**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA**

MICHELLY CRISTINY PEREIRA

**Estudo funcional do gene PAWR/Par-4 (*Prostate
apoptosis response-4*) em células de mama
normais e tumorais**

**São Paulo
2012**

MICHELLY CRISTINY PEREIRA

Estudo funcional do gene PAWR/Par-4 (*Prostate apoptosis response-4*) em células de mama normais e tumorais

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

Programa: Oncologia

Orientador: Dra Maria Aparecida Nagai

**São Paulo
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pereira, Michelly Cristiny

Estudo funcional do gene PAWR/Par-4 (*Prostate apoptosis response-4*) em células de mama normais e tumorais / Michelly Cristiny Pereira. -- São Paulo, 2012.

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

Orientadora: Maria Aparecida Nagai.

Descritores: 1.Neoplasias de mama 2.Expressão gênica 3.Inativação gênica
4.Proliferação de células 5.Apoptose

USP/FM/DBD-132/12

Dedico este trabalho

A **Deus** e ao **Mestre Jesus** pela oportunidade de crescimento e por estar presente nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais **Jorge e Marília** que sempre me apoiaram e são um exemplo de LUTA, DEDICAÇÃO e AMOR!Tenho muito orgulho de vocês!

Ao meu amor **DIOGO** pelo amor e compreensão. Obrigada pelo apoio em todos os momentos e por tornar minha vida mais feliz! TE AMO!

Aos meus irmãos **Diego e Jean, Fabiana e Júlia**, pelo companheirismo e incentivo!Amo muito!

A vovó **Elza e Jane** pelas orações e em memória da minha avó **Adélia** e vovó **Gaspar**.

A todos **familiares e amigos** que acreditaram e me incentivaram.

Obrigada por tudo, por fazerem parte da minha vida e por acreditar nos meus sonhos!

AGRADECIMENTOS

A **Dra Maria Aparecida Nagai**, pela oportunidade, orientação e pelos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento científico.

À amiga **Dra Ana Lúcia Garippo** pela grande ajuda técnica na aquisição das belas imagens do Confocal e pelos conselhos.

Aos colegas do laboratório pelo companheirismo e amizade: **Simone, Flávia, Érika, Úrsula e Gui, Irina, Regina, Lourival, Liliane**.

Aos amigos **Sibele e Marcos** pela amizade e por tornarem meus dias mais alegres além de me apresentarem a filosofia espírita que me fez enxergar de outra forma as dificuldades do dia-a-dia.

À amiga **Carol** que nestes últimos meses me ajudou em todos os sentidos, me dando força e carinho.

Aos amigos que não estão mais no laboratório e de que sinto muitas saudades: **D. Antônia e Débora Casolari**.

À minha amiga e irmã **Vanessa**, por sempre estar presente e compartilhar meus momentos difíceis e alegres, juntamente com o **Fábio**, obrigada por tudo meus queridos.

Aos meus amigos que se tornaram minha família em muitos momentos desta minha vivência em São Paulo: **Taíse** (irmãzinha) e **Will, Polliana e Rodrigo, Rô e Léo**.

Às amigas **Aline, Maria Fernanda e Lucinéia** que conviveram comigo, obrigada pela amizade, convivência e estímulos constantes!

Às novas companheiras e irmãszinhas **Dani, Nati e Mi** por ceder um espaço no ap para eu ficar estes últimos meses. Obrigada por aguentar a mineira! Adoro muito vocês!

Aos amigos de Minas, que mesmo estando longe me apoiaram e incentivaram: **Lorene, Pércia, Marina, Su, Pri, Fla, Gabi, Grazi, Renan, Luara**.

A minha **família de Minas**, que compreendeu minha ausência nestes anos e que me incentivou em todos os momentos!

A minha **família de Pernambuco**, em especial à **Lise** e vovó **Jane** pelo apoio e orações.

Ao **Departamento de Oncologia** da Faculdade de Medicina de São Paulo por ceder as instalações para o desenvolvimento deste trabalho e as secretárias **Sônia e Maria José**.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) e a **FAPESP** pelo apoio financeiro concedido no período de execução do projeto.

A todos que contribuíram para realização deste projeto que me dediquei por estes quatro anos com a intenção de poder ajudar um pouquinho na pesquisa do câncer.

Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar
a vida com paixão, perder
com classe e vencer com ousadia,
pois o triunfo pertence a quem se atreve...

A VIDA é MUITA para ser
insignificante.

Charles Chaplin

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

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

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

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

RESUMO

Pereira, MC. *Estudo funcional do gene PAWR/Par-4 (Prostate apoptosis response-4) em células de mama normais e tumorais* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

O câncer de mama é o tumor mais incidente entre as mulheres no mundo. Assim como em outros tumores, a tumorigênese nas mamas é um processo complexo resultante da combinação de fatores genéticos e ambientais que dirigem a transformação das células normais em células malignas. O gene *PAWR*, conhecido como *PAR-4 (Prostatic apoptosis response-4)* foi primeiramente identificado em células de câncer de próstata de rato induzidas a apoptose e codifica uma proteína de 342 aminoácidos que é efetiva na indução de apoptose nas células tumorais e causa regressão dos tumores ativando Fas/FasL e inibindo a atividade de NF- κ B. O aumento de Par-4 é suficiente para causar apoptose seletiva em células tumorais, mas não em células normais ou imortalizadas. Recentemente, um estudo de nosso grupo demonstrou que a expressão reduzida de Par-4 está associada a um pior prognóstico em câncer de mama e que esta proteína pode ter um papel importante na morfogênese da glândula mamária. O estudo funcional do gene Par-4 em diferentes linhagens de mama é importante para o melhor entendimento do papel deste gene no processo tumorigênico da glândula mamária. Portanto, a proposta do presente estudo foi investigar os efeitos do aumento de expressão ou supressão de Par-4 na proliferação celular e sobrevivência das células normais e tumorais de mama. As células MCF10A e MCF-7 foram transfectadas com os vetores de expressão para Par-4 (pCMV6-PAR-4) ou com oligos siRNA para supressão transiente de Par-4. A caracterização dos clones foi feita por Real Time PCR e Western Blot. Os ensaios de proliferação foram feitos por MTT e os ensaios de apoptose por dupla marcação com Laranja de Acridina/ Hoechst 33342 e por citometria de fluxo. O aumento da expressão de Par-4 diminuiu a proliferação de ambas às células comparadas às células-controle ($p<0,01$). Por outro lado, a diminuição de expressão de Par-4 por siRNA levou ao aumento da proliferação das células tumorais MCF-7 ($p<0,01$). A quantificação das células em apoptose mostrou um aumento significativo de apoptose nas células MCF-7 com aumento de Par-4 em relação às células controle MCF-7 pcNEO tratadas com ambas as concentrações de docetaxel (5 nM – 13,24% versus 3,89%; $p=0.001$; 100 nM – 24,81% versus 6,07%; $p=0,0001$) por 24 horas. Embora preliminares, os resultados de citometria também mostraram que as células MCF-7 com aumento de Par-4 apresentam maior porcentagem de células em apoptose na ausência de tratamento e após tratamento com 100 nM de docetaxel por 24 horas. Embora novos estudos sejam necessários, nossos dados sugerem que o aumento de expressão de Par-4 sensibilizou as células MCF-7 ao quimioterápico docetaxel. Pela primeira vez, mostramos o efeito inibitório de Par-4 no crescimento e sobrevivência das células epiteliais mamárias.

Descritores: neoplasias de mama, expressão gênica, inativação gênica, proliferação celular, apoptose.

ABSTRACT

Pereira, MC. *Functional study of gene PAWR/Par-4 (Prostate apoptosis response-4) in normal and cancer breast cells* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Breast cancer is the most common tumor among women in the world. As for other malignancies the tumorigenic process of the breast involves genetic alterations that drive the progressive transformation of normal cells into malignant cells with and aggressive phenotype. Alterations in cells that upregulate proliferation or downregulate apoptosis are one of essential mechanisms that dictate tumor growth. The *PAWR* gene, also known as *PAR-4* (Prostatic apoptosis response-4), was first identified in prostate cancer cells undergoing apoptosis and encodes a 332 aminoacid protein that is effective in inducing cancer cell apoptosis and cause regression of tumors by activating Fas/FasL and inhibiting NF- κ B activity. Interestingly, Par-4 overexpression is sufficient to cause apoptosis in cancer cells, but not in normal or immortalized cells. Recently, we demonstrated that reduced expression of PAR-4 is associated with breast cancer poor prognosis and this protein may have a role in the process of the mammary gland morphogenesis. The functional study of Par-4 gene in different cell lines of breast is important to better understand its role in the tumorigenic process of the breast. Therefore, the purpose of the present study was to investigate the effects of overexpression and suppression of PAR-4 in cell proliferation and survival in mammary epithelial cells. MCF10A and MCF-7 cells were transfected with expression vectors for PAR-4 overexpression (pCMV6-PAR-4) or with small interfering RNAs duplexed oligonucleotides. Clone characterization was performed using real time PCR and western blot. Proliferation assays were carried out using MTT and apoptotic assays were performed by doublefluorescence staining technique (Acridine Orange/Hoechst 33342) or using flow cytometry. PAR-4 overexpression decreased the proliferation rates in both MCF10A and MCF-7 cells compared to the parental or control cells ($p < 0,01$). On the other hand, PAR-4 knockdown leads to increased proliferation in MCF7 cells ($p < 0,01$). We observed a significant increase in apoptosis of MCF-7 cells with increased expression of Par-4 compared to control cells (MCF-7 pcNEO) in both concentrations of docetaxel (5 nM – 13,24% versus 3,89%, $p = 0,001$; 100 nM – 24,81% versus 6,07%, $p < 0,0001$). Cytometry analysis, although preliminary, showed that MCF-7 pcPar-4 have a higher percentage of apoptotic cells in the absence of treatment and after treatment of 100 nM of docetaxel. Although more studies are needed, our data suggest that increased expression of Par-4 sensitizes breast cancer cells to treatment with docetaxel. This is the first report showing that PAR-4 has inhibitory effects on mammary epithelial cells proliferation and survival.

Descriptors: breast neoplasms, gene expression, gene silencing, cell proliferation, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - a. Anatomia da glândula mamária.....	24
Figura 2 - Esquema representativo das vias extrínseca e intrínseca do processo apoptótico.....	29
Figura 3 - Representação esquemática dos domínios funcionais de Par-4.	31
Figura 4 - Mecanismos de indução da apoptose por Par-4	33
Figura 5 - Expressão de Par-4 e da caspase 3 ativada nas células MCF10A cultivadas em cultura 3D.....	40
Figura 6 - Esquema do vetor genérico utilizado para expressar a sequência codificadora do gene Par-4 (pCMV6-XL6) e do vetor controle pCMV6-NEO	48
Figura 7 - Esquema do vetor de supressão pRS shRNA (short hairpin RNA – 29 nucleotídeos).....	48
Figura 8 - Reação de amplificação do transcrito Par-4 do vetor de expressão pCMV6-XL6-Par-4.....	66
Figura 9 - Expressão protéica basal de Par-4 nas diferentes linhagens de mama.	68
Figura 10 - Localização intracelular de Par-4 nas diferentes linhagens de mama.	69
Figura 11 - Efeito da ausência de hormônios esteroídicos e fatores de crescimento na expressão protéica de Par-4 nas células MCF7.....	70
Figura 12 - Expressão de Par-4 nas células MCF-7 cultivadas em soro normal (SN), soro tratado (ST) e na ausência de soro.	70
Figura 13 - Efeito da ausência de hormônios esteroídicos e fatores de crescimento no ciclo e morte celular das células MCF-7	72
Figura 14 - Efeito da ausência de hormônios esteroídicos e fatores de crescimento na expressão dos genes BAX, BID, BCL-2 e BECLIN.....	73
Figura 15 - Imagem representativa das células MCF10A e dos clones MCF10A transfectados	74
Figura 16 - Amplificação dos genes GADPH e β -2-microglobulina para análise da qualidade e integridade dos cDNAs sintetizados	75
Figura 17 - Análise da expressão dos transcritos Par-4 nos clones MCF10A-pcPar-4 e MCF10A-pcNEO	75
Figura 18 - Expressão protéica de Par-4 nos clones MCF10A-pcPar-4 e MCF10A-pcNEO.....	76
Figura 19 - Efeito do aumento de expressão de Par-4 na proliferação das células MCF10A.....	77
Figura 20 - Efeito do aumento de expressão de Par-4 na proliferação das células MCF10A.....	78
Figura 21 - Efeito do aumento da expressão de Par-4 na expressão dos genes BAX, BID, BCL-2 e BECLIN.	79
Figura 22 - Expressão protéica de Par-4 nas células MCF10A após supressão por siRNA nos diferentes tempos.	81
Figura 23 - Efeito da supressão de Par-4 na proliferação das células normais MCF10A.....	82
Figura 24 - Efeito da percentagem do soro ou do inibidor PD na proliferação das células MCF10A com expressão diminuída de Par-4.	83
Figura 25 - Imagem representativa das células MCF-7 e dos clones MCF-7	85
Figura 26 - Análise da expressão dos transcritos Par-4 nos clones MCF-7 pcPar-4 e MCF-7 pcNEO.	85
Figura 27 - Análise da expressão protéica de Par-4 das células MCF-7 pcPar-4 e MCF-7 pcNEO.	86
Figura 28 - Localização de Par-4 nos clones de expressão MCF-7 pcPar-4 e MCF-7-pcNEO	87
Figura 29 - Efeito do aumento de expressão de Par-4 na proliferação das células MCF-7.	88
Figura 30 - Análise da expressão protéica de p-ERK das células MCF-7 com aumento de Par-4.....	89

Figura 31 - Efeito do aumento da expressão de Par-4 no ciclo e morte celular das células MCF-7 cultivadas em 5% de SN e ST	90
Figura 32 - Efeito do aumento da expressão de Par-4 no perfil de expressão dos genes <i>BAX</i> , <i>BID</i> , <i>BCL-2</i> e <i>BECLIN</i>	91
Figura 33 - Análise dos transcritos Par-4 nos clones MCF-7 siPar-4 e MCF-7 siC.	92
Figura 34 - Expressão protéica de Par-4 nos clones de supressão MCF-7 siPar-4	93
Figura 35 - Curvas de proliferação dos clones MCF-7 de supressão para Par-4	94
Figura 36 - Análise da expressão dos transcritos e das proteínas Par-4 e p-ERK nas células MCF7 com supressão transiente de Par-4.....	95
Figura 37 - Efeito da supressão de Par-4 na proliferação das células MCF-7.	96
Figura 38 - Efeito da diminuição de Par-4 no perfil de expressão dos genes <i>BAX</i> , <i>BID</i> , <i>BCL-2</i> e <i>BECLIN</i>	97
Figura 39 - Efeito do aumento da expressão de Par-4 na ativação da caspase-7 após tratamento das células MCF-7 com docetaxel.	98
Figura 40 - Efeito do carenciamento de soro nas células MCF7-pcPar-4 e MCF7-pcNEO.	99
Figura 41 - Aumento da expressão de Par-4 sensibiliza as células ao tratamento com docetaxel	100
Figura 42 - Efeito da expressão de Par-4 na apoptose das células MCF-7 após tratamento com docetaxel.	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nas hibridizações do Western blot	58
Tabela 2 - Anticorpos utilizados para análise de imunofluorescência	59
Tabela 3 - Análise comparativa das sequências dos vetores de expressão pCMV6-NEO e pCMV6-XL6-Par-4.	66

