Adriana Priscila Trapé

**Análise do perfil de expressão gênica
de linhagens epiteliais mamárias
humanas submetidas ao tratamento
com rapamicina associada à
doxorubicina**

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

Programa de: Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Mitzi
Brentani

São Paulo
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Trapé, Adriana Priscila

Análise do perfil de expressão gênica de linhagens epiteliais mamárias humanas submetidas ao tratamento com rapamicina associada à doxorrubicina / Adriana Priscila Trapé. -- São Paulo, 2011.

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

Orientadora: Maria Mitzi Brentani.

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2. Rapamicina 3.Sirolimo 4.Doxorrubicina

USP/FM/DBD-038/11

Dedico esta tese a toda minha família e ao meu namorado, Fábio, por terem me acompanhado e me incentivado mesmo nos momentos mais difíceis da trajetória desse trabalho.
Obrigada por todo o carinho e dedicação!
Amo vocês...

À Dra. Maria Mitzi Brentani, minha orientadora, por todo o incentivo durante a execução desse projeto e por compartilhar seus conhecimentos, colaborando com o meu aprendizado e meu crescimento profissional.

Ao Dr. Roger Chammas, coordenador do programa de Pós-Graduação.

À Dra. Lúcia Hirata Katayama, pelos ensinamentos e por todo o apoio e auxílio nas decisões realizadas durante a trajetória desse trabalho.

À Dra. Rosimeire Aparecida Roela, pelo apoio, pelas sugestões e pela amizade.

Às Dras. Patrícia Bortman Rozencham, Flávia Mangone e Fátima Pasini, ao Dr. Igor Snitkovisky e a Profa. Dra. Maria Aparecida Koike Folgueira pelas discussões e sugestões aproveitadas na execução desse trabalho.

Aos meus amigos e companheiros de bancada: Laura Tojeiro Campos, Elen Pereira Bastos, Karina Augusto Escobar, Natália Bromberg, Paulo Del Valle, Simone Crestoni Fernandes, Victor Celso e Yuri Urata. A todos aqueles que passaram pelo laboratório: Arthur Willian Alvarenga, Bruno Cadima, Camila Máximo, Carla Pinheiro, Cíntia Milani, Iara Sant'Ana Rodrigues, Karen Cristina Sant'Anna Brunialti, Lílian Barbeta, Juliana Yamagushi, Mateus Barros, Suzana Honda. Muito obrigada pelo apoio, pelos conselhos nos momentos de dificuldade, pelo carinho e por toda a amizade.

À Maria José Benevides, Elizangela Dias e Rosilene Arruda por toda a atenção e dedicação aos alunos.

Aos funcionários Jair Cláudio e Willame Macedo por colaborarem em tornar nosso ambiente de trabalho mais agradável.

À funcionária Ivonete Lima por toda a ajuda pelos momentos de descontração.

A todos os integrantes dos grupos Adesão Celular e Cultura Celular pela amizade, ajuda e companheirismo.

À Dra. Ana Maria Camargo, do Instituto Ludwig, por nos ter cedido gentilmente uma amostra de linhagem usada em nossos experimentos, sem a qual esse trabalho não teria atingido seus principais objetivos.

Ao Fábio, por todo o carinho e paciência e por sempre estar ao meu lado.

À toda minha família pela compreensão, ajuda, carinho, incentivo e por sempre acreditarem em mim.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela infraestrutura.

À FAPESP e ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Unidades	
Lista de Abreviaturas e Siglas	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
RESUMO	
SUMMARY	
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Justificativa.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivos Gerais.....	14
2.2. Objetivos Específicos.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Comitê de Ética.....	16
3.2. Desenho experimental.....	16
3.3. Cultura celular.....	16
3.4. Plaqueamento.....	17
3.5. Tratamento.....	18
3.6. Citometria de Fluxo.....	19
3.7. Ensaio de viabilidade celular (proliferação).....	24
3.8. Microarray.....	25
3.9. Análises estatísticas.....	35
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Citometria de Fluxo.....	42
4.2. Viabilidade celular.....	49
4.3. Análises estatísticas entre tratamentos.....	56
4.4. Análises de curvas dose-resposta.....	60
4.5. Extração e purificação do RNA total.....	62
4.6. Amplificação e purificação do RNA amplificado.....	63

4.7.	Qualidade das reações de amplificação e hibridização.....	64
4.8.	Análise do perfil de expressão gênica.....	65
5.	DISCUSSÃO.....	77
6.	CONCLUSÕES.....	88
7.	ANEXOS.....	90
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

LISTA DE UNIDADES

°C	graus Celsius
g	força de gravidade (aceleração centrípeta)
M	molar
m²	metro quadrado
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
ng	nanograma
nM	nanomolar
rpm	rotação por minuto
U	Unidade
μL	microlitro
μM	micromolar
=	igual a
>	maior
<	menor

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ACTB	Gene codificador de beta-actina
ATP	Adenosina trifosfato
C	Citosina
C5.2	Linhagem celular epitelial derivada pela transfecção da linhagem HB4a com o cDNA <i>full-length</i> correspondente ao gene HER-2
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cDNA	DNA complementar
cRNA	RNA complementar
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados (desoxi-adenosina, desoxi-citidina, desoxi-guanosina e desoxi-timidina)
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
ER	Receptor de estrógeno
G	Guanina
GAPDH	Gene codificador da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HB4a	Linhagem celular epitelial mamária humana derivada de mamoplastia
HER-2	Receptor do fator de crescimento humano epidermal 2
n	Número
P	Nível de significância estatística
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Iodeto de propídio
PR	Receptor de progesterona

RIN	Número de integridade do RNA
RNA	Ácido ribonucléico
RNA_m	RNA mensageiro
RPMI	Meio para cultura celular - <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro fetal bovino
SKBR3	Linhagem celular epitelial mamária proveniente de adenocarcinoma mamário
T	Timina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Histograma representativo da distribuição das células em fases do ciclo celular após aquisição dos dados por citometria de fluxo.....	22
Figura 2	- (A) <i>Dot-plot</i> (FL2A versus FL2W) representando a população de células isoladas (vermelho) e de <i>doublets</i> celulares (azul). (B) Histograma representativo da distribuição das células em fases do ciclo celular, considerando apenas a população de células isoladas representada em A.....	24
Figura 3	- Reação da luciferase utilizada nos ensaios de luminescência.....	25
Figura 4	- Esquema que mostra a disposição das sondas nos <i>GeneChips</i>	26
Figura 5	- Imagens obtidas pelo <i>Scanner 3000</i> após a hibridização das amostras.....	30
Figura 6	- Esquema representativo do cálculo do <i>background</i> , com cada quadrado representando uma zona.....	31
Figura 7	- Desenho representativo da variação do valor de R em função da intensidade de sinal das sondas MM.....	32
Figura 8	- Exemplo da análise dos dados de proliferação pelo modelo de regressão não-linear.....	37
Figura 9	- Histogramas (FL2A) representativos da distribuição no ciclo celular da linhagem celular HB4a tratada durante 24 horas.....	43
Figura 10	- Histogramas (FL2A) representativos da distribuição no ciclo celular da linhagem celular C5.2 tratada durante 24 horas.....	45
Figura 11	- Histogramas (FL2A) representativos da distribuição no ciclo celular da linhagem celular SKBR3 tratada durante 24 horas.....	47
Figura 12	- Ensaios de proliferação para a linhagem HB4a tratada com doxorubicina (grupo doxo), doxorubicina associada à rapamicina (grupo doxo + rapa) e rapamicina (grupo rapa) nos três períodos de tempo (24, 48 e 72 horas).	50
Figura 13	- Ensaios de proliferação para a linhagem C5.2 tratada	

---

	com doxorubicina (grupo doxo), doxorubicina associada à rapamicina (grupo doxo + rapa) e rapamicina (grupo rapa) nos três períodos de tempo (24, 48 e 72 horas).....	52
Figura 14	- Ensaios de proliferação para a linhagem SKBR3 tratada com doxorubicina (grupo doxo), doxorubicina associada à rapamicina (grupo doxo + rapa) e rapamicina (grupo rapa) nos três períodos de tempo (24, 48 e 72 horas).	54
Figura 15	- Comparação entre os três tratamentos nas linhagens HB4a, C5.2 e SKBR3 após 24, 48 e 72 horas.....	57
Figura 16	- Análises de regressão não-linear para as linhagens HB4a, C5.2 e SKBR3 tratadas com doxorubicina (Doxo – D) e o tratamento combinado (Doxo + Rapa – D+R) após 48 e 72 horas.....	61
Figura 17	- Análise da integridade do RNA total purificado pelo aparelho <i>Bioanalyzer</i>	63
Figura 18	- Dendrograma representativo da clusterização hierárquica supervisionada, utilizando <i>Euclidean Distance</i> e <i>Average-Linkage</i> como parâmetros.....	66
Figura 19	- Diagramas de venn representativos do número de genes regulados por cada tratamento isolado, assim como dos genes comumente regulados por cada fármaco sozinho e o tratamento combinado.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Processos biológicos modulados pelo tratamento combinado.....	69
Tabela 2 - Categorias funcionais dos genes exclusivamente regulados pelo tratamento combinado na linhagem C5.2	71
Tabela 3 - Categorias funcionais dos genes exclusivamente regulados pelo tratamento combinado na linhagem SKBR3.....	73
Tabela 4 - Categorias funcionais dos genes exclusivamente regulados pelo tratamento combinado na linhagem HER-2.....	75

RESUMO

Trapé, AP. *Análise do perfil de expressão gênica de linhagens epiteliais mamárias humanas submetidas ao tratamento com rapamicina associada à doxorrubicina* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

A resistência à quimioterapia, a qual se constitui em um dos maiores desafios a serem superados durante o tratamento do cancer de mama, pode ser modulada por várias cascatas de sinalização celular que levam ao aumento da sobrevivência celular. A via PI3K/Akt/mTOR é uma importante reguladora desse processo, visto que ela pode favorecer o crescimento tumoral após sua ativação por diversos receptores de fatores de crescimento, incluindo os receptores HER-2. Assim, nossa proposta foi investigar se a inibição dessa via poderia aumentar a sensibilidade de linhagens epiteliais mamárias humanas ao agente quimioterápico doxorrubicina. Também decidimos analisar o perfil de expressão gênica gerado por essa abordagem com o objetivo de compreender os mecanismos moleculares associados à resposta biológica. A rapamicina (um inibidor de mTOR) e a doxorrubicina foram utilizadas individualmente ou em combinação no tratamento de três linhagens epiteliais mamárias humanas: HB4a, C5.2 e SKBR3. A linhagem HB4a, uma linhagem derivada de epitélio mamário normal, expressa níveis basais do receptor HER-2. As outras duas linhagens expressam altos níveis desse receptor: a linhagem SKBR3 (derivada de adenocarcinoma mamário), expressa constitutivamente esse receptor e a linhagem C5.2 foi derivada da linhagem HB4a pela transfecção com o cDNA *full-length* do gene HER-2.

A células foram tratadas com 20 nM de rapamicina associada ou não a doses de 30 nM a 1000 nM de doxorrubicina por 24, 48 e 72 horas. Após 24 horas, os resultados de citometria de fluxo mostraram que, enquanto as linhagens SKBR3 e C5.2 apresentaram indução de parada na fase G0/G1 do ciclo celular, a linhagem HB4a não demonstrou alterações significativas na distribuição do ciclo celular pelo tratamento com rapamicina. Esses resultados sugeriram que as linhagens SKBR3 e C5.2 foram mais sensíveis à rapamicina quando comparadas à linhagem HB4a. A doxorrubicina, por sua vez, induziu parada na fase S-G2/M do ciclo celular, a qual foi maior na linhagem HB4a comparada com as demais. De forma similar ao tratamento com doxorrubicina sozinha, o tratamento combinado também induziu parada em S-G2/M nas linhagens HB4a e C5.2. Assim, os efeitos da doxorrubicina foram predominantes aos da rapamicina na distribuição do ciclo celular no tratamento combinado nessas linhagens. Por outro lado, a linhagem SKBR3 mostrou um efeito proeminente da rapamicina, visto que sua associação com doxorrubicina induziu parada na fase G0/G1 do ciclo celular após exposição a 30 nM de doxorrubicina. Os ensaios de viabilidade celular mostraram que o tratamento combinado foi 20% mais eficiente na inibição do crescimento celular quando comparado à doxorrubicina sozinha nas três linhagens celulares, o que foi associado a uma redução de 2 vezes no IC₅₀ da doxorrubicina.

Para cada linhagem, os dados de microarray foram analisados usando o SAM (FDR 5%) para comparar os tratamentos com doxorrubicina, rapamicina e o tratamento combinado aos seus respectivos controles.

Considerando apenas as linhagens C5.2 e SKBR3, a anotação funcional dos genes modulados pelo tratamento combinado mostrou que os genes relacionados ao tratamento combinado estavam relacionados ao rearranjo de RNAs (*splicing*). Além disso, genes exclusivamente modulados pelo tratamento combinado mostrou funções associadas ao transporte intracelular enquanto que a resposta mediada por HER-2 no tratamento combinado incluiu alterações na via do ubiquitina-proteossomo, glicólise e cadeia transportadora de elétrons. Em conjunto, nossos resultados pareceram afetar vias moleculares importantes relacionadas à sobrevivência tumoral em linhagens caracterizadas pela superexpressão de HER-2, o que foi associado a uma supressão de 2 vezes no IC₅₀ da doxorrubicina. Esses dados ressaltam a relevância clínica da terapia combinada no contexto do HER-2, visto que essa associação pode ser capaz de reduzir a toxicidade dos pacientes submetidos à quimioterapia.

Descritores: neoplasias de mama, sirolimo, rapamicina, doxorrubicina

---

SUMMARY

Trapé, AP. *Gene expression analysis of human breast epithelial cell lines treated with the combination of rapamycin and doxorubicin*. [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Chemotherapy resistance, which is the major challenge to be overcome during breast cancer treatment, can be modulated by several signaling cascades that lead to increased cell survival. The PI3K/Akt/mTOR pathway is an important regulator of this process, as it can favour the tumor growth after its activation by several growth factor receptors, including HER-2 receptors. Thus, we proposed to investigate whether the inhibition of this pathway could improve the sensitivity of human HER-2-overexpressing breast epithelial cell lines to the chemotherapeutic agent doxorubicin. We also decided to analyze the gene expression profile generated by this approach to better understand the molecular mechanisms associated with the biological response. Rapamycin (a mTOR inhibitor) and doxorubicin were used individually or in combination on three human breast epithelial cell lines: HB4a, C5.2 e SKBR3. The HB4a cell, a normal mammary epithelial cell line, expresses basal levels of HER-2. The two other cell lines express high levels of this receptor: the SKBR3 cell (derived from a mammary adenocarcinoma) expresses constitutively this receptor, and the C5.2 cell was derived from HB4a cells transfected with the cDNA-full length of HER-2.

The cells were treated with 20 nM of rapamycin with or without 30nM to 1000nM of doxorubicin for 24, 48 and 72 hours. After 24 hours, the flow cytometry results showed that while SKBR3 and C5.2 were arrested in G0/G1

---

phase, HB4a demonstrated no alterations in the cell cycle distribution after rapamycin treatment. These results showed that SKBR3 and C5.2 cells were more sensitive to rapamycin compared to HB4a. Doxorubicin, in turn, led the cells to a S-G2/M arrest which was greater in HB4a cells compared to SKBR3 and C5.2. Similarly to doxorubicin alone, the combined treatment also caused an increase of S-G2/M arrest in HB4a and C5.2 cells. So, doxorubicin effects were predominant to the rapamycin effects on the cell cycle distribution of the combined treatment in these cell lines. Otherwise, SKBR3 showed a predominant effect of rapamycin since its association with doxorubicin caused a G0/G1 arrest after exposure to 30 nM of doxorubicin. The viability assays showed that the combined treatment was 20% more effective in inhibiting cell growth than doxorubicin alone in the three cell lines, which was associated with a reduction in the IC_{50} of doxorubicin by 2-fold.

For each cell line, microarray data were analyzed using SAM (FDR 5%) to compare doxorubicin, rapamycin and the combined treatment to the respective untreated cells. Considering only C5.2 and SKBR3 cells, Gene Ontology (GO) annotations of the genes modulated by the combined treatment showed altered genes related to RNA splicing. Moreover, genes exclusively modulated by the combined treatment showed altered functions related to intracellular trafficking whereas HER-2-mediated response to the combined treatment included changes in the ubiquitin-proteasome pathway, glycolysis and electron transport chain. Altogether, our results seemed to affect important molecular pathways related to tumor survival in HER-2-overexpressing cell lines, which was associated to a 2-fold suppression in the

---

IC₅₀ of doxorubicin. These findings highlight the clinical relevance of the rapamycin/doxorubicin combination therapy in HER-2 context, since this association could be able to decrease toxicity of patients undergoing chemotherapy.

Descriptors: breast neoplasms, sirolimus, doxorubicin

---

1. INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento do câncer, as células tumorais adquirem uma série de características fenotípicas que permitem sua rápida proliferação, invasão do tecido adjacente e metástase (Hanahan; Weinberg, 2000). Essas características podem ser decorrentes de diversas alterações genômicas, tais como mutações pontuais, rearranjos, deleções e amplificações (Storchova; Pellman, 2004) que resultam na superexpressão de oncogenes e redução da expressão de genes supressores tumorais (Nicholson; Anderson, 2002).

O câncer de mama permanece como o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o primeiro entre as mulheres. De acordo com dados do INCA, o número de casos de câncer de mama estimados para o Brasil no ano de 2010 foi de 49.240, com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres (disponível em <http://www.inca.gov.br>).

O prognóstico dos cânceres de mama é geralmente determinado através da análise de fatores clínico-patológicos tradicionais, tais como tamanho, grau e a expressão de receptores de superfície celular (Marty et al, 2005), e podem ser classificados como luminais A e B, triplo-negativos, com superexpressão de *HER-2/neu* (*HER-2*) e basais (Perou et al., 2000). Entretanto, pacientes que apresentam características clínico-patológicas semelhantes podem, muitas vezes, apresentar respostas distintas ao tratamento. Cirurgia ou radioterapia infelizmente não são as melhores escolhas para todos os pacientes já que cânceres de mama localmente

---

avanzado ou metastático podem inicialmente responder à quimioterapia ou terapia hormonal, mas a doença frequentemente progride dentro de poucos meses ou anos (Knueffermann, 2003), o que torna a busca por marcadores moleculares importante para selecionar os pacientes que se mostrarão mais susceptíveis a determinado tratamento.

A amplificação do proto-oncogene *HER-2* ocorre em cerca de 25-30% dos cânceres de mama e estão associados a pior prognóstico (Menard et al, 2001). Entretanto, estudos têm demonstrado que a superexpressão desse receptor pode conferir maior sensibilidade aos quimioterápicos antracíclicos (Pritchard et al, 2006; Paik et al, 1998; Paik et al, 2000), tais como a doxorrubicina (Rody et al, 2007). A amplificação do gene *HER-2* pode ser acompanhada pela co-amplificação do gene da topoisomerase II (Jarvinen et al, 2000; Slamon et al, 2005), principal alvo de ação da doxorrubicina. A amplificação simultânea destes dois genes foi proposta como um preditor molecular de resposta a antraciclina (Jarvinen et al, 2006; Liu et al, 2006; O'Malley et al, 2009). Por outro lado, outros trabalhos mostraram que a superexpressão de *HER-2* está relacionada à ativação da via *PI3K/Akt/mTOR* (Zhou et al, 2004).

A proteína *PI3K* é formada por uma subunidade regulatória ($p85\alpha$) e uma subunidade catalítica ($p110\alpha$), a qual é responsável pela fosforilação da posição D_3 das moléculas de fosfatidilinositol $PI(4)P$ e $PI(4,5)P_2$, gerando, respectivamente, os segundo-mensageiros $PI(3,4)P_2$ e $PI(3,4,5)P_3$ (Martelli et al, 2007). A ligação dessas moléculas às proteínas *Akt* (*protein kinase B*) e *PDK1* (*phosphoinositide-dependent kinase-1*) culmina no recrutamento

---

dessas proteínas para a membrana plasmática, o que resulta na fosforilação de Akt em seu resíduo Thr³⁰⁸ por PDK1 e em seu resíduo Ser⁴⁷³ por outra proteína kinase, denominada PDK2 (Hresko; Mueckler, 2005). Nesse ponto, a proteína PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*) funciona como um regulador negativo dessa via, pois é capaz de remover de forma específica os resíduos de fosfato na posição 3 dessas moléculas, antagonizando os efeitos da proteína PI3K (Steelman et al, 2004).

