão dos transcritos de *PAR-4* foi observada na células MCF10A e MCF7 (Figuras 11B e 11D; $p < 0.0001$) mantidas por 6 e 24h em condições de hipóxia em relação às células controle. Observamos um efeito dual na

expressão dos transcritos de PAR-4 nas células MDA-MB-231, que apresentou aumento no tempo de 6 horas ($p = 0.043$) e redução no tempo de 24 horas ($p < 0.001$) de exposição à hipóxia em relação às células mantidas em condições de normóxia.

Figura 11 – Efeito da hipóxia na expressão de PAR-4 nas células MCF10A (A e B), MCF7 (C e D) e MDA-MB-231 (E e F). **A, C e E.** Imagens representativas de western blot de Par-4 e suas respectivas densitometrias; **B, D e F.** Histogramas da análise de expressão relativa de PAR-4. N, normóxia; H6, 6 horas, H24, 24 horas.

Na Figura 12 são apresentados os resultados do efeito da hipóxia na modulação de expressão de NDRG1. O padrão da expressão da proteína e dos transcritos do gene

NDRG1 mostrou aumento gradativo nos tempos de exposição à hipóxia de 6 e 24 horas nas células MCF10A (Figura 12A e 12B, $p < 0,0001$), MCF7 (Figura 12C e 12D, $p < 0,0001$) e MDA-MB-231 (Figura 12E, $p = 0.033$ e 12F).

Figura 12 – Efeito da hipóxia na expressão de NDRG1 nas células MCF10A(A e B), MCF7 (C e D) e MDA-MB-231 (E e F). **A, C e E.** Imagens representativas de western blot de NDRG1 e suas respectivas densitometrias; **B, D e F.** Histogramas da análise de expressão relativa de NDRG1. N, normóxia; H6, 6 horas, H24, 24 horas.

4.2 – Efeito da hipóxia na expressão dos genes *PAR-4* e *NDRG1* em células MCF7 utilizando câmara de hipóxia ou H35 Hypoxystation

Com o objetivo de avaliar a eficiência de dois equipamentos de incubação de hipóxia, células de câncer de mama MCF7 foram incubadas na estação de trabalho com hipóxia controlada, H35 Hypoxystation, e em câmaras de hipóxia (*Modular Incubator Chamber*), para efeito de comparação, por 6 e 24 horas. Células MCF7 cultivadas em condição de normóxia foram utilizadas como controle.

Não houve alteração significativa na expressão da proteína Par-4 em células MCF7 expostas a condição de hipóxia utilizando a câmara de hipóxia (Figura 13A) ou a Hypoxystation (Figura 13C). Entretanto, a expressão relativa dos transcritos de PAR-4 apresentou redução significativa nos tempos de 6h ($p < 0,0001$) e 24 h ($p < 0,0001$) de exposição a hipóxia realizada em câmara de hipóxia e efeito dual, com aumento no tempo de 6 horas e redução no tempo de 24 horas ($p = 0,001$) quando foi utilizada a Hypoxystation.

Como mostra a Figura 14, a expressão da proteína e dos transcritos do gene NDRG1 foi modulada positivamente em células MCF7 mantidas em condições de Hipóxia utilizando-se a câmara de hipóxia ou a Hypoxystation.

Figura 13 – Efeito da hipóxia na expressão de PAR-4 em MCF7 incubada em câmara de hipóxia (**A e B**) e em H35 Hypoxystation (**C e D**). **A e C**. Análise por western blot da expressão protéica de Pawr em normóxia e em hipóxia de 6 e 24 horas e as respectivas densitometrias; **C e D**: análise por RTqPCR da expressão do gene *PAR-4*. N, normóxia; H6, 6 horas, H24, 24 horas.

Figura 14 – Efeito da hipóxia na expressão de NDRG1 em MCF7 incubada em câmara de hipóxia (**A e B**) e em H35 Hypoxystation (**C e D**). **A e C**. Análise por western blot da expressão protéica de NdrG1 em normóxia e em hipóxia de 6 e 24 horas e as respectivas densitometrias; **C e D**: análise por RTqPCR da expressão do gene *NDRG1*. N, normóxia; H6, 6 horas, H24, 24 horas.