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Homólogo ao oncogene viral v-akt de thimona murino
APS	persulfato de amônia (<i>amonium persulfate</i>)
AP-1	Proteína de ativação 1 (<i>Activation Protein 1</i>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Ataxia telangiectasia
BAD	Agonista de morte celular associado a BCL-2 (<i>BCL-2 antagonist of cell death</i>)
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BCL2	Célula B CLL/linfoma 2 (<i>The B-cell lymphoma protein-2 family</i>)
BID	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
BRCA1	Câncer de mama 1 (<i>Breast cancer 1</i>)
BRCA2	Câncer de mama 2 (<i>Breast cancer 2</i>)
BRIP1	<i>BRCA1 interacting protein c-terminal helicase 1</i>
BSA	Albumina bovina sérica (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CASP8	Caspase-8
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
c-myc	Oncogene homólogo a mielocitomatose viral v-myc
CHEK2	Checkpoint kinase 2
DCIS	Carcinoma Ductal in situ (<i>Ductal Carcinoma in situ</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
dNTPs	2'desoxirribonucleotídeos 5' trifosfato
ECM	matriz extracelular (<i>Extracellular matrix</i>)
EGF	Fator de crescimento epidermal (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal (<i>Epidermal Growth Factor</i>)

Receptor)

ER	Receptor de Estrógeno (<i>Estrogen Receptor</i>)
ER-	Receptor de Estrógeno (<i>Estrogen Receptor</i>) negativo
ER+	Receptor de Estrógeno (<i>Estrogen Receptor</i>) positivo
ERK1/2	Quinase de sinalização extracelular
Fas	Membro 6 da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral
FADD	Domínio de morte associado associado à via Faz (<i>Fas-associated via death domain</i>)
GADPH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>)
GATA3	GATA binding protein 3
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>)
IGF-1R	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (<i>Insulin-like Growth Factor 1 receptor</i>)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ITGA6	Integrina alfa-6 (<i>integrin, alpha 6</i>)
ITGB4	Integrina beta-4 (<i>integrin beta 4</i>)
M	Molar
MAPK	Proteína quinase ativada pelo mitógeno (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MAPKK	Proteína quinase quinase ativada pelo mitógeno (<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>)
MEK	Quinase ativada pelo mitógeno
mg	miligrama
ml	mililitro
mM	milimolar
NFκB	Fator nuclear do gene enhancer do polipeptídio leve Kappa nas células-B 1 (<i>Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-cells 1</i>).
Par-4	Proteína de resposta a apoptose prostática (<i>Prostate Apoptosis Response Protein 4</i>)

pH	potencial hidrogeniônico
PI3-K	Fosfatidilinositol 3 – quinase (<i>Phosphatidylinositol 3 – Kinase</i>)
PKA	Proteína quinase A (<i>Protein Kinase A</i>)
PKB	Proteína quinase B (<i>Protein Kinase B</i>)
PKCζ	Proteína quinase C zeta (<i>Protein Kinase C zeta</i>)
PR	Receptor Progesterona (<i>Progesterone Receptor</i>)
PTEN	Homólogo à fosfatase e tensina (<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>)
q	braço longo do cromossomo
RAS	homólogo ao oncogene viral de sarcoma de rato
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
r.p.m	rotações por minuto
TGFBR1	<i>Transforming growth factor beta</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)
XBP1	<i>x-box binding protein 1</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	18
1.1 CÂNCER DE MAMA	19
1.2 DESENVOLVIMENTO E MATURAÇÃO DA GLÂNDULA MAMÁRIA	22
1.3 APOPTOSE E O GENE PAR-4	27
1.5 PAPEL DE PAR-4 NAS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	38
1.6 PAPEL DE PAR-4 NA MORFOGÊNESE DA GLÂNDULA MAMÁRIA	39
OBJETIVOS.....	42
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 CULTURA DE CÉLULAS	45
3.1.1 Monocada (2D)	45
3.1.2 3D (Matrigel™).....	46
3.2 PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS VETORES	47
3.2.1 Transformação de bactérias e amplificação dos vetores	47
3.2.3 Digestão Enzimática.....	49
3.2.4 Sequenciamento e Validação dos vetores de expressão	50
3.3 TRANSFEÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO E DO siRNA PARA O GENE PAR-4	51
3.4 TRATAMENTO DAS CÉLULAS MCF7 COM DOCETAXEL E FARNESOL	52
3.5 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	52
3.6 TRATAMENTO DO RNA COM <i>DNase I</i>	54
3.7 SÍNTESE DE CDNA	54
3.8 REAL TIME PCR (QPCR).....	55
3.9 EXTRAÇÃO PROTEICA	56
3.11 DENSITOMETRIA	58
3.12 IMUNOFLUORESCÊNCIA	59
3.13 ENSAIOS DE MORFOGÊNESE E IMUNOFLUORESCÊNCIA 3D	60
3.14 ANÁLISE DA APOPTOSE	60
3.14.1 Por marcação dupla Hoechst/Acridina Orange	60
3.14.2 Por citometria AnexinaV-FITC.....	61
3.15 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	62
3.16 ANÁLISE DO CICLO CELULAR E MORTE CELULAR ATRAVÉS DA MARCAÇÃO COM PI (<i>PROPIDIUM IODIDE</i>).....	62
3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
RESULTADOS	64
4.1 AVALIAÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO PCMV6-XL6-PAR-4 E DOS VETORES DE SILENCIAMENTO PRS SHRNA-PAR-4.....	65
4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA BASAL DE PAR-4 NA DIFERENTES LINHAGENS DE MAMA.....	67
4.3 LOCALIZAÇÃO DE PAR-4 NAS DIFERENTES LINHAGENS DE MAMA	68
4.4 EFEITO DA AUSÊNCIA DE HORMÔNIOS ESTEROÍDICOS E FATORES DE CRESCIMENTO NA EXPRESSÃO PROTÉICA DE PAR-4.....	69
4.5 EFEITO DA AUSÊNCIA DE HORMÔNIOS ESTEROÍDICOS E FATORES DE CRESCIMENTO NO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS MCF-7	71
4.6 EFEITO DA AUSÊNCIA DE HORMÔNIOS ESTEROÍDICOS E FATORES DE CRESCIMENTO NA EXPRESSÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NOS PROCESSOS DE APOPTOSE E AUTOFAGIA.....	72
4.7 EFEITOS DO AUMENTO DA EXPRESSÃO DE PAR-4 NAS CÉLULAS MCF10A	73

4.7.1 Caracterização dos clones de células MCF10A transfectadas com vetor de expressão pCMV6-XL6-Par-4	73
4.7.2 Efeito do aumento de expressão de Par-4 na proliferação das células MCF10A.....	76
4.7.3 Efeito do aumento de expressão de Par-4 no perfil de expressão de genes envolvidos nos processos de Apoptose e Autofagia	79
4.8 EFEITOS DA DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE PAR-4 NAS CÉLULAS MCF10A	80
4.8.1 Padronização da técnica de siRNA transiente para supressão de Par-4 nas células MCF10A	80
4.8.2 Efeito da supressão transiente de Par-4 na proliferação das células MCF10A	81
4.9 EFEITO DO AUMENTO DA EXPRESSÃO DE PAR-4 NAS CÉLULAS TUMORAIS MCF-7.....	84
4.9.1 Caracterização dos clones MCF-7 transfectados com vetores de expressão para Par-4	84
4.9.2 Localização de Par-4 nos clones MCF-7 de expressão de Par-4.....	86
4.9.3 Efeito do aumento da expressão de Par-4 na proliferação das células MCF-7	87
4.9.4 Avaliação do envolvimento da quinase ERK no controle da proliferação por Par-4 nas células MCF-7.....	88
4.9.5 Efeito da expressão de Par-4 no ciclo e morte celular das células MCF-7	89
4.9.6 Efeito do aumento da expressão de Par-4 no perfil de expressão dos genes envolvidos nos processos de Apoptose e Autofagia	91
4.10 EFEITOS DA DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE PAR-4 NAS CÉLULAS TUMORAIS MCF-7	91
4.10.1 Caracterização dos clones de supressão de Par-4 com vetor pRS shPar-4.....	91
4.10.2 Efeito da diminuição de Par-4 na proliferação das células tumorais MCF-7	93
4.10.3 Efeito da diminuição da expressão de Par-4 por siRNA transiente nas células MCF-7.....	94
4.11.1 Efeito da diminuição de expressão de Par-4 por siRNA na proliferação das células MCF-7	95
4.11.2 Efeito da diminuição de expressão de Par-4 no perfil de expressão dos genes envolvidos nos processos de Apoptose e Autofagia	97
4.12 EFEITOS DO AUMENTO DA EXPRESSÃO DE PAR-4 NA SENSIBILIDADE AO QUIMIOTERÁPICO DOCETAXEL NAS CÉLULAS MCF-7	97
4.13 EFEITO DO AUMENTO DE EXPRESSÃO DE PAR-4 NA SENSIBILIDADE AO FARNESOL (FOH) NAS CÉLULAS MCF-7	101
DISCUSSÃO.....	103
CONCLUSÕES.....	113
REFERÊNCIAS.....	115

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

O câncer, nas últimas décadas, tornou-se um problema de saúde pública mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde, até o ano de 2030, estima-se que 15,5 milhões de pessoas serão acometidas pelo câncer, com aproximadamente 11,5 milhões de morte (*World Health Organization*, 2008). O câncer de mama é a neoplasia mais comum entre as mulheres no mundo e entre as mulheres brasileiras é o câncer de maior mortalidade. Em 2012 são esperados para o Brasil, 52.680 casos novos de câncer de mama, com 52 casos a cada 100 mil mulheres, segundo dados do Inca (2011).

Assim como em outros tumores, o processo tumorigênico das mamas é complexo resultante da combinação de fatores genéticos e ambientais que dirigem a transformação das células normais em células malignas. Esta transformação progressiva está associada com o acúmulo de várias alterações genéticas em genes reguladores de processos biológicos importantes como proliferação, diferenciação celular, reparo do DNA, apoptose, metabolismo, adesão e migração celular (Ponder, 2001; Polyak, 2001). Como consequência destas alterações, as células adquirem capacidades importantes para o crescimento maligno, incluindo aquisição de independência aos sinais regulatórios de crescimento e proliferação, capacidade de evasão a apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, habilidade de invasão de tecidos e metástase (Hanahan; Weinberg, 2000). Uma revisão recente de Hanahan e Weinberg (2011) ampliou o número destas capacidades adquiridas durante o desenvolvimento maligno. Além das seis características citadas anteriormente, a reprogramação do metabolismo energético (glicólise aeróbica) e evasão do sistema imune pelas células tumorais são características importantes em muitos tipos tumorais. Todas estas capacidades são geradas não somente pelas diversas mutações decorrentes da instabilidade genética, mas também pelas complexas interações entre as células tumorais e o microambiente tumoral.

História familiar é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama. No entanto, o câncer de mama hereditário representa apenas 5-10 % de todos os casos diagnosticados (Kluttig; Schmidt-Pokrzywniak, 2009). Os supressores tumorais *BRCA1* e *BRCA2*, com funções relacionadas à manutenção da integridade genômica e reparo do DNA, são os genes mais comumente envolvidos nos casos de câncer de mama herdado. Pacientes com mutações em *BRCA1* geralmente desenvolvem câncer de mama de maior agressividade e prognóstico ruim em idade precoce e apresentam tumores caracterizados como triplo-negativos de alto grau e elevadas taxas de proliferação com histologia medular atípica e infiltração linfocitária (Ellsworth et al., 2010). Apesar da grande maioria dos casos de câncer de mama hereditário ser decorrente de mutações em *BRCA1* e *BRCA2*, muitas famílias com grande incidência de câncer mamário não apresentam mutações detectáveis nestes dois supressores, sugerindo o envolvimento de outros genes nos casos herdados. Mutações nos genes *p53* e *PTEN* podem ser encontradas em pacientes com câncer de mama e outros genes de menor susceptibilidade também foram identificados nos últimos anos, como o *ATM*, *CHEK2*, *CASP8*, *BRIP1* e *TGFBR1* (Ellsworth et al., 2010; Rosman et al., 2007).

A maioria dos tumores de mama diagnosticados é do tipo esporádico, resultante de mutações, alterações epigenéticas ou mesmo polimorfismo de genes envolvidos no metabolismo e detoxificação de carcinógenos, de genes que codificam componentes das vias de sinalização hormonal e fatores de crescimento, proto-oncogenes e genes do reparo de DNA (Dunning et al., 1999; Polyak, 2001). Outros fatores importantes para a etiologia do câncer de mama não hereditário são os fatores de riscos endógenos, relacionados à exposição hormonal (menarca precoce, menopausa tardia, gravidez) e os fatores exógenos, influenciados pelo estilo de vida do indivíduo, como dieta, ingestão de álcool e atividade física (Dumitrescu; Cotarla, 2005; Kluttig; Schmidt-Pokrzywniak, 2009).

O câncer de mama apresenta uma etiologia complexa apresentando tipos tumorais heterogêneos com grande variabilidade molecular, patológica e clínica. A transformação das células epiteliais da mama em células malignas é resultado de um conjunto de alterações genéticas e epigenéticas, além de aberrantes interações dentro do microambiente. Estudos moleculares e epidemiológicos propõem um modelo

hipotético de progressão sequencial para a tumorigênese mamária em que epitélio normal progride para lesões proliferativas atípicas. Estas lesões benignas, por sua vez, poderiam progredir para um carcinoma *in situ*, até se tornarem tumores invasivos e metastáticos (Allred et al., 2001; Vargo-Gorgola; Rosen, 2007). No entanto, este modelo histológico linear para a progressão do câncer de mama simplifica e subestima a complexidade da doença, uma vez que o câncer de mama invasivo pode surgir diretamente das células normais ou mesmo de células-tronco presentes nas unidades lóbulo-ductais terminais (Allred et al., 2001).

As hiperplasias e os carcinomas lobulares e ductal *in situ* (exceção de DCIS de alto grau) são frequentemente dependentes do estrógeno para seu crescimento, como confirmado pela presença dos receptores de estrógeno (ER) (Shoker; Sloane, 1999; Polyak, 2001; Clarke et al., 2004). A presença do receptor de estrógeno e progesterona tem grande importância para a avaliação do prognóstico e escolha do melhor tratamento para o paciente, uma vez que a maioria dos tumores ER+ é diplóide, apresenta maior grau de diferenciação, menor agressividade e são responsivos à terapia anti-hormonal. Por outro lado, os pacientes com tumores negativos para o receptor de estrógeno estão associados a um prognóstico pior e frequentemente apresentam expressão aumentada dos genes codificadores dos receptores de fatores de crescimento, EGFR e erbB2/HER2, além de não responderem à terapia anti-hormonal (Polyak, 2001; Clarke et al., 2004). Portanto, tanto os receptores de estrógeno quanto os receptores de fatores de crescimento estão dentre os marcadores prognósticos e preditivos mais utilizados para o câncer de mama.

A busca de novos marcadores moleculares para uma classificação fenotípica mais precisa dos tumores de mama tornou-se o foco de muitos pesquisadores nos últimos anos. Estudos utilizando a tecnologia do DNA *microarray* permitiram uma caracterização mais detalhada e individualizada dos tumores baseada nos diferentes padrões de expressão gênica. A classificação molecular dos tumores e das linhagens celulares de mama em diferentes subtipos amplia a possibilidade de identificação de marcadores de predição, prognóstico, resposta ao tratamento e como alvos terapêuticos.

Perou e colaboradores (2000) caracterizaram um conjunto de 65 amostras de

tumores de mama através da análise genômica por *microarray*. De acordo com o perfil de expressão gênica, os tumores foram classificados em 4 subtipos: tipo luminal (ER+, aumento da expressão das citoqueratinas 8 e 18); tipo basal (ER-, aumento da expressão das citoqueratinas 5, 6 e 17); tipo ERBB2+ (superexpressão do receptor ERBB2) e os tipo- normais. Outros estudos confirmam esta classificação e subdividem os luminais em luminal A (maior expressão dos genes relacionados ao receptor de estrógeno) e luminal B (considerados “proliferativos” com maior expressão dos genes relacionados à proliferação e ciclo celular) (Sorlie et al., 2001; Fu; Jeffrey, 2007). Além disso, avaliou-se a relação destes subtipos com o prognóstico, analisando sobrevida livre de doença e sobrevida global. O subtipo basal e ERBB2+ apresentam os piores prognósticos comparados às pacientes luminais (Sorlie et al., 2001).