Os dois eventos de fosforilação de Akt por PDK1 e PDK2 são necessários para sua completa ativação (Alessi et al, 1996), favorecendo a sobrevivência celular em resposta a estímulos apoptóticos pela fosforilação de diversos fatores, incluindo NF-κB, Bad, caspase-9 e MDM2 (Ozes et al, 1999; Del Peso et al, 1997; Cardone et al, 1998; Mayo; Donner, 2001). Além disso, a proteína Akt pode interagir de maneira direta ou indireta com outras proteínas regulatórias, tais como ciclina D1, p27^{kip1}, p21^{Cip1}, GSK-3 (*glycogen synthase kinase-3*) e mTOR (*mammalian target of rapamycin*). (Liang et al, 2002; Cross et al, 1995; Sekulic et al, 2000).

A proteína mTOR (*mammalian target of rapamycin*), também chamada FRAP (*FK506-binding protein 12 and rapamycin-associated protein*), RAFT1 (*rapamycin and FKBP12 target-1*), RAPT1 (*rapamycin target-1*) ou SEP (*sirolimus effector protein*), é uma proteína tirosino-quinase identificada e clonada pouco tempo após a descoberta dos genes TOR1 e TOR2 (Kunz et al., 1993), ortólogos correspondentes presentes na levedura *Sacharomyces cerevisiae* e com os quais possui identidade de 42% na

---

sequência de aminoácidos. Quando associada à proteína Raptor (*regulatory associated protein of TOR*) e mLST8/GβL, mTOR constitui o complexo mTORC1 (Sarbasov et al., 2004). O complexo mTORC2 também contém mTOR e mLST8, mas ao invés de Raptor, existem duas outras proteínas, a rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) e a mSin1 (*mitogen-activated-protein kinase-associated protein 1*) (Sabatini, 2006). Alguns estudos revelaram que o complexo mTORC2 corresponde, na realidade, à proteína PDK2, cuja identidade até então era desconhecida (Hresko; Mueckler, 2005; Sarbasov et al, 2005). Assim, esse complexo está envolvido na ativação de Akt e, conseqüentemente, atua como regulador positivo de mTORC1.

A regulação de mTOR pela proteína Akt pode ocorrer de forma direta, ou indireta. No primeiro caso, a proteína Akt pode ativar mTOR pela fosforilação do resíduo Ser²⁴⁴⁸ dessa proteína (Reynolds et al, 2002) e, no segundo, ela pode inibir a atividade de TSC1/TSC2 (Potter et al, 2002). Como o complexo TSC1/TSC2 é responsável pela inativação de Rheb (Garamy et al, 2003), a inibição desse complexo por Akt aumenta a atividade de Rheb, capaz de se ligar ao domínio quinase de mTOR e causar uma mudança conformacional que promove sua ativação (Long et al, 2005). Quando ativada, mTOR fosforila a proteína 4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1*), que deixa de interagir com o fator de início de tradução eIF-4E (Gingras et al, 1999a), permitindo a formação do complexo de início de tradução. Nesse complexo, eIF4-E é capaz de se ligar à porção 5' UTR do RNAm e, juntamente com outros fatores de início de tradução,

causar o desenovelamento de estruturas secundárias presentes nessa região, o que favorece o reconhecimento da estrutura em *cap* pela subunidade 40S ribossomal (Gingras et al, 1999b), permitindo o início da tradução de mRNAs principalmente relacionados à proliferação celular, os quais possuem a região 5' UTR extensa (Hellen; Sarnow, 2001). Outro alvo de ação de mTOR é a proteína S6K1, a qual estimula a tradução de proteínas ribossomais e outros componentes da maquinaria traducional. Como resultado, os níveis de tradução global da célula são aumentados, favorecendo altas taxas de síntese de proteínas relacionadas a diversos processos celulares, tais como crescimento, proliferação, metabolismo, e transcrição gênica (Proud et al, 2004).

Considerando os efeitos de mTOR sobre a transcrição, alguns trabalhos *in vivo* (Majumder et al, 2004) e *in vitro* (Del Bufalo et al, 2006) mostraram que essa proteína é capaz de regular não apenas a expressão de genes sabidamente relacionados à maquinaria traducional, mas também uma série de outros genes relacionados ao crescimento tumoral, tais como VEGF (*vascular endothelial growth factor*), HIF-1 α e enzimas glicolíticas. Assim, a desregulação da via PI3K/Akt/mTOR favoreceria a progressão tumoral, possibilitando especular sobre sua importância como valor prognóstico no câncer de mama. De fato, estudos que investigaram os níveis de fosforilação de membros dessa via por imuno-histoquímica em amostras de pacientes com câncer de mama (Rojo et al, 2007, Hage et al, 2004, Noh et al, 2008), mostraram que altos níveis de fosforilação das proteínas S6K1 e 4E-BP1 estão relacionados ao aumento no risco de recorrência locoregional,

sendo associadas à redução nas taxas de sobrevida livre de doença. Além de mostrar resultados semelhantes a esses para as proteínas, Zhou et al (2004) também mostraram que a fosforilação de tais proteínas pode estar relacionada à superexpressão de receptores HER-2.

Apesar de ter sido descrita primeiramente como um antibiótico macrolídeo com propriedades antifúngicas e imunossupressoras, sendo até mesmo aprovada para uso após transplante de órgãos (Abraham et al, 1996), a atividade antiproliferativa e antineoplásica da rapamicina em células de mamíferos foi identificada mais tarde (Eng et al, 1984). O mecanismo de ação desse fármaco baseia-se na sua associação com o receptor intracelular FKBP12 (Choi et al, 1996) e posterior ligação direta desse complexo ao mTORC1 (Sabatini et al, 2006), enfraquecendo a interação entre mTOR e a proteína Raptor (Kim et al, 2002). Isso impediria a fosforilação das proteínas S6K1 (Jefferies et al, 1997) e 4E-BP1 (Gingras et al, 1999a), diminuindo assim os níveis de tradução global da célula tumoral e culminando com a parada no ciclo celular do meio para o final da fase G1, antes do “ponto de restrição” que modula o início da fase S (Mita et al, 2003).

Outro aspecto a ser ressaltado diz respeito a trabalhos *in vitro* (Zhou et al, 2004) e *in vivo* (Liu et al, 2005; Mosley et al, 2007) os quais mostraram que a associação da superexpressão de HER-2 com a ativação da via PI3K/AKT/mTOR exerce um importante papel na resposta de linhagens celulares e tumores ao tratamento com rapamicina. Zhou et al (2004) observaram que linhagens mamárias transfectadas com o gene HER-2

---

apresentaram, quando comparadas às suas correspondentes parentais, maior redução na porcentagem de células invasivas após o tratamento com rapamicina. Em camundongos transgênicos contendo o gene HER-2 ativado, (Liu et al, 2005), observou-se que a rapamicina inibiu drasticamente o aparecimento de tumores e, em tumores já desenvolvidos, ocasionou redução de 80% da massa total. De acordo com o trabalho de Mosley et al (2007), camundongos que desenvolveram tumores mamários em resposta à superexpressão do receptor HER-2 mostraram não apenas regressão dos tumores primários em resposta à rapamicina, como também inibição na proliferação de metástases pulmonares, indicando que a ação da rapamicina sobre mTOR é capaz de bloquear múltiplos estágios da progressão tumoral mediada pela superexpressão de HER-2.

Apesar dos resultados promissores obtidos no tratamento antitumoral com a rapamicina em ensaios pré-clínicos, quando utilizado em ensaios clínicos, esse fármaco apresentou apenas modesta atividade antitumoral em pacientes com câncer de mama. No estudo de Chan et al (2005), o tratamento de mulheres com câncer de mama localmente avançado ou metastático resistentes à ação de antraciclinas e/ou taxanos, resultou em uma taxa de resposta após o uso do temsirolimus (análogo da rapamicina) de 9,2%, incluindo respostas totais e parciais de regressão tumoral. Considerando que o tratamento padrão de mulheres com câncer de mama metastático resistente a antraciclinas envolve o uso de quimioterápicos taxanos e/ou inibidores de HER-2, para os quais as taxas de resposta são

---

em torno de 30% e 15%, respectivamente, a resposta tumoral ao uso da rapamicina pode ser considerada modesta.

Tais resultados podem ser explicados pela existência de alguns mecanismos de resistência tumoral à ação da rapamicina, dentre eles, a existência de mecanismos de tradução protéica alternativos. Shi et al (2005), por exemplo, mostraram que os RNAs mensageiros que possuem extensa região 5' UTR podem ser traduzidos via mecanismos independentes de eIF-4E, tais como os mediados pelas seqüências IRES (*internal ribosome entry site*). Outros mecanismos de resistência descritos envolvem a ativação da proteína Akt. Considerando que a contínua ativação da proteína S6K1 exerce um efeito de *feedback* negativo sobre a ativação de Akt (Harrington et al, 2005), a ação inibitória da rapamicina sobre o complexo mTORC1 e a conseqüente redução nos níveis de S6K ativada impedem a ocorrência desse *feedback*, levando assim à contínua estimulação de Akt (Sun et al, 2005). Enquanto alguns trabalhos descreveram que a ativação da proteína Akt também pode ocorrer pela ação do complexo mTORC2, o qual era considerado insensível à ação da rapamicina, mais recentemente, Sarbassov et al (2006) mostraram que a rapamicina é capaz de inibir a formação desse complexo após um período prolongado de tratamento.

Embora diversos trabalhos tivessem relacionado a superexpressão de *HER-2* à ativação da via PI3K/Akt em linhagens celulares (Nicholson et al, 2003; Alimandi et al, 1995), a maioria dos estudos não buscou evidências claras da ativação de mTOR em pacientes com tais tumores. Zhou et al (2004) forneceram tais evidências, indicando que a proteína mTOR pode ter

---

papéis importantes em mediar a progressão tumoral mediada pela superexpressão de HER-2. Dentre as possíveis modalidades de melhorar a eficiência e os benefícios relacionados à sobrevida do paciente, encontra-se a combinação entre terapia alvo molecular e quimioterapia. Portanto, estratégias usando inibidores específicos da proteína mTOR, tais como a rapamicina, acoplados à doxorrubicina podem representar uma abordagem alternativa e importante no tratamento de certos tumores.

Estudos pré-clínicos têm obtido resultados promissores após a associação desse fármaco ao uso de agentes quimioterápicos, tais como a doxorrubicina, no tratamento de diferentes tumores (Grunwald et al, 2002; Mondesire et al, 2004; Wendel et al, 2004). Resultados promissores da associação entre rapamicina e doxorrubicina têm sido obtidos em diferentes modelos experimentais. Em células de câncer prostático PTEN negativas (Grunwald et al, 2002), a taxa de crescimento do tumor obtida com a doxorrubicina passou de 69% para 29% após a associação entre os dois fármacos. Além disso, camundongos com linformas caracterizados pela superexpressão de AKT e submetidos ao tratamento combinado (Wendel et al, 2004), apresentaram maior ocorrência de apoptose, o que resultou em índices de remissão tumoral de quase 100% em comparação ao índice de 20% obtido com cada fármaco separadamente. Em linhagens tumorais de mama, a citotoxicidade induzida pela doxorrubicina também cresceu após sua associação com a rapamicina (Mondesire et al, 2004; Steelmann et al, 2008).

1.1. Justificativa

Considerando o envolvimento da superexpressão de HER-2 tanto na resposta ao tratamento com rapamicina como na resposta à doxorrubicina, a proposta do presente trabalho é analisar o perfil de expressão gênica de linhagens luminais mamárias humanas caracterizadas pela presença de receptores HER-2 e submetidas ao tratamento com rapamicina associada à doxorrubicina, com o objetivo de compreender os eventos moleculares associados aos efeitos dessa combinação nesses tipos de tumor. Em comparação a outros estudos dos marcadores moleculares da ação da rapamicina e doxorrubicina, os quais se focalizaram em um grupo pré-selecionado de genes com um papel já descrito na via mTOR ou na ação da doxorrubicina sobre a estrutura do DNA, nossa abordagem tem como vantagem a de verificar a expressão de múltiplos genes, permitindo a possibilidade de encontrar grupos de marcadores potenciais da ação conjunta desses dois fármacos.

Nosso primeiro passo foi avaliar o efeito da rapamicina em combinação com doxorrubicina sobre o crescimento e a progressão no ciclo celular de três linhagens, sendo que duas superexpressam HER-2: a SKBR3, derivada de adenocarcinomas mamários (Kraus et al, 1987) e a C5.2, derivada pela transfecção da linhagem epitelial mamária HB4a com HER-2 (transformada) (Harris et al, 1999). Como o fenótipo tumoral pode ser fortemente influenciado pelo tipo celular epitelial normal que lhe deu origem, a análise da linhagem HB4a (derivada de epitélio mamário normal) (Stamps

---

et al, 1994), será essencial para a completa compreensão do fenótipo tumoral (Ince et al, 2007).

---

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar a ação conjunta da rapamicina associada à doxorrubicina sobre os processos de crescimento e variação no perfil de expressão gênica de linhagens luminais mamárias humanas caracterizadas pela presença de HER-2.

2.2. Objetivos específicos

- a) Estabelecer as concentrações nas quais a rapamicina e a doxorrubicina mostram inibição de crescimento.
  - b) Híbrido, para cada linhagem, os mRNAs dos grupos tratados com rapamicina e/ou doxorrubicina em plataformas de *microarray*.
  - c) Encontrar, para cada linhagem, genes diferencialmente expressos relacionados aos diferentes tratamentos.
-

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Comitê de Ética

O trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da USP (protocolo nº 0750/07).

3.2. Desenho experimental

Em nosso estudo, utilizamos 3 linhagens mamárias sendo que, para cada linhagem, os tratamentos foram divididos em 4 grupos: o grupo controle (C), que recebeu apenas os veículos correspondentes a cada fármaco; o grupo D, tratado apenas com doxorrubicina; o grupo R, tratado apenas com rapamicina e o grupo D+R, tratado com a associação entre rapamicina e doxorrubicina. Nos experimentos de citometria e viabilidade celular, foram realizados 3 ensaios independentes e, para os ensaios de *microarray*, foram realizados 5 ensaios independentes para cada condição de tratamento.

3.3. Cultura celular

Foram utilizadas três linhagens luminais mamárias que expressavam HER-2 e que estavam disponíveis para estudo: HB4a, C5.2 e SKBR3. As linhagens HB4a e C5.2 foram gentilmente cedidas pelo Instituto Ludwig de

---

Pesquisa em Câncer de Londres e a linhagem SKBR3 foi cedida pelo Instituto Ludwig de São Paulo, Brasil. A linhagem HB4a foi estabelecida a partir de epitélio mamário normal (Stamps et al, 1994), a C5.2 foi derivada pela transfecção da linhagem HB4a com o *cDNA full lenght* correspondente ao receptor HER-2 (Harris et al, 1999) e a SKBR3 foi derivada de adenocarcinomas mamários (Kraus et al, 1987). Enquanto que a linhagem HB4a apresenta níveis basais do receptor HER-2, a linhagem C5.2 expressa níveis equivalentes aos da linhagem SKBR3, a qual apresenta constitutivamente altos níveis desse receptor (10^6 receptores/célula) (Lewis et al, 1996). A linhagem SKBR3 foi considerada negativa tanto para o receptor de estrógeno (ER⁻) quanto para o receptor de progesterona (PR⁻), e positiva para a expressão de EGFR (Kraus et al, 1987). Experimentos prévios realizados em nosso laboratório mostraram características similares para as linhagens HB4a e C5.2. As células foram cultivadas em meio RPMI contendo 10% de soro fetal (SFB); para as linhagens HB4a e C5.2, esse meio foi suplementado com 5 µg/mL de insulina, 5 µg/mL de hidrocortisona, 100 µg/mL de ampicilina e 50 µg/mL de gentamicina, enquanto que para as células SKBR3, ao meio de cultura foram adicionados 2 mM de glutamina, 50 µg/mL de ampicilina e 50 µg/mL de estreptomicina.

3.4. Plaqueamento

O número de células a ser plaqueado para os tratamentos foi padronizado para cada linhagem, mantendo-se a confluência das células

---

nas garrafas em torno de 40%-50% da área total. Esse controle foi realizado com o objetivo de evitar a ocorrência de alterações na progressão do ciclo decorrentes das condições do próprio ambiente de cultura, como a privação de nutrientes, que pode estar diretamente relacionada ao nível de confluência das células e mascarar os efeitos dos fármacos sobre o ciclo celular.

3.5. Tratamento

Os tratamentos foram realizados durante 24 horas para os ensaios de citometria e *microarray* e durante 24, 48 e 72 horas para os ensaios de proliferação celular. Para as linhagens HB4a e C5.2, as células foram plaqueadas a uma densidade de 6.0×10^3 cél/cm² e, após 24 horas do plaqueamento, o meio foi trocado adicionando-se cada fármaco. Para a linhagem SKBR3, a densidade de células utilizada correspondeu a 1.5×10^4 cél/cm², as quais permaneceram plaqueadas por 72 horas previamente ao tratamento.

A rapamicina (*Rapamycin*) (Sigma-Aldrich) foi diluída em *DMSO* (dimetil-sulfóxido) e acrescentada ao meio de forma que o volume do fármaco não ultrapassasse 0.02% do volume total de meio. As concentrações de rapamicina testadas para cada linhagem foram de 20 nM, 100 nM e 500 nM, sendo que os controles negativos receberam apenas *DMSO*, em volume equivalente ao fármaco aplicado nas células tratadas.

As concentrações avaliadas para os tratamentos com a doxorrubicina (*Doxorubicin hydrochloride*) (Sigma-Aldrich) foram de 30 nM, 60 nM, 120 nM, 250 nM, 500 nM e 1000 nM. Como o veículo utilizado para a doxorrubicina também foi *DMSO*, os controles negativos receberam esse diluente em volume correspondente às células tratadas, o qual também não ultrapassou 0.02% do volume total de meio.

Para os tratamentos realizados a partir da associação entre as duas drogas, as células foram tratadas com 20 nM de rapamicina associada às 6 concentrações de doxorrubicina. Os controles negativos receberam simultaneamente os veículos de ambos os fármacos, totalizando até 0.04% do volume total de meio.

3.6. Citometria de fluxo

Os efeitos dos tratamentos sobre a distribuição do ciclo celular foram avaliados pela realização de três ensaios independentes de tratamento. Os passos para o preparo das amostras e a obtenção dos dados estão descritos a seguir:

a) Tripsinização e avaliação da viabilidade celular

Após 24 horas de tratamento, as células foram soltas da garrafa por um processo chamado tripsinização. Inicialmente, o meio de cultura foi retirado por sucção a vácuo e as células foram submetidas a uma lavagem com *PBS-EDTA* (Na_2HPO_4 10mM, NaCl 1,37 mM, KCl 27 mM, KH_2PO_4

2mM, EDTA 1mM) durante cerca de 30 segundos. Posteriormente, as células foram descoladas pela ação de 0,5% *Trypsin-EDTA 1X* (Gibco). A inativação da ação da tripsina ocorreu pela a adição às células de meio *RPMI* suplementado com 10% *SFB* (Gibco). Após serem homogeneizadas com esse meio, as células em suspensão foram finalmente retiradas da garrafa e colocadas em um tubo *falcon* para serem centrifugadas por 2 minutos a 2000 rpm. Após descartar o sobrenadante, o *pellet* celular foi ressuspendido em 10 mL de meio completo, específico para cada linhagem, conforme descrito no **item 3.3**. Alíquotas de 10 µl foram utilizadas para avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão do corante *Tripan Blue*. Para isso, acrescentou-se 10 µl do corante a cada amostra e a mistura foi aplicada sobre uma câmara de *newbauer*. Foram contadas as células nos quatro campos, considerando viáveis apenas as células que não apresentavam coloração azul, ou seja, não incorporaram o corante.

b) Fixação das amostras

Após avaliação da viabilidade celular, as células em suspensão foram centrifugadas durante 2 minutos a 2000 rpm e, após descartar o sobrenadante, foram ressuspendidas em *PBS* (Na_2HPO_4 10mM, NaCl 1,37 mM, KCl 27 mM, KH_2PO_4 2mM). O *pellet* formado após nova centrifugação (2 minutos a 2000rpm), foi cuidadosamente ressuspendido para fixação das células em 1 mL de etanol 70% diluído em *PBS*, e transferido para

eppendorfs de 1.5 mL deixados no gelo. A seguir, as amostras foram deixadas a -20 °C para posterior análise por citometria de fluxo.

c) Incorporação do iodeto de propídio (PI) e leitura das amostras

As amostras fixadas foram retiradas da temperatura a -20 °C e centrifugadas a 2000 *rpm* durante 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas cuidadosamente em 1 mL de *PBS* e submetidas a uma nova centrifugação (2000 *rpm* por 5 minutos). A seguir, descartou-se o *PBS* e as células foram ressuspensas em 200 µL de solução de PI. Essa solução foi preparada previamente a partir de 5 mL de *PBS* ao qual foram adicionados 5 µL *Triton 100* (0,01% v/v), 50 µL *RNAse A* (2mg/mL) e 20 µL de iodeto de propídio (5 mg/mL). As células foram lidas no aparelho a uma velocidade de cerca de 100 a 300 cél/segundo.

d) Representação gráfica dos dados

O iodeto de propídio (PI) é um agente que se intercala de forma estequiométrica às duplas-fitas de DNA. Após a incidência do laser do aparelho sobre a amostra, a excitação do PI leva a uma emissão de fluorescência proporcional ao conteúdo de DNA na célula. Células diplóides que não estejam replicando (fases G0/G1 do ciclo celular) possuem conteúdo de DNA 2n, emitindo sinais de intensidade menor que as células situadas na fase S, durante a qual ocorre o aumento do conteúdo de DNA. Células em fase S, por sua vez, geram sinais de intensidade menor que

---

aquelas situadas em G2/M até que completem a replicação do conteúdo de DNA para $4n$, que permanece assim durante a fase G2 até a mitose, na qual cada célula-mãe dá origem a duas células-filhas. As células situadas no pico hipodiplóide (Sub-G1) possuem conteúdo de DNA menor que $2n$, e podem representar aumento na ocorrência de *debris* celulares e DNA fragmentado, característicos de eventos de morte celular.