4.3 – Efeito da hipóxia na expressão dos genes *PAR-4* e *NDRG1* nas linhagens celulares MCF10A e MCF7 incubadas em câmara de hipóxia por tempos curtos

A fim de avaliar a velocidade de resposta de PAR-4 a baixas concentrações de oxigênio, as linhagens celulares MCF10A e MCF7 foram incubadas em câmara de hipóxia por 30 minutos, 1 e 2 horas, usando como controle as células em normóxia.

Não foram observadas alterações significativas na expressão das proteínas Par-4 e NDRG1 nas células MCF10A e MCF7 mantidas em condições de hipóxia nos tempos de 30 minutos, 1 hora e 2 horas (Figuras 15A, 15C, 16A e 16C). No entanto, observamos redução na expressão dos transcritos de PAR-4 em células MCF10A mantidas em condições de hipóxia por 30 minutos, 1 hora e 2 horas (Figura 15 B), em relação às células controle. Nas células MCF7 não foi observada alteração significativa na expressão dos transcritos de PAR-4 nessas condições. A expressão proteica de NDRG1 não apresentou alteração significativa nas células MCF10A e MCF7 mantidas em condições de hipóxia nos tempos de 30 minutos, 1 hora e 2 horas (Figura 16 B). Já a expressão relativa dos transcritos de NDRG1 apresentou redução nas células MCF10A mantidas em condições de hipóxia nos tempos de 30 minutos e 1 hora e nas células MCF7 mantidas em condições de hipóxia por 30 minutos, 1 hora e 2 horas. Esses dados, entretanto, são relativos a um único experimento.

Figura 15 – Efeito da hipóxia na expressão de PAR-4 em MCF10A e MCF7 incubada em câmara de hipóxia por 30 minutos, 1 hora e 2 horas em câmara de hipóxia. **A e C.** Análise por western blot da expressão protéica de Par-4 em normóxia e em hipóxia de 30 min, 1 e 2 horas, em MCF10A (A) e MCF7 (C). **B e D.** Análise de RTqPCR do gene *PAR-4* em normóxia e em hipóxia de 30 min, 1 e 2 horas, em MCF10A (B) e MCF7 (D). N, normóxia; H30, 30 minutos; H1, 1 horas; H2, 2 horas.

Figura 16 – Efeito da hipóxia na expressão de NDRG1 em MCF10A e MCF7 incubada em câmara de hipóxia por 30 minutos, 1 hora e 2 horas em câmara de hipóxia. **A e C.** Análise por western blot da expressão protéica de NDRG1 em normóxia e em hipóxia de 30 min, 1 e 2 horas, em MCF10A (A) e MCF7 (C). **B e D.** Análise de RTqPCR do gene *NDRG1* em normóxia e em hipóxia de 30 min, 1 e 2 horas, em MCF10A (B) e MCF7 (D). N, normóxia; H30, 30 minuto; H1, 1 hora, H2, 2 horas.

5 - DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO

No presente trabalho, tivemos como objetivo avaliar a modulação da expressão do gene supressor tumoral *PAR-4* em condições de hipóxia nas linhagens celulares MCF10A, MCF7 e MDA-MB-231, visto que há trabalhos relatando o envolvimento deste gene no processo de apoptose em resposta a numerosos estímulos de morte em diversas linhagens celulares e que a hipóxia pode ser considerada a força motriz da progressão tumoral (Avni et al. 2011; Chaudhry et al. 2012).

Trabalhos do nosso grupo (de Bessa Garcia et al. 2010; Nagai et al. 2010) têm avaliado a função de PAR-4 em câncer de mama. De Bessa (2010) e colaboradores descreveram que PAR-4 é diferencialmente expresso durante o processo da morfogênese acinar da linhagem celular MCF10A na cultura celular 3D, sendo detectados níveis elevados de PAR-4 no interior dos ácinos, sugerindo seu papel apoptótico no processo da morfogênese da glândula mamária. Considerando que no interior dos ácinos haja carência de oxigênio, pode-se hipotetizar que a diminuição de PAR-4 pode estar relacionada com esta condição.