A caracterização das linhagens celulares de mama também é importante, uma vez que a utilização das mesmas é um dos modelos mais utilizados para o estudo do câncer de mama. Charafe-Jauffret et al. (2006) determinaram os subtipos moleculares de 31 linhagens de mama, encontrando um conjunto de 1233 genes diferencialmente expressos entre as amostras luminais e basais. As linhagens caracterizadas como luminais, como por exemplo, a linhagem de adenocarcinoma de mama MCF-7, apresentou 1160 genes superexpressos, incluindo o receptor ER α , fatores de transcrição (GATA3, XBP1) e genes associados à positividade do receptor de estrógeno. As linhagens do tipo basal apresentaram 391 genes característicos, incluindo as citoqueratinas 4, 5, 6 e 17, integrinas (ITGA6, ITGB4) e positividade para o receptor EGFR. Outro subgrupo encontrado além das células com superexpressão de ERBB2 foi o das células mesenquimais, por exemplo, a linhagem tumoral de mama MDA-MB-231, com expressão de genes codificadores de proteínas com papéis no remodelamento da matriz extracelular (colágenos, proteases).

1.2 Desenvolvimento e maturação da glândula mamária

A glândula mamária sofre modificações constantes durante seu

desenvolvimento, apresentando uma grande capacidade de remodelamento e regeneração. O desenvolvimento das mamas ocorre em três fases diferencialmente reguladas: embrionária, puberal e adulta. Durante a puberdade, muitas alterações acontecem sob influência dos elevados níveis dos hormônios ovarianos que induzem a proliferação dos ductos, com sucessivos ciclos de alongação e ramificação (Gjorevski; Nelson, 2011). O ducto mamário maduro é composto por dois tipos celulares principais: camada externa de células mioepiteliais, adjacentes a matriz extracelular e uma camada interna de células epiteliais que circundam o lúmen (Ali; Coombes, 2002; Hennighausen; Robinson, 2005; Gjorevski; Nelson, 2011) (Figura 1b). Esta arquitetura epitelial organizada e polarizada é determinada por diversos fatores incluindo as interações célula-célula e célula-ECM (*extracellular matrix*), fatores solúveis, hormônios e força física. Este microambiente influencia a homeostase do tecido mamário, uma vez que regula a proliferação, diferenciação, polarização e sobrevivência (Lanigan et al., 2007; Hebner et al., 2008). Alterações nestes processos rompem a estrutura epitelial organizada podendo dar origem ao processo tumorigênico das mamas (Figura 1c).

As mamas rudimentares, após o nascimento, entram em fase de quiescência e só completarão seu desenvolvimento durante a puberdade. Nesta fase, os ductos imaturos, sob a influência do estrógeno, se alongam no tecido conectivo para formar de 15 a 20 lóbulos (Ali; Coombes, 2002; Lanigan et al., 2007; Gjorevski; Nelson, 2011) (Figura 1a). Ocorre o crescimento do tecido adiposo e conjuntivo além da ramificação dos ductos galactórofos. Posteriormente, até a menopausa, a glândula mamária passará por ciclos regulares de proliferação e apoptose. Durante o ciclo menstrual há proliferação das células dos ductos, no entanto a glândula se mantém indiferenciada (Hebner et al., 2008).

Adaptado Simak Ali & R. Charles Coombes. *Nature Reviews Cancer* 2. 2002.

Figura 1 - a. Anatomia da glândula mamária. Cada glândula contém de 15-20 lóbulos que são conectados a um conjunto de ductos que drenam o leite no período da lactação para o mamilo (*nipple*). b. Cada ducto é formado por uma camada de células epiteliais (que se diferenciam em células produtoras de leite durante a gravidez), delimitada por uma camada de células mioepiteliais com propriedades contráteis. Os ductos estão imersos no estroma composto de adipócitos, fibroblastos, células do sistema hematopoiético, vasos sanguíneos e neurônios. c. Massa epitelial de células desorganizada, típica de um tumor de mama.

A proliferação e maturação dos alvéolos com completa diferenciação das células epiteliais luminais para a produção de leite só ocorrerá durante a gravidez. Na fase gravídica ocorre também a diferenciação dos ductos resultando na formação das estruturas luminais exigidas para lactação. Após amamentação, ocorre uma involução parcial da glândula, acompanhada de apoptose das células luminais secretórias nos alvéolos. Mais uma vez o tecido mamário (epitélio e estroma) é remodelado, retornando ao seu estado não gravídico (Poirier et al., 2003; Henninghausen; Robinson, 2005; Hebner et al., 2008). Todos estes ciclos de desenvolvimento, maturação e involução são regulados por um sistema complexo de transdução de sinal, do qual fazem parte as integrinas, componentes da matriz extracelular (ECM), hormônios e fatores de crescimento, através da ativação ou inibição das vias proliferativas e apoptóticas. A fase puberal é estimulada pelos estrógenos produzidos

pelos ovários, que se tornam ativos nesta fase; e pelo hormônio de crescimento e seus mediadores: os fatores de crescimento tipo-insulina (IGF-1 e IGF-2). Os ciclos menstruais são controlados principalmente pelo estradiol e progesterona. Durante a gravidez, o crescimento e diferenciação das mamas são estimulados por vários hormônios, incluindo os estrógenos, progesterona, insulina, com importante influência da prolactina e lactógenos da placenta (Schulz, 2005; Henninghausen, Robinson, 2005; Hebner et al., 2008).

Como descrito anteriormente, as mamas, assim como outros órgãos regulados por hormônios, tais como o endométrio, sofrem modificações cíclicas associadas ao ciclo menstrual, como alterações morfológicas, de expressão protéica e cinética celular. Alterações estruturais e funcionais das mamas durante o ciclo menstrual podem predispor este tecido a modificações malignas com possibilidade de desenvolvimento tumoral (Ramakrishnan et al., 2002; Navarrete et al., 2005). Por isso, entender os mecanismos e fatores que regulam estas alterações é de grande importância.

Dentre as alterações decorrentes do ciclo menstrual, o balanço entre proliferação e morte celular está entre os processos mais estudados, por sua importância na carcinogênese mamária. As taxas de proliferação e apoptose da glândula mamária variam durante toda a vida e dependem da idade, do ciclo menstrual, gravidez, involução puerperal e menopausa. Um estudo de Navarrete et al. (2005) avaliou a variação do índice de proliferação e apoptose que ocorre durante o ciclo menstrual, analisando tecidos de mulheres saudáveis recolhidos nas diferentes fases do ciclo menstrual: fase folicular e fase luteal. Os resultados mostram que a proliferação epitelial é maior durante a fase luteal, próximo ao final do ciclo, sugerindo a influência sinérgica dos hormônios estrógenos e progesterona. Os maiores índices apoptóticos também ocorrem na fase luteal, coincidindo com máximo valor do índice proliferativo, no 24º dia do ciclo. No entanto, diferentemente da proliferação, os níveis de progesterona correlacionam negativamente com apoptose, ou seja, níveis altos de progesterona com baixos índices apoptóticos.

Os estrógenos, além de atuarem no desenvolvimento normal das mamas, apresentam um papel importante na indução do câncer de mama através de sua interação com os receptores ER- α e ER- β (ERs), que são membros de uma

superfamília de receptores nucleares. O estrógeno, como fator de risco para o câncer de mama, está associado com sua exposição cumulativa no epitélio mamário (Feigelson; Henderson, 2000). Por exemplo, menarca precoce e menopausa tardia aumentam o risco de câncer de mama, enquanto que menopausa precoce, gravidez em idade jovem e amamentação apresentam efeitos protetores (Carter et al., 1989; Clarke et al., 2004; Dumitrescu; Cotarla, 2005).

Os receptores de estrógeno podem agir como fatores de transcrição, associando-se diretamente às sequências do tipo ERE (Elementos Responsivos ao Estrógeno), localizados nos promotores dos genes alvos. A ligação do estrógeno ao receptor ER induz sua fosforilação e dimerização e altera sua conformação, facilitando sua interação com o DNA. Além disso, a transativação mediada pelo receptor é modulada por interações com proteínas co-regulatórias (co-ativadores ou co-repressores), que aumentam ou diminuem a transcrição dos genes alvos (O’Lone et al., 2004; Nagai; Brentani; 2008).

Os receptores de estrógeno também podem regular a expressão gênica indiretamente, através de interações com outros fatores de transcrição ou ativando vias de sinalização a partir dos receptores de estrógenos localizados na membrana ou no citoplasma. Estas ações estão associadas à ativação de várias cascatas de proteínas quinases, tais como a via das Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs) e a via da fosfoinositol 3-quinase (PIK – *Phosphoinositide kinase-3*) (Losel; Wehling, 2003; Bjornstrom; Sjoberg, 2005). Todos estes mecanismos tornam o estrógeno um importante modulador da transcrição de uma variedade de genes, incluindo aqueles importantes para o desenvolvimento e progressão do tumor.

Estudos têm mostrado que interações entre os ERs com as vias dos receptores dos fatores de crescimento representam mais um mecanismo que pode potencializar a ação transformadora dos estrógenos e dos fatores de crescimento no desenvolvimento do tumor. As vias de sinalização mediadas pelos fatores de crescimento epidérmico (EGF) e pelos fatores de crescimento tipo-insulina (IGF), por exemplo, podem modular as funções dos ERs na ausência dos estrógenos, através da fosforilação dos receptores e de seus co-ativadores (Campbell et al., 2001; Bjornstrom; Sjoberg, 2005). Além disso, estas vias podem regular e estimular o crescimento, independentemente do receptor de estrógeno. Estudos mostraram que os

fatores EGF e IGF promovem sinergicamente a síntese de DNA, progressão do ciclo celular e proliferação das células epiteliais mamárias (Smith, 1998; Stull et al., 2002). A interação destas vias seria um fator importante para a aquisição de resistência aos tratamentos anti-hormonais dos tumores ER+, além de contribuir para o aumento na sensibilidade dos tumores a níveis menores do hormônio.

O hormônio progesterona também regula a ligação do estrógeno ao ER. Além disso, a interação do hormônio com seu receptor (PR) inibe a ativação do estrógeno, ou seja, a progesterona apresenta um papel de regulador negativo da ação estrogênica (Ramakrishnan et al., 2002).

1.3 Apoptose e o gene Par-4

Durante as últimas décadas, muitos estudos têm revelado a importância da apoptose no câncer, uma vez que a desregulação deste processo é uma aquisição crucial para a transformação oncogênica (Hanahan; Weinberg, 2000).

A apoptose é um mecanismo celular importante precisamente controlado que evoluiu para regular a morte celular em diversas condições fisiológicas: durante o desenvolvimento embrionário, indução da tolerância imune, eliminação das células com DNA danificado, além de manter a homeostase dos tecidos, regulando o balanço entre proliferação e morte (Weinberg; Hanahan, 2000). Na glândula mamária, um dos exemplos clássicos de apoptose das mamas é a involução da glândula após lactação, decorrente da diminuição dos hormônios lactogênicos que resulta na eliminação programada das células epiteliais diferenciadas (Ramakrishnan et al., 2002; Navarrete et al., 2005).

O processo apoptótico pode ser induzido por duas vias independentes que convergem para a via comum das caspases executoras (Figura 2) (Youle; Strasser, 2008). A ativação destas proteases culmina com o eficiente processo de morte celular programada, caracterizado pelo rompimento da dupla fita de DNA, compactação da cromatina, fragmentação da membrana plasmática sem rompimento da mesma e subsequente eliminação fagocítica dos restos celulares (corpos apoptóticos)

(Simstein et al., 2003). A via intrínseca (mitocondrial), regulada pela família de proteínas Bcl-2 (*The B-cell lymphoma protein-2 family*), é ativada por sinais internos (danos no DNA, oncogenes ativados, privação de fatores de crescimento) e envolve o aumento da permeabilidade mitocondrial com liberação do citocromo c e consequente formação do complexo protéico indutor de apoptose, denominado apoptossomo. Este complexo é formado por monômeros de Apaf-1 (*Apoptosis protease-activating factor*) com moléculas de caspases 9 que ativam a caspase 3. A via extrínseca, por sua vez, é iniciada pelos receptores de morte na superfície celular, membros da família do receptor TNF (*Tumor Necrosis Factor receptor* – TNFR1 e FAS/FAS L) que são ativados por citocinas ou pelas proteínas citotóxicas das células imunes. Estes receptores ativados associam-se com as proteínas adaptadoras FADD em um complexo denominado “DISC” (*Death-Inducing Signalling Complex*) que ativa caspases iniciadoras (caspase 8) com posterior indução direta das caspases executoras (caspases 3, 6 e 7) (Youle; Strasser, 2008; Degterev; Yuan, 2008). A caspase 8 também pode induzir a via mitocondrial através da clivagem da proteína Bid (*BH3-interacting domain death agonist*), gerando o fragmento permeabilizador de mitocôndria tBid, que por sua vez induz a liberação do citocromo C com consequente ativação da via intrínseca (caspase 9 – caspase 3) (Galluzzi et al., 2011)

Youle R.J., Strasser A. *Molecular Cell Biology Nature Reviews*. 2008.

Figura 2 - Esquema representativo das vias extrínseca e intrínseca do processo apoptótico.

Todos os passos das vias apoptóticas descritos anteriormente devem ser bem definidos e controlados visto que a desregulação do processo apoptótico pode resultar na perda de células essenciais, originando doenças neurodegenerativas, isquemia e AIDS. Outra consequência desta desregulação seria o acúmulo de células mutadas podendo originar doenças auto-imunes ou câncer (Schulz, 2005; Youle; Strasser, 2008).

A diminuição relativa ou absoluta da atividade apoptótica celular pode ser considerada uma propriedade universal dos cânceres humanos, uma vez que confere diversas vantagens para o crescimento e progressão tumoral, como: intensificação da hiperproliferação com seleção das células danificadas (mutadas), escape

imunológico, além de aquisição de resistência aos agentes quimioterápicos devido à insensibilidade aos sinais pró-apoptóticos (Schulz, 2005).

A inibição da via apoptótica nos tumores pode ser decorrente de alterações em diferentes passos do processo, incluindo desensibilização dos receptores de morte, ativação das vias anti-apoptóticas e de sobrevivência (PI3K, NFκB) e inativação de supressores tumorais pró-apoptóticos (p53 ou PTEN) (Schulz, 2005; Goswani et al., 2006).

Portanto, é de grande importância a identificação e o estudo de genes pró-apoptóticos, uma vez que permite avanços no tratamento do câncer com a possibilidade de regressão do tumor após reativação destes genes nas células tumorais. O gene *Par-4*, objeto deste presente estudo, por exemplo, seria um potencial candidato para a terapia molecular do câncer (Gurumurthy; Rangnekar, 2004).

O gene pró-apoptótico *Par-4* (*Prostatic apoptosis response-4*) ou *PAWR* foi primeiramente identificado em células de câncer de próstata de rato induzidas a apoptose em resposta à elevada concentração intracelular de $[Ca^{2+}]_i$ (Sells et al., 1994). A sequência codificadora de *Par-4* foi mapeada no cromossomo humano 12q21 (Johnstone et al., 1998), região instável e frequentemente deletada em câncer gástrico e pancreático (Gurumurthy; Rangnekar, 2004).

O gene *Par-4* contém sete éxons e seis íntrons e codifica um produto protéico de aproximadamente 342 aminoácidos nos humanos (Zhao et al., 2007). A proteína *Par-4* apresenta domínios funcionais conservados: um domínio zíper de leucina na região C-terminal, e duas sequências de localização nuclear NLS1 e NLS2, ambas na região N-terminal (El-Guendy, Rangnekar, 2003a). El-Guendy e colaboradores (2003) identificaram na sequência de *Par-4*, um domínio central de 52 aminoácidos (entre os aminoácidos 137-195), denominado SAC (*death-inducing domain selective for apoptosis induction in cancer cells*) (Figura 3). O domínio SAC quando superexpresso foi considerado essencial e suficiente para indução seletiva da apoptose nas células tumorais de próstata (El-Guendy et al., 2003 b).