Todos os sinais gerados são amplificados e convertidos pelo aparelho em pulsos, permitindo a construção de gráficos de distribuição das células no ciclo celular, conforme mostrados pelo histograma na figura 1. Considerando que existe uma relação proporcional entre o aumento no conteúdo de DNA e a área do pulso gerado, os histogramas foram construídos utilizando o parâmetro FL2 área (FL2A).

Figura 1: Histograma representativo da distribuição das células em fases do ciclo celular após aquisição dos dados por citometria de fluxo. G1: número de eventos (células) localizados na fase G1; S/G2/M: número de eventos (células) localizados em S/G2/M. FL2A: parâmetro que representa a área do pulso gerado; $2n$ e $4n$: conteúdo de DNA antes e após duplicação, respectivamente.

e) Exclusão de *doublets*

A velocidade da passagem das células pelo citômetro foi mantida em torno de 100 a 200 cél/segundo, com a finalidade de minimizar a passagem de agrupamentos celulares durante a aquisição dos dados. Entretanto, mesmo a velocidades reduzidas, é comum a formação de tais agrupamentos, denominados *doublets* celulares. Assim, duas células com um conteúdo de DNA correspondente à fase G1 podem ser consideradas, pelo citômetro, como um evento único de conteúdo de DNA similar ao de uma célula situada na fase G2/M, o que pode levar a um valor superestimado da porcentagem de células situadas em G2/M, afetando a confiabilidade dos dados. Os gráficos *dot-plot* permitem a exclusão desses *doublets* a partir da utilização de dois parâmetros: FL2A (área do pulso) e FL2W (tempo de duração do pulso). Considerando que tanto os *doublets* como as células em G2/M emitem a mesma intensidade de fluorescência, mas diferem quanto à duração do pulso gerado que é proporcional ao tamanho da partícula, é possível selecionar a região que contém a população de células isoladas. A figura 2 permite a visualização de duas populações celulares distintas: uma formada por células isoladas, e uma formada por *doublets* celulares. A seleção da população de células isoladas permite que apenas essa população seja considerada pelo histograma FL2A, para a análise de fases do ciclo celular.

Figura 2: (A) *Dot-plot* (FL2A versus FL2W) representando a população de células isoladas (vermelho) e de *doublets* celulares (azul). (B) Histograma representativo da distribuição das células em fases do ciclo celular, considerando apenas a população de células isoladas representada em A. G1: número de eventos (células) localizados na fase G1; S/G2/M: número de eventos (células) localizados em S/G2/M. FL2A: parâmetro que representa a área do pulso gerado; 2n e 4n: conteúdo de DNA antes e após duplicação, respectivamente.

3.7. Ensaios de viabilidade celular (proliferação)

Também foram realizados três ensaios independentes de proliferação, sendo que, para cada ensaio, os efeitos de cada condição de tratamento foram avaliados em quintuplicatas. A ação de cada fármaco isolado e sua combinação sobre a viabilidade celular foi investigada utilizando-se a metodologia de bioluminescência *Cell Titer Glo*^{TM}, (Promega), a qual envolve a adição de um reagente único, contendo luciferina e luciferase, diretamente às células em cultura, resultando em lise celular. Considerando que as moléculas de ATP liberadas pelas células viáveis são usadas na conversão da luciferina em oxiluciferina pela enzima luciferase, o sinal bioluminescente gerado por essa reação é diretamente proporcional à quantidade de ATP, sendo um importante indicador de viabilidade celular (figura 3). Os dados são expressos em unidades relativas de luminescência

(RLU). Como esses ensaios não requerem a utilização de fontes externas de excitação, pois a própria reação química gera o sinal de luz a ser captado pelo aparelho, esse tipo de metodologia elimina a interferência causada pela fluorescência intrínseca da célula e dos compostos utilizados no tratamento, como é o caso da doxorrubicina (Karukstis et al, 1998).

Figura 3: Reação da luciferase utilizada nos ensaios de luminescência. A mono-oxigenação da luciferina é catalisada pela luciferase na presença de Mg²⁺, ATP e oxigênio. Fonte: Technical Bulletin # TB288

3.8. Microarray

3.8.1. Características dos GeneChips

Para a construção dos *GeneChips HG U133 Plus 2.0* foram utilizados vários bancos de dados públicos, tais como *GenBank*, *dbEST*, e *RefSeq*. As seqüências de oligonucleotídeos (sondas) selecionadas correspondem a regiões localizadas a 600 bases da porção 3' dos transcritos-alvo. Os *GeneChips* contêm seqüências de oligonucleotídeos representativas de mais de 19.000 transcritos humanos. Os transcritos são representados por *probe sets*, os quais correspondem a 11 pares de sondas. Cada *probe set* pode reconhecer diferentes transcritos de um mesmo gene ou transcritos

correspondentes a genes diferentes. Os pares de sondas são constituídos de sondas *Perfect Match* (PM) e *Mismatch* (MM). A sequência de PM e MM é a mesma, exceto pela mudança de um nucleotídeo na porção média da sequência de MM, o que a torna capaz de se ligar de forma não específica a outros transcritos, permitindo estimar a ocorrência desse evento no cálculo final da expressão do gene em questão. Cada sonda está localizada em uma região denominada *cell*, de acordo com a figura 4:

Figura 4: Esquema que mostra a disposição das sondas nos *GeneChips*. PM: sonda *perfect match*. MM: sonda *mismatch*. *Cell*: espaço ocupado por cada sequência. *Probe set*: conjunto formado pelos pares. Fonte: Affymetrix GeneChip® Comand Console® Software (AGCC) versão 3.0.1.

3.8.2. Extração do RNA total

Após a extração do RNA total utilizando Trizol (Invitrogen), as amostras foram purificadas usando o RNeasy Mini Kit (Qiagen), conforme descrito pelos fabricantes. A quantificação das amostras foi realizada pelo aparelho NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) e a integridade do RNA total foi avaliada pelo equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent). Amostras que apresentaram relação 260/280 entre 1.9 e 2.0 e *RNA Integrity number* (RIN) > 7 foram utilizadas nos experimentos de amplificação e hibridização nos GeneChips Affymetrix.

3.8.3. Preparo das amostras para hibridização

a) Amplificação

A amplificação foi realizada utilizando o kit *3' IVT Expression* (Affymetrix). Foram usados 250 ng de RNA total, ao qual foram adicionados 2 uL de poly-A RNA, submetido previamente a diluições seriadas de 1:20, 1:50, 1:100 e 1:400. A síntese de cDNA primeira fita foi realizada a 42°C por 2 horas após a adição de 5 uL da mistura de tampão e enzimas para síntese de primeira fita (*First-Strand Master Mix*). A segunda fita de cDNA foi sintetizada após adição de 20uL da mistura de tampão e enzimas para segunda fita (*Second-strand Master Mix*). Após incubação a 16°C por 1 hora, a reação foi submetida à temperatura de 65°C por 10 minutos. Em seguida, a transcrição *in vitro* e a marcação do RNA amplificado (RNAa) foram realizadas adicionando-se 30uL de mistura de nucleotídeos biotinilados (*IVT Biotin Label*), tampão de marcação (*IVT Labeling Buffer*) e enzimas (*IVT Enzyme Mix*), sendo que a reação foi incubada a 40°C por 16 horas.

b) Purificação do RNA amplificado

O RNAa foi purificado utilizando uma placa magnética (Applied Biosystems). Foram utilizados 60 uL de RNAa ao qual foram adicionados 60 uL de tampão contendo as partículas magnéticas para a purificação do RNAa (*aRNA Binding Mix*). Após os 120 uL terem sido transferidos para uma placa plástica de 96 poços, 120uL de etanol absoluto foram misturados a cada amostra e, em seguida, a placa foi colocada em contato com uma placa magnética por 5 minutos. O sobrenadante foi removido de cada poço,

---

cuidadosamente, evitando-se remover o RNAa capturado no fundo do poço devido a ação magnética. Após duas lavagens com o tampão apropriado (*aRNA Wash Solution*), o RNAa foi eluído utilizando 50uL de tampão de eluição (*aRNA Elution Solution*), previamente aquecido a 50-60°C por 10 minutos.

c) Fragmentação e hibridização das amostras

A fragmentação das amostras foi realizada pela adição de 8uL de 5X tampão de fragmentação (*5X Array Fragmentation Buffer*) a 32 uL de RNAa purificado (15 ug) em um volume total de 40uL, incubados a 94°C por 35 minutos. Foram utilizados 33.3 uL de RNAa fragmentado no preparo para a hibridização, ao qual foram adicionados 4.2 uL de *Oligo B2*, 12.5 uL de *20X Hybridization Controls*, 125 uL de *2X Hybridization Mix*, 25 uL de *DMSO* e 50 uL de água *nuclease free*. em volume final de 250 uL. Todo o volume das amostras (250 ul) foi aplicado sobre os *Genechips U133 plus 2.0* e a hibridização ocorreu por 17 horas à 45° C e 60 rpm no forno de hibridização.

d) Lavagem dos GeneChips

Em seguida à reação de hibridização, os GeneChips foram colocados no aparelho *Fluidics Station 450*, no qual foram submetidos à lavagem e incubados em solução contendo estreptavidina conjugada com ficoeritrina (*Streptavidin - Phycoerythrin - SAPE*), fluorocromo utilizado para posterior captura e digitalização da intensidade de sinal. Primeiramente, os *arrays* foram submetidos a 10 ciclos de lavagem a 25 °C com tampão não

---

estringente (6X SSPE, 0.01% Tween-20) e 8 ciclos de lavagem a 50 °C com tampão estringente (100 mM MES, 0.1 M [Na⁺], 0.01% Tween-20). Em seguida, foram deixados por 10 minutos a 25 °C em solução SAPE (*Streptoavidin-Phycoerythrin*), constituída de 600 µl de *Stain Buffer* (2X); 48 µl de BSA (50 mg/mL); SAPE (1 mg/mL) e 540 µl de água deionizada. Após nova lavagem de 10 ciclos com tampão não estringente a 30 °C, os *GeneChips* foram incubados por 10 minutos em solução contendo anticorpo (300 µl de *Stain Buffer* 2X; 24 µl de BSA (50 mg/mL); 6 µl de *Goat IgG Stock* 10 mg/mL; 3.6 µl de anticorpo biotinilado 0.5 mg/mL e 266.4 µl de água deionizada) e submetidos à segunda etapa de incubação em solução SAPE por 10 minutos e 25 °C. A lavagem final consistiu em 35 ciclos a 35 °C utilizando tampão não estringente.

3.8.4. Obtenção dos dados

A captura das imagens correspondentes à intensidade de sinal da hibridização foi realizada pelo aparelho *GeneChip Scanner 3000 7G*, operado com o auxílio do software *Gene Chip*® *Command Console*. O software *Expression Console*™ (Affymetrix) foi utilizado para a determinação da qualidade da hibridização.

3.8.5. Análise de qualidade dos dados

a) Análise da Imagem

Toda a área do *chip* foi inspecionada, com o objetivo de identificar a presença de artefatos, tais como manchas ou riscos. Além disso, outros parâmetros foram verificados, tais como a hibridização do Oligo B2 que, além de servir como controle positivo da hibridização, é utilizado pelo software para localizar a “grade” que define a área de cada *spot*. Foram considerados *chips* de qualidade satisfatória aqueles que apresentaram o contorno, os cantos e o nome visíveis (Figura 5), visto que essas são as principais regiões relacionadas à hibridização desse oligo.

Figura 5: Imagens obtidas pelo *Scanner 3000* após a hibridização das amostras. Cada quadrado representa uma região *cell*. a. Padrão alternado de hibridização do Oligo B2 em um dos cantos e nas bordas do *chip*. b. Visualização do nome da lâmina também pela hibridização com esse oligo. Fonte: Affymetrix GeneChip® Comand Console® Software (AGCC) versão 3.0.1.

b) Cálculo do *background*

O algoritmo MAS 5.0 foi utilizado para o cálculo do *background*, a normalização e o cálculo de intensidade de sinal para cada *probe set*. O

cálculo do *background* foi realizado após a divisão do *array* em 16 zonas quadrangulares (blocos) (Figura 6). As intensidades de sinal de todas as seqüências (regiões *cell*) pertencentes a cada quadrado foram consideradas e apenas 2% do total (correspondentes a sinais de menor intensidade), foram utilizadas para estimar o valor de *background* específico de cada zona, situado no centro de cada quadrado. Entretanto, como o valor de *background* também deve considerar as possíveis transições de intensidade entre os diferentes blocos, foi obtido, para cada *cell*, um fator (peso) calculado em função da sua distância a cada um dos 16 centros. A soma dos fatores resultantes foi utilizada para estimar o valor *background* final a ser subtraído de cada *cell*. De acordo com instruções do fabricante, os valores típicos de *background* devem se situar entre 20 e 100.

Figura 6: Esquema representativo do cálculo do *background*, com cada quadrado representando uma zona. Ponto vermelho (A): corresponde a uma única seqüência (*cell*). Pontos verdes (B): valor médio do *background* de cada zona. Flechas vermelhas: representam a distância (*d*) da seqüência ao centro de cada quadrado. Fonte: Affymetrix GeneChip® Comand Console® Software (AGCC) versão 3.0.1.

c) Porcentagem de genes presentes

A porcentagem de genes presentes em cada lâmina foi determinada após o cálculo de um valor denominado *Discrimination Score* [R], o qual descreve, para cada par de sondas representativas de um gene, sua habilidade para detectar de forma específica o transcrito-alvo correspondente. O valor de [R] representa a medida relativa entre a diferença de intensidade de sinal alvo-específica (PM-MM) e a intensidade de sinal global (PM+MM):

$$R = (PM-MM)/(PM+MM).$$

De acordo com essa fórmula, seqüências que possuem altos valores de intensidade de MM resultam em redução no valor de R, indicando grande probabilidade de hibridização não específica (figura 7):

Figura 7: Desenho representativo da variação do valor de R em função da intensidade de sinal das sondas MM. A: Conjunto de sondas PM e MM em um dado *probe set*, com valores crescentes de sinal oriundo das sondas MM (flecha vermelha). B: Gráfico representativo da relação entre os valores de R (eixo y) e o aumento na intensidade de sinal das sondas MM (eixo x). A linha tracejada representa o valor *threshold Tau*, usado como referência para calcular o *Detection p-value*. Fonte: Affymetrix GeneChip® Comand Console® Software (AGCC) versão 3.0.1.

Em seguida, os valores de [R] foram comparados a um valor *threshold* Tau (padrão = 0.015) pelo teste estatístico *One-Sided Wilcoxon's Signed Rank*. Considerando a distância entre [R] e Tau obtida para cada par de sondas, esse teste calcula um *Detection p-value*, o qual determina se o gene em questão pode ser considerado presente, marginal ou ausente, utilizando níveis de significância estatística α_1 e α_2 . Valores de [R] baixos (próximos a Tau) estão relacionados à incapacidade de discriminar os sinais oriundos das sondas PM e MM indicando, portanto, a possibilidade de hibridização inespecífica. Caso isso ocorra para a maioria dos pares de sondas representativas de um dado gene, o *p-value* obtido para esse gene será alto, e, portanto, será considerado marginal ($\alpha_1 < p\text{-value} < \alpha_2$) ou ausente ($p\text{-value} > \alpha_2$). De acordo com os critérios adotados pelo programa, a porcentagem de genes presentes para cada amostra deve estar em torno de 40%.

d) Controles positivos

A porcentagem de genes presentes para cada amostra deve incluir os denominados controles positivos, os quais também funcionam como parâmetros para a verificação da qualidade do ensaio. Dentre esses, incluem-se os controle positivos de hibridização (BioB, BioC e BioD, Cre), e os de amplificação, que consistem em controles internos (ex: ACTB e GAPDH) e externos (Dap, Lys, Phe, Thr).

Controles de hibridização: além do Oligo B2, outras moléculas de RNA amplificado e biotinilado são adicionadas como uma mistura (20X *Eukaryotic*

Hybridization Controls) nas amostras a serem hibridizadas. Correspondem aos genes BioC e BioD (*E.coli*) e Cre (bacteriófago P1). Todos eles devem sempre estar sempre presentes, com sinais crescentes de intensidade de acordo com suas concentrações finais na mistura: BioC (5 pM) < BioD (25 pM) < Cre (100 pM).

Controles de amplificação internos: representam os genes constitutivos da amostra, tais como ACTB (B-actina) e GAPDH. São utilizados para verificar tanto a qualidade do RNA da amostra como a eficiência do processo de amplificação, que, por iniciar-se a 3' do RNA total pode reduzir a representatividade dos transcritos situados a 5', resultando em viés experimental. Esse viés pode ser avaliado pela razão entre as intensidades de sinal dos *probe sets* que representam as regiões a 3' e 5' desses genes, a qual deve estar em torno de 3.0.

Controles de amplificação externos: São moléculas de RNA correspondentes aos genes Dap, Lys, Phe, Thr (espécie *B. subtilis*), que, por serem adicionados durante o preparo das amostras, são utilizados para monitorar todo o processo de amplificação e marcação do RNA mensageiro. Devem ser considerados presentes em todas as amostras, com intensidades de sinal crescentes de acordo com sua concentração na solução: Lys<Phe<Thr<Dap. Da mesma forma que para os controles internos, a razão entre as intensidades de sinal dos *probe sets* que representam as regiões a 3' e 5' desses genes deve estar em torno de 3.0.

3.9. Análises estatísticas

As análises estatísticas dos dados de distribuição do ciclo celular e viabilidade celular foram realizadas com o auxílio do programa *GraphPad Prism versão 4.00 para Windows, GraphPad Software (2003)*.

3.9.1. Distribuição do ciclo celular

Após a realização dos experimentos de citometria, foram calculadas as médias das porcentagens de células situadas em cada fase do ciclo celular (Sub-G1, G1 e S-G2/M) entre os três ensaios independentes, considerando cada dose de tratamento individualmente. Em seguida, para cada condição de tratamento (rapa, doxo, doxo + rapa), as médias foram comparadas tanto entre as diferentes doses entre si quanto em relação ao respectivo grupo controle pela realização do teste *One-Way Analysis of Variance (ANOVA)*, seguido pelo teste de *Tukey* para identificar quais pares diferiram ($p\text{-value} < 0.05$).

3.9.2. Viabilidade Celular

Considerando os dados de proliferação, para cada ensaio independente, calculou-se a média entre as quintuplicatas representativas de cada dose de tratamento, assim como do grupo controle. Em seguida, esses valores foram usados para calcular a média dos efeitos de cada dose

---

entre os três ensaios independentes. As médias obtidas para cada dosagem foram representadas como porcentagens do grupo controle (% controle), considerada 1.0. Foram realizadas diferentes abordagens de análise, descritas a seguir:

a) One-Way Analysis of Variance (ANOVA)

De maneira similar à análise realizada para os dados de citometria, as médias obtidas para cada dose de tratamento foram comparadas entre si e ao respectivo controle pelo teste *One-Way Analysis of Variance (ANOVA)*, seguido pelo teste de *Tukey* para identificar quais pares diferiram (*p-value* < 0.05). Para essa análise, considerou-se cada condição de tratamento separadamente (rapa, doxo, doxo + rapa). Em seguida, para cada dose do quimioterápico (30 η M - 1000 η M), a mesma análise foi realizada na comparação entre o tratamento combinado (doxo + rapa) e os dois tratamento isolados (rapa e doxo).

b) Regressão não-linear

O modelo de regressão não-linear se baseia na construção de curvas que melhor se ajustam a seus dados, de forma a minimizar a distância entre os pontos obtidos experimentalmente e a curva escolhida para representar seus dados. Conforme mostra a figura 8, as curvas dose-efeito do tratamento combinado e o quimioterápico isolado podem ser apresentadas no mesmo gráfico, permitindo verificar os efeitos da associação entre os dois fármacos no perfil apresentado pelas diferentes doses do quimioterápico

isolado. O coeficiente de determinação R^2 avalia justamente a proximidade entre a curva encontrada e os dados analisados, e deve estar próximo de 1.0 para ambas as curvas. As concentrações, representadas no eixo x, estão representadas como logaritmos da notação exponencial ($1 \text{ } \eta\text{M} = 10^{-9} \text{ M}$). Como não é possível definir o logaritmo de 0, foi escolhido, para o grupo controle (segundo recomendações do programa *GraphPad Prism*) uma dose que correspondeu a unidades de log abaixo da menor concentração utilizada ($30 \text{ } \eta\text{M}$).