Em condição de hipóxia, característico do interior de tumores sólidos, células tendem a superar a limitação de oxigênio e nutrientes através da troca de via oxidativa (via do ácido cítrico) pela via não-oxidativa (ciclo das pentoses), ativando mecanismos de sobrevivência celular e inativando vias de apoptose (Avni et al. 2011; Carroll & Ashcroft, 2005). No presente estudo *in vitro*, fizemos uma simulação deste mecanismo que acontece *in vivo*, observando, que a baixa concentração de oxigênio diminuiu a expressão de mRNA de Par-4, em tempos de 6 e 24 horas, nas linhagens MCF10A e

MCF7 e no tempo de 24h nas células MDA-MB-231. No entanto, os níveis protéicos de Par-4 não acompanharam o mesmo padrão nessas células após exposição a condição de hipóxia.

Apesar de não ter relatos de estudos da baixa concentração de oxigênio na expressão de PAR-4 em câncer, grupo de Chung (2007) e colaboradores avaliaram o efeito da privação de glicose e oxigênio em células neuronais PC12, observando aumento da expressão de Par-4. Contudo, ao se tratar estas células com IGF-1, houve inibição da morte celular pela supressão de Par-4, com ação possivelmente dependente das vias de MAPK, PI3K e PKA. O trabalho de Hwang (2009) e colaboradores também avaliou a expressão de PAR-4 em células neuronais, porém durante isquemia induzida *in vivo*. Foi observada inibição de PAR-4 assim como de caspase-3, quando as células foram tratadas com grelina, um novo peptídeo neuronal que promove defesa e sobrevida contra danos por isquemia via inibição de processo apoptótico. Juntos, os dados de Chung (2007) e Hwang (2009) sugerem envolvimento de mecanismos celulares de sobrevivência celular, onde a regulação negativa de PAR-4 pode providenciar vantagem seletiva para sobrevida de células de câncer em privação de oxigênio. Este mesmo efeito, apesar de não envolver hipóxia, pode ser confirmado também no trabalho de Casolari (2011) e colaboradores, onde foi visto que PAR-4 é regulado negativamente por IGF-1 e E2 em células MCF7, onde a ação de IGF-1 é dependente da ativação das vias PI3K e p38 MAPK. Além disso, outro estudo nosso grupo (Nagai et al. 2010) avaliou um coorte de 1161 amostras de câncer de mama observando que a baixa expressão de PAR-4 pode estar associada com pior prognóstico em pacientes com câncer de mama do tipo luminal A, sugerindo que a down-regulação de PAR-4 promove

a progressão tumoral e resistência a terapias antitumorais, características também encontrada em condição de hipóxia.

Visto que não foi observada diferença nos níveis protéicos de Par-4 em tempos de 6 e 24 horas, avaliamos o tempo de resposta de PAR-4 a baixas concentrações de oxigênio, incubando as linhagens celulares MCF10A e MCF7 em câmara de hipóxia por 30 minutos, 1 e 2 horas (tempos curtos), usando como controle as células em normóxia. Porém, não foram observadas alterações na expressão da proteína Par-4 nas linhagens celulares estudadas. No entanto, foi possível observar redução na expressão do transcrito de PAR-4 em células MCF10A, mantidas em hipóxia por tempos curtos, efeito este não observado na linhagem MCF7 exposta às mesmas condições experimentais. Tendo em vista que o tempo de meia vida da proteína de Par-4 ser de 30 horas (Sells et al. 1997), supomos então que o tempo de incubação de 24 horas não seria suficiente para ocasionar efeito na expressão protéica de Par-4.

Para fins de controle da condição de estudo, expressão de *NDRG1*, gene de resposta ao stress e regulado por HIF, foi avaliada. *NDRG1* já é estabelecido na literatura como marcador molecular de hipóxia, estando up-regulado em vários tipos de câncer (Cangul, 2004). Foi observado no presente estudo que o padrão da expressão de *NDRG1* se mostrou gradativamente aumentado nos tempos de exposição à hipóxia de 6 e 24 horas nas células MCF10A, MCF7 e MDA-MB-231. Já quando a expressão protéica de *NDRG1* foi avaliada nas linhagens MCF10A e MCF7 em tempos de 30 minutos, 1 hora e 2 horas (tempos curtos), não foi observada diferença. No entanto, a análise da expressão relativa dos transcritos de *NDRG1* apresentou redução nas células MCF10A e MCF7 mantidas em condições de hipóxia nos tempos curtos. Estes dados

comprovam a eficiência da incubação de hipóxia do presente trabalho em tempos de 6 e 24 horas e mostrando então que *NDRG1* é um gene de resposta mais tardia a hipóxia.