Par-4 executa suas funções pró-apoptóticas dependendo do contexto celular e de modificações pós-traducionais. A proteína *Par-4* também apresenta sítios de fosforilação importantes para regulação de sua localização e função. A fosforilação

do resíduo de Treonina (T155) pela quinase PKA regula positivamente sua atividade pró-apoptótica, uma vez que induz sua translocação para o núcleo (Gurumurthy et al., 2005). Ao contrário, a fosforilação pela quinase Akt1 do resíduo S249 é essencial para retenção de Par-4 no citoplasma pela chaperona 14-3-3, impedindo sua translocação nuclear, com consequente inibição de sua função apoptótica nas células de próstata (Goswami et al., 2005).

Zhao Y. et al. *Cancer Res.* 2007; 67: 9276-85.

Figura 3 - Representação esquemática dos domínios funcionais de Par-4. Os domínios funcionais de Par-4 incluem duas sequências de localização nuclear (NLS), denominadas NLS1 (entre os aminoácidos 20-25) e NLS2 (entre os aminoácidos 137-153), ambas na região N-terminal; o domínio zíper de leucina (entre os aminoácidos 290-332), na região C-terminal e o domínio SAC (entre os aminoácidos 137-195).

Par-4 é amplamente expresso nos tecidos dos mamíferos. Na glândula prostática normal é expresso na parte ventral da próstata e nas células epiteliais basais, mas está ausente nas células ductais diferenciadas. O mesmo padrão de expressão é verificado nas células epiteliais da glândula mamária e da retina, sendo que Par-4 é indetectável nas células terminalmente diferenciadas. Estes dados sugerem que a expressão de Par-4 é reduzida durante a diferenciação (Boghaert et al., 1997; Gurumurthy; Rangnekar, 2004).

A superexpressão de Par-4 é suficiente para induzir apoptose na maioria das células tumorais, principalmente nas células hormônio-independentes de próstata, pulmão, pâncreas, cabeça e pescoço. No entanto, células primárias ou imortalizadas são resistentes a sua ação apoptótica na ausência de um segundo sinal apoptótico. Na presença destes outros sinais apoptóticos (ausência de fatores de crescimento, agentes indutores da liberação de Ca^{2+} , TNF, UV) Par-4 mostra-se essencial para a sensibilização destas células, antes resistentes a sua função (El-Guendy et al., 2003b;

Gurumurthy; Rangnekar 2004).

Par-4 exerce seu papel apoptótico através de diversos mecanismos. Um deles seria pela inibição da transcrição do gene anti-apoptótico *BCL-2* via interação com a proteína WT1. A interação com a proteína WT1 também implica no envolvimento de Par-4 no desenvolvimento de vários tumores, como no tumor de Wilm's e nos tumores de células germinativas masculinas (El-Guendy; Rangnekar, 2003a). O estudo realizado por Charkraborty et al. (2001) com células prostáticas mostrou que Par-4 ativa a via apoptótica FasL-Fas-FADD-caspase 8 pela translocação de Fas e FasL para a membrana celular, o que induz a interação do receptor Fas com FADD, essencial para a formação do complexo de sinalização indutor de morte DISC. Paralelamente, Par-4 inibe a atividade transcricional do fator chave de sobrevivência NFκB, prevenindo assim a expressão de genes anti-apoptóticos (Diaz-Meco et al., 1996) (Figura 4).

A proteína Par-4 também inibe a via ativada pelas quinases atípicas PKCs, que regulam positivamente a proliferação e sobrevivência celular através da ativação dos fatores de transcrição AP-1 e NFκB, respectivamente (Figura 4). As quinases aPKCs bloqueiam a apoptose pela fosforilação da proteína pró-apoptótica FADD, com consequente inibição da formação do DISC (Diaz-Meco et al., 1996).

El-Guendy N., Rangnekar V.M. *Experimental Cell Research*. 2003a; 283: 51-66.

Figura 4 - Mecanismos de indução da apoptose por Par-4. Par-4 induz a apoptose das células tumorais por diversas vias, regulando a sobrevivência celular com ações no citoplasma e no núcleo. No citoplasma, Par-4 aumenta a translocação de Fas e Fas L para a membrana, bloqueia atividade de PKC e da proteína anti-apoptótica Bcl-2. No núcleo Par-4 inibe a atividade transcrricional de NFκ-β e inibe a expressão de *Bcl-2* através de sua interação com WT1.

Um estudo recente de Chaudhry et al. (2012) relatou que a proteína Par-4 também é um substrato da caspase 3 em diferentes linhagens tumorais, sendo clivada durante a apoptose induzida pela cisplatina ou doxorubicina. A clivagem de Par-4 gera um fragmento C-terminal (25 kDa) contendo os domínios importantes para sua atividade pró-apoptótica (NLS2, SAC, zipper-de-leucina) e induz ao seu acúmulo no núcleo, favorecendo a indução da apoptose.

Burikhanov e colaboradores (2009) demonstraram que a proteína Par-4 também é secretada espontaneamente pelas células normais e tumorais em cultura.

Esta secreção ocorre pela via clássica ER-Golgi e é estimulada por fatores indutores do estresse do Retículo Endoplasmático. O meio condicionado obtido das células transfectadas com vetores de expressão Par-4-GFP ou SAC-GFP, que continham Par-4 ou SAC secretado, é capaz de induzir a apoptose das células tumorais de próstata PC-3 (hormônio-independentes). O mesmo não ocorre com as células normais da próstata, confirmando a seletividade de Par-4 para as células tumorais. Ensaios de co-imunoprecipitação e western blot com os extratos celulares de PC-3 identificaram o receptor GRP78 (proteína de resposta ao estresse oxidativo) como parceiro de Par-4/SAC. A interação Par-4/GRP78 leva a indução da apoptose pela via do estresse do Retículo Endoplasmático (dependente de PERK) e pela ativação da via FADD/caspase-8/caspase-3. Além disso, este estudo menciona que o tratamento com o agente indutor apoptótico TRAIL leva ao aumento da expressão do receptor GRP78 na membrana e de sua co-localização com Par-4 nas células tumorais PC-3, o que não ocorreu na linhagem normal de próstata (BPH). Nas células não tratadas com TRAIL, o complexo Par-4/GRP78 co-localiza-se no retículo endoplasmático em ambas as células. Este resultado sugere que em condições de estresse do Retículo Endoplasmático ocorre translocação do complexo Par-4/GRP78 do retículo para a membrana plasmática nas células tumorais.

Um estudo desenvolvido por Boosen et al. (2009) com fibroblastos de embrião de rato (REF52.2) mostra que a quinase Dlk (*DAP-like kinase*) fosforila o resíduo T155 de Par-4, levando a translocação do complexo Dlk/Par-4 para o citoplasma. O evento de fosforilação está acoplado à estabilização do complexo Par-4/Dlk e sua associação com citoesqueleto de actina, o que poderia induzir a reorganização citoesquelética durante a apoptose.

Muitos estudos mostram o papel de Par-4 como supressor tumoral, uma vez que sua inativação ou diminuição de expressão está associada à indução ou à progressão tumoral. Moreno-Bueno et al. (2007) observou que a expressão de *Par-4* estava silenciada por metilação da região promotora, em 32% dos tumores endometriais. Outros estudos observaram expressão diminuída de Par-4 em carcinomas renais (Cook et al., 1999), câncer de mama (Nagai et al., 2010) e neuroblastomas (Kogel et al., 2001).

A expressão de Par-4 foi avaliada em amostras de pacientes com câncer de mama, encontrando negatividade de expressão para a proteína em 57% das amostras analisadas. Esta expressão negativa de Par-4 foi associada a um pior prognóstico das pacientes com câncer de mama, particularmente nas pacientes com o subtipo luminal A. Observou-se também um prognóstico pior (menor sobrevida livre de doença e menor sobrevida global) nas pacientes que apresentavam tumores com expressão diminuída de Par-4 concomitante com positividade para os receptores EGFR e HER-2 e para quinase p-Akt (Nagai et al., 2010).

Nas linhagens tumorais de mama hormônio independentes (MDA-MB231 e MDA-MB435), Par-4 induz apoptose quando superexpresso, enquanto que nas linhagens tumorais dependentes de hormônios (MCF-7 e T47D) ou nas células imortalizadas (MCF10-A) não há indução, ou seja, são resistentes à ação apoptótica do gene na ausência de um segundo estímulo apoptótico (El-Guendy et al., 2003b).

Um estudo do nosso grupo mostrou pela primeira vez que a expressão de Par-4 pode ser modulada negativamente pelo estrógeno e fatores de crescimento. Células MCF-7 tratadas com 17β Estradiol (E2) ou com fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) por 24 horas apresentaram expressão diminuída do transcrito Par-4, e foi observado sinergismo (diminuição ainda maior) quando as células foram tratadas com os dois mitógenos ao mesmo tempo. O efeito do E2 foi dependente do receptor de estrógeno enquanto que o efeito do IGF foi dependente das vias de sinalização PI3K e P38MAPK. Estes resultados sugerem que a diminuição da expressão de Par-4 pelos mitógenos favoreça a sobrevivência das células tumorais de mama (Casolari et al., 2011).

Em outro estudo do nosso grupo (de Bessa Garcia, 2009) foi observado o efeito do soro tratado (soro livre de esteróides e fatores de crescimento) no aumento da expressão do transcrito Par-4. Este estudo também mostrou que a expressão do transcrito Par-4 é regulada negativamente pelo hormônio 17β Estradiol (E2) e pelo fator de crescimento epidérmico (EGF) e sugere que este controle transcricional é dependente da interação entre as vias de sinalização mediadas pelos receptores de estrógeno (ER) e EGF (ERK1/2).

Diversos estudos sugerem que Par-4 poderia ser um candidato em potencial para a terapia antitumoral, principalmente devido a sua especificidade tumoral. Em

modelos tumorais de camundongos, a superexpressão de Par-4 resultou na regressão do tumor através da ativação da apoptose pela via do receptor Fas/FADD (Gurumurthy; Rangnekar 2004). Zhao e colaboradores (2007) também relataram que camundongos transgênicos expressando o domínio SAC são normais em relação ao desenvolvimento e expectativa de vida, além de serem resistentes ao crescimento de tumores. Em contrapartida, a simultânea deleção de Par-4 em camundongos associada à heterozigiosidade para o supressor tumoral PTEN (*The phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10*) leva ao desenvolvimento de carcinoma de próstata invasivo, afetando o número, tamanho, progressão e severidade das lesões de maneira dependente da expressão gênica de Par-4 (Fernandez-Marcos et al., 2009). PTEN codifica uma fosfatase que regula negativamente a via PI-3K/Akt. A severidade das lesões encontradas na próstata destes animais com inativação simultânea destes dois supressores tumorais está relacionada a uma maior ativação da via NF- κ B e da quinase Akt.

Recentemente, um estudo de Zhao et al. (2011) mostrou que camundongos transgênicos que superexpressam Par-4 ou o domínio efetor SAC são resistentes ao crescimento de tumores espontâneos ou induzidos pela injeção das células LLC1 (*Lewis Lung carcinoma cells*). Quando células MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) retiradas dos camundongos transgênicos são co-cultivadas com células imortalizadas ou transformadas, as últimas são induzidas a apoptose. Este efeito apoptótico seletivo para as células imortalizadas também ocorreu com o co-cultivo com o soro dos animais que superexpressam Par-4/SAC. Interessantemente, observou-se que ao transferir a medula óssea destes camundongos transgênicos SAC-GFP para os camundongos controles, estes últimos apresentavam o complexo SAC-GFP no soro e tornavam-se resistentes aos tumores induzidos pelas células LLC1. Além disso, a proteína Par-4 ou o domínio SAC recombinante quando são introduzidos intravenosamente nos camundongos inibem a metástase de pulmão das células LLC1.

Segundo o estudo de Brieger et al. (2004) com células mielóides transformadas K562 (Bcr-Abl positivas), a superexpressão de Par-4 aumentou a sensibilidade aos agentes quimioterápicos Imatinib e inibidores das desacetilases de histona (HDAC), aumentando a taxa de apoptose destas células resistentes aos

tratamentos convencionais com doxorrubicina e com os agonistas Trail e Fas.

O aumento da expressão de Par-4 também aumenta a apoptose induzida por drogas indutoras do estresse do retículo endoplasmático (*endoplasmic reticulum stress*) nas células tumorais renais Caki, através da diminuição dos níveis da proteína anti-apoptótica XIAP e da quinase p-Akt (Lee et al., 2008).

Um estudo de Kline e colaboradores (2009) em camundongos relatou a possibilidade de utilização de Par-4 no tratamento de câncer de cólon. Ao receber nanolipossomos contendo o plasmídeo de expressão de Par-4, estes camundongos ficaram mais susceptíveis ao quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU). O grupo também demonstrou que a superexpressão de Par-4 na linhagem tumoral humana HT29 levou ao aumento dos níveis de apoptose na presença do 5-fluorouracil e este aumento decorreu da inativação do fator NFκB. Esta *downregulação* de NFκB por Par-4 é relevante na terapia contra o câncer de cólon, uma vez que esta via é ativada nos tumores colo-retais.

Wang et al. (2010) também mostraram que Par-4 pode sensibilizar as células de câncer de cólon ao quimioterápico 5-FU através da inibição de NFκB e da desregulação da via dos miRNAs. O aumento da expressão de Par-4 nas células tumorais SW480 e HT29 levou a interação de Par-4 com NFκB no citoplasma, impedindo a translocação nuclear das subunidades p65 e p50, e consequentemente impedindo a transcrição de genes de sobrevivência. Além disso, as células com aumento de Par-4 tiveram expressão reduzida de DROSHA, proteína reguladora da via dos miRNAs, o que levou ao aumento da tradução de alvos pró-apoptóticos (Bim) e diminuição de alvos anti-apoptóticos como Bcl-2.

Observou-se, ainda, o envolvimento de Par-4 na apoptose seletiva de várias células tumorais via ativação do receptor nuclear LXR-α. O tratamento das células com Withaferin A e consequente ativação do receptor leva ao aumento da expressão de Par-4 e diminuição de Bcl-2, c-myc e do gene *E2F1*, forçando as células a entrar em estado apoptótico (Mehrotra et al., 2011).

Segundo Donninger e colaboradores (2010), K-Ras modula a interação de Par-4 com RASSF2, proteína pró-apoptótica efetora de K-Ras, levando a translocação de Par-4 para núcleo e consequentemente induzindo a apoptose de células tumorais de próstata. A perda de RASSF2 confere resistência a apoptose e

impede a localização nuclear de Par-4 induzida por TRAIL.

Além do papel na ativação da apoptose, verificou-se que Par-4 também está envolvido na supressão da transformação. Estudos mostram que o oncogene Ras, envolvido em 40% dos tumores epiteliais, inibe a expressão de Par-4 via Raf-MEK-ERK. A restauração dos níveis de Par-4 em células transformadas por Ras prejudica severamente a formação de colônias no ágar, indicando que a diminuição da expressão deste gene pelo oncogene Ras é um evento crítico para a progressão do tumor (Barradas et al., 1999; Qiu et al., 1999).