Figura 8: Exemplo da análise dos dados de proliferação pelo modelo de regressão não-linear. Curvas dose resposta obtidas pelo tratamento combinado (doxo + rapa) e o quimioterápico isolado (doxo). Eixo x: representa os valores logados das doses do quimioterápico. Eixo y: representa os efeitos de cada dose como porcentagens da controle. R^2 : coeficiente de determinação. a: Logaritmo da dose de doxorubicina necessária para causar 50% de inibição de proliferação em relação ao grupo controle (EC_{50}) no tratamento combinado. b: Logaritmo da dose de doxorubicina necessária para causar 50% de inibição de proliferação em relação ao grupo controle (EC_{50}) no tratamento com o quimioterápico isolado.

Nessa figura, o tratamento combinado causou um ligeiro deslocamento na curva de dose-resposta da doxorubicina, quando comparada ao tratamento isolado. Como resultado, o valor de EC_{50} pareceu

ter sido reduzido pela sua associação com a rapamicina. Apesar dessa redução parecer pequena, isto pode ser devido ao fato de a escala representada no eixo x ser logarítmica. A significância estatística dessa diferença é, assim, verificada pelo programa usando o teste F, o qual testa as duas hipóteses: (a) cada curva apresenta um valor de EC_{50} distinto, ou seja, a rapamicina realmente reduziu o valor de EC_{50} do quimioterápico no tratamento combinado e (b) as duas curvas compartilham o mesmo valor de EC_{50} e, portanto, os efeitos da associação entre os dois fármacos não diferiu significativamente dos efeitos da doxorrubicina sozinha.

3.9.3. Análise dos dados de microarray

a) Pré-processamento dos dados

Os valores de intensidade de sinal para cada *probeset* foi calculado pelo método RMA (*Robust Multichip Average*), baseado em *median polish*, com o auxílio do software RMA Express Release 1.0. Nesse método, a normalização dos GeneChips é baseada no cálculo da média de $\log_2$ (B(PM)), na qual B (PM) representa os valores de intensidade de sinal das sondas PM corrigidos após a subtração do background (Irizarry et al, 2003). As linhagens foram submetidas à análise por RMA individualmente, considerando os 4 grupos de tratamento (C, D, R e D+R) em conjunto.

b) Identificação dos genes diferencialmente expressos

Inicialmente, foi calculada a média da intensidade de sinal entre as *probe sets* representativas de um único gene. Como resultado, foram

---

obtidos 19.621 valores, os quais foram utilizados para análise dos genes diferencialmente expressos entre o grupo controle e cada tratamento, com o auxílio do software *MultiExperiment Viewer* (Mev versão 4.5). As linhagens foram analisadas separadamente e, para cada uma, foram realizadas 3 comparações: Controle (C) vs Doxorubicina (D); Controle vs Rapamicina (R) e Controle (C) vs tratamento combinado (D+R). A identificação dos genes diferencialmente expressos foi realizada pela metodologia de SAM (*Significance Analysis of Microarrays*). Nesse teste, a significância estatística é calculada usando testes de permutação, nos quais a expressão diferencial é confirmada comparando os valores de intensidade de sinal de cada gene entre os diferentes ensaios independentes. Além disso, foi possível selecionar o número de genes diferencialmente expressos de acordo com a porcentagem de falsos positivos (FDR - *False Discovery Rate*) (Tusher et al, 2001). Para o nosso estudo, realizamos 1000 permutações e valor de $FDR < 0.05$. O número de vezes de diferença de expressão (*fold change*) foi obtido nos grupos tratados em relação ao controle, utilizado como referência para cada linhagem.

c) Clusterização Hierárquica

Com o objetivo de confirmar a relevância dos genes diferencialmente expressos, verificamos se os três grupos de genes encontrados em cada comparação foram capazes de discriminar as amostras controle de cada tratamento pela construção de dendrogramas. Utilizamos os parâmetros de *Euclidean Distance* e *Average Linkage* como métodos métricos para definir,

---

respectivamente, a distância entre os diferentes valores de expressão gênica e a distância entre *clusters*. A confiabilidade dos dados gerados foi confirmada avaliando se todas as comparações apresentaram valores de *Bootstrap* próximos a 100% na separação entre o grupo de amostras controle e de cada tratamento.

d) Classificação funcional (*Gene Ontology*)

Os genes diferencialmente expressos foram classificados de acordo com suas funções biológicas com o auxílio do programa FunNet v 1-05, disponível em <http://www.funnet.info>. Utilizamos como critério nível de especificidade igual a 1, o qual corresponde ao maior grau de precisão durante a classificação funcional, aumentando a confiabilidade dos dados gerados e valor de p-value < 0.05.

---

4. RESULTADOS

4.1. Citometria

Os ensaios de citometria foram realizados para cada uma das linhagens tratadas com rapamicina, doxorubicina e a associação entre os dois fármacos, após 24 horas de tratamento. As análises estatísticas dos dados de citometria foram realizadas considerando a média entre os três ensaios independentes obtidos para cada linhagem. Os efeitos de cada dose foram avaliados para cada fase do ciclo celular (Sub-G1, G1 e S-G2/M), individualmente. A figura 9 mostra os resultados obtidos para a linhagem HB4a:

Figura 9: Histogramas (FL2A) representativos da distribuição no ciclo celular da linhagem celular HB4a tratada durante 24 horas. (A) Grupo Doxo: As células foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de doxorubicina (30 η M, 60 η M, 120 η M, 250 η M, 500 η M, 1000 η M). (B) Grupo Doxo + Rapa: Representa o tratamento combinado entre as diferentes doses de doxorubicina (30 η M, 60 η M, 120 η M, 250 η M, 500 η M, 1000 η M) e uma concentração fixa de rapamicina (20 η M). (C) Grupo Rapa: Os gráficos representam os efeitos de 20 η M e 100 η M de rapamicina. Sub-G1: Valores (em porcentagem) que indicam a ocorrência de morte celular associada ao tratamento (pico hipo-diplóide). G1: Porcentagem de células situadas na fase G1 do ciclo celular. S-G2/M: Porcentagem de células situadas nas fases S-G2/M do ciclo celular.

De acordo com a figura acima, os efeitos da doxorubicina (doxo) aparentemente consistiram em parada do ciclo celular na fase S-G2/M, visto que o aumento na porcentagem de células situadas em S-G2/M nas doses de 30 nM a 250 nM do quimioterápico sozinho (grupo doxo) atingiu até 50% em relação ao grupo controle e foi acompanhado pela redução na porcentagem de células situadas na fase G1. Além disso, as doses a partir de 250 nM mostraram aumento na porcentagem de células situadas na fase Sub-G1 de 20% a 30%, indicando a ocorrência de morte celular. No tratamento combinado, a rapamicina teve pouca influência no perfil de distribuição do ciclo celular correspondente à ação da doxorubicina, visto que a porcentagem de células situadas na fase S-G2/M também aumentou de maneira similar ao tratamento com o quimioterápico isolado. Diferentemente da doxorubicina, a rapamicina (rapa) não pareceu alterar a distribuição do ciclo celular.

As análises estatísticas mostraram que a distribuição do ciclo celular nas fases G1 e S-G2/M realmente diferiram significativamente entre o grupo controle e as doses de 30 nM, 60 nM, 120 nM e 250 nM de doxorubicina ($p\text{-value} < 0.001$) tanto no tratamento com o quimioterápico isolado como no tratamento combinado. O aumento na morte celular ocorreu de forma estatisticamente significativa apenas após a utilização de 500 nM no grupo doxo ($p\text{-value} < 0.01$). Em relação ao tratamento com rapamicina, observou-se que esse fármaco realmente não alterou de forma significativa a distribuição do ciclo celular ($p\text{-value} > 0.05$).

A figura 10 mostra os gráficos de distribuição no ciclo celular da linhagem C5.2:

Figura 10: Histogramas (FL2A) representativos da distribuição no ciclo celular da linhagem celular C5.2 tratada durante 24 horas. (A) Grupo Doxo: As células foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de doxorubicina (30 μ M, 60 μ M, 120 μ M, 250 μ M, 500 μ M, 1000 μ M). (B) Grupo Doxo + Rapa: Representa o tratamento combinado entre as

diferentes doses de doxorrubicina (30 η M, 60 η M, 120 η M, 250 η M, 500 η M, 1000 η M) e uma concentração fixa de rapamicina (20 η M). (C) Grupo Rapa: Os gráficos representam os efeitos de 20 η M e 100 η M de rapamicina. Sub-G1: Valores (em porcentagem) que indicam a ocorrência de morte celular associada ao tratamento (pico hipo-diplóide). G1: Porcentagem de células situadas na fase G1 do ciclo celular. S-G2/M: Porcentagem de células situadas nas fases S-G2/M do ciclo celular.

A figura acima mostra que, na linhagem C5.2, os principais efeitos da doxorrubicina sobre a distribuição no ciclo celular também consistiram em aumento no número de células em S-G2/M. Diferentemente da linhagem HB4a, na linhagem C5.2, o aumento na porcentagem de células situadas na fase S-G2/M pela ação da doxorrubicina sozinha foi gradual, variando de 27% após o uso de 30 nM do quimioterápico a 50% nas dosagens de 60 nM a 500 nM. Além disso, essa linhagem apresentou maior resistência aos efeitos citotóxicos do quimioterápico, visto que o aumento da população celular em sub-G1 não pareceu ser significativo. A resposta ao tratamento também foi similar após a combinação do quimioterápico com a rapamicina, sendo que a dose de 30 nM do quimioterápico apresentou efeitos 10% menores no tratamento combinado comparado ao tratamento isolado. A rapamicina sozinha induziu cerca de 12% de parada em G1.

As análises estatísticas mostraram que o grupo controle diferiu significativamente das doses de 30 nM a 500 nM tanto no tratamento combinado como no tratamento isolado ($p\text{-value} < 0.01$). A ocorrência de morte celular não foi estatisticamente significativa ($p > 0.05$), tanto no tratamento com a doxorrubicina sozinha quanto após sua associação com a rapamicina. Em relação à rapamicina, o aumento de 12% na porcentagem de células situadas em G1 foi considerado significativo ($p\text{-value} < 0.01$).

A figura 11 mostra os efeitos obtidos para os três tratamentos na linhagem SKBR3:

Figura 11 - Histogramas (FL2A) representativos da distribuição no ciclo celular da linhagem celular SKBR3 tratada durante 24 horas. (A) Grupo Doxo: As células foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de doxorubicina (30 η M, 60 η M, 120 η M, 250 η M, 500 η M, 1000 η M). (B) Grupo Doxo + Rapa: Representa o tratamento combinado entre as diferentes doses de doxorubicina (30 η M, 60 η M, 120 η M, 250 η M, 500 η M, 1000 η M) e uma concentração fixa de rapamicina (20 η M). (C) Grupo Rapa: Os gráficos representam os efeitos de 20 η M e 100 η M de rapamicina. Sub-G1: Valores (em porcentagem) que indicam a ocorrência de morte celular associada ao tratamento (pico hipo-diplóide). G1: Porcentagem de células situadas na fase G1 do ciclo celular. S-G2/M: Porcentagem de células situadas nas fases S-G2/M do ciclo celular.

Verifica-se nessa figura que a linhagem SKBR3 também apresentou um aumento gradual na porcentagem de células situadas em S-G2/M no tratamento com o quimioterápico isolado. Entretanto, essa linhagem pareceu mais resistente à indução de parada em S-G2/M, considerando que os efeitos máximos de aumento nessa fase (30%) apresentaram-se menores em relação aos observados para as linhagens HB4a e C5.2 (50%). Diferentemente das demais linhagens, no tratamento combinado, os efeitos da rapamicina na indução de parada do ciclo celular pareceram ser preponderantes aos da doxorubicina, visto que, na dose de 30 nM, ocorreu 10% de aumento na fase G0/G1. As demais doses distribuição do ciclo celular semelhante ao grupo controle. A rapamicina sozinha induziu 15% de parada na fase G1 do ciclo celular.

No tratamento com o quimioterápico isolado, as análises estatísticas mostraram que os efeitos de 30 nM a 1000 nM de doxorubicina realmente diferiram em relação ao grupo controle ($p\text{-value} < 0.001$). No tratamento combinado, a maioria das doses não apresentou diferenças significativas ($p\text{-value} > 0.05$) na porcentagem de células situadas em S-G2/M quando comparadas ao grupo controle, exceto a dose de 30 nM ($p\text{-value} < 0.05$). A

indução de parada em G1 pela rapamicina foi considerada estatisticamente significativa ($p\text{-value} < 0.01$).

4.2 Viabilidade Celular

Diferentemente dos ensaios de citometria, os efeitos de cada fármaco e sua associação sobre a viabilidade celular foram avaliados após 24, 48 e 72 horas de tratamento. Os resultados dos ensaios de proliferação para a linhagem HB4a estão mostrados na figura 12:

Figura 12: Ensaio de proliferação para a linhagem HB4a tratada com doxorrubicina (grupo doxo), doxorrubicina associada à rapamicina (grupo doxo + rapa) e rapamicina (grupo rapa) nos três períodos de tempo (24, 48 e 72 horas). Os efeitos de cada dosagem situam-se acima de cada barra e estão representados em relação aos valores do grupo controle (% controle), considerados 1.0. Os asteriscos representam os resultados do teste de *Tukey*, considerando a comparação entre cada dose e o grupo controle. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Os gráficos mostram, na figura acima, que a doxorrubicina aparentemente exerceu maiores efeitos sobre a redução na viabilidade celular quando comparada à rapamicina. Em 24 horas, as doses de 120 nM e 250 nM de doxorrubicina exerceram, respectivamente, 20% e 40% de

inibição, chegando a 50% para a dose de 1000 nM. Durante esse período, 20 nM e 100 nM de rapamicina atingiram apenas 10% de inibição. Em 48 e 72 horas, concentrações de 250 nM a 1000 nM de doxorrubicina atingiram de 90% a 100% de inibição, enquanto que a rapamicina exerceu efeitos máximos de 20% a 40%. Dados interessantes foram obtidos para o tratamento combinado (doxo + rapa) quando comparado ao isolado (grupo doxo), principalmente após os períodos de 48 e 72 horas. Considerando as doses entre 30 nM e 120 nM do quimioterápico, os efeitos obtidos para uma mesma dose foram 20% maiores no tratamento combinado em relação ao tratamento isolado. Após 72 horas, por exemplo, a dose de 30 nM causou sozinha 40% de inibição, que passou para 60% quando foi associada à rapamicina. A mesma situação ocorreu para 60 nM (50% para 70%) e 120 nM (70% para 90%). Tais diferenças entre os tratamentos isolado e combinado não foram observadas para doses maiores de doxorrubicina (250 nM a 1000 nM).

Após 24 horas, as análises estatísticas mostraram que o tratamento combinado e o isolado exerceram efeitos significativos sobre a viabilidade celular a partir de 120 nM e 250 nM, respectivamente. Após 48 e 72 horas, os resultados já foram significativos a partir de 30 nM. Em relação às comparações entre as doses (dados não mostrados), foi visto que, para ambos os grupos, os efeitos das doses de 30 nM a 120 nM atingiram diferenças significativas entre si após 48 e 72 horas ($p\text{-value} < 0.001$). As doses de 250 nM a 1000 nM não se mostraram estatisticamente diferentes entre si em nenhum dos períodos analisados ($p\text{-value} > 0.05$). Os

---

tratamentos com rapamicina mostraram resultados significativos em relação à controle após 48 e 72 horas (p -value < 0.001).

A figura 13 mostra os resultados observados para a linhagem C5.2:

Figura 13: Ensaios de proliferação para a linhagem C5.2 tratada com doxorubicina (grupo doxo), doxorubicina associada à rapamicina (grupo doxo + rapa) e rapamicina (grupo rapa) nos três períodos de tempo (24, 48 e 72 horas). Os efeitos de cada dosagem estão representados em relação aos valores do grupo controle (% controle), considerados 1.0. Os asteriscos representam os resultados do teste de Tukey, considerando a comparação entre cada dose e o grupo controle. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Nessa linhagem, a doxorubicina também mostrou efeitos proeminentes aos da rapamicina sobre a inibição da proliferação celular. Em 24 horas, as doses de 120 nM e 250 nM de doxorubicina exerceram,

respectivamente, 10% e 20% de inibição, chegando a 30% para a dose de 1000 nM. Durante esse período, 20 nM e 100 nM de rapamicina atingiram apenas 10% de inibição. Em 48 e 72 horas, concentrações de 250 nM a 1000 nM de doxorrubicina atingiram, respectivamente, 80% e 100% de inibição, enquanto que a rapamicina exerceu efeitos máximos de 30% e 50%.

De forma semelhante à linhagem HB4a, os efeitos obtidos para uma mesma dose de doxorrubicina aparentemente foram maiores no tratamento combinado em relação ao isolado. Enquanto que, no tratamento isolado, as doses de 30 nM e 60 nM exerceram, respectivamente, 40% e 50% de inibição sobre a proliferação após 72 horas, tais valores chegaram a 60% e 70% no tratamento combinado. É possível notar que o uso de maiores doses também reduziu tais diferenças, as quais atingiram apenas 10% após o uso de 120 nM e foram praticamente nulas para as doses de 250 nM a 1000 nM.

As análises estatísticas mostraram que, após 24 horas, os tratamentos combinado e isolado exerceram efeitos inibitórios significativos em relação ao grupo controle a partir de 30 nM e 120 nM, respectivamente. Após 48 e 72 horas, todas as doses diferiram do grupo controle para ambos os grupos. De maneira similar à linhagem HB4a, a comparação entre as doses (dados não mostrados) mostrou que todas diferiram entre si após 48 e 72 horas ($p\text{-value} < 0.001$), exceto as de 500 nM e 1000 nM, que não diferiram entre si em nenhum dos períodos analisados ($p\text{-value} > 0.05$). Diferentemente da linhagem HB4a, os dados relacionados ao tratamento com rapamicina mostraram-se estatisticamente significativos em relação ao

---

grupo controle até mesmo após 24 horas. Além disso, os efeitos máximos de inibição da rapamicina sobre a proliferação celular (após 72 horas) apresentaram-se ligeiramente maiores na C5.2 (50%), quando comparados aos obtidos pela HB4a (40%), indicando que essa linhagem parece ser mais sensível ao tratamento com rapamicina quando comparada à HB4a.

A figura 14 apresenta o mesmo tipo de análise realizado para a linhagem SKBR3:

Figura 14: Ensaios de proliferação para a linhagem SKBR3 tratada com doxorubicina (grupo doxo), doxorubicina associada à rapamicina (grupo doxo + rapa) e rapamicina (grupo rapa) nos três períodos de tempo (24, 48 e 72 horas). Os efeitos de cada dosagem estão representados em relação aos valores do grupo controle (% controle), considerados 1.0. Os asteriscos representam os resultados do teste de Tukey, considerando a comparação entre cada dose e o grupo controle. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Conforme observado para as demais linhagens, a doxorubicina mostrou efeitos proeminentes aos da rapamicina sobre a inibição da proliferação. Em 24 horas, as doses de 120 nM e 250 nM de doxorubicina exerceram, respectivamente, 10% e 20% de inibição, chegando a 30% para a dose de 1000 nM. Durante esse período, 20 nM e 100nM de rapamicina atingiram apenas 10% de inibição. Em 48 horas, as concentrações de 250nM e 500 nM do quimioterápico exerceram 50% de inibição, atingindo 70% na dosagem de 1000 nM. Em 72 horas, os efeitos inibitórios da doxorubicina atingiram 80% para as doses de 250 nM e 500 nM e 90% após o uso de 1000 nM. Em contrapartida, após 48 e 72 horas, a rapamicina exerceu 30% e 50% de inibição, respectivamente. Entretanto, em comparação com as demais linhagens, a SKBR3 apresentou uma resposta menor aos efeitos da doxorubicina sobre a proliferação celular. Após 72 horas, por exemplo, as doses de 30 nM a 120 nM exerceram efeitos de 30% a 60% de inibição nessa linhagem. Em contrapartida, as linhagens HB4a e C5.2 apresentaram de 40% a 80% de inibição nas mesmas dosagens. Além disso, as doses de 250 nM e 500 nM causaram de 90% a 100% de inibição sobre a proliferação nas linhagens HB4a e C5.2, enquanto que, na linhagem SKBR3, as mesmas concentrações exerceram efeitos de 80% de inibição, atingindo 100% apenas quando foi utilizada a dose de 1000 nM. De forma semelhante às outras linhagens, os efeitos obtidos para uma mesma dose de doxorubicina aparentemente foram maiores no tratamento combinado em relação ao isolado. Enquanto que, no tratamento isolado, as doses de 30 nM e 60 nM exerceram, respectivamente, 30% e 50% de inibição sobre a

---

proliferação após 72 horas, tais valores chegaram a 50% e 60% no tratamento combinado. É possível notar que o uso de maiores doses reduziu tais diferenças, visto que os efeitos das doses de 120 nM a 1000 nM praticamente não diferiram entre os dois tratamentos.