Nossos dados sugerem que a expressão dos transcritos do gene supressor de tumor PAR-4 durante exposição à privação de oxigênio por tempos de 6 e 24 horas seja regulada primeiramente por HIF-1 por este ser o componente central do mecanismo de sensibilização a oxigênio, o qual também está envolvido na ativação das vias de sobrevivência celular PI3K/Akt, p38 MAPK e mTOR (Alvarez-Tejado, 2001), além de fatores de crescimento celular como IGF-1 e E2. Podendo-se concluir que, durante a exposição à hipóxia, ocorre ativação dos fatores de sobrevivência celular que regulam negativamente a expressão do gene pró-apoptótico *PAR-4*. Estudos complementares em tempos longos de exposição à hipóxia ainda se fazem necessários para avaliar a resposta de PAR-4 nesta condição.

6 - BIBLIOGRAFIA

6 - BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, M.M. et al., 2008. Downregulation of PAR-4, a pro-apoptotic gene, in pancreatic tumors harboring K-ras mutation. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 122(1), pp.63–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17893871> [Accessed November 24, 2013].
- Ali, S. & Coombes, R.C., 2002. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nature reviews. Cancer*, 2(2), pp.101–112. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12635173> [Accessed November 17, 2013].
- Alvarez-Tejado, M. et al., 2001. Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway in PC12 cells: protective role in apoptosis. *The journal of biological chemistry* 276(25), pp. 22368-74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11294857> [Accessed June 28, 2014]
- American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 2nd edition, 2008. Global Cancer Facts and Figures. , (700).
- Avni, R., Cohen, B. & Neeman, M., 2011. Hypoxic stress and cancer: imaging the axis of evil in tumor metastasis. *NMR in biomedicine*, 24(6), pp.569–581. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3558740&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 24, 2013].
- De Bessa Garcia, S. a, Pereira, M.C. & Nagai, M. a, 2010a. Expression Pattern of the Pro-apoptotic Gene PAR-4 During the Morphogenesis of MCF-10A Human Mammary Epithelial Cells. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society*, 4(1), pp.33–38. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3047628&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 24, 2013].
- De Bessa Garcia, S. a, Pereira, M.C. & Nagai, M. a, 2010b. Expression Pattern of the Pro-apoptotic Gene PAR-4 During the Morphogenesis of MCF-10A Human Mammary Epithelial Cells. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society*, 4(1), pp.33–38. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3047628&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 24, 2013].
- Bland K.I., Copeland, E.M., 2004, “*The Breast: comprehensive management of Benign and Malignant disorders, Chap6, Gynecomastia*”, Bland/Saunders
- Boehrer, S. et al., 2001. Deregulated expression of prostate apoptosis response gene-4 in less differentiated lymphocytes and inverse expressional patterns of par-4 and bcl-2 in acute lymphocytic leukemia. *The hematology journal : the official journal of the European Haematology Association / EHA*, 2(2), pp.103–107.

- Boghaert, R. et al., 1997. Analysis Par-4 in Normal Rat Tissues of the Proapoptotic Protein. , 8(August), pp.881–890.
- Brenton, J.D. et al., 2005. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(29), pp.7350–7360. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16145060> [Accessed November 8, 2013].
- Burikhanov, R. et al., 2009. The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis. *Cell*, 138(2), pp.377–388. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2774252&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 10, 2013].
- Cancer, T. & Atlas, G., 2012. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. , pp.1–10.
- Cangul, H., 2004. Hypoxia upregulates the expression of the NDRG1 gene leading to its overexpression in various human cancers. *BMC genetics*, 5, p.27. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=518960&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 24, 2013].
- Carroll, V. a & Ashcroft, M., 2005. Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert reviews in molecular medicine*, 7(6), pp.1–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15831177> [Accessed November 24, 2013].
- Casolari, D. a et al., 2011. Insulin-like growth factor-1 and 17 β -estradiol down-regulate prostate apoptosis response-4 expression in MCF-7 breast cancer cells. *International journal of molecular medicine*, 28(3), pp.337–342. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21567071> [Accessed November 24, 2013].
- Chakraborty, M. et al., 2001. Par-4 drives trafficking and activation of Fas and FasL to induce prostate cancer cell apoptosis and tumor regression. *Cancer research*, 61(19), pp.7255–7263.
- Chaudhry, P. et al., 2012a. Prostate Apoptosis Response 4 (Par-4), a Novel Substrate of Caspase-3 during Apoptosis Activation. , 4, pp.826–839.
- Chaudhry, P. et al., 2012b. Prostate apoptosis response 4 (Par-4), a novel substrate of caspase-3 during apoptosis activation. *Molecular and cellular biology*, 32(4), pp.826–39. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3272980&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 19, 2013].