1.5 Papel de Par-4 nas doenças neurodegenerativas

Muitos estudos mostram o envolvimento de Par-4 na disfunção neuronal e na morte celular relacionada às doenças neurodegenerativas. Uma sinalização aberrante nos terminais sinápticos parece ser um evento crítico na maioria dos casos de apoptose neuronal. Análises de imunofluorescência mostram que os níveis de Par-4 são aumentados nos compartimentos neuríticos e sinápticos de neurônios hipocâmpais expostos a insultos apoptóticos (Mattson et al., 1999). O cultivo de neurônios hipocâmpais de rato na ausência de fatores de crescimento leva ao aumento da expressão transcricional e protéica de Par-4 e este aumento precede a depolarização da membrana mitocondrial, ativação das caspases e condensação da cromatina, demonstrando que Par-4 age precocemente na indução da morte celular (Chan et al., 1999). Estudos anteriores relatavam que Par-4 encontrava-se aumentado nas regiões cerebrais vulneráveis de pacientes com Mal de Alzheimer comparado aos pacientes-controle (Mattson et al., 1999). Um estudo de Jun Xie e Qing Guo (2005) mostrou que Par-4 regula a clivagem da proteína percussora amilóide (APP) através de sua interação com a enzima β -secretase (BACE1). Diversos estudos indicam que a produção aberrante e agregação do peptídeo β -amilóide ($A\beta$ 1-42) têm papel central na patogênese do Mal de Alzheimer. Estes peptídeos são gerados quando a proteína amilóide percussora (APP) é clivada pelas enzimas β -secretase e γ secretase. Os resultados deste estudo mostram que o aumento da expressão de Par-4 em neurônios

hipocampais aumentou significativamente a clivagem de APP pela BACE1 enquanto que o silenciamento de Par-4 por siRNA, diminuiu a atividade da β -secretase. Portanto, estes dados sugerem que Par-4 está diretamente envolvido na regulação da clivagem de APP por BACE1, tornando-o potencial alvo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o Mal de Alzheimer. A doença de Parkinson é caracterizada pela degeneração de neurônios dopaminérgicos da substância negra (*nigra*) do cérebro. Estudos em tecidos cerebrais post-mortem de pacientes com Parkinson ou de primatas tratados com a toxina MPTP indutora da doença (toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) mostram que os neurônios dopaminérgicos sofrem apoptose e apresentam níveis elevados de Par-4 (Duan et al., 1999; Mattson et al., 1999).

Par-4 também apresenta participação no processo neurodegenerativo da esclerose lateral amiotrófica, no qual há degeneração dos neurônios motores da medula espinhal e na doença de Huntington, distúrbio hereditário caracterizado pela morte de neurônios do estriado cerebral (disfunção motora) (Mattson et al., 1999).

Neurônios que apresentam expressão aumentada de Par-4 após indução de trauma cerebral (*TBI – Traumatic brain injury*) apresentam sobrevivência diminuída, diminuição no potencial transmembrana da mitocôndria, acúmulo de radicais livres e ativação da caspase 3 com consequente aumento da apoptose (Payette et al., 2008).

1.6 Papel de Par-4 na morfogênese da glândula mamária

Diferentes estudos têm observado diferenças na integração das vias de sinalização pelas células quando estas são cultivadas como monocamadas em plástico (cultura 2D) ou numa matriz extracelular (Matrigel - cultura 3D). Os modelos de cultura tridimensional utilizando a linhagem de mama imortalizada MCF10A recriam as características do epitélio glandular *in vivo*, uma vez que estas células formam esferóides semelhantes à ácinos com lúmen, adquirem polarização apicobasal, além de manter os contatos célula-célula e célula-membrana basal, o que torna a cultura tridimensional uma ferramenta importante para os estudos de genes e

vias celulares envolvidos na morfogênese mamária e na transformação tumoral (Debnath; Brugge, 2005; Hebner et al., 2008). A formação do lúmen envolve a ativação seletiva dos processos de apoptose e autofagia e alterações nestes processos resulta no preenchimento celular do espaço luminal, evento recorrente observado no processo tumorigênico da glândula mamária (Shaw et al., 2004). Estudos recentes do nosso grupo observaram o potencial papel de Par-4 na morfogênese da glândula mamária. Células MCF10A cultivadas em cultura tridimensional (3D) apresentaram expressão diferencial de Par-4 durante a morfogênese celular e células do centro do lúmen mostraram intensa marcação de Par-4, sugerindo sua participação no processo de formação do lúmen através da ativação da apoptose (Nagai et al., 2010; de Bessa Garcia et al., 2010) (Figura 5).

Nagai M.A et al., *Int J Oncol.* 2010; 37: 41-9.

Figura 5 - Expressão de Par-4 e da caspase 3 ativada nas células MCF10A cultivadas em cultura 3D. Imagens representativas das células MCF10A cultivadas em Matrigel por 5

(A) e 7 (B) dias mostram a expressão de Par-4 (em vermelho) por imunofluorescência. Os núcleos foram marcados com *Hoechst* (a, azul). (B) No sétimo dia os ácinos foram marcados com Par-4 (em vermelho) e com caspase 3 ativada (em verde). As imagens dos ácinos foram obtidas utilizando o microscópio confocal (scale bar: A 15µm; B, 25 µm; C, 50 µm).

Os estudos citados anteriormente mostram o envolvimento de Par-4 em diversos tipos tumorais e sua potencialidade como marcador prognóstico e terapêutico. No entanto, pouco é conhecido sobre o papel funcional deste gene na glândula mamária. Portanto, o estudo funcional de Par-4, objetivo deste estudo, nas células de mama normais (MCF10A) e tumorais (MCF-7) é de grande importância para melhor entendimento do papel deste gene tanto no desenvolvimento da glândula mamária normal quanto na tumorigênese das mamas.

OBJETIVOS

2 OBJETIVO

Análise funcional do gene *Par-4* nas linhagens de mama MCF10A (linhagem normal de origem basal) e MCF-7 (linhagem tumoral de origem luminal, ER+).

2.1 Objetivos Específicos

- Análise do efeito do aumento de expressão do Par-4 na proliferação e sobrevida nas células de mama MCF10A e MCF-7.
- Análise do efeito da supressão do Par-4 na proliferação e sobrevida nas células de mama MCF10A e MCF-7.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

3.1.1 Monocada (2D)

As células epiteliais normais de mama MCF10A e as células tumorais MCF-7 (receptor de estrógeno positiva) e MDA-MB-231 (receptor de estrógeno negativa), adquiridas da ATCC (*American Type Culture Collection*, Rockville, EUA), fazem parte do banco de linhagens celulares do Laboratório de Genética Molecular do Câncer da FMUSP. Células MCF10A foram cultivadas na proporção 1:1 dos meios de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*): F12 (*Ham's Nutrient Mixture*) (Invitrogen, Carlsbad, EUA), suplementado com 5 % soro de cavalo (GIBCO, Gainthersburg, EUA), hidrocortisona (0,5 µg/ml), insulina (10,0 µg/ml), EGF (0,02 µg/ml) e toxina colérica (0,1 µg/ml). As células tumorais de mama MCF7 e MDA-MB232 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (SIGMA Chemical Corporation, St. Louis, EUA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (GIBCO, Gainthersburg, EUA). Ambas as linhagens foram mantidas nos meios específicos contendo antibiótico-antimicótico nas concentrações de 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 0,25 µg/ml de fungizona (GIBCO, Gainthersburg, EUA). As células foram mantidas em estufa (Thermo Electron Corporation, Marietta, EUA) a 37 °C sob atmosfera de 5 % de CO₂.

Para realização de alguns experimentos as células foram cultivadas em meio contendo soro tratado com carvão dextrana (ST). Este tratamento com carvão ativo desenvolvido por Armelin (1978) retira esteróides e fatores de crescimento do soro, sem inativar os demais componentes. Para o tratamento de 100,0 ml de soro, foram adicionados 1,25 g de carvão dextrana (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, EUA) a 50,0 ml de solução salina (PBS – 8,2 g/L NaCl; 0,2 g/L KCl; 0,2 g/L KH₂PO₄; 1,15 g/L Na₂PO₄.2H₂O). Em seguida centrifugou-se esta mistura a 10.000 r.p.m por 25 minutos a 4 °C e o sobrenadante resultante foi filtrado uma vez em papel

de filtro 3 μm (Inlab, Brasil) e 3 vezes em membrana de nitrocelulose 0.22 μm (Millipore Corporation, Massachusetts, EUA) para esterilização. O teste para controle da eficiência da retirada de esteróides do soro foi realizado no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (Disciplina de Endocrinologia da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) e avaliou pelo método fluorimétrico que a concentração de estrógenos era indetectável.

3.1.2 3D (MatrigelTM)

Para realização da cultura tridimensional, células MCF10A são cultivadas em monocamada até atingirem 100 % de confluência. Em seguida, as células são tripsinizadas e centrifugadas a 2000 r.p.m por 2 minutos. O sobrenadante será aspirado e as células ressuspensas e contadas. Posteriormente, a suspensão de células totalmente dissociadas será misturada com o meio contendo 4 % de Matrigel. Antes o Matrigel (BD MatrigelTM Matrix - BD Biosciences, Califórnia, EUA), matriz extracelular secretada pela linhagem de sarcoma de camundongo Engelbreth-Holm-Swarm, foi desolidificado a 4 °C por 14 – 16 horas. Aliquotas de 30,0 μL de Matrigel serão adicionadas a cada poço das lâminas de cultura de 8 poços (BD, Califórnia, EUA) tomando-se o cuidado para não formar bolhas. Em seguida, as lâminas serão colocadas em estufa a 37 °C por 15 minutos para solidificação do Matrigel, conforme descrito por Debnath *et al* (2003). Aliquotas de 400,0 μL da suspensão de células com Matrigel serão cuidadosamente adicionadas sobre a camada de Matrigel previamente solidificada em cada poço da placa de cultura. A quantidade final de células será 1×10^3 células/poço. As células são mantidas em estufa a 5 % de CO_2 a 37 °C, com troca de meio a cada dois dias.

3.2 Purificação e avaliação dos vetores

3.2.1 Transformação de bactérias e amplificação dos vetores

O vetor de expressão pCMV6-XL6-Par-4 contendo a sequência codificadora para Par-4 e o vetor vazio pCMV6-NEO (controle) (Figura 6) foram adquiridos da OriGene (Rockville, EUA), assim como os vetores de silenciamento para proteína Par-4 pRS shRNA-Par-4 com quatro vetores de 4 sequências distintas: TI342397 (SEQ1); TI342398 (SEQ2); TI342399 (SEQ3); TI342400 (SEQ4)) e o vetor controle shRNA-C- (TR20003) (Figura 7). Estes vetores foram amplificados através da transformação de bactérias *E.coli* quimiocompetentes *XL1Blue* (Stratagene, Cedar Creek, EUA) em meio Luria Bertani (LB-AGAR) com ampicilina (50 µg/ml; SIGMA Chemical Corporation, St. Louis, EUA). Para a transformação química, 50 ng dos vetores foram adicionados em alíquotas de 100,0 µl de *XL1Blue* que ficaram no gelo por 30 minutos. Em seguida, a mistura foi incubada a 42 °C por 30 segundos e transferida novamente para o gelo. As bactérias foram colocadas nos tubos contendo 1,0 ml de meio S.O.C (Invitrogen, Califórnia, EUA) e incubadas a 37 °C sob agitação (180 r.p.m.) por 1 hora. Posteriormente, a mistura de bactérias transformadas foi plaqueada em meio LB-ÁGAR a 37 °C por 16 horas. As colônias de bactérias isoladas que receberam os vetores, ou seja, resistentes a ampicilina, foram selecionadas para o pré-inóculo em 5 ml de meio LB contendo o antibiótico, por 8 horas sob agitação de 200 r.p.m. a 37 °C. Para confirmar a presença do vetor de expressão na colônia transformada, 10,0 µl do pré-inóculo foram adicionados em 50,0 µl de água e aquecido a 100 °C. Centrifugou-se a 4000 r.p.m. por 2 minutos e 5,0 µl deste sobrenadante foi utilizado para amplificação pela reação de PCR, utilizando os iniciadores para o gene Par-4. Após confirmar a presença do inserto, 50,0 µl deste pré-inóculo foram colocados em 25,0 ml de meio LB com Ampicilina por 16 h (200 r.p.m. – 37 °C) para amplificação dos vetores. Parte do inóculo foi congelada com glicerol (proporção de 15 % de glicerol para 75 % de volume de bactéria). O restante do inóculo foi utilizado para extração dos vetores utilizando-se o

kit Plasmid MIDI Qiagen (Qiagen, Valencia, EUA).

<http://www.origene.com/cdna/trueclone/vectors>

Figura 6 - Esquema do vetor genérico utilizado para expressar a sequência codificadora do gene Par-4 (pCMV6-XL6) e do vetor controle pCMV6-NEO (OriGene, Rockville, EUA).

<http://www.origene.com/cdna/trueclone/vectors>.

Figura 7 - Esquema do vetor de supressão pRS shRNA (short hairpin RNA – 29 nucleotídeos) utilizado para expressar a sequência codificadora do RNAi para inibir a tradução de Par-4 (OriGene, Rockville, EUA).

3.2.2 Extração/Purificação dos vetores

A extração e purificação dos vetores foi feita através do kit Plasmid MIDI

Qiagen, seguindo as orientações do fabricante (Qiagen, Valencia, EUA). Os passos de extração e purificação são baseados na lise da parede bacteriana sob condições alcalinas (NaOH-SDS) na presença de RNase A, que digere o RNA liberado da bactéria. O lisado é posteriormente neutralizado com Acetato de Potássio ácido que precipita o SDS juntamente com as proteínas denaturadas, DNA cromossômico e os debris. Em seguida, o lisado é transferido para as unidades de filtração para a ligação do DNA plasmidial (carregado negativamente) na resina de sílica (grupos DEAE carregados positivamente). As lavagens com o tampão com concentrações medianas de sal eliminam todos os contaminantes (RNA, proteína, debris). A eluição do DNA plasmidial ocorre na presença de altas concentrações de sal. Este, por sua vez, é eliminado através da precipitação com isopropanol a temperatura ambiente. Depois de centrifugado (9000 r.p.m. – 20 minutos), o precipitado de DNA é lavado com Etanol 70 % para remoção dos resíduos de sal. O DNA plasmidial é seco e redissolvido em água livre de RNase DNase (Invitrogen, Grand Island, EUA) para posterior análise da qualidade em gel de agarose 1 % e quantificação espectrofotométrica a 260 nm.

3.2.3 Digestão Enzimática

O vetor de expressão pCMV6-XL6-Par-4 (1 µg) e o vetor controle pCMV6-NEO (1 µg) foram digeridos com a enzima de restrição *Not I* (5U – Biolabs, New England, United Kingdom) por 1 h ou 16 h a 37 °C. A digestão com *Not I* foi feita para liberar o inserto (1750 kb) e confirmar a presença da sequência codificadora de Par-4. Observou-se após a digestão, 3 bandas referentes ao vetor de expressão pCMV6-Par-4 : uma banda de 5800 kb (vetor vazio), uma banda de 1750 kb referente ao inserto Par-4 e uma banda de 501/553 kb resultante da presença do sítio de *NotI* na sequência de Par-4, como confirmado no programa *NEBcutter* (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>).

Os vetores de silenciamento pRS shRNA-Par-4 e os vetores controles foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* (10U – Biolabs, New England, United Kingdom) e *HindIII* (10U - Gibco, Gatherburg, EUA) simultaneamente durante 1

hora a 37 °C. Após a digestão enzimática, observou-se a banda referente ao inserto do shRNA (402 kb) e a banda referente ao vetor vazio (5120 kb).

Para análise dos fragmentos digeridos, 10,0 µl da amostra diluída em 3,0 µl do tampão Type II (0,25 % azul de bromofenol, 0,25 % xileno cianol, 15 % ficoll 400) foram aplicados em gel de agarose 1 % contendo 0,8 µg/ml de brometo de etídeo. A eletroforese foi realizada a 5,5 V/cm em tampão TBE (Tris 0,09 M; EDTA 0,002 M, ácido bórico 0,09 M).

3.2.4 Sequenciamento e Validação dos vetores de expressão

Primeiramente foi feita uma reação de amplificação das sequências dos vetores pCMV6-XL6-Par-4 e o vetor vazio pCMV6-NEO com os iniciadores específicos XL39 (*reverse*) e VP1. 5 (*foward*) (Origen- Rockville, EUA). Em seguida, utilizou-se 1,0 µl do produto da amplificação (PCR) para a reação de sequenciamento, conforme o protocolo descrito do Kit ET (Amersham Biosciences, UK): 40 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 55 °C por 10 segundos e 60 °C por 1 minuto. Após amplificação os produtos foram precipitados com acetato de amônio 7,5 M e 2,5 vezes volumes de etanol absoluto por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi centrifugada por 30 minutos (4 °C – 3800 r.p.m.) e após lavagem com etanol 70 %, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado dissolvido em 5,0 µl de tampão formamida. O sequenciamento foi feito utilizando o aparelho Mega BACE 1000 (DNA Analysis System, Amersham Biosciences, UK).