As análises estatísticas mostraram que, após 24 horas, os tratamentos combinado e isolado exerceram efeitos inibitórios significativos em relação ao grupo controle a partir de 30 nM e 500 nM, respectivamente. Após 48 e 72 horas, todas as doses diferiram do grupo controle para ambos os tratamentos. De maneira similar às demais linhagens, a comparação entre as doses (dados não mostrados) mostrou que todas diferiram entre si após 48 e 72 horas ($p\text{-value} < 0.001$). De maneira similar à linhagem C5.2, os efeitos inibitórios da rapamicina sobre a proliferação mostraram-se estatisticamente significativos em relação à controle até mesmo após 24 horas sendo que, após 72 horas, esse fármaco também exerceu efeitos de 50% de inibição.

4.3 Análises estatísticas entre tratamentos

Considerando que, para as três linhagens, os resultados mostraram que o tratamento combinado parece ter exercido maiores efeitos sobre a proliferação quando comparado ao uso do quimioterápico sozinho, foram realizados testes estatísticos para verificar a significância desses dados. Com esse objetivo, os efeitos de cada dose de doxorrubicina no tratamento combinado foram comparados aos efeitos obtidos para a mesma dose no

---

tratamento com o quimioterápico isolado e a rapamicina sozinha. A abordagem utilizada está representada na figura 15:

Figura 15: Comparação entre os três tratamentos nas linhagens HB4a, C5.2 e SKBR3 após 24, 48 e 72 horas. As barras mostram os resultados obtidos para o grupo tratado com rapamicina (R), doxorubicina (D) e a associação entre os dois fármacos (D+R) em função de cada dose de doxorubicina. Os valores, representados em relação ao grupo controle (% controle), são mostrados nas tabelas abaixo de cada gráfico.

É possível observar na figura acima que, nas linhagens HB4a e C5.2, para a maioria das dosagens de doxorubicina utilizadas, o tratamento combinado apresentou efeitos maiores sobre a proliferação quando comparado aos dois fármacos isolados. Tais diferenças se mostraram discretamente a partir de 24 horas, e se acentuaram após 48 e 72 horas. Além disso, para cada período de tempo, o aumento da dosagem de doxorubicina minimizou as diferenças entre o tratamento combinado e o uso do quimioterápico sozinho. Nas linhagens HB4a e C5.2, por exemplo, considerando o período de 72 horas, pode-se observar que o tratamento combinado apresentou efeitos maiores em relação ao uso isolado do quimioterápico quando as doses de 30 nM e 60 nM foram associadas à rapamicina. Enquanto que as diferenças entre os tratamentos combinado e isolado encontraram-se em torno de 20% para ambas as dosagens, a partir de 120 nM essas diferenças foram reduzidas para 10%, e praticamente não existiram quando foram avaliadas as doses de 250 nM a 1000 nM. Tais observações foram confirmadas pelos testes estatísticos, os quais mostraram que as diferenças entre o tratamento combinado e o uso da doxorubicina isolada foram significativas apenas para as doses de 30 nM a 120 nM, tanto para a linhagem HB4a ($p\text{-value} < 0.05$) como para a linhagem C5.2 ($p\text{-value} < 0.001$). Em contrapartida, as comparações não atingiram significância estatística quando a combinação entre ambos os fármacos envolveu maiores doses do quimioterápico (250 nM a 1000 nM) ($p\text{-value} > 0.05$). Além disso, os efeitos do tratamento combinado diferiram dos obtidos

---

para a rapamicina em todas as dosagens de doxorrubicina utilizadas (p -value < 0.001).

Apesar de também ter mostrado diferenças entre o tratamento combinado e os de cada fármaco isolado sobre a inibição de proliferação, tais diferenças foram mais discretas na linhagem SKBR3. Isso pode ser explicado pelo fato de que, quando comparada às outras linhagens, o tratamento combinado na SKBR3 apresentou efeitos de inibição próximos ao tratamento com rapamicina sozinha quando foram utilizadas menores doses de doxorrubicina. Considerando a dosagem de 30 nM, o tratamento combinado não diferiu dos efeitos da rapamicina sozinha, visto que a porcentagem de células permaneceu cerca de 60% em ambos os tipos de tratamento. Embora o tratamento combinado tenha apresentado efeitos distintos dos observados para a rapamicina na dosagem de 60 nM, doses maiores a essa minimizaram as diferenças entre os efeitos do uso do quimioterápico isolado e associado à rapamicina, conforme observado para as linhagens HB4a e C5.2. As análises estatísticas confirmaram esses resultados, mostrando que na dosagem de 30 nM, o tratamento combinado diferiu apenas do quimioterápico isolado ($p < 0.01$), não diferindo do tratamento com rapamicina ($p > 0.05$). Na dosagem de 60 nM, os efeitos do tratamento combinado diferiram tanto em relação à rapamicina ($p < 0.05$) como em relação à doxorrubicina ($p < 0.001$). Nas demais doses de doxorrubicina, o tratamento combinado diferiu significativamente da rapamicina ($p < 0.01$), mas não diferiu do tratamento com o quimioterápico isolado ($p > 0.05$).

4.4. Análises de curvas dose-resposta

Considerando que, para uma mesma dose de doxorrubicina, o tratamento combinado exerceu maiores efeitos quando comparado ao uso do quimioterápico sozinho, decidimos investigar se tal associação foi capaz de alterar o perfil da curva de proliferação apresentada pela doxorrubicina sozinha, de modo a reduzir a dosagem de doxorrubicina necessária para causar 50% de inibição sobre a proliferação (EC_{50}). Com essa finalidade, utilizamos o modelo de regressão linear, disponibilizado pelo *software GraphPad Prism versão. 4.0 (2003)*. Considerando que os resultados foram mais proeminentes após 48 e 72 horas, consideramos apenas esses dados para a análise das três linhagens.

A figura 16 mostra as curvas obtidas para o tratamento combinado (doxo + rapa) e o tratamento com doxorrubicina sozinha. A confiabilidade dos dados gerados pode ser vista pelos valores de R^2 próximos a 1.0, mostrando que tais curvas podem ser representativas dos resultados obtidos em cada condição. Além disso, os valores de *SE Log EC_{50}* não ultrapassaram o valor de 0.05, conforme recomendado pelo programa de análise.

Figura 16: Análises de regressão não-linear para as linhagens HB4a, C5.2 e SKBR3 tratadas com doxorubicina (Doxo – D) e o tratamento combinado (Doxo + Rapa – D+R) após 48 e 72 horas. Eixo x: valores logados das doses de doxorubicina. Eixo y: Efeitos obtidos para cada dose de doxorubicina, representados como valores em porcentagem da controle. R²: coeficiente de determinação. EC₅₀: dosagem de doxorubicina necessária para causar 50% de inibição sobre a proliferação (IC₅₀). Log EC₅₀: valor logado de EC₅₀. SE Log EC₅₀: Erro-padrão na determinação do Log EC₅₀.

Para as linhagens HB4a e C5.2, a análise dos valores de EC_{50} mostraram que o tratamento combinado foi capaz de reduzir cerca de duas vezes o EC_{50} ($p\text{-value} < 0.0001$), tanto no período de 48 horas quanto no período de 72 horas. No caso da linhagem SKBR3, os valores de EC_{50} não diferiram entre o tratamento combinado e o quimioterápico isolado após 48 horas ($p\text{-value} > 0.05$). Entretanto, de maneira similar às demais linhagens, após 72 horas, o valor de EC_{50} da doxorrubicina foi reduzido significativamente (cerca de duas vezes) ($p\text{-value} < 0.0001$) após sua associação com a rapamicina. Assim, esses resultados mostraram que a rapamicina realmente foi capaz de reduzir o EC_{50} da doxorrubicina de forma similar nas três linhagens estudadas.

Em conjunto, as análises estatísticas pelo teste *One-Way ANOVA* mostraram que o tratamento combinado pareceu exercer efeitos importantes nas três linhagens quando comparado a cada fármaco isoladamente, principalmente quando são utilizadas menores doses do quimioterápico (30 nM e 60 nM). As análises por regressão não-linear revelaram que a rapamicina foi capaz de reduzir cerca de duas vezes a dose de doxorrubicina necessária para causar 50% de inibição sobre a proliferação, aumentando a sensibilidade ao quimioterápico. Essas evidências sugerem a existência de sinergismo entre os dois fármacos.

4.5. Extração e Purificação do RNA total

De maneira geral, as amostras de RNA total purificado apresentaram níveis de pureza satisfatórios após quantificação no aparelho NanoDrop. As razões 260/280 se situaram entre 1.97 e 2.06. As leituras no aparelho Bioanalyzer também mostraram RNA íntegros, visto que o RIN variou de 8.4 a 10.0. Como exemplo, a figura 17 representa eletroferogramas de 1 ensaio independente da linhagem HB4a. É possível observar a integridade dos picos representativos das bandas 18S e 28S do RNA ribossômico.

Figura 17: Análise da integridade do RNA total purificado pelo aparelho *Bioanalyzer*. A: Visualização das bandas 28 S e 18 S para as amostras correspondentes aos controles (C1, C2) e tratamento com rapamicina (R1, R2). B: Eletroferograma correspondente às 4 amostras.

4.6. Amplificação e purificação do RNA amplificado

A quantificação do RNA amplificado no aparelho NanoDrop não demonstrou contaminação por *beads*, visto que a razão 260/230 variou de

1.69 a 2.27. O rendimento de todas as amostras foi satisfatório visto que as concentrações variaram de 777.1 ng/ μ L a 1818.6 ng/ μ L.

4.7. Qualidade das reações de amplificação e hibridização

Todas as amostras apresentaram valor *background* dentro dos critérios de qualidade estabelecidos pelo fabricante (entre 20 e 100), variando de 29.3 a 39.4. A porcentagem de genes presentes situou-se entre 32% a 39%, valores próximos aos 30% estabelecido como critério. Os controles positivos de hibridização apresentaram intensidades de sinal a 3' na ordem estabelecida BioC<BioD<Cre, os quais se situaram, respectivamente, em torno de 1000, 3000 e 7800. Assim, todas as amostras apresentaram eficiência semelhante de hibridização. Os controles de amplificação internos foram avaliados segundo a razão 3'/5' apresentada pelos transcritos GAPDH e ACTB. Tais valores não ultrapassaram o valor de 3.0, variando de 0.93 a 1.58 indicando que não houve viés experimental a 3' inserido pela própria metodologia 3' IVT. Os controles de amplificação externos (*Poly-A RNA Control-Lys*, *Phe*, *Thr* e *Dap*) também mostraram ausência desse viés, visto que as razões 3'/5' desses transcritos também não ultrapassaram o valor de 3.0 sugerido pelo protocolo, variando de 1.06 a 2.30.

4.8. Análise do perfil de expressão gênica

4.8.1. Clusterização Hierárquica

O perfil de expressão gênica foi obtido para as linhagens HB4a, C5.2 e SKBR3 tratadas com doxorubicina, rapamicina e o tratamento combinado. Com o objetivo de verificar se os genes modulados por cada tratamento seriam realmente capazes de discriminá-los da amostra controle, foi realizada uma clusterização hierárquica utilizando os valores de intensidade de sinal normalizados apenas dos genes diferencialmente expressos (clusterização supervisionada). Nos três tipos de tratamento, os 5 ensaios independentes do grupo controle foram separados dos 5 ensaios correspondentes a cada tratamento, confirmando a fidedignidade dos dados obtidos. Como exemplo, a figura 18 apresenta a distribuição da intensidade de sinal (entre todos os ensaios independentes) de alguns dos genes superexpressos no tratamento combinado em relação ao controle.

Figura 18: Dendrograma representativo da clusterização hierárquica supervisionada, utilizando *Euclidean Distance* e *Average-Linkage* como parâmetros. Os genes estão dispostos em cada linha, e as amostras, em colunas. O verde representa valores próximos a zero, os quais, ao aumentarem em direção às amostras tratadas, correspondem ao sinal vermelho.

4.8.2. Comparação entre tratamentos

A figura 19 mostra que os principais efeitos da doxorrubicina consistiram na indução de expressão gênica e essa resposta foi mais preponderante na linhagem HB4a, visto que 1453 genes foram induzidos nessa célula comparada aos 468 e 174 genes encontrados nas linhagens C5.2 e SKBR3. Genes reprimidos pelo tratamento com doxorrubicina também foram observados predominantemente na linhagem HB4a ($n = 231$)

comparada à C5.2 (n = 12) e a SKBR3 (n = 11). Diferentemente da doxurrubicina, a rapamicina reduziu substancialmente a expressão gênica e esses efeitos ocorreram predominantemente nas linhagens C5.2 e SKBR3, as quais demonstraram, respectivamente, 1589 e 867 genes de expressão reduzida enquanto que a linhagem HB4a mostrou 167 genes suprimidos por esse fármaco. A indução na expressão gênica pela rapamicina ocorreu prevalentemente na linhagem SKBR3 (518 genes), enquanto que as células HB4a e C5.2 apresentaram 190 e 188 genes induzidos pelo tratamento, respectivamente.

No tratamento combinado, um maior número de genes foi induzido na linhagem HB4a (1439 up vs 821 down), reduzido na linhagem C5.2 (509 up vs 1203 down) e alterada em ambas as direções na SKBR3 (926 up vs 1109 down). A comparação entre o perfil de expressão gênica gerado pelo tratamento combinado e o obtido por cada fármaco isolado indicou que 50% dos genes no tratamento combinado foram uma consequência da soma dos efeitos individuais de cada fármaco *per se* na linhagem HB4a (1131/2260) e SKBR3 (1023/2035), enquanto que esse índice foi ligeiramente maior na linhagem C5.2, já que essa linhagem apresentou cerca de 60% (656/1712) dos genes no tratamento combinado comumente regulados pelos dois fármacos sozinhos. Além disso, essas análises mostraram que a contribuição da rapamicina no tratamento combinado consistiu principalmente na redução na expressão gênica enquanto que a doxurrubicina contribuiu induzindo a expressão gênica.

Figura 19: Diagramas de venn representativos do número de genes regulados por cada tratamento isolado, assim como dos genes comumente regulados por cada fármaco sozinho e o tratamento combinado. D: Grupo Doxo; R: grupo Rapa; D+R: Tratamento Combinado. UP: Genes de expressão induzida por cada tratamento; DOWN: Genes de expressão reduzida por cada tratamento.

4.8.3. Categorias funcionais moduladas pelo tratamento combinado

Com o objetivo de compreender os mecanismos moleculares envolvidos na resposta ao tratamento combinado, os genes diferencialmente expressos por essa abordagem foram classificados de acordo com os processos biológicos mais relevantes. Tal classificação incluiu genes de expressão induzida e reduzida e representativos de 3 grupos: (a) comumente regulados pela doxorrubicina sozinha, (b) comumente regulados pela rapamicina sozinha e (c) exclusivamente regulados pelo tratamento combinado (Tabela 1). (Tabelas completas das linhagens C5.2 e SKBR3 em ANEXO).

Processos biológicos modulados pelo tratamento combinado			
Categoria	HB4a	C5.2	SKBR3
Resposta Imune	NE	↑TRIM22, ↑PROCR, ↑RNF19B, ↑MARCH8, ↑FCGRT, ↑HLA-B	↑CXCL10, ↑IL8, ↑SEMA4D, ↑RNF19B, ↑HLA-E, ↑HLA-G
Regulação negativa da proliferação celular	↑DHRS2, ↑GDF11, ↑CDKN1A, ↑BMP7, ↑MXD4	NE	↑CDH5, ↑GPNMB, ↑LBX1, ↑CGREF1, ↑ADM, ↑HDAC4
Anti-apoptose	↑CRYAB, ↑EEF1A2, ↑ATF5, ↑DDAH2, ↑IFI6	↑CRYAB, ↑DAPK1, ↑GPX1, ↑ANXA4, ↑FAS, ↑NGFR	↑CITED2, ↑SEMA4D, ↑DAPK1, ↑IKKBK, ↑NFKB1
Resposta à hipóxia	↑CLDN3, ↑ECE1, ↑EDN1, ↑EPAS1, ↑ERCC3, ↓VEGFA, ↓VLDLR, ↓CA9, ↓CXCR4	NE	↑CITED2, ↑ADM, ↑CYP1A1, ↑EDN1, ↑EPAS1
Parada do ciclo celular	↓CDKN1C, ↓ERN2, ↓DBC1, ↓DHCR24, ↓ERN1, ↓GAS1	↑CDKN1A, ↑GADD45A, ↑PPP1R15A, ↑HBP1, ↑SESN1, ↑SESN2	↑CDKN2B, CGREF1, ↑PPP1R15A, ↑PPP2R3B, ↑HBP1
Ciclo celular	↑UBE2C, ↑CIT, ↑CDCA5, ↑CKS1B, ↑PLK3	↑SPAG5, ↑SESN1, ↑SESN2, ↑UBE2C, ↑CIT, ↑CKS1B, ↑TP53INP, ↑PPM1D	↓CDC7, ↓CDC45, ↓CKS1B, ↓ZWINT
Indução de apoptose	↑TRAIP, ↑DLC1, ↑UNC13B, ↑SERINC3, ↑NLRP3	↑ZMAT3, ↑TP53INP, ↑PHLDA3, ↑BBC3, ↑GPX1	NE
Oxidação-redução	↓HTATIP2, ↓RDH13, ↓ALKBH2, ↓SRXN1,	↓LDHA, ↓SCD, ↓SCO2, ↓COX15, ↓COX6B1	NE

	↓CYP2F1		
Processos metabólicos	↓PECI, ↓CHIT1, ↓DCT, ↓PLD5, ↓ACSL1	↓ACACA, ↓ACAT2, ↓FAH, ↓ALDOA, ↓ALDOC	↑CCNO, ↑AGPAT2, ↑SDSL, ↑DCI, ↑TYMP
Apoptose	↓VAV3, ↓ERN2, ↓NEK6, ↓DHCR24, ↓ERN1	↓SFN, ↓YARS, ↓FASTK, ↓RFFL, ↓DAD1	NE
Processamento de RNAr	↓NOP56, ↓DKC1, ↓FBL, ↓PDCD11, ↓RRP1B	↓NPM3, ↓NOP56, ↓UTP14A, ↓FTSJ3, ↓EIF4A3	NE
Processos metabólicos de carboidratos	↓CHST4, ↓CHI3L2, ↓CHIT1, ↓ALDH1B1, ↓B4GALT1	↓PDK1, ↓HK2, ↓PGM1, ↓TPI1, ↓SHPK	NE
Estruturação protéica (<i>folding</i>)	↓DNAJB6, ↓PPIF, ↓CCT7, ↓AHSA1, ↓RUVBL2	↓HSPA9, ↓HSPB1, ↓PFDN6, ↓CCT7, ↓AHSA1	NE
Resposta a danos no DNA	NE	↑RRM2B, ↑RPS27L, ↑POLH, ↑RAD51C, ↑ZMAT3	↓RAD21, ↓TOPBP1, ↓CHEK1, ↓CHEK2, ↓RAD51C, ↓RAD51AP1
Rearranjos de RNA (splicing)	NE	↓THOC4, ↓DDX39, ↓GEMIN6, ↓USP39, ↓RNPS1,	↓THOC4, ↓GEMIN6, ↓HNRNPR, ↓SYNCRIP, ↓SNRPA1, ↓SIP
Replicação do DNA	NE	↓TREX1, ↓DUT, ↓FEN1, ↓MCM2, ↓MCM3	↓CENPF, ↓DBF4, ↓RRM2, ↓TYMS, ↓RFC4

* Tabela 1: Os genes representativos das categorias funcionais de cada linhagem estão representados de acordo com seu símbolo (*gene symbol*). NE: processo não encontrado na linhagem em questão.

Nós observamos várias funções comumente reguladas pelo tratamento combinado nas três linhagens celulares, tais como ciclo celular e processos metabólicos. Entre as categorias funcionais representadas na linhagem C5.2, encontramos indução de genes relacionados à parada do ciclo celular (SESN1, SESN2) e indução de apoptose (ZMAT3, TP53INP) enquanto que os genes de expressão reduzida foram relacionados aos processos de óxido-redução (LDHA, COX15, COX6B1), apoptose (SFN, YARS), processos metabólicos (ACACA, ACAT2), metabolismo de carboidratos (PDK1, HK2, TPI1), rearranjos de RNA (THOC4, GEMIN6) e estruturação protéica (HSPA9, HSPB1). A linhagem SKBR3 mostrou indução de genes implicados na resposta imune (HLA-E, HLA-G) e regulação negativa da proliferação celular (LBX1, HDAC4) enquanto que os genes

reduzidos foram associados a ciclo celular (CKS1B), resposta a danos no DNA (CHEK1, RAD21) e rearranjos de RNA (SNRPA1 and SIP1).