- Chung, H. et al., 2007. IGF-I inhibition of apoptosis is associated with decreased expression of prostate apoptosis response-4. *The Journal of endocrinology*, 194(1), pp.77–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17592023> [Accessed November 24, 2013].
- Cook, J. et al., 1999. Decreased expression of the pro-apoptotic protein Par-4 in renal cell carcinoma. *Oncogene*, 18(5), pp.1205–1208.
- Curtis, C. et al., 2012. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 486(7403), pp.346–52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3440846&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 6, 2013].
- El-Guendy, N. et al., 2003. Identification of a unique core domain of par-4 sufficient for selective apoptosis induction in cancer cells. *Molecular and cellular biology*, 23(16), pp.5516–5525.
- El-Guendy, N. & Rangnekar, V.M., 2003. Apoptosis by Par-4 in cancer and neurodegenerative diseases. *Experimental cell research*, 283(1), pp.51–66.
- Ellen, T.P. et al., 2008. NDRG1, a growth and cancer related gene: regulation of gene expression and function in normal and disease states. *Carcinogenesis*, 29(1), pp.2–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17916902> [Accessed November 8, 2013].
- Ellsworth, R.E. et al., 2010. Breast cancer in the personal genomics era. *Current genomics*, 11(3), pp.146–161.
- Garcia-Cao, I. et al., 2003. Genetic inactivation of Par4 results in hyperactivation of NF-kappaB and impairment of JNK and p38. *EMBO reports*, 4(3), pp.307–312. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1315897&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 24, 2013].
- Gjorevski, N. & Nelson, C.M., 2011. Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. *Nature Publishing Group*, 12(9), pp.581–593. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3168>.
- Goswami, A. et al., 2005. Binding and Phosphorylation of Par-4 by Akt Is Essential for Cancer Cell Survival. , 20, pp.33–44.
- Gruver, A.M., Portier, B.P. & Tubbs, R.R., 2011. Molecular Pathology of Breast Cancer - The Journey From Traditional Practice Toward Embracing the Complexity of a Molecular Classification. *Arch Pathol Lab Med*, 135, pp.544–557.

- Gurumurthy, S. et al., 2005. Phosphorylation of Par-4 by Protein Kinase A Is Critical for Apoptosis Phosphorylation of Par-4 by Protein Kinase A Is Critical for Apoptosis. , 25(3).
- Gurumurthy, S. & Rangnekar, V.M., 2004. Par-4 Inducible Apoptosis in Prostate Cancer Cells. , 512, pp.504–512.
- Hebner, C., Weaver, V.M. & Debnath, J., 2008. Modeling Morphogenesis and Oncogenesis in Three-Dimensional Breast Epithelial Cultures. , pp.313–341.
- Hirschhaeuser, F., Sattler, U.G.A. & Mueller-kliesser, W., 2011. Lactate : A Metabolic Key Player in Cancer Lactate : A Metabolic Key Player in Cancer. , pp.6921–6925.
- Höckel, M. & Vaupel, P., 2001. Tumor Hypoxia : Definitions and Current Clinical , Biologic, and Molecular Aspects. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(4), pp.266–276.
- Hwang, S. et al., 2009. Neuroprotective effect of ghrelin is associated with decreased expression of prostate apoptosis response-4. *Endocrine journal*, 56(4), pp.609–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19352052>.
- Jemal, A. et al., 2011. Global Cancer Statistics. , 61(2), pp.69–90.
- Johnstone, R.W. et al., 1996. A Novel Repressor , par-4 , Modulates Transcription and Growth Suppression Functions of the Wilms ' Tumor Suppressor WT1. , 16(12), pp.6945–6956.
- Kitowska, A. & Pawełczyk, T., 2010. N-myc downstream regulated 1 gene and its place in the cellular machinery. , 57(1), pp.15–21.
- Knowles, H.J. & Harris, A.L., 2001. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer Hypoxia and tumourigenesis.
- Lanigan, F. et al., 2007. Molecular links between mammary gland development and breast cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 64, pp.3161–3184.
- Lerebours, F. & Lidereau, R., 2002. Molecular alterations in sporadic breast cancer. , 44, pp.121–141.
- Li, J. et al., 2010. A genome-wide association scan on estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, 12(August).
- Liu, P. et al., 2009. Targeting the phosphoinositide. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2926>.
- Mamlouk, S. & Wielockx, B., 2012. Hypoxia-inducible factors as key regulators of tumor. , 000, pp.1–9.