A confirmação das sequências obtidas pelo sequenciamento como sendo sequências referentes ao transcrito Par-4 foi feita através da ferramenta de análise comparativa de sequências BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* – <http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.3 Transfecção do vetor de expressão e do siRNA para o gene Par-4

Para os ensaios de expressão e silenciamento do gene Par-4, 5×10^5 de células MCF10A ou $2,5 \times 10^5$ de células MCF-7 foram distribuídas em placas de 6 poços até atingirem a confluência específica para cada ensaio. Para os ensaios de expressão de Par-4, a confluência necessária foi de 50-70 % enquanto que para os ensaios de supressão de Par-4 por RNAi foi de 30-50 % de confluência. As células MCF7 foram transfectadas utilizando-se o reagente TurboFectin 8.0 (Origene, Rockville, EUA) e para as células MCF10A foi utilizado o reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Califórnia, EUA), seguindo as instruções dos respectivos fabricantes.

A transfecção com o reagente TurboFectin necessitou da preparação da mistura de transfecção contendo 100,0 μ l do meio de cultura sem antibiótico e sem soro com 3,0 ou 6,0 μ l do reagente turboFectin. Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, foram adicionados 1,0 μ l (1 μ g/ μ l) do vetor de expressão pCMV6-XL6-Par-4 ou do vetor de silenciamento pRS shRNA-Par-4, além dos respectivos controles negativos, na mesma concentração. Após 15 minutos de incubação, esta mistura foi adicionada por gotejamento às células em cultura contendo 3,0 ml de meio completo com soro. As células foram incubadas em estufa a 5 % de CO₂ a 37 °C por 24 h, com posterior adição dos antibióticos para seleção dos clones transfectados. Inicialmente, os clones transfectados com o vetor de expressão pCMV6-XL6-Par-4 foram selecionados com 500 μ g/ml ou 3000 μ g/ml de Geneticina (GIBCO, Gainthersburg, EUA) para as linhagens MCF10A e MCF-7, respectivamente. Para manutenção dos clones já selecionados, as células foram mantidas em uma concentração mais baixa de Geneticina: 300 μ g/ml para as células MCF10A ou 1500 μ g/ml para as células MCF-7. As células transfectadas com os vetores de supressão pRS shRNA-Par-4 foram selecionadas inicialmente com 0,75 μ g/ml de Puomicina (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, EUA).

As linhagens também foram transfectadas com oligos siRNA transientes TriFECTA™ (IDT-Integrated DNA Technologies, Iowa, EUA) para supressão de Par-4. A linhagem MCF10A mostrou-se resistente a transfecção com o reagente TurboFectin, sendo utilizado o reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen). As células

foram cultivadas em placas de 6 poços e após atingirem confluência entre 30-50 % receberam meio sem antibiótico e sem soro. Colocou-se 5,0 µl de lipofectamina em 250,0 µl de meio Opti-MEN® *I Reduced Serum Medium* (Invitrogen, Califórnia, EUA) e incubou-se por 5 minutos. Em seguida, uma mistura de 250,0 µl de meio Opti-MEN® I, contendo 5 nM de oligos siRNA (0,8 µl) foi adicionada aos tubos contendo meio e lipofectamina preparados anteriormente. Após incubação de 20 minutos a temperatura ambiente, a mistura contendo siPar-4 ou seu siRNA controle foi adicionada às células. Seguidas 6 horas de transfecção, o meio das células foi trocado por meio contendo soro.

A caracterização dos clones transfectados para confirmação da supressão ou do aumento da expressão gênica e protéica de Par-4 foi feita por imunofluorescência, PCR em tempo real e western blot.

3.4 Tratamento das células MCF7 com Docetaxel e Farnesol

Células MCF-7 transfectadas com o vetor de expressão pCMV6-Par4 ou com vetor controle pCMV6-Neo após atingirem aproximadamente 70 % de confluência foram mantidas em meio RPMI 1640 sem vermelho de Fenol (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, EUA) contendo 5 % ou 0,1 % de soro fetal bovino por 24 horas. Em seguida foram tratadas com o quimioterápico docetaxel (Taxotere - Aventis Pharmaceuticals Inc., Bridgewater, NJ) nas concentrações de 5,0 nM ou 100,0 nM ou com álcool isoprenyl Farnesol (FOH - Sigma Chemical Corporation, St. Louis, EUA) na concentração de 30,0 µM por 24 horas.

3.5 Extração de RNA Total

O RNA total das células foi extraído conforme o método descrito por Chomczynski e Sacchi (1987) ou através do kit Norgen (Thorold, Canadá), de acordo com as instruções do fabricante. Seguindo o método de extração Isotiocianato de

Guanidina e Fenol-Clorofórmio, a monocamada de células foi lavada duas vezes com tampão PBS, com posterior adição de 700,0 µl de solução D gelada (Isotiociantato de Guanidina 4 M, Citrato de Sódio 25,0 mM pH7.0, Sarcosil 0,05 % e 0,1 M de β-Mercaptoetanol 98 %). Após a lise total das células, a solução foi transferida para um novo tubo de 2,0 ml.

Em sequência foram adicionados 70,0 µl de acetato de sódio 2 M, pH 4,0; 700 µl de fenol saturado (pH 5,0-6,0); e 175,0 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (proporção 49:1). Após a adição de cada reagente, a mistura foi homogeneizada por inversão. A suspensão final foi agitada vigorosamente por 10 segundos e deixada em banho de gelo por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000 r.p.m. a 4 °C. A fase aquosa sobrenadante (referente ao RNA extraído) foi transferida para um novo tubo cuidadosamente, evitando a retirada da interfase (proteínas e fragmentos maiores de DNA) e da fase inferior (proteínas e fragmentos menores de DNA). Em seguida, a amostra foi precipitada com igual volume de isopropanol a -20 °C por 16 horas. Após este período, foi centrifugada a 10.000 r.p.m. por 20 minutos e o precipitado resultante foi dissolvido em 150,0 µl de solução D, com adição de 170,0 µl de isopropanol para nova precipitação do RNA durante 1 hora a -20 °C. Os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 10.000 r.p.m. a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 75 % e centrifugado por 10 minutos a 10.000 r.p.m. O sobrenadante foi desprezado e após secar o excesso de etanol a temperatura ambiente, o RNA foi dissolvido em água livre de RNase/DNase (GIBCO, Gaithersburg, EUA).

A concentração e pureza do RNA foram determinadas por leitura espectrofotométrica a 260 nm no geneQuant *pro* (Amersham Biosciences-Cambridge, Inglaterra). Foi utilizada uma densidade óptica (OD) igual a um que equivale a 40 µg/ml de RNA fita simples. A pureza do RNA foi avaliada pela proporção 260/280nm, que deve ficar entre 1,8 e 2,0. A qualidade (integridade) do RNA foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1 % contendo formaldeído. Para eletroforese, as amostras de RNA foram preparadas da seguinte maneira: em um volume de 3,0 µl de H₂O (livre de RNase/DNase) e 4,0 µl de tampão de aplicação (75,0 µl formamida deionizada; 24,0 µl formaldeído; 15,0 µl MOPS 10X; 10,0 µl H₂O livre de RNase/DNase; 10,0 µl glicerol; 8,0 µl azul de bromofenol

5 %) foram adicionados 1,0 µl da amostra de RNA. A mistura foi incubada por 15 minutos a 65 °C e dois minutos a 4 °C; em seguida, adicionou-se 1,0 µl de brometo de etídeo (1 mg/ml). Após aplicar o volume total no gel, a corrida eletroforética foi realizada em tampão MOPS (MOPS 0,02 M; acetato de sódio 5,0 mM; EDTA 0,1 mM; pH 7,0) a 60V (4V/cm).

3.6 Tratamento do RNA com *DNase I*

Após análise da integridade concentração, alíquotas de RNA total (3,0 µg) foram tratadas com a enzima *DNase I* (volume igual a 30 % da concentração de RNA) (1 U/µl – Promega, Madison, EUA) por 60 minutos a 37 °C, com a finalidade de eliminar possíveis contaminantes de DNA. Em seguida, o RNA foi precipitado com etanol absoluto (2,5X volumes) e Acetato de Sódio (0,2 M pH 4.0-4.6) a -20 °C por 14 a 16 h. Após este período, o RNA foi centrifugado por 30 minutos (10.000 r.p.m. a 4 °C) e lavado com etanol 75 % . O RNA foi novamente centrifugado por 20 minutos (10.000 r.p.m.) e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi seco a temperatura ambiente por 15 minutos para retirada de qualquer traço de etanol e em seguida dissolvido em água livre de RNase/DNase (GIBCO, Gainsburg, EUA).

3.7 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA utilizou-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems-Warrington, UK), seguindo as instruções do fabricante. Uma mistura contendo dNTPs, iniciadores randômicos (*random primers*), transcriptase reversa e inibidor de RNase (1 U/µl de *RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor* - Invitrogen Life Technologies, Califórnia, EUA) foi preparada e adicionada a um mesmo volume de RNA tratado anteriormente com *DNase I*. A reação de síntese de cDNA foi feita a 25 °C por 10 minutos seguida por 2 horas de

incubação a 42 °C. Para verificação da eficiência da síntese de cDNA (qualidade da amostra e massa) foram realizadas reações de amplificação (PCR), utilizando as moléculas de cDNA como molde, com o auxílio de iniciadores (oligonucleotídeos) específicos para os genes *β-2-microglobulina* (0,08 μM) e *GAPDH* (0,16 μM). As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25,0 μl utilizando-se: 2,5 μl de cDNA (diluído 1:10); 125,0 μM de dNTPs (Amersham Biosciences, Nova Jersey, EUA); 50,0 mM KCl; 10,0 mM de Tris-HCl pH 8.3; 0,1 mg/ml de gelatina; 1,5 mM MgCl₂ e 0,75 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Califórnia, EUA). Em seguida, as amostras foram amplificadas por 35 ciclos, sendo que cada ciclo corresponde: desnaturação a 94 °C por 1 minuto, hibridização a 55 °C por 1 minuto e extensão a 75 °C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram diluídos em tampão Type II e submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1,5 % (contendo 0,8 μg/ml de brometo de etídeo), utilizando-se o marcador de peso molecular de 100 bp.

3.8 Real time PCR (qPCR)

Para análise quantitativa dos transcritos diferencialmente expressos foi feita PCR em tempo real utilizando-se o reagente *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Warrington, UK) e o equipamento GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A reação de amplificação dos cDNAs foi realizada com oligonucleotídeos específicos previamente desenhados para o transcrito Par-4 e para os transcritos envolvidos nos processos de morte celular e autofagia. Foi utilizado o gene de referência *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), cuja expressão é constitutiva, para posterior análise comparativa do nível de expressão dos transcritos de interesse. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados são: Par-4, *foward* 5'- CCAGAGAAGGGCAAGAGCTCGG- 3' *reverse* 5'- ATTGCATCTTCTCGTTTCCGC - 3'; *GAPDH*, *foward* 5'- CCTCCAAAATCAAGTGGGCG - 3' e *reverse* 5'-

GGGGCAGAGATGATGACCCTT - 3'. Também utilizamos oligonucleotídeos para Bcl-2 *forward* 5'- CGACTTCGCCGAGATGTCCAG- 3', *reverse* 5'- CCGTCCCTGAAGAGCTCCTCC-3'; Bax, *forward* 5'- GGCCGGGTTGTCGCCCTTTTC-3', *reverse*, 5'- GTCCAGCCCATGATGGTTCTG-3'; Bid, *forward* 5'- AACTCCTGTGACCACAACATG-3', *reverse* 5'- CAGGAAAGCATCTGGTAAGAA-3'; Beclin *forward*, 5'- ACTTTCCAGAGCTACAACATG-3', *reverse* 5'- GTCCATGGGGTTAAGAATCAA-3'.

A expressão relativa foi calculada pela seguinte fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde: Ct = ciclo de início de quantificação do transcrito; ΔCt = Ct do gene de interesse menos o Ct do gene referência; $\Delta\Delta Ct$ = ΔCt médio da amostra de interesse menos ΔCt médio da amostra referência.

Para a análise da expressão gênica relativa das células transfectadas, utilizou-se os clones transfectados com os vetores vazios (pCMV6-NEO) ou o siRNA controle (shRNA-C-) como amostras referências ou as células cultivadas em 5% de soro normal.

3.9 Extração Proteica

Para extração de proteínas totais, as células foram primeiramente, lavadas duas vezes com PBS e incubadas com tripsina-EDTA a 37 °C para retirada da monocamada de células. As células soltas foram transferidas para um tubo de 1,5 ml e em seguida, foi adicionado o tampão de lise previamente preparado (50,0 mM de pirofosfato de sódio, 50,0 mM de fosfato de sódio, 5,0 mM de cloreto de sódio, 5,0 mM de EDTA dissódico, 5,0 mM de EGTA, 10,0 mM de HEPES, 0,5 % de Triton-X100, 2,0 mM de Ortovanadato de sódio, 1,0 mM de PMSF e 2,0 mM de inibidores de proteases (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, EUA). Esta solução ficou em gelo por 15 minutos com agitações a cada 5 minutos no vortex, para completa lise das células. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 13.000 r.p.m. (4 °C por

20 minutos). O sobrenadante correspondente ao extrato protéico foi transferido para um novo tubo e a concentração protéica determinada através do método de Bradford (Pierce, Rockford, EUA). Este método de quantificação do extrato protéico utiliza uma curva padrão com diluições seriadas de BSA (componente do kit Coomassie Plus – *The Better Bradford Assay*TM Kit, Pierce, Rockford, EUA) nas concentrações de 0 a 2,0 mg/ml e o extrato protéico diluído 10 vezes. Em uma placa de 96 poços, foram pipetados 5,0 µl das diluições de BSA bem como 5,0 µl dos extratos protéicos diluídos a serem quantificados; todas as amostras em duplicata. A seguir, foram adicionados 295,0 µl do Coomassie Plus – *The Better Bradford Assay*TM Kit (Pierce, Rockford, EUA) em cada poço e a placa foi incubada protegida da luz, por 10 minutos a temperatura ambiente. A leitura da placa foi feita à 595 nm no leitor de placas *Biotrak II Plate Reader* (Amersham Biosciences, Cambridge, Inglaterra). Os valores das absorbâncias da curva padrão BSA foram plotados em um gráfico, e as concentrações dos extratos protéicos determinadas a partir da equação da reta da curva padrão.

3.10 Western Blot

Os extratos protéicos quantificados e aliqotados com 30,0 µg de proteína foram desnaturados a 95 °C por 5 minutos com tampão de Laemmli 6X (7,5 % Tris 2M pH 6,8; 0,5 % SDS; 5 % azul de bromofenol; 26 % glicerol; 16,5 % de 2-mercaptoetanol), em um volume apropriado para a concentração final de 1X. Em seguida, as amostras foram separadas por eletroforese em gel de SDS-PAGE 10 % em tampão de corrida Tris-Glicina (3,0 g/l Tris-Base; 14,5 g/l Glicina, 0,1 % de SDS). A corrida foi realizada a 70 V durante 20 minutos e posteriormente a 100 V por aproximadamente 2 horas. Após este período, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Pierce, Rockford, EUA) por 50 minutos a 15 V, utilizando-se o Trans-Blot SD *Semi-dry Transfer Cell* (Bio-Rad, EUA) e tampão de transferência (48,0 mM Tris, 39,0 mM Glicina, 0,00375 % SDS e 20 % de metanol). Em seguida, as membranas foram bloqueadas em solução de 5 % de leite desnatado

em TBS-T (2,42 g/l Tris-Base; 8,0 g/l NaCl; acrescidos de 0,1 % de Tween-20 -MP Biomedicals, Ohio, EUA), sob agitação, por 16 horas a 4 °C. A incubação com os anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio (Tabela 1) foi feita durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Após sequência de lavagens de quatro vezes por 5 minutos com TBS-T e uma vez com TBS por 10 minutos, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário apropriado associado à peroxidase por 1,5 h a temperatura ambiente. A detecção das proteínas na membrana foi realizada por quimioluminescência com o kit ECL™ *Western Blottin Detection Reagents* (Amersham, UK) por 5 minutos a temperatura ambiente, seguindo as recomendações do fabricante. A revelação foi realizada em câmara escura com exposição da membrana ao filme de raio-X Amersham Hiperfilm™ ECL (GE healthcare, Buckinghamshire, UK) por 2-40 minutos a temperatura ambiente.