4.8.4. Categorias funcionais dos genes exclusivamente regulados pelo tratamento combinado

Os genes exclusivamente regulados pelo tratamento combinado podem resultar de uma interação entre os dois fármacos, já que eles foram alterados independentemente da ação de cada fármaco sozinho. A anotação funcional desses genes indicou funções específicas de cada linhagem. Na linhagem C5.2, foram observados genes induzidos relacionados à diferenciação celular, fosforilação de aminoácidos e catabolismo de lipídios. Dentre os genes reprimidos, encontramos alguns envolvidos na regulação negativa da transcrição do promotor da RNA polimerase II e transdução de sinal mediada por *small*-GTPases (Tabela 2).

<i>Categorias funcionais dos genes exclusivamente regulados pelo tratamento combinado na linhagem C5.2</i>		
Símbolo do gene	Nome do gene	Número de acesso
Genes induzidos		
Diferenciação celular		
PGF	placental growth factor	NM_002632
TSG101	tumor susceptibility gene 101	NM_006292
CSPG5	chondroitin sulfate proteoglycan 5 (neuroglycan C)	NM_006574
CIT	citron (rho-interacting, serine/threonine kinase 21)	NM_007174
SERPINE2	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2	NM_001136528
PBXIP1	pre-B-cell leukemia homeobox interacting protein 1	NM_020524
NGFR	nerve growth factor receptor	NM_002507
Fosforilação de aminoácidos		

LIMK2	LIM domain kinase 2	NM_001031801
MAPK11	mitogen-activated protein kinase 11	NM_002751
MOS	v-mos Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog	NM_005372
CSNK1G1	casein kinase 1, gamma 1	NM_022048
CIT	citron (rho-interacting, serine/threonine kinase 21)	NM_007174
MARK4	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4	NM_001199867
DAPK1	death-associated protein kinase 1	NM_004938
Catabolismo de lipídios		
PLA2G7	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	NM_001168357
PLCD1		NM_001130964
PLCXD2	phospholipase C, delta 1 phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 2	NM_001185106
Genes reprimidos		
Regulação negativa da transcrição do promotor da RNA polymerase II		
FOXA1		NM_004496
ZNF174	forkhead box A1	NM_001032292
TRIM27	zinc finger protein 174	NM_006510
E2F6	tripartite motif-containing 27	NM_198256
PKIG	E2F transcription factor 6	NM_007066
TLE1	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor gamma	NM_005077
ZNF8	transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, la)	NM_021089
ZFP161	zinc finger protein 8	NM_001143823
ENO1	zinc finger protein 161 homolog (mouse)	NM_001428
GLIS1	enolase 1, (alpha)	NM_147193
ID2	GLIS family zinc finger 1	NM_002166
	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix	
Transdução de sinal mediada por small-GTPases		
RAB34	RAB34, member RAS oncogene family	NM_001142624
RAB27B	RAB27B, member RAS oncogene family	NM_004163
ARL4C	ADP-ribosylation factor-like 4C	NM_005737
SIAH2	seven in absentia homolog 2 (Drosophila)	NM_005067
ARL4A	ADP-ribosylation factor-like 4A	NM_001037164
RAB40A	RAB40A, member RAS oncogene family	NM_080879
RASL11A	RAS-like, family 11, member A	NM_206827
RERG	RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor	NM_001190726

* Tabela 2: Genes modulados exclusivamente pelo tratamento combinado e classificados em processos biológicos na linhagem C5.2. Símbolo do gene: Gene symbol; Nome do gene: Gene Name; Número de acesso: Accession Number.

Por sua vez, os genes induzidos na linhagem SKBR3 foram associados à resposta imune e organização da matriz extracelular. Os genes reprimidos foram relacionados ao catabolismo de proteínas dependente de modificação e transporte de vesículas do retículo endoplasmático para o complexo de golgi (Tabela 3).

<i>Categorias funcionais dos genes exclusivamente modulados pelo tratamento combinado na linhagem SKBR3</i>		
Genes induzidos		
Símbolo do gene	Nome do gene	Número de acesso
Resposta Imune		
FYB	FYN binding protein	NM_001465
THBS1	thrombospondin 1	NM_003246
PTMS	Parathymosin	NM_002824
SEMA4D	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4D	NM_001142287
SMAD6	SMAD family member 6	NM_001142861
NCR3	natural cytotoxicity triggering receptor 3	NM_001145466
ERAP1	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	NM_001040458
RNF19B	ring finger protein 19B	NM_001127361
SQSTM1	sequestosome 1	NM_001142298
TNFAIP1	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)	NM_021137
CCL28	chemokine (C-C motif) ligand 28	NM_148672
SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein	NM_001128325
CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	NM_005409
SECTM1	secreted and transmembrane 1	NM_003004
TAPBP	TAP binding protein (tapasin)	NM_003190
CX3CL1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	NM_002996
Organização da matriz extracelular		
IBSP	integrin-binding sialoprotein	NM_004967
TNR	tenascin R (restrictin, janusin)	NM_003285
B4GALT1	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1	NM_001497
GFOD2	glucose-fructose oxidoreductase domain containing 2	NM_030819
Genes reprimidos		
Gene Symbol	Gene Name	Accession Number
Catabolismo de proteínas dependente de modificação		
VPRBP	Vpr (HIV-1) binding protein	NM_001171904
SAE1	SUMO1 activating enzyme subunit 1	NM_001145713
MED8	mediator complex subunit 8	NM_052877
ANAPC13	anaphase promoting complex subunit 13	NM_015391
UBE2E2	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 2 (UBC4/5 homolog, yeast)	NM_152653
RAD23B	RAD23 homolog B (S. cerevisiae)	NM_002874
KCMF1	potassium channel modulatory factor 1	NM_020122
SPOP	speckle-type POZ protein	NM_001007226

ANAPC7	anaphase promoting complex subunit 7	NM_001137664
UBE2M	ubiquitin-conjugating enzyme E2M (UBC12 homolog, yeast)	NM_003969
FANCL	Fanconi anemia, complementation group L	NM_001114636
BRCC3	BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3	NM_001018055
RNF138	ring finger protein 138	NM_001191324
UBE2V2	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	NM_003350
KLHL15	kelch-like 15 (Drosophila)	NM_030624
PJA2	praja ring finger 2	NM_014819
HLTF	helicase-like transcription factor	NM_003071
RNF128	ring finger protein 128	NM_024539
UBE2A	ubiquitin-conjugating enzyme E2A (RAD6 homolog)	NM_003336
USP7	ubiquitin specific peptidase 7 (herpes virus-associated)	NM_003470
USP32	ubiquitin specific peptidase 32	NM_032582
USP13	ubiquitin specific peptidase 13 (isopeptidase T-3)	NM_003940
UBE2G2	ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2 (UBC7 homolog, yeast)	NM_003343
TCEB1	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1 (15kDa, elongin C)	NM_005648
UCHL5	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5	NM_001199261
UCHL3	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 (ubiquitin thiolesterase)	NM_006002
UBE2K	ubiquitin-conjugating enzyme E2K (UBC1 homolog, yeast)	NM_001111112
Transporte de vesículas do retículo endoplasmático para o Complexo de Golgi		
SEC24D	SEC24 family, member D (S. cerevisiae)	NM_014822
NRBP1	nuclear receptor binding protein 1	NM_013392
SEC23B	Sec23 homolog B (S. cerevisiae)	NM_001172745
SAR1B	SAR1 homolog B (S. cerevisiae)	NM_001033503
ATL2	atlastin GTPase 2	NM_001135673
TMX1	thioredoxin-related transmembrane protein 1	NM_030755

* Tabela 3: Genes modulados exclusivamente pelo tratamento combinado e classificados em processos biológicos na linhagem SKBR3. Símbolo do gene: Gene symbol; Nome do gene: Gene Name; Número de acesso: Accession Number.

4.8.5. Perfil de expressão gênica modulado pela presença de HER-2

Nosso próximo passo foi investigar o modo pelo qual a superexpressão de HER-2 poderia mediar essa resposta. Inicialmente, comparamos os perfis de expressão gênica gerados pelo tratamento combinado entre as linhagens HB4a e C5.2, considerando que elas diferem entre si apenas pela presença desse receptor. Os resultados mostraram que 27% (139/509) dos genes induzidos e 65% (780/1203) dos genes reduzidos pelo tratamento combinado na linhagem C5.2 foram exclusivamente modulados nessa célula em relação à linhagem HB4a. Em seguida, decidimos verificar se tais genes foram comumente modulados pelo

tratamento combinado na linhagem SKBR3. Os resultados mostraram 16 genes induzidos e 108 genes de expressão reduzida comuns entre as duas linhagens. Após a classificação funcional desses genes, observamos a modulação de genes envolvidos na glicólise, *splicing* de RNAs e cadeia transportadora de elétrons (tabela 4).

Categorias funcionais moduladas pelo tratamento combinado e mediadas pela superexpressão de HER-2			
Gene Symbol Genes UP	Gene Name	Accession Number	GO process
MARCH8 DET1	membrane-associated ring finger (C3HC4) 8 de-etiolated homolog 1 (Arabidopsis)	NM_001002265 NM_001144074	Catabolismo de proteínas dependente de modificação
TXNIP	thioredoxin interacting protein	NM_006472	Resposta à glicose
CHKB	choline kinase beta	NM_005198	Biossíntese de fosfatidilcolina
DUSP6	dual specificity phosphatase 6	NM_001946	Inativação de MAPK
EIF4B	eukaryotic translation initiation factor 4B	NM_001417	Início da tradução
Genes DOWN			
DDX39 LSM2 SNRPF SNRPG SNRNP25 LSM10	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39 LSM2 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae) small nuclear ribonucleoprotein polypeptide F small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G small nuclear ribonucleoprotein 25kDa (U11/U12) LSM10, U7 small nuclear RNA associated	NM_005804 NM_021177 NM_003095 NM_003096 NM_024571 NM_032881	Rearranjo de RNA (splicing)
AKAP8 ANAPC7 TIPIN CDC6 CDC25A	A kinase (PRKA) anchor protein 8 anaphase promoting complex subunit 7 TIMELESS interacting protein cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae) cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)	NM_005858 NM_001137664 NM_017858 NM_001254 NM_001789	Mitose
PRMT5 DTYMK CKLF TCF19	protein arginine methyltransferase 5 deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase) chemokine-like factor transcription factor 19	NM_001039619 NM_001165031 NM_001040138 NM_001077511	Proliferação celular
UQCR10 NDUFA8 NDUFAB1 NDUFS6 GLRX2	ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit X NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 8, 19kDa NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex, 1, 8kDa NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6, 13kDa glutaredoxin 2	NM_001003684 NM_014222 NM_005003 NM_004553 NM_016066	Cadeia transportadora de elétrons

PSMA7 PSMB6 PSMD2 PSMD13	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7 proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 6 proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2 proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 13	NM_002792 NM_002798 NM_002808 NM_002817	Regulação positiva da atividade de ubiquitina-ligase
FEN1 ORC1 GINS2	flap structure-specific endonuclease 1 origin recognition complex, subunit 1 GINS complex subunit 2 (Psf2 homolog)	NM_004111 NM_001190818 NM_016095	Replicação do DNA
EIF4B	eukaryotic translation initiation factor 4B	NM_001417	Início da tradução
PRMT5 SNRPF SNRPG	protein arginine methyltransferase 5 small nuclear ribonucleoprotein polypeptide F small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G	NM_001039619 NM_003095 NM_003096	Rearranjo de RNAm nuclear, via spliceossomo
DLAT ALDOC HK1.	dihydrolipoamide S-acetyltransferase aldolase C, fructose-bisphosphate hexokinase 1	NM_001931 NM_005165 NM_000188	Glicólise
PHGDH SHMT1 SHMT2.	phosphoglycerate dehydrogenase serine hydroxymethyltransferase 1 (soluble) serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	NM_006623 NM_004169 NM_001166356	Metabolismo de Glicinas

* Tabela 4: Genes cuja modulação pelo tratamento combinado foi dependente da superexpressão de HER-2. Símbolo do gene: Gene symbol; Nome do gene: Gene Name; Número de acesso: Accession Number.

5. DISCUSSÃO

A superexpressão de HER-2 parece ser um fator de sensibilidade ao tratamento com doxorrubicina (DiGiovanna et al, 2008; Paik et al, 2000), a qual pode ser devida à ocorrência de elevados níveis da enzima topoisomerase II α (alvo de ação da doxorrubicina) após a ativação de HER-2 (Harris et al, 1998). Evidências do valor preditivo dessa proteína surgiram, por exemplo, no trabalho de Arpino e colaboradores (2005), o qual demonstrou que os pacientes com elevados níveis dessa proteína (previamente ao tratamento) responderam melhor ao tratamento neoadjuvante com doxorrubicina em relação aos que apresentavam níveis menores da enzima.

Apesar dessas evidências, a presença de HER-2 ainda é considerada um indicador de mau prognóstico, o que pode ser devido à capacidade desse receptor ativar diversas vias de sinalização mediadoras da resistência à morte celular, dentre elas, a via PI3K/AKT/mTOR. Resultados do grupo de Zhou et al (2004), mostraram que os níveis de fosforilação de AKT e mTOR, assim como o de 4E-BP1 (alvo de mTOR), foram maiores em tecidos de câncer de mama invasivos que superexpressavam HER-2 em relação àqueles que não superexpressavam. Os efeitos dessa ativação parecem se contrapor aos efeitos citotóxicos da doxorrubicina, conforme apontado por alguns trabalhos que examinaram a resposta de linhagens mamárias ao tratamento com doxorrubicina (Liang et al, 2006; Knueffermann et al, 2003; Steelmann et al, 2008). Além disso, a modulação de AKT também ocorrer

---

pelo próprio tratamento quimioterápico independentemente dos níveis endógenos de ativação dessa via, visto que tanto linhagens com baixos e altos níveis de AKT ativado (previamente ao tratamento) tiveram a superativação dessa via até mesmo com reduzidas doses de doxorrubicina (50 η M) (Li et al, 2005; Clark et al, 2002). Considerando esses dados, é possível que inibidores da via PI3K/AKT/mTOR, tais como a rapamicina, exerçam um importante papel em aumentar a sensibilidade de células de câncer de mama ao tratamento quimioterápico.

Diversos trabalhos têm indicado o efeito sinérgico entre inibidores da via PI3K/AKT e agentes quimioterápicos em diferentes modelos experimentais (Wang et al, 2008; Fujiwara et al, 2006; Wendel et al, 2006; Fujiwara et al, 2007; Beuvink et al, 2005; Dong et al, 2005; Steelman et al, 2008; Mondesire et al, 2004; Grunwald et al, 2002; Wendel et al, 2004). De acordo com essas evidências, foi proposto, nesse estudo, investigar a influência da superexpressão dos receptores HER-2 nos efeitos da rapamicina e doxorrubicina sobre o perfil biológico das linhagens epiteliais mamárias HB4a, C5.2 e SKBR3, comparando os resultados com os obtidos no tratamento combinado.

A escolha de 20 nM de rapamicina para a realização dos nossos experimentos foi baseada na farmacocinética desse agente, de acordo com a literatura. Em ensaios clínicos de fase I (Raymond et al, 2004) e fase II (Chan et al, 2005), o tratamento com CCI-779 (temsirolimus, análogo clínico da rapamicina) resultou em concentrações plasmáticas iniciais de 1000 η M de rapamicina (0 horas), que variaram entre 60 η M e 100 nM no período de

---

24 a 48 horas. No caso da doxorrubicina, dados da literatura mostraram que as concentrações plasmáticas iniciais de pacientes submetidos a essa terapia varia de 300 η M (Kokenberg, 1988) a 5000 η M (Brenner et al, 1985), mantendo-se de 10 η M a 150 η M durante os períodos de 24 a 48 horas (Creasey et al, 1976; Launay et al, 1989; Mross et al, 1988; Benjamin et al, 1977). Considerando esses dados, utilizamos doses que variaram de 30 η M a 1000 η M do quimioterápico.

No presente trabalho, os primeiros resultados apresentados referiram-se ao tratamento com rapamicina. As análises do perfil de distribuição do ciclo celular mostraram que, enquanto a linhagem HB4a não apresentou diferenças significativas no perfil de distribuição do ciclo celular, as linhagens C5.2 e SKBR3 exibiram, em média, 12% e 15% de aumento na porcentagem de células situadas na fase G1 do ciclo celular, respectivamente. Tais resultados foram concordantes com os dados da literatura, visto que estudos anteriores relataram que o principal efeito da rapamicina sobre o ciclo celular consiste na indução de parada do ciclo na fase G1 (Noh, et al, 2004; Del Bufalo et al, 2006; Shapira et al, 2006; Garcia-Morales et al, 2006). Além disso, os valores de 12% e 15% obtido para as linhagens C5.2 e SKBR3 se apresentaram dentro dos valores descritos para a linhagem SKBR3 tratada com rapamicina, os quais variaram de 12% (Noh et al, 2004) a 27% (Garcia-Morales et al, 2006) e que foram considerados, pelos autores desses trabalhos, valores determinantes de sensibilidade à rapamicina. Nossos ensaios de luminescência mostraram resultados semelhantes, visto que a rapamicina exerceu maiores efeitos na redução da viabilidade celular nas

linhagens C5.2 e SKBR3 (50%) em relação à HB4a (40%), quando comparadas às controles. Esses resultados já eram esperados devido ao fato de que as linhagens C5.2 e SKBR3 possuem altos níveis de HER-2, o que permitiu a especulação de que também devem ter a proteína AKT ativada, um dos fatores relacionados à sensibilidade à rapamicina (Noh et al, 2004; Gera et al, 2004).

Diferentemente da rapamicina, os efeitos da doxorrubicina consistiram em aumento da porcentagem de células em S-G2/M, sendo que a linhagem HB4a pareceu ser mais sensível a esses efeitos. Na dosagem de 30 nM, uma porcentagem maior dessa célula se situou na fase S-G2/M quando comparada às demais linhagens. Além disso, apenas a linhagem HB4a foi sensível aos efeitos citotóxicos desse fármaco quando comparada às demais linhagens. Tais resultados estão de acordo com o fato de que a presença de HER-2 pode promover maior resistência ao tratamento quimioterápico (Knueffermann et al, 2003). A parada em S-G2/M pela doxorrubicina também foi descrita em outros trabalhos (Bar-On et al, 2007), e pode ser explicada pelo fato de o mecanismo de ação da doxorrubicina consistir na sua ligação à enzima topoisomerase II, cuja expressão é máxima durante a fase S-G2/M, favorecendo a ocorrência de quebras do DNA e a subsequente parada no ciclo principalmente nessa fase em relação às demais (Potter et al, 2005). Nesse contexto, receptores HER-2 podem ativar a expressão de survivina, a qual favorece a sobrevivência celular e a progressão do ciclo celular na fase S-G2/M (Li et al, 2004).

A contribuição de inibidores da via PI3K/AKT na indução de parada em S-G2/M em linhagens mamárias foi descrita por Wang e colaboradores (2008), cujos dados mostraram que o tratamento combinado exerceu maiores efeitos na indução de parada em S-G2/M e no aumento de morte celular (pico sub-G1) quando comparados aos efeitos da doxorrubicina sozinha. Ao contrário do observado nesse trabalho, os resultados de distribuição de ciclo nas linhagens HB4a e C5.2, mostraram que a associação entre a rapamicina e a doxorrubicina não apresentou grandes efeitos no aumento da porcentagem de células mortas ou situadas em S-G2/M pelo quimioterápico. Tais resultados podem ser explicados pelo fato de que os autores desse trabalho usaram o agente LY294002, inibidor direto da proteína PI3K, a qual possui papéis regulatórios amplos, mediando até mesmo os efeitos de outras vias de sinalização. (Abraham, 2004).

O perfil de distribuição do ciclo celular da linhagem SKBR3 submetida ao tratamento combinado mostrou-se diferente em relação às demais. Enquanto que nas linhagens HB4a e C5.2 a rapamicina teve pouca influência nos efeitos da doxorrubicina sobre o ciclo celular, na linhagem SKBR3, a inibição de mTOR alterou os efeitos do quimioterápico sobre a indução de parada em S-G2/M. Tais dados sugerem que a rapamicina pode ter efeitos preponderantes aos da doxorrubicina nessa linhagem.