- Marinho, V.F.Z. et al., 2008. MARCADORES MOLECULARES EM CÂNCER DE MAMA PREDITIVOS DE METÁSTASES AXILARES. *Rev Assoc Med Bras*, 54(3), pp.203–207.
- Melotte, V. et al., 2010. The N-myc downstream regulated gene (NDRG) family: diverse functions, multiple applications. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(11), pp.4153–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20667976> [Accessed January 23, 2014].
- Nagai, M.A. et al., 2010. Down-regulation of the candidate tumor suppressor gene PAR-4 is associated with poor prognosis in breast cancer. , pp.41–49.
- Nielsen, T.O. et al., 2004. Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal- Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. , 10(919), pp.5367–5374.
- Perou, C.M. et al., 2000. Molecular portraits of human breast tumours. , 533(May), pp.747–752.
- Polyak, K., 2007. Science in medicine Breast cancer : origins and evolution. , 117(11).
- Raica, M. et al., 2009. From conventional pathologic diagnosis to the molecular classification of breast carcinoma : are we ready for the change ? *Romanian Journal of Morphology and Embriology*, 50(1), pp.5–13.
- Reis-filho, J.S. & Pusztai, L., 2011. Gene expression profiling in breast cancer : classification , prognostication , and prediction. *Lancet*, 378, pp.1812–1823.
- Rohwer, N. et al., 2012. The growing complexity of HIF-1 α 's role in tumorigenesis : DNA repair and beyond. *Oncogene*, (September), pp.1–8.
- Rojó, F. et al., 2007. 4E-Binding Protein 1 , A Cell Signaling Hallmark in Breast Cancer that Correlates with Pathologic Grade and Prognosis that Correlates with Pathologic Grade and Prognosis. , pp.81–89.
- Sells, S.F. et al., 1994. Commonality of Apoptosis of the Gene Programs in Androgen-dependent Prostate Cells1 Induced and by Effectors. , 5(April), pp.457–466.
- Sells, S.F. et al., 1997. Expression and Function of the Leucine Zipper Protein Par-4 in Apoptosis. , 17(7), pp.3823–3832.
- Semenza, G.L., 2008. Tumor metabolism : cancer cells give and take lactate. *The Journal of Clinical Investigation*, 4(9), pp.10–12.
- Sen, P. et al., 2003. Involvement of the Akt / PKB signaling pathway with disease processes Early indications. , pp.241–246.

- Sørli, T. et al., 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), pp.10869–74. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=58566&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sun, J. et al., 2013. Metastasis suppressor, NDRG1, mediates its activity through signaling pathways and molecular motors. *Carcinogenesis*, 34(9), pp.1943–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23671130> [Accessed November 24, 2013].
- Trichopoulos, D. et al., 2008. Early life events and conditions and breast cancer risk: from epidemiology to etiology. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 122(3), pp.481–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18022897> [Accessed January 23, 2014].
- Voduc, K.D. et al., 2010. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(10), pp.1684–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20194857> [Accessed January 21, 2014].
- Wilson, W.R. & Hay, M.P., 2011. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 11(6), pp.393–410. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21606941> [Accessed January 20, 2014].
- Wong, C.C., 2012. Inhibitors of Hypoxia-Inducible Factor 1 Block Breast Cancer Metastatic Niche Formation and Lung Metastasis. *J Mol Med*, 90(7), pp.803–815.
- World cancer report / edited by Peter Boyle and Bernard Levin, 2008. *World Cancer Report 2008*,
- Zhao, Y. & Rangnekar, V.M., 2008. Apoptosis and Tumor Resistance Conferred by Par-4. *Cancer Biology & Therapy*, 7(12), pp.1867–1874.