As membranas hibridizadas anteriormente puderam ser re-utilizadas para novas incubações com outros anticorpos, após passarem pelo processo de *stripping* (retirada dos anticorpos hibridizados). Para isso, as membranas foram incubadas em solução de *stripping* (50,0 mM de tampão Tris pH 6,8; 2 % de SDS e 0,1 M β-mercapto etanol) durante 20 minutos a 50 °C sob leve agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas por quatro vezes de 5 minutos com tampão TBS-T e uma vez de 10 minutos com tampão TBS, a temperatura ambiente sob agitação. Após este procedimento as membranas foram novamente bloqueadas e incubadas com outros anticorpos, seguindo o protocolo descrito anteriormente.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nas hibridizações do Western blot.

ANTICORPO	Empresa/Código	Diluição	Peso molecular	Diluição secundário
anti-β-actina	Millipore (MAB1501R)	1/2.000	42kDa	mouse 1/10.000
anti-Par-4	Abcam (ab5787)	1/1.000	41kDa	rabbit 1/10.000
p-ERK (E4)	Santa Cruz (sc-7383)	1/200	42/44kDa	mouse 1/1.000
p-Akt 1/2/3 (Thr 308)-R	Santa Cruz (sc-16646-R)	1/500	56/60kDa	rabbit 1/4.000

3.11 Densitometria

As análises semi-quantitativas da expressão protéica foram determinadas por densitometria da intensidade das bandas do Western Blot. Utilizou-se a expressão da proteína β -actina como controle de massa para a normalização dos resultados. As densitometrias foram realizadas utilizando o *software* ChemiImager™4400 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, EUA).

3.12 Imunofluorescência

Ao atingir confluência de 70 %, as células foram lavadas com PBS 1X e fixadas com paraformaldeído (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, EUA) 4 % em PBS durante 20 minutos. A permeabilização foi feita com Triton-X100 0,5 % (USB Corporation, Cleveland, USA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionada a solução de bloqueio 1 % BSA (*Bovine serum albumin* - Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, EUA) por 1 hora a temperatura ambiente. As células foram incubadas com anticorpo primário por 14-16h em câmara úmida nas diluições específicas descritas na tabela 2. Em seguida, as células foram lavadas 3X com PBS e incubadas com anticorpo secundário por mais 1 hora (câmara úmida) protegidas da luz. Após lavagens com PBS, os núcleos celulares foram marcados com *Hoechst 33342* (Invitrogen, Carlsbad, EUA) durante 10 minutos, protegidos da luz. Seguida a montagem das lâminas, as células foram visualizadas no microscópio Confocal Zeiss LSM 510 META /UV.

Tabela 2 - Anticorpos utilizados para análise de imunofluorescência

ANTICORPO	Empresa/Código	Diluição	Secundário	cor/diluição
Par-4 (A-10)	Santa Cruz (sc-1666)	1/100	mouse Alexa fluor 546	laranja 1/300
Tubulina Beta	Origene (TA300713)	1/300	rabbit Alexa fluor 488	verde 1/300
Caspase 7 cleaved (Asp 198)	Cell Signalling (9491)	1/50	rabbit Alexa fluor 488	verde 1/300
Caspase 3 cleaved (Asp 175)	Cell Signalling (9661)	1/50	rabbit Alexa fluor 488	verde 1/300

3.13 Ensaios de Morfogênese e Imunofluorescência 3D

As linhagens MCF10A e MCF-7 serão cultivadas em seus meios específicos até atingirem uma confluência de 100 % para serem inoculadas nas lâminas de 8 poços contendo Matrigel, conforme descrito anteriormente no item 3.1.2. Seguindo o protocolo descrito por Debnath et al. (2003), com algumas alterações, as lâminas serão lavadas com PBS e posteriormente fixadas com Paraformaldeído 4 % por 25 minutos. A permeabilização será feita com Triton-X100 0,5 % por 45 minutos e o bloqueio com o tampão IF 1X (NaCl 130,0 mM, Na₂HPO₄ 7,0 mM, KH₂PO₄ 3,5 mM, NaN₃ 7,7 mM, 0,1 % BSA, 0,2 % Triton X100 e 0,05 % Tween-20) contendo 5 % de soro de cabra (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, EUA) durante 1 hora a temperatura ambiente. As células em seguida receberão uma segunda solução de bloqueio contendo o fragmento Fab` (5 µg/ml – Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, EUA) diluído na mesma solução de bloqueio primária (IF 1X com 5 % soro de cabra) por 40 minutos. Os anticorpos serão incubados por 16 horas em câmara úmida a temperatura ambiente. Utilizaremos o anticorpo monoclonal anti-Par-4 da Santa Cruz, Inc., na diluição 1:50. As células serão incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse-Alexa 546 (Invitrogen, 1:300) durante 1 hora a temperatura ambiente protegidas da luz. A marcação nuclear será feita com *Hoechst* 33342 (Invitrogen, Carlsbad, EUA) por 15 minutos protegida da luz. Posteriormente, as lâminas serão montadas e analisadas no microscópio Confocal Zeiss LSM Meta 510.

3.14 Análise da Apoptose

3.14.1 Por marcação dupla *Hoechst/Acridina Orange*

Análise semi-quantitativa do número de células em apoptose foi feita pela técnica de marcação dupla *Hoechst/Acridina Orange* descrito por (Xin Kai et al.,

2010). As células após serem fixadas em Paraformaldeído 4 % foram marcadas com os fluoróforos Acridina *Orange* (8,5 µg/ml) e com o marcador nuclear *Hoechst* 33342/Dapi (5 µg/ml) por 10 minutos protegidos da luz e examinadas no microscópio Confocal Zeiss LSM 510 META /UV. Este método de coloração marca células com características de apoptose: cromatina condensada, fragmentação nuclear, desaparecimento de nucléolo, aumento da fluorescência laranja nuclear e aparecimento de corpos apoptóticos. As células viáveis aparecem com coloração verde brilhante (núcleo intacto com presença de nucléolos) e as células em apoptose exibem núcleo verde ou de coloração laranja (apoptose tardia) com condensação de cromatina visível e desaparecimento dos nucléolos. As células em necrose podem aparecer com coloração laranja, mas não apresentam condensação da cromatina. A quantificação das células em apoptose foi feita através do software *ImageJ Launcher* (*Image Processing and Analysis in Java, National Institutes of Health, EUA*) , contando-se 10 campos para cada tratamento. Para análise estatística utilizou-se o teste Mann-Whitney (SPSS® Inc.) que avaliou a média da porcentagem de apoptose nos diferentes grupos de tratamento.

3.14.2 Por citometria AnexinaV-FITC

Para avaliar a apoptose das células, utilizamos o Kit Annexin V-FITC *APOPTOSIS DETECTION KIT I* (BD Pharmingen- Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O método se baseia na detecção das células apoptóticas marcadas com Anexina V conjugada a fluoresceína (Anexina V-FITC). Nos estágios iniciais da apoptose, uma das alterações da membrana plasmática é a translocação da proteína fosfatidilserina (PS-*phosphatidylserine*) da face interna da membrana para a superfície externa, tornando-a acessível a proteína anticoagulante Anexina V, que possui alta afinidade à proteína PS. Para distinção entre as células apoptóticas e necróticas, foi utilizado o marcador de viabilidade nuclear PI (*red-fluorescent propidium iodide*), uma vez que este só é permeável às células que apresentam a membrana plasmática danificada (ou seja, em processo de necrose). Resumidamente,

10^6 células foram incubadas com 5,0 μ l de Anexina V-FITC e 5,0 μ l de PI durante 15 minutos, protegidas da luz. Em seguida, foi adicionado 400,0 μ l do tampão de ligação fornecido pelo kit (0,1 M Hepes/NaOH (pH 7,4), 1,4 M NaCl, 25,0 mM CaCl₂). A detecção das amostras foi feita por citometria de fluxo utilizando o citômetro Attune (Life Technologies), analisando-se 10.000 eventos.

3.15 Análise da Proliferação Celular

A análise da proliferação celular foi feita utilizando o Kit *Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit* (Molecular Probes, Invitrogen), segundo o protocolo estabelecido pelo fabricante. Este ensaio colorimétrico utiliza a atividade metabólica como parâmetro para a viabilidade celular e proliferação. O ensaio baseia-se na conversão do tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) em Formazan (sal insolúvel colorido). Esta redução do MTT é feita pela enzima *redutase succinate-tetrazolium* somente nas células metabolicamente ativas.

As células foram cultivadas na proporção de $0,5 \times 10^4$ células/ poço nas placas de 96 poços com meio completo e soro. Após adesão destas células, removeu-se o meio e lavou-se duas vezes com PBS para retirar qualquer traço do vermelho de fenol presente. Adicionou-se 100,0 μ l de meio sem vermelho de fenol com 5 % ou 0,1 % de soro. Em seguida, 10,0 μ l de MTT (12 mM) foi adicionado às células e ao controle que contém apenas o meio, por 4 horas a 37 °C. A solução de HCl-SDS 0,01 M (100,0 μ l) foi adicionada em cada poço, com posterior incubação por 17 horas a 37 °C em câmara úmida. Após homogeneização, a quantificação do formazan solúvel foi feita através da leitura das amostras a 570 nm no leitor de placas *Biotrak II Plate Reader* (Amersham Biosciences, Cambridge, Inglaterra).

3.16 Análise do Ciclo Celular e Morte Celular através da marcação com PI (*Propidium Iodide*)

Para análise do ciclo e morte celular as células aderidas e em suspensão foram recolhidas, lavadas uma vez com PBS, fixadas com etanol 70% e estocados a -20° C até a análise por citometria. Posteriormente, as células fixadas foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em uma solução de PBS contendo 200 µg/ml RNase A; 0,1% Triton X-100 e 20 µg/ml Iodeto de Propídio. A progressão do ciclo celular foi analisada por citometria (FacsCalibur – BD Biosciences), utilizando o programa *Cell Quest* (Beckton Dickinson, EUA) para os cálculos da percentagem de células nos diferentes estágios do ciclo (G0-G1, S-G2/M) e das células em morte celular (sub-G1).

3.17 Análise Estatística

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

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação dos vetores de expressão pCMV6-XL6-Par-4 e dos vetores de silenciamento pRS shRNA-Par-4

Bactérias quimiocompetentes *E.coli* XL1Blue foram transformadas com o vetor de expressão pCMV6-XL6-Par-4, contendo o cDNA completo do gene Par-4, com vetor vazio pCMV6-NEO ou com os vetores de silenciamento pRS shRNA-Par-4 (Origene, Rockville, EUA). Após transformação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB-ÁGAR para posterior seleção das colônias transformadas. Para cada vetor foi feito um pré-inóculo a partir de uma única colônia de bactéria. Confirmamos a presença do inserto Par-4 nas colônias escolhidas através da amplificação pela reação de PCR, utilizando os iniciadores específicos para o gene Par-4. Posteriormente, 50 µl deste pré-inóculo foram colocados em 25 ml de meio LB com ampicilina por 16h, para amplificação e purificação dos vetores de expressão. Os vetores foram extraídos utilizando-se o kit Plasmid MIDI Quiagen.

Para avaliação dos vetores purificados foram feitos os seguintes procedimentos: digestão enzimática com enzimas de restrição; reação de amplificação (PCR) para o transcrito Par-4; e sequenciamento dos vetores.

Os vetores de expressão pCMV6-XL6-Par-4 foram digeridos com a enzima *Not I* para liberar o inserto referente a sequência codificadora de Par-4, conforme descrito no item 3 (Material e Métodos). O vetor vazio apresenta 5800 pb e o inserto contendo a sequência Par-4 apresenta um tamanho de aproximadamente 1750 pb. Verificamos após a digestão, um fragmento de 501/553 kb resultante da presença do sítio de *NotI* na sequência de Par-4, como confirmado no programa NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>).

A presença da sequência Par-4 no vetor de expressão pCMV6-XL6-Par-4 também foi confirmada pela reação de PCR com iniciadores específicos para amplificação do transcrito Par-4. Observamos que o vetor pCMV6-XL6-Par-4 apresentou amplificação do transcrito Par-4, diferente do vetor controle pCMV6-

NEO, que não apresentou amplificação do mesmo (Figura 8)

Figura 8 - Reação de amplificação do transcrito Par-4 do vetor de expressão pCMV6-XL6-Par-4 e do vetor controle pCMV6-NEO. Gel analítico representativo (2% de agarose) da reação de amplificação (PCR) utilizando iniciadores específicos para Par-4: 1- Padrão de Peso Molecular (100pb); 2- vetor de expressão pCMV6-XL6-Par-4 (proveniente da colônia transformada); 3- vetor de expressão pCMV6-XL6-Par-4 (extrato de bactérias); 4- vetor pCMV6-NEO; 5- controle negativo da reação de PCR.

Os vetores foram sequenciados com iniciadores específicos do vetor pCMV6 (XL39 *reverse* e VP1.5 *foward*) (Origene) e após análise no BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* – <http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), confirmamos a sequência do inserto para Par-4, validando os vetores para experimentos posteriores (tabela 3).

Tabela 3 - Análise comparativa das sequências dos vetores de expressão pCMV6-NEO e pCMV6-XL6-Par-4.

	IDENTIDADE
pCMV-NEO	100% pCMV6-XL4 87% pCMV6-XL3
Par-4 pCMV6-XL6	100% <i>Homo sapiens PRKC</i> , apoptosis, WT1, regulator (<i>PAWR/Par-4</i>) gene.

NOTA: A ferramenta de análise comparativa de sequências BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* – <http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) foi utilizada para validação dos vetores.

Os vetores de silenciamento pRS shRNA-Par-4 também foram purificados a partir um inóculo de 25 ml de LB através do kit Plasmid MIDI Quiagen. Em seguida, os vetores foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* para verificação da presença do inserto shRNA para os transcritos Par-4. Após a digestão enzimática, observamos a banda referente ao inserto de 402 pb e a banda referente ao vetor vazio (5120 pb).

4.2 Análise da expressão protéica basal de Par-4 na diferentes linhagens de mama

A linhagem normal MCF10A e as células tumorais de mama MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em seus respectivos meios de cultura contendo soro normal e após atingirem confluência de 70%, foram retiradas da cultura para extração total de proteínas. A expressão protéica basal de Par-4 nas diferentes células foi avaliada por western blot, utilizando o anticorpo anti-Par-4 (Abcam) (Figura 9). Observamos que as células tumorais apresentaram maior expressão de Par-4 em relação às normais MCF10A. As células hormônio-dependentes MCF-7 apresentaram 11,6 vezes da proteína Par-4 enquanto que as células de fenótipo mais agressivo MDA-MB-231 apresentaram 2,8 vezes da proteína em relação à MCF10A.

Figura 9 - Expressão protéica basal de Par-4 nas diferentes linhagens de mama.
A. Western Blot a partir de 30 µg de proteína total das células MCF10A, MCF-7 e MDA MB231 utilizando o anticorpo anti-Par-4 (Abcam) e anti-actina para normalização da massa.
B. Representação gráfica da razão dos valores densitométricos de Par-4 pela Actina.