Os ensaios de luminescência mostraram que, para uma mesma dose, a associação favoreceu uma inibição 20% maior na viabilidade celular quando comparada ao tratamento com o quimioterápico isolado nas três linhagens celulares, principalmente após 72 horas. De acordo com Fujiwara

---

e colaboradores (2006), efeitos sinérgicos entre a associação de inibidores de PI3K/AKT e a doxorrubicina requerem que essa via seja constitutivamente ativada. Considerando que a linhagem HB4a não apresenta superexpressão de HER-2, seria esperado que essa linhagem fosse mais resistente aos efeitos do tratamento combinado comparada às demais linhagens. Entretanto, a linhagem HB4a expressa grande quantidade de receptores EGFR em sua membrana plasmática. Como os homodímeros de EGFR também são potentes ativadores da via PI3K/AKT, talvez eles possam levar a uma cascata de sinalização alternativa que resulta na ativação de mTOR (Timms et al, 2002).

Nossos próximos resultados foram referentes às análises de perfil de expressão gênica. Consistente com o fato de que as linhagens C5.2 e SKBR3 apresentaram-se mais sensíveis à parada no ciclo celular causada pela rapamicina, o perfil de expressão dessas linhagens mostrou um maior número de genes modulados por esse fármaco quando comparadas à linhagem HB4a. O perfil molecular gerado pelo tratamento com doxorrubicina também mostrou resultados concordantes com a resposta biológica, já que esse fármaco alterou a expressão de um maior número de genes na linhagem HB4a, a qual havia demonstrado ser mais sensível aos efeitos desse quimioterápico na distribuição do ciclo celular e indução de morte. Em conjunto, esses dados sugerem que a superexpressão de HER-2 foi capaz de ativar a via PI3K/Akt/mTOR nas linhagens C5.2 e SKBR3. Como o nosso objetivo principal foi o de investigar como a superexpressão de HER-2 poderia mediar a resposta de linhagens epiteliais mamárias ao

---

tratamento combinado, as análises posteriores do perfil de expressão gênica foram realizadas enfocando principalmente na resposta das linhagens C5.2 e SKBR3 aos efeitos da associação entre os dois fármacos

Com o objetivo de entender a contribuição de cada fármaco na modulação da expressão gênica pelo tratamento combinado em cada linhagem, analisamos as principais categorias funcionais associadas aos genes comumente regulados por cada fármaco sozinho e o tratamento combinado. Algumas funções foram moduladas em ambas as linhagens, como por exemplo, o rearranjo de RNAs (RNA splicing), que pareceu ser suprimido pela contribuição da rapamicina no tratamento combinado. Essa alteração pode ser importante no contexto de superexpressão de HER-2, visto que ela apareceu como alterada apenas nas linhagens C5.2 e SKBR3 em relação à HB4a. Além disso, Menon e colaboradores (2010) identificaram grande quantidade de variantes de *splicing* em tumores de camundongos transgênicos expressando altos níveis desse receptor quando comparados ao grupo controle. Outras funções reguladas nas duas linhagens incluíram a resposta a danos no DNA e ciclo celular. Enquanto que a linhagem C5.2 apresentou a indução de genes de reparo e parada de ciclo celular em S-G2/M pela ação da doxorubicina (SESN1, SESN2, TP53INP, RAD51C), a linhagem SKBR3 mostrou que os genes associados a essas funções apresentaram expressão reduzida e foram regulados pela rapamicina (RAD51C, RAD51AP1, CHK1). Em conjunto, esses dados se correlacionaram com a indução de parada em S-G2/M na linhagem C5.2 e a ausência dessa parada na linhagem SKBR3, conforme apresentado pelos

dados de citometria. Além disso, a supressão da resposta a danos no DNA tem sido implicada no aumento da citotoxicidade de quimioterápicos (Asakawa et al, 2010). A proteína CHK1 é reguladora central da ativação da resposta a danos no DNA na fase S-G2/M e a sua inibição é capaz de aumentar a ocorrência de apoptose e catástrofe mitótica após o tratamento com doxorrubicina (Xiao et al, 2006).

Genes exclusivamente regulados pelo tratamento combinado podem ser uma consequência da interação entre os dois fármacos, visto que eles não foram comumente regulados por cada fármaco sozinho. Assim, nosso próximo passo foi o de verificar a contribuição desse grupo de genes no tratamento combinado. Alguns dos processos biológicos representados por esses genes foram relacionados a funções de transporte. Entre as funções representadas na linhagem C5.2, observamos a repressão de genes relacionados à transdução de sinal mediada por small-GTPases (ARL4C, RAB34, RAB27B). Os genes RAB34 e RAB27B são membros da família Ras e são consideradas reguladoras do transporte intracelular (Subramani et al, 2010). Elas exercem importantes papéis na progressão do câncer pela ativação da via PI3K/AKT (Cheng et al, 2005) e internalização de receptores de fator de crescimento (Chamberlain et al, 2010), o que leva ao aumento da sobrevivência celular. Além disso, as proteínas Rab também regulam o acúmulo de integrinas na membrana plasmática e, assim, estimulam o remodelamento da matriz, o qual é necessário para a invasão da célula tumoral (Pellinen et al, 2006). Na linhagem SKBR3, verificamos genes reprimidos relacionados ao transporte nuclear, tais como as exportinas

---

(XPO1) e importinas (SNUPN, MYRIP). A proteína XPO1 foi implicada na expulsão de proteínas supressoras tumorais e alvos de quimioterápicos do núcleo, levando à quimioresistência (Turner et al, 2008).

Com o objetivo de identificar os processos biológicos relacionados exclusivamente à superexpressão de HER-2, filtramos os genes modulados exclusivamente na linhagem C5.2 (em resposta ao tratamento combinado) quando comparada à linhagem HB4a. Na lista obtida, encontramos alguns genes descritos como associados à superexpressão de HER-2, tais como os genes ALDOC, FOXA1 e ACAT2 (Mackay et al, 2003, Santos et al, 2006, Worthington et al, 2010, Sirconlomb et al, 2010). Após comparar essa lista de genes aos modulados pelo tratamento combinado na linhagem SKBR3, obtivemos genes comuns entre as duas linhagens, os quais também puderam ser classificados em categorias funcionais. Por essa análise, observamos que a modulação do processo de RNA *splicing*, a qual já havia sido representada como alterada pelo tratamento combinado nas duas linhagens, foi mantida, sugerindo que a supressão dessa função pode ser importante na resposta ao tratamento combinado mediada pela presença de HER-2. Além disso, observamos a redução na expressão de genes relacionados à glicólise (ALDOC, HK1) e à cadeia de transporte de elétrons (NDUFA8, NDUFAB1), também correspondentes à ação da rapamicina. A via PI3K/AKT/mTOR pode ser ativada sob condições de hipóxia (Majumder et al, 2004) e durante a redução no aporte de nutrientes, situações comuns durante a progressão tumoral. No primeiro caso, a proteína mTOR é capaz de estimular a glicólise (Pankratz et al, 2009) e, no segundo caso, essa

---

proteína estimula o consumo de oxigênio pela regulação da atividade de fatores transcricionais que aumentam a transcrição de genes envolvidos na biogênese mitocondrial (Cunningham et al, 2007). Enquanto que os genes ALDOC e HK1 codificam proteínas envolvidas na glicólise, os genes NDUFA8 e NDUFAB1 codificam componentes da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria. Outra função alterada correspondeu à supressão da regulação positiva da atividade ubiquitina-ligase (PSMA7, PSMB6), a qual está relacionada à via do complexo ubiquitina-proteossomo. Como essa via está implicada na degradação de ciclinas, evento necessário para a progressão do ciclo (Montagut et al, 2006), sua inibição deve ser importante para causar a parada no ciclo celular. Além disso, a supressão dessa via também está relacionada à inibição da via NFkB , ativada por HER-2 e relacionada à quimiorresistência (Sethi et al., 2007).

---

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho, propusemos estudar os efeitos antiproliferativos da doxorrubicina associada à rapamicina em linhagens epiteliais mamárias humanas caracterizadas pela superexpressão de HER-2. Com esse objetivo, realizamos análises de distribuição do ciclo celular e viabilidade celular, os quais demonstraram que a associação foi capaz de reduzir cerca de duas vezes o IC₅₀ da doxorrubicina. A análise do perfil de expressão gênica do tratamento combinado mostrou que tais resultados podem representar uma consequência da somatória dos efeitos moleculares de cada fármaco isolado, associada à modulação de genes possivelmente resultantes da interação entre os dois fármacos. Processos biológicos cuja modulação pelo tratamento combinado pareceu ser mediada pela superexpressão de HER-2 foram relacionados à supressão de eventos de *splicing* de RNAs, glicólise e biogênese mitocondrial, processos importantes durante a progressão tumoral. Apesar da necessidade de validação desses resultados (procedimento que está sendo realizado para posteriores discussões), tais dados sugerem a existência de efeitos benéficos do tratamento combinado na resposta à doxorrubicina, incluindo a possível redução na toxicidade do paciente associada à quimioterapia.

---

7. ANEXOS

Categorias Funcionais dos Genes Induzidos pelo tratamento combinado na célula C5.2.

Resposta immune
TRIM22, PROCR, RNF19B, MARCH8, FCGRT, HLA-B, HLA-E, HLA-F, MR1, FAZ, IL18, LIF, NOTCH1, SUSD2, TAP1, TNFSF9, TNFRSF14, CD70, CD97
Anti-apoptose
CRYAB, DAPK1, GPX1, ANXA4, FAZ, NGFR, TRIAP1, TNFAIP3, TNFRSF10D
Parada do ciclo celular
CDKN1A, JMY, GADD45A, PPP1R15A, HBP1, SESN1, ING4, TSG101, SESN2, TP53INP1
Ciclo celular
SPAG5, TXNIP, UBE2C, CIT, CKS1B, E2F7, KCTD11, CCNDBP1, C13orf15, ING4, NUSAP1, NDE1, HAUS4, SEPT3, CHMP1B, TFDP2, TSG101, MAD1L1, PPM1D, CCNG1, CCNG2, CCNB2, PTTG1, NCAPD2, CDC25C.
Indução de apoptose
SERINC3, JMY, PHLDA3, BBC3, GPX1, C16orf5, RRM2B, PMAIP1, BIK, ZMAT3, TNFRSF10A, TP53INP1, EI24, CD70
Reposta a danos no DNA
CDKN1A, JMY, DDB2, GADD45A, PPP1R15A, SESN1, RRM2B, RPS27L, POLH, RAD51C, ZMAT3, AEN, XPC, BTG2, PTTG1

Categorias Funcionais dos Genes reprimidos pelo tratamento combinado na célula C5.2.

Oxidação-Redução
PRDX4, HTATIP2, CYP2R1, ALKBH2, CYP4F22, COX6B1, COX15, SRXN1, CYP1B1, CYP51A1, AKR1C1, AKR1C2, DHCR7, DHCR24, DHODH, ALDH2, ALDH1B1, AKR1B1, JMJD6, G6PD, CYP4X1, PHGDH, GMPR, GSR, HSD17B10, HCCS, AOX1, HMOX1, HMOX2, IDH1, IMPDH1, LDHA, MDH2, MTHFD2L, NQO2, OGDH, NSDHL, GFOD1, EGLN1, DUS2L, STEAP3, UEVLD, RSAD1, PYCR1, SQRLD, BDH1, SC4MOL, SCD, SORD, SQLE, D2HGDH, UGDH, SRD5A3, STEAP4, RTN4IP1, AKR1C3, CBR1, OXNAD1, PRDX6, SCO2
Processos metabólicos
ACAA2, DLAT, FAH, ALDOA, ALDOC, ALPP, NEIL2, LPCAT4, GLA, MCAT, CECR5, PGP, ACACA, INSIG1, ACAT2, ASNS, NTHL1, OGG1, PC, METTL13, ENPP2, COQ3, PFKFB4, PMM2, PIGG, MOCOS, NAT10, AGPAT4, ENOPH1, TPI1, UCK2, UNG, C20orf7, ISOC2, FLAD1, HDHD1, HYAL3, AGPAT9, CBS
Protein folding
PDIA6, PPIH, PFDN6, CCT7, AHSA1, FKBP4, FKBP15, HSPBP1, HSPA9, HSPE1, FKBP11, FKBP7, PPIB, GRPEL1, MKKS, DNAJA3, BAG3
Metabolismo de carboidratos
CHI3L2, GALM, ALDH2, ALDH1B1, AKR1B1, SHPK, G6PD, GPI, PGP, HK1, HK2, IDH1, KHK, MGAT1, PDK1, PGM1, DPM3, SLC3A2, TPI1, HYAL3, ST3GAL5
rRNA processing
CDKN2A, NPM3, NOP56, UTP14A, FTSJ3, FBL, PDCD11, RRP1B, BOP1, RRP8, FTSJ1, FTSJ2, NOP2, PA2G4, GEMIN4, EXOSC10, GAR1, EXOSC4, DDX56, IMP3, NOP10, NHP2, RRP9, NOLC1, IMP4, EIF4A3
RNA splicing
THOC4, DDX39, PPIH, USP39, RNPS1, PUF60, SNRNP200, JMJD6, SF3B3,

GEMIN5, PRPF19, RBM15B, NOVA1, GEMIN4, PPAN, LSM2, SRSF2, SNRPF, SNRPG, SNRNP25, GEMIN6, RBM10, PHF5A, LSM10, PRPF4, SNRNP40, DDX23, EIF4A3
Apoptose
NEK6, MRPS30, FASTK, RFFL, DAD1, DAXX, DFFB, DHCR24, E2F1, PUF60, ALDOC, PEG10, JMJD6, TCTN3, GATA6, TNFRSF21, SFN, NME3, GLRX2, PDCD2, GULP1, MTFP1, PTRH2, DDIT4, PPARD, STEAP3, NLRP2, BAG1, PREX1, CIDEA, SIAH2, BNIP1, TIAM1, TNFRSF1A, PHLDA2, TWIST1, CLPTM1L, YARS, DNAJA3, TBRG4, ELMO1
DNA replication
TREX1, DUT, FEN1, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, ORC1, CINP, GINS2, PHB, POLE3, C10orf2, RFC2, GINS3, SSRP1, CHAF1B, CDC25A
Transporte
THOC4, ABCA7, UQCR11, CPT1A, CYB5A, CYB561, CYC1, ENSA, SLC29A1, ETFB, FABP5, GJA1, UQCR10, MB, NDUFA8, NDUFA9, NDUFB1, NDUFB2, NDUFB9, NDUFS3, NDUFS6, GLRX2, SLC35F2, ENOX1, SDHB, SLC1A1, SLC1A4, SLC1A5, SLC3A2, UQCRCF1, ABCG2, EIF4A3

Categorias Funcionais dos Genes Induzidos pelo tratamento combinado na célula SKBR3.

Resposta imune
LILRB2, TRIM22, SPON2, SEMA4D, RNF19B, CTSS, MARCH8, FTH1, FYB, NCR3, GBP2, CXCL1, ANXA11, HLA-E, HLA-G, IL8, IL18, CXCL10, ARHGAP24, SMAD6, OLR1, ERAP1, TRPM4, CCL28, PSMB8, PSMB9, PTMS, CCL20, CXCL11, CX3CL1, SECTM1, TINAGL1, TAP1, TAP2, TAPBP, THBS1, TNFAIP1, VTCN1, CBLB, SQSTM1, IL32, IKBKE
Regulação negativa de proliferação celular
CDH5, GPNMB, LBX1, CGREF1, ADM, IL28RA, FTH1, GAS8, B4GALT1, PPP2R3B, CXCL1, TAX1BP3, IL8, JUN, SMAD3, NDN, ING4, RARRES3, BCL6, TNF, TSG101, PTGES, HDAC4
Anti-apoptose
CITED2, SEMA4D, DAPK1, IKBKB, NFKB1, NFKBIA, SERPINB2, BFAR, AVEN, CCL2, THBS1, TNF, TNFAIP3, RIPK2, SQSTM1
Resposta à hipóxia
CITED2, ADM, CYP1A1, EDN1, EPAS1, IL18, SMAD3, NOS2, ADCK3, CCL2, TGFB2, THBS1
Cell cycle arrest
CDKN2B, CGREF1, PPP1R15A, PPP2R3B, IL8, SMAD3, ING4, TGFB2, THBS1, TP53, TSG101
Metabolic process
CCNO, AGPAT2, SDSL, DCI, TYMP, AHCY, EPHX2, ARSG, GAA, NAT9, MOCS3, GNS, GUSB, HEXA, HMGCL, ARSI, IDS, IDUA, ARSA, ARSD, MUTYH, NEU1, FAHD2A, DPH5, ACSL5, UGT2B28, NAT14, SAT1, METTL12, ECHDC3, ACSF2, HDHD1, PLA2G4C, NAT8

**Categorias Funcionais dos Genes reprimidos pelo tratamento
combinado na célula SKBR3.**

Ciclo celular
SMC4, PSME3, STAG1, CDKN2C, CDKN3, NDC80, SMC2, SPAG5, CENPE, NUDC, DBF4, CHEK1, CIT, ZWINT, CHEK2, CDCA5, OIP5, ESCO1, CKS1B, CKS2, SPC24, SGOL2, SGOL1, CDCA2, DTYMK, E2F6, CENPV, ERH, FANCD2, C11orf82, SKA1, SEPT6, PDS5A, NCAPD3, RABGAP1, CDC26, ANAPC13, ASPM, APPL1, FBXO5, CKAP2, RACGAP1, UHRF1, HELLS, BIRC5, SKA2, ITGAE, KIF11, KIFC1, SETD8, LIG1, MAD2L1, MCM6, MKI67, MLH1, NEK2, NUSAP1, ANAPC7, ZC3HC1, PLK1, ANLN, ERCC6L, NCAPG2, TIPIN, CDCA8, CEP55, FANCI, HJURP, MAPK6, SPC25, RAD17, RAD21, RBBP4, RBL1, NCAPG, BRCA1, BUB1, BUB1B, TFDP1, PTP4A1, NUP37, HAUS3, CDC73, SUV39H2, E2F8, C13orf34, FAM83D, SEH1L, CDC7, CDC45, CDCA3, NUF2, PSRC1, CDC23, CDC123, CCNA2, CCNA1, TIMELESS, CCNF, CCNH, PRC1, SMC3, AURKB, NOLC1, PTTG1, KIF23, KIF20B, DLGAP5, CKAP5, CDK1, SEPT7, CDC6, CDC20, NCAPD2, CDC25A, CDC25C.
Response to DNA damage stimulus
RAD51AP1, TOPBP1, CHEK1, CHEK2, FANCD2, SMG1, XRCC6, UHRF1, LIG1, MLH1, DTL, POLH, TIPIN, FANCL, FANCI, PRKDC, FANCM, BARD1, RAD17, RAD21, RAD23B, RAD51, RAD51C, BLM, DCLRE1C, BRCA1, SSRP1, TDG, TOP2A, UBE2A, VCP, BRCC3, ATAD5, RAD54L, TIMELESS, BAZ1B, SMC3, EXO1, PTTG1
RNA splicing
THOC4, DDX39, HNRNPR, SYNCRIP, IVNS1ABP, SF3A3, PUF60, JMJD6, TARDBP, GEMIN5, LSM1, HNRNPA2B1, PPIL1, LSM7, PPIL3, MAGOHB, LSM2, SRSF1, SRSF2, SRSF7, TRA2B, SNRPA1, SNRPB2, SNRPD1, SNRPD3, SNRPF, SNRPG, SNRNP25, TTF2, SIP1, LSM10, PRPF4, PRPF3, ZRANB2, THOC1
DNA replication
CENPF, DBF4, CHEK1, DUT, EGF, FEN1, LIG1, MCM6, NUP98, ORC1, ORC2, DTL, GINS2, MED1, MCM10, RBBP4, RBBP7, RFC2, RFC4, RFC5, RPA3, RRM1, RRM2, BLM, SSRP1, TOP1, TOP2A, TYMS, RMI1, TMX1, CDC7, CDC45, GINS1, CDC25A, CDC25C
Regulação negative de ubiquitina-ligase durante o ciclo celular mitótico
PSME3, PSMD14, CDC26, MAD2L1, ANAPC7, PSMA7, PSMB3, PSMB6, PSMC1, PSMC5, PSMD1, PSMD2, PSMD3, PSMD11, PSMD12, PSMD13, BUB1B, CDC23, CCNB1, BUB3, CDK1, CDC20, CDC27
Processos catabólicos de proteínas dependents de modificação
UBA2, SAE1, MARCH6, MED8, PPIL5, FBXO45, CDC26, ANAPC13, FBXO5, CACYBP, UBE2S, UBE2T, UHRF1, ANAPC7, RNF138, DTL, ZC3HC1, FANCL, UBR7, G2E3, KCMF1, BARD1, RAD23B, PJA1, SKP2, HLTF, BRCA1, UBE2E2, UBE2V2, VCP, BRCC3, RNF128, KLHL15, CDCA3, SPOP, KLHL13, UBE2M, VPRBP, PJA2.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham RT, Wiederrecht GJ. Immunopharmacology of rapamycin *Annu Rev Immunol.* 1996;14:483-510.

Abraham RT. mTOR as a positive regulator of tumor cell responses to hypoxia. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2004; 279:299-319.

Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF. *EMBO J.* 1996;15: 6541-6551.

Alimandi M, Romano A, Curia MC, Muraro R, Fedi P, Aaronson SA, Di Fiore PP, Kraus MH. Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene.* 1995;10(9):1813-21.

Arpino G, Ciocca DR, Weiss H, Allred DC, Daguerre P, Vargas-Roig L, Leuzzi M, Gago F, Elledge R, Mohsin SK. Predictive value of apoptosis, proliferation, HER-2, and topoisomerase IIalpha for anthracycline chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;92(1):69-75.

Asakawa H, Koizumi H, Koike A, Takahashi M, Wu W, Iwase H, Fukuda M, Ohta T. Prediction of breast cancer sensitivity to neoadjuvant chemotherapy based on status of DNA damage repair proteins. *Breast Cancer Res.* 2010;12(2):R17

Bar-On, Ortala; Shapira, Ma'anita; Hershko, Dan D.a b. Differential effects of doxorubicin treatment on cell cycle arrest and Skp2 expression in breast cancer cells. *Anti-Cancer Drugs.* 2007;18(10): 1113-1121.

Benjamin RS, Riggs CE Jr, Bachur NR. Plasma pharmacokinetics of adriamycin and its metabolites in humans with normal hepatic and renal function. *Cancer Res.* 1977; 37(5):1416-20.

Beuvink I, Boulay A, Fumagalli S, Zilbermann F, Ruetz S, O'Reilly T, Natt F, Hall J, Lane HA, Thomas G. The mTOR inhibitor RAD001 sensitizes tumor cells to DNA-damaged induced apoptosis through inhibition of p21 translation. *Cell.* 2005; 120:747-759.

Brenner DE, Galloway S, Cooper J, Noone R, Hande KR. Improved high-performance liquid chromatography assay of doxorubicin: detection of circulating aglycones in human plasma and comparison with thin-layer chromatography. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1985;14(2):139-45.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998;282:1318–1321.

Chamberlain MD, Oberg JC, Furber LA, Poland SF, Hawrysh AD, Knafelc SM, McBride HM, Anderson DH. Deregulation of Rab5 and Rab4 proteins in p85R274A-expressing cells alters PDGFR trafficking. *Cell Signal*. 2010;22(10):1562-1575.

Chan S, et al. Phase II study of temsirolimus (CCI-779), a novel inhibitor of mTOR, in heavily pretreated patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol*. 2005; 23: 5314-22.

Cheng KW, Lahad JP, Gray JW, Mills GB. Emerging role of RAB GTPases in cancer and human disease. *Cancer Res*. 2005;65(7):2516-2519.

Choi J, Chen J, Schreiber SL, Clardy J. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science*. 1996; 273: 239-242.

Clark AS, West K, Streicher S, Dennis PA. Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2002;1:707–717.

Creasey WA, McIntosh LS, Brescia T, Odujinrin O, Aspnes GT, Murray E, Marsh JC. Clinical effects and pharmacokinetics of different dosage schedules of adriamycin. *Cancer Res*. 1976;36(1):216-21.

Cross DAE, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995; 785-789.

Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature*. 2007;450(7170):736-40.

Del Bufalo D, Ciuffreda L, Trisciuglio D, Desideri M, Cognetti F, Zupi G, Milella M. Antiangiogenic potential of the mammalian target of rapamycin inhibitor temsirolimus. *Cancer Res*. 2006;66 (11):5549- 5554.

Del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*. 1997;278:687–689.

DiGiovanna MP, Stern DF, Edgerton S, Broadwater G, Dressler LG, Budman DR, Henderson IC, Norton L, Liu ET, Muss HB, Berry DA, Hayes DF, Thor AD. Influence of activation state of ErbB-2 (HER-2) on response to adjuvant cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil for stage II, node-positive

breast cancer: study 8541 from the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol.* 2008;26(14):2364-72.

Dong LQ, Liu F. PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;289:E187-196.

Eng CP, Sehgal SN, Vézina C. Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J Antibiot.* 1984;37(10):1231-7.

Fujiwara Y, Hosokawa Y, Watanabe K, Tanimura S, Ozaki K, Kohno M. Blockade of the phosphatidylinositol-3-kinase-Akt signaling pathway enhances the induction of apoptosis by microtubule-destabilizing agents in tumor cells in which the pathway is constitutively activated. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(3):1133-42.

Fujiwara Y, Kawada K, Takano D, Tanimura S, Ozaki K, Kohno M. Inhibition of the PI3 kinase/Akt pathway enhances doxorubicin-induced apoptotic cell death in tumor cells in a p53-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;340(2):560-566.

Garamy A, Zwartkruis FJ, Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Stocker H, Kozma SC, Hafen E, Bos JL, Thomas G. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 e 2. *Mol. Cell.* 2003;11: 1457-1466.

García-Morales P, Hernando E, Carrasco-García E, Menéndez-Gutierrez MP, Saceda M, Martínez-Lacaci I. Cyclin D3 is down-regulated by rapamycin in HER-2-overexpressing breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(9):2172-2181.

Gera JF, Mellinghoff IK, Shi Y, Rettig MB, Tran C, Hsu JH, Sawyers CL, Lichtenstein AK. AKT activity determines sensitivity to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors by regulating cyclin D1 and c-myc expression. *J Biol Chem.* 2004;279(4):2737-2746.

Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, Aebersoldr, Sonenberg N. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two step mechanism. *Genes & Dev.* 1999a;13:1422-1437.

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 1999b;68: 913-963.

Greene RF, Collins JM, Jenkins JF, Speyer JL, Myers CE Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol: implications for the design of in vitro experiments and treatment protocols. *Cancer Res.* 1983;43(7):3417-3421.

Grunwald V, DeGraffenried L, Russel D, Friedrichs WE, Ray RB, Hidalgo M. Inhibitors of mTOR reverse doxorubicin resistance conferred by PTEN status in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2002; 62: 6141-45.

Hanahan D; Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 2000; 100:57-70.
Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF. Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Biochem. Sci.* 2005; 30:35-42.

Harris L., Tang C., Yang C., Harris A., Lupu R. Induction of chemotherapy sensitivity in MCF-7 breast cancer cells by heregulin. *Clin. Cancer Res.* 1998;4:1005-1012.

Harris RA, Eichholtz TJ, Hiles ID, Page MJ, O'Hare MJ. New model of ErbB-2 over-expression in human mammary luminal epithelial cells. *Int J Cancer.* 1999;29;80(3):477-484.

Hellen CU, Sarnow P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.* 2001;15(13):1593-612.

Hresko RC, Mueckler M. mTOR/RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/PKB in 3t3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 2005;280: 40406- 40416.

INCA- Ministério da Saúde, Brasil; 2010. Disponível em <http://www.inca.gov.br>).

Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* 2003 Apr;4(2):249-64

Järvinen TA, Liu ET. Simultaneous amplification of HER-2 (ERBB2) and topoisomerase II α (TOP2A) genes--molecular basis for combination chemotherapy in cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2006;6(7):579-602.

Järvinen TA, Tanner M, Rantanen V, Bärlund M, Borg A, Grénman S, Isola J. Amplification and deletion of topoisomerase II α associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. *Am J Pathol.* 2000; 156(3):839-847.

Jefferies HB et al. Rapamycin suppress 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70S6K. *EMBO J.* 1997; 16:3693-704.

Karukstis KK, Thompson EH, Whiles JA, Rosenfeld RJ. Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin. *Biophys Chem.* 1998;73(3):249-263.

Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King Je, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. mTOR interacts with Raptor to form a nutrient-

sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 2002;110:163-175.

Knueffermann C, Lu Y, Liu B, Jin W, Liang K, Wu L, Schmidt M, Mills GB, Mendelsohn J, Fan Z. HER-2/PI3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene*. 2003;22:3205-3212.

Kokenberg E, Sonneveld P, Sizoo W, Hagenbeek A, Löwenberg B. Cellular pharmacokinetics of daunorubicin: relationships with the response to treatment in patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 1988;6(5):802-812.

Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh SC, King CR. Overexpression of the EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. *EMBO J* 1987;6:605–610.

Kunz J, Henriquez R, Schneider U, Deuter-Reinhard M, Movva NR, Hall MN. Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell*. 1993;73:585-596.

Launay MC, Milano G, Iliadis A, Frenay M, Namer N. A limited sampling procedure for estimating adriamycin pharmacokinetics in cancer patients. *Br J Cancer*. 1989;60(1):89-92.

Lewis GD, Lofgren JA, McMurtrey AE, Nuijens A, Fendly BM, Bauer KD, Sliwkowski MX. Growth regulation of human breast and ovarian tumor cells by heregulin: Evidence for the requirement of ErbB2 as a critical component in mediating heregulin responsiveness. *Cancer Res*. 1996;56(6):1457-1465.

Li X, Lu Y, Liang K, Liu B, Fan Z. Differential responses to doxorubicin-induced phosphorylation and activation of Akt in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2005;7: 589-597.

Li YH, Wang C, Meng K, Chen LB, Zhou XJ. Influence of survivin and caspase-3 on cell apoptosis and prognosis in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2004;10(13):1984-8.

Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med*. 2002;8(10):1153-1160.

Liang K, Lu Y, Li X, Zeng X, Glazer RI, Mills GB, Fan Z. Differential roles of phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and akt1 expression and phosphorylation in breast cancer cell resistance to Paclitaxel, Doxorubicin, and gemcitabine. *Mol Pharmacol*. 2006;70(3):1045-1452.

Liu M, Howes A, Lesperance J, Stallcup WB, Hauser CA, Kadoya K, Oshima RG, Abraham RT. Antitumor activity of rapamycin in a transgenic mouse model of ErbB2-dependent human breast cancer. *Cancer Res.* 2005;65: 5325-5336.

Liu X, Gu X, Li Z, Li X, Li H, Chang J, Chen P, Jin J, Xi B, Chen D, Lai D, Graham RM, Zhou M. Neuregulin-1/erbB-activation improves cardiac function and survival in models of ischemic, dilated, and viral cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(7):1438-1447.

Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol.* 2005;15:702-713.

Mackay A, Jones C, Dexter T, Silva RL, Bulmer K, Jones A, Simpson P, Harris RA, Jat PS, Neville AM, Reis LF, Lakhani SR, O'Hare MJ. cDNA microarray analysis of genes associated with ERBB2 (HER2/neu) overexpression in human mammary luminal epithelial cells. *Oncogene.* 2003;22(17):2680-2688.

Majumder PK, Febbo PG, Bikoff R, Berger R, Xue Q, McMahon LM, Manola J, Brugarolas J, McDonnell TJ, Golub TR, Loda M, Lane HA, Sellers WR. mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nat Med.* 2004;10(6):594-601.

Martelli AM, Tazzari PL, Evangelisti C, Chiarini F, Blalock WL, Billi AM. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin module for acute myelogenous leukemia therapy: from bench to bedside. *Curr Med Chem.* 2007;14:2009-2023.

Marty M, Cognetti F, Maraninchi D et al. Efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: results of a randomized phase II trial by the M77001 study group. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 4265–4274.

Mayo L.D., Donner D.B. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci.* 2001; 98(20):11598-11603.

Menard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa S, Agresti R, Tagliabue E: HER2 overexpression in various tumor types, focussing on its relationship to the development of invasive breast cancer. *Ann Oncol.* 2001;12:S15-S19.

Menon R, Omenn GS. Proteomic characterization of novel alternative splice variant proteins in human epidermal growth factor receptor 2/neu-induced breast cancers. *Cancer Res.* 2010;70(9):3440-3449.

Mita MM, Mita A, Rowinsky EK. The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. *Cancer Biol. & Therapy*. 2003;2:169-177.

Mondesire WH, Jian W, Zhang H, Ensor J, Hung MC, Mills GB, Meric-Bernstam F. Targeting mammalian target of rapamycin synergistically enhances chemotherapy –induced cytotoxicity in breast cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2004;10:7031-7034.

Montagut C, Rovira A, Albanell J. The proteasome: a novel target for anticancer therapy. *Clin Transl Oncol*. 2006;8(5):313-317.

Mosley JD, Polrier JT, Seachrist DD, Landis MD, Keri RA. Rapamycin inhibits multiple stages of c-Neu/ErbB2-induced tumor progression in a transgenic mouse model of HER2 positive breast cancer. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(8):2188-2197.

Mross K, Maessen P, van der Vijgh WJ, Gall H, Boven E, Pinedo HM. Pharmacokinetics and metabolism of epirubicin and doxorubicin in humans. *J Clin Oncol*. 1988;6(3):517-26.

Nicholson KM, Anderson NG: The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 2002;14:381–395.

Nicholson KM, Streuli CH, Anderson NG. Autocrine signaling through ErbB receptors promotes constitutive activation of protein kinase B/Akt in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2003;81:117-128.

Noh WC, Kim YH, Kim MS, Ko JS, Kim H-A, Moon NM, Paik N-S. Activation of the mTOR signaling pathway in breast cancer and its correlation with the clinicopathologic variables. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;110(3):477-483.

Noh WC, Mondesire WH, Peng J, et al. Determinants of rapamycin sensitivity in breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004;10:1013–1023.

O'Malley F. P., S. Chia, D. Tu, L. E. Shepherd, M. N. Levine, V. H. Bramwell, I. L. Andrulis, and K. I. Pritchard Topoisomerase II Alpha and Responsiveness of Breast Cancer to Adjuvant Chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(9):644–650.

Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner, DB. NF- κ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*. 1999; 401:82–85.

Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, et al: HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15. *J Natl. Cancer Ins*. 2000;92:1992-1998.

Paik S. M., Bryant J., Park C. H., Fisher B., TanChiu E., Hyams D., Fisher E. R., Lippman M. E., Wickerham D. L., Wolmark N. erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998;90:1361-1370.

Pavlik EJ, Kenady DE, van Nagell JR Jr, Hanson MB, Donaldson ES, Casper S, Garrett D, Smith D, Keaton K, Flanigan RC. Stability of doxorubicin in relation to chemosensitivity determinations: loss of lethality and retention of antiproliferative activity. *Cancer Invest.* 1984;2(6):449-58.

Pellinen T, Arjonen A, Vuoriluoto K, Kallio K, Fransén JA, Ivaska J. Small GTPase Rab21 regulates cell adhesion and controls endosomal traffic of beta1-integrins. *J Cell Biol.* 2006;173(5):767-780.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406:747-752.

Potter AJ, Rabinovitch PS. The cell cycle phases of DNA damage and repair initiated by topoisomerase II-targeting chemotherapeutic drugs. *Mutat Res.* 2005;572(1-2):27-44.

Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat. Cell. Biol.* 2002;4:658-65.

Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP, Andrulis IL, Tu D, Bramwell VH, Levine MN. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med.* 2006;354(20):2103-2111.

Proud CG. The multifaceted role of mTOR in cellular stress responses. *DNA Repair.* 2004: 827-934.

Raymond E, Alexandre J, Faivre S, Vera K, Maternan E, Boni J, Leister C, Korth-Bradley J, Hanauske A, Armand JP. Safety and pharmacokinetics of escalated doses of weekly intravenous infusion of CCI-779, a novel mTOR inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22(12):2336-2347.

Reynolds THt, Bodine SC, Lawrence JC, Jr. Control of Ser2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. *J Biol Chem* 2002;277:17657-62

Rody A, Karn T, Gätje R, Ahr A, Solbach C, Kourtis K, Munnes M, Loibl S, Kissler S, Ruckhäberle E, Holtrich U, von Minckwitz G, Kaufmann M. Gene expression profiling of breast cancer patients treated with docetaxel, doxorubicin, and cyclophosphamide within the GEPARTRIO trial: HER-2, but not topoisomerase II alpha and microtubule-associated protein tau, is highly predictive of tumor response. *Breast.* 2007; 6(1):86-93.

Rojo F, Najera L, Lirola J, Jiménez J, Guzmán M, Sabadell MD, Baselga J, Y Cajal SR. 4E-Binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis. *Clin. Cancer Res.* 2007;13:81-89.

Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nature Reviews.* 2006;6:729-734.

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

Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17:596-603.

Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell.* 2006;22(2):159-168.

Sarbassov, DD. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Bio.* 2004;14:1296-1302.

Sekulic A, Hudson CC, Homme JL, Yin P, Otterness DM, Karnitz LM, Abraham RT. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res.* 2000;60:3504-3513.

Sethi G, Ahn KS, Xia D, Kurie JM, Aggarwal BB. Targeted deletion of MKK4 gene potentiates TNF-induced apoptosis through the down-regulation of NF-kappa B activation and NF-kappa B-regulated antiapoptotic gene products. *J Immunol.* 2007;179(3):1926-1933.

Shapira M, Kakiashvili E, Rosenberg T, Herskho DD. The mTOR inhibitor rapamycin down-regulates the expression of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2006;8(4):R46

Shi Y, Sharma A, Wu H, Lichtenstein A, Gera J. Cyclin D1 and c-myc Internal Ribosome Entry Site (IRES)-dependent translation is regulated by AKT activity and enhanced by rapamycin through a p38 MAPK- and ERK-dependent Pathway. *J Biol Chem.* 2005; 280(12):10964-10973.

Sircoulomb F, Bekhouche I, Finetti P, Adélaïde J, Ben Hamida A, Bonansea J, Raynaud S, Innocenti C, Charafe-Jauffret E, Tarpin C, Ben Ayed F, Viens P, Jacquemier J, Bertucci F, Birnbaum D, Chaffanet M. Genome profiling of ERBB2-amplified breast cancers. *BMC Cancer.* 2010;10:539.

Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Pawlicki M, et al. Phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel (AC-T) with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (AC-TH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in HER2 positive early breast cancer patients: BCIRG 006 study. *Breast Cancer Res Treat.* 2005; 94: Suppl.1 (abstract 1).

Stamps, A.C., Davies, S.C., Burman, J. and O'Hare, M.J., Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalized by retroviral infection with a temperature-sensitive SV40 T-antigen construct. *Int. J. Cancer*, 1994;57:1–10.

Steelman LS, Bertrand FE, McCubrey JA. The complexity of PTEN: mutation, marker and potential target for therapeutic intervention. *Expert Opin Ther Targets.* 2004; 8: 537-550.

Steelman LS, Navolanic PM, Sokolosky ML, Taylor JR, Lehmann BD, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Stadelman KM, Terrian DM, Leslie NR, Martelli AM, Stivala F, Libra M, Franklin RA, McCubrey JA. Suppression of PTEN function increases breast cancer chemotherapeutic drug resistance while conferring sensitivity to mTOR inhibitors . *Oncogene.*2008;27(29):4086-4095.

Storchova Z, Pellman D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5:45–54.

Sun SY, Rosenberg LM, Wang X, Zhou Z, Yue P, Fu H, Khuri FR. Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res.* 2005;65:7052-7058.

Timms JF, White SL, O'Hare MJ, Waterfield MD. Effects of ErbB-2 overexpression on mitogenic signalling and cell cycle progression in human breast luminal epithelial cells. *Oncogene.* 2002;21(43):6573-6586.

Turner JG, Sullivan DM. CRM1-mediated nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. *Curr Med Chem.* 2008;15(26):2648-55.

Wang YA, Johnson SK, Brown BL, McCarragher LM, Al-Sakkaf K, Royds JA, Dobson PR. Enhanced anti-cancer effect of a phosphatidylinositol-3 kinase inhibitor and doxorubicin on human breast epithelial cell lines with different p53 and oestrogen receptor status. *Int J Cancer.* 2008;123(7):1536-1544.

Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS, Malina A, Ray S, Kogan S, Cordon-Cardo C, Pelletier J, Lowe SW. *Nature.* 2004; 428:332-337.

Wendel HG, Malina A, Zhao Z, Zender L, Kogan SC, Cordon-Cardo C, Pelletier J, Lowe SW. Determinants of sensitivity and resistance to

rapamycin-chemotherapy drug combinations in vivo. *Cancer Res.* 2006;66(15):7639-7646.

Worthington J, Bertani M, Chan HL, Gerrits B, Timms JF. Transcriptional profiling of ErbB signalling in mammary luminal epithelial cells--interplay of ErbB and IGF1 signalling through IGFBP3 regulation. *BMC Cancer.* 2010;10:490.

Xiao Z, Xue J, Sowin TJ, Zhang H. Differential roles of checkpoint kinase 1, checkpoint kinase 2, and mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in mediating DNA damage-induced cell cycle arrest: implications for cancer therapy. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(8):1935-1943.

Zhou X, Tan M, Hawthorne Vs, Klos KS, Lan K-H, Yang Y, Yang W, Smith TL, Shi d, Yu D. Activation of the Akt/Mammalian Target of Rapamycin/4E-BP1 Pathway by ErbB2 Overexpression Predicts Tumor Progression in Breast Cancers. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:6779–6788.