4.3 Localização de Par-4 nas diferentes linhagens de mama

Na literatura, muitos estudos sugerem uma forte correlação entre a localização nuclear de Par-4 e sua função apoptótica. Objetivando avaliar a localização intracelular de Par-4 nas diferentes linhagens de mama, foram feitas imunofluorescências utilizando o anticorpo anti-Par-4 (sc-1666, Santa Cruz). Verificamos que nas células MCF10A, Par-4 encontrava-se predominantemente no citoplasma. As células tumorais MCF-7 mostravam Par-4 predominantemente no núcleo enquanto que as células hormônio independentes MDA-MB-231 mostravam Par-4 no citoplasma e no núcleo (Figura 10).

Figura 10 - Localização intracelular de Par-4 nas diferentes linhagens de mama. Imagens representativas da localização de Par-4 nas células MCF10A, MCF-7 e MDA-MB-231 por imunofluorescência, utilizando anti-Par-4 (sc-1666, Santa Cruz; em vermelho) e o marcador nuclear Hoechst/Dapi (Invitrogen; em azul). Aumento de 20X (zoom de 2-4 vezes).

4.4 Efeito da ausência de hormônios esteróidicos e fatores de crescimento na expressão protéica de Par-4

Um trabalho anterior do nosso grupo mostrou que células MCF-7 cultivadas em soro tratado apresentavam um aumento do transcrito Par-4 (Garcia, 2009). Para confirmar a influência da ausência de hormônios e fatores de crescimento na indução da expressão protéica de Par-4, células MCF-7 foram cultivadas em meio contendo 5% de soro normal (SN) ou em meio contendo 5% de soro tratado (ST) com carvão dextrana (soro livre de estrógenos e fatores de crescimento). Após 48 horas, analisou-se a expressão protéica de Par-4 por Wester Blot. Células MCF-7 cultivadas em soro tratado apresentaram maior expressão da proteína Par-4 (3 vezes) em relação as células cultivadas em soro normal (SN) (Figura 11).

Figura 11 - Efeito da ausência de hormônios esteróidicos e fatores de crescimento na expressão protéica de Par-4 nas células MCF7. A. Western blot a partir de 30 μ g do extrato protéico obtido das células MCF7 cultivadas em meio contendo 5% de soro normal (SN) ou 5% de soro tratado (ST), utilizando os anticorpos anti-Par-4 (Abcam) e posteriormente o anti-actina para normalização da massa. B. Representação gráfica da razão dos valores densitométricos de Par-4 pela Actina.

A expressão da proteína Par-4 também foi avaliada por imunofluorescência nas células MCF-7 cultivadas por 48 horas em meio contendo 5% de soro normal, 5% de soro tratado (soro tratado com carvão dextrana) ou na ausência de soro. Observamos marcação e granulação mais intensa de Par-4 nos núcleos das células cultivadas em soro tratado e nas células cultivadas em meio sem soro em relação às células em soro normal (Figura 12).

Figura 12 - Expressão de Par-4 nas células MCF-7 cultivadas em soro normal (SN), soro tratado (ST) e na ausência de soro. Imagens representativas das células MCF-7

utilizando anti-Par-4 (sc-1666 Santa Cruz; em vermelho), anti-tubulina (em verde) e o marcador nuclear Hoechst/DAPI (em azul) (aumento 20X - zoom 4X).

4.5 Efeito da ausência de hormônios esteroídicos e fatores de crescimento no ciclo celular das células MCF-7

Para investigar o efeito do aumento de Par-4 na sobrevivência e proliferação celular das células MCF-7 cultivadas em soro tratado realizamos ensaios de ciclo celular utilizando a marcação com Iodeto de Propídio (PI). Após análises por citometria, observamos uma parada no ciclo celular (*cell arrest*) nas células em soro tratado por 48 horas, com um acúmulo médio significativo de 72,74% das células na fase G0-G1 (Figura 13A) com uma média de apenas 27,1% das células ciclando (fase G2-M). Ao contrário, as células cultivadas em soro normal apresentam um equilíbrio na porcentagem de células nas fases G0-G1 (51%; média de 3 experimentos 58,8%) e nas fases G2-M (46%; média de 3 experimentos 41%) (Figura 13B) Quando avaliamos a porcentagem de células na fase sub-G1, que representa células em morte celular, encontramos um aumento de 1,9 vezes na porcentagem de morte celular das células em soro tratado comparado às células em condições normais de hormônios e fatores de crescimento (Figura 13C).

Figura 13 - Efeito da ausência de hormônios esteróidicos e fatores de crescimento no ciclo e morte celular das células MCF-7. A e B. Histogramas representativos das fases do ciclo das células cultivadas em 5% soro normal (completo) ou 5% soro tratado; gráfico em pizza mostrando a percentagem de células nas diferentes fases do ciclo: G0-G1 (2N); G2-M (4N) e sub-G1 (% morte celular). C. Gráfico de percentagem de morte celular das células MCF-7 em soro normal e soro tratado.

4.6 Efeito da ausência de hormônios esteróidicos e fatores de crescimento na expressão dos genes envolvidos nos processos de apoptose e autofagia

Para investigar o efeito do aumento da expressão de Par-4 nas células cultivadas na ausência de hormônios esteróidicos e fatores de crescimento, avaliamos o perfil de expressão de genes envolvidos nos processos de apoptose e autofagia das células MCF-7 cultivadas em meio contendo 5% de soro normal (SN) e em meio

contendo 5% de soro tratado com carvão dextrana (ST). As células mantidas em soro tratado apresentaram maior expressão dos genes pró-apoptóticos *BAX* e *BID* em relação às células mantidas em soro normal (*BAX* – 2,14 vezes, $p<0,001$; *BID* - 1,43, $p=0,08$). Verificamos um aumento da expressão do gene anti-apoptótico *BCL-2* (3,35 vezes, $p<0,01$) e do gene indutor da autofagia *BECLIN* (2,63 vezes, $p=0,03$) nas células cultivadas em soro tratado (ST) (Figura 14).

Figura 14 - Efeito da ausência de hormônios esteróidicos e fatores de crescimento na expressão dos genes BAX, BID, BCL-2 e BECLIN. Perfil de expressão dos genes envolvidos nos processos de apoptose e autofagia determinado por PCR em tempo real. As células MCF-7 foram cultivadas em meio contendo 5% de soro normal (SN) ou 5% de soro tratado com carvão dextrana (ST). As barras representam a média e o desvio padrão de três experimentos, tendo como referência as células em SN (** $p\leq 0.001$; * $p\leq 0.05$).

4.7 Efeitos do aumento da expressão de Par-4 nas células MCF10A

4.7.1 Caracterização dos clones de células MCF10A transfectadas com vetor de expressão pCMV6-XL6-Par-4

Células MCF10A foram transfectadas com os vetores de expressão pCMV6-XL6-Par-4 ou com vetor vazio pCMV6-NEO (Figura 15). Após seleção com

Geneticina (500 µg/ml), os clones MCF10A-pcNEO e MCF10A-pcPar-4 foram caracterizados para experimentos posteriores para confirmação do aumento do transcrito e da proteína Par-4.

Figura 15 - Imagem representativa das células MCF10A e dos clones MCF10A transfetados com vetores de expressão pCMV6-XL6-Par-4 e com o vetor vazio pCMV6-NEO (Aumento de 20X).

Foram extraídos RNA e proteína dos clones MCF10A-pcPar-4 e MCF10A-pcNEO e após síntese do cDNA, foi feita uma reação de amplificação (PCR) para avaliar a qualidade e integridade dos transcritos utilizando iniciadores específicos para amplificação dos transcritos *GADPH* e *β-2-microglobulina* (Figura 16). Em seguida, uma PCR em tempo real foi feita para análise da quantidade relativa dos transcritos Par-4 nas células MCF10A-pcPar-4 e MCF10A-pcNEO. O clone MCF10A-pcPar-4 apresentou um aumento da expressão relativa de Par-4 de 1,54 vezes em relação à MCF10A- pcNEO (Figura 17).

Figura 16 - Amplificação dos genes *GADPH* e β -2-microglobulina para análise da qualidade e integridade dos cDNAs sintetizados. Gel analítico representativo (2% de agarose) da reação de amplificação para os transcritos *GADPH* (2, 3 e 4) e β -2-*Microglobulina* (5, 6 e 7). 1-Marcador de peso molecular 100 pb. 2 e 5 - MCF10A. 3 e 6 - MCF10A-pcPAR-4. 4 e 7 - controle negativo da reação de amplificação.

Figura 17 - Análise da expressão dos transcritos Par-4 nos clones MCF10A-pcPar-4 e MCF10A-pcNEO. As barras representam expressão relativa do transcrito Par-4 determinadas por PCR em tempo real.

A expressão protéica de Par-4 foi analisada por Western blot, utilizando os anticorpos anti-Par-4 (Abcam) e anti- β -actina (Millipore). A análise densitométrica das bandas mostrou um aumento de 1,68 vezes da proteína Par-4 nas células MCF10A-pcPar-4 em relação ao controle MCF10A-pcNEO (Figura 18A e 18B).

Figura 18 - Expressão protéica de Par-4 nos clones MCF10A-pcPar-4 e MCF10A-pcNEO. A. Western Blot a partir de 30 µg de proteína dos clones 1 -MCF10A-pcNEO; 2 e 3 - MCF10A-pcPar-4 (2- extração Kit Norgen; 3- extração tampão lise) utilizando anti-Par-4 (Abcam) e o anticorpo β-actina (Millipore) para normalização da massa. B. Representação gráfica da razão dos valores densitométricos de Par-4 pela β-actina dos clones MCF10A-pcNEO e MCF10A-pcPar-4.

4.7.2 Efeito do aumento de expressão de Par-4 na proliferação das células MCF10A

Em cultura, observamos que as células MCF10A transfectadas com os vetores de expressão pCMV6-XL6-Par-4 apresentavam crescimento mais lento em relação as células transfectadas com o vetor vazio, como foi confirmado por ensaios independentes de proliferação, pelo método colorimétrico de redução do MTT (Invitrogen). No primeiro ensaio de proliferação, avaliamos alguma possível diferença na taxa de proliferação dos clones MCF10A-pcPar-4 e MCF10A-pcNEO cultivados em meio contendo 5% ou 0.1% de soro de cavalo (Figura 19A). Não houve diferença significativa de proliferação entre os clones mantidos em meio contendo 0,1% de soro comparado aos clones mantidos em meio contendo 5% de soro. No entanto, os clones MCF10A com aumento de expressão de Par-4 apresentaram menor taxa de proliferação em relação às células MCF10A sem o vetor ou transfectada com vetor vazio em meio contendo 5% de soro (Figura 19B). Esta

diferença foi significativa em todos os tempos ($p=0,002$ em 48h, $p=0,003$ em 72h e $p=0,0001$ em 96h). Ao avaliar a percentagem de inibição de crescimento notamos que as células MCF10A-pcPar-4 apresentavam uma inibição de 29,7% no tempo de 48 horas (Figura 19B), 27,1% no tempo de 72 horas e 37,4% de inibição no tempo de 96 horas comparados às células controle.

Figura 19 - Efeito do aumento de expressão de Par-4 na proliferação das células MCF10A. A. Curva de proliferação das células MCF10A transfectadas com o vetor de expressão pCMV6-XL6-Par-4 ou com vetor vazio (pCMV6-NEO) crescidas em meio contendo 5% ou 0,1% de soro de cavalo. B. Curva de proliferação das células MCF10A pcPar-4 e MCF10A pcNEO cultivadas em 5% soro normal e gráfico de percentagem de inibição de crescimento no tempo de 48 horas.

O resultado obtido anteriormente foi confirmado com mais dois experimentos independentes. Como mostrado na figura 20, as células com aumento de expressão de Par-4 apresentaram crescimento menor em relação aos controles (MCF10-pcNEO e MCF10A sem vetor). Esta diferença mostrou-se significativa ($p \leq 0,05$) nos tempos

de 72 horas e 96 horas em relação ao controle MCF10A pcNEO (Figura 20A) e nos tempos 48, 72 e 96 horas ($p \leq 0,001$) em relação à célula sem o vetor (Figura 20B), ambos cultivados em meio contendo 5% de soro normal. Quando avaliamos a percentagem de inibição de crescimento nas células MCF10A pcPar-4, verificamos que no tempo de 72 horas há uma inibição de 29,1% comparado a MCF10A pcNEO e uma inibição de 47,8% em relação às células MCF10A sem o vetor. No tempo de 96 horas foi observado uma inibição de 29,5% e 32,9% comparado a MCF10A pcNEO e sem vetor respectivamente.

Figura 20 - Efeito do aumento de expressão de Par-4 na proliferação das células MCF10A. A. Curva de proliferação das células MCF10A pcPar-4 comparado ao controle MCF10A pcNEO em 5% de soro normal e a percentagem de inibição de crescimento no tempo de 72h. B. Curva de proliferação do clone MCF10A pcPar-4 comparado à célula MCF10A sem o vetor em 5% de soro normal e a percentagem de inibição no tempo de 72h. As barras representam o desvio padrão dos valores em triplicata.

4.7.3 Efeito do aumento de expressão de Par-4 no perfil de expressão de genes envolvidos nos processos de Apoptose e Autofagia

Considerando a função pró-apoptótica de Par-4 descrito na literatura, avaliamos o perfil de expressão dos genes pró-apoptóticos (*BAX*, *BID*), anti-apoptóticos (*BCL-2*) e do gene relacionado ao processo de autofagia *BECLIN*, nas células MCF10A com aumento de expressão de Par-4. Dentre os genes pró-apoptóticos, foi observado um aumento de 1,81 vezes ($p=0,02$) na expressão do gene *BID* nas células MCF10A pcPar-4, enquanto que o gene *BAX* mostrou um aumento de 1,27 vezes ($p=0,5$) em relação às células com vetor vazio. O gene anti-apoptótico *BCL-2* também apresentou um aumento de expressão de 1,18 vezes ($p=0,02$) nas células MCF10 pcPar-4. O gene pró-autofágico *BECLIN* apresentou aumento de expressão (1,23 vezes; $p=0,4$) comparado às células MCF10A pcNEO (Figura 21).

Figura 21 - Efeito do aumento da expressão de Par-4 na expressão dos genes BAX, BID, BCL-2 e BECLIN. Barras representam expressão relativa dos genes envolvidos nos processos de apoptose e autofagia determinado por PCR em tempo real nas células MCF10A pcNEO e MCF10A pcPar-4.

4.8 Efeitos da diminuição da expressão de Par-4 nas células MCF10A

4.8.1 Padronização da técnica de siRNA transiente para supressão de Par-4 nas células MCF10A

O efeito da diminuição da expressão de Par-4 nas células MCF10A foi avaliado pela técnica de siRNA transiente. Primeiramente foi feita a padronização do ensaio de siRNA nas células MCF10A transfectadas com lipofectamina (Invitrogen) utilizando os oligos de supressão para Par-4 (siPar-4 - TriFECTA™) e os oligos para controle negativo (siC), nas concentrações finais de 5 nM. As células foram mantidas em cultura por 48, 72 e 96 horas após transfecção para avaliar o tempo de inibição da expressão de Par-4 nas células MCF10A (Figura 22A). Verificamos que a diminuição de Par-4 foi tempo-dependente e que no tempo de 96h ocorreu uma inibição maior da tradução de Par-4, de aproximadamente 72 % comparado ao controle (Figura 22B).

Figura 22 - Expressão protéica de Par-4 nas células MCF10A após supressão por siRNA nos diferentes tempos. A. Análise da expressão protéica de Par-4 por Western Blot nos diferentes tempos nas células MCF10A transfectadas com siPar-4 comparado ao controle siC. B. Representação gráfica da razão dos valores densitométricos de Par-4 pela β -actina referente às células MCF10A transfectadas com siPar-4.

4.8.2 Efeito da supressão transiente de Par-4 na proliferação das células MCF10A

Para análise do efeito da diminuição da expressão de Par-4 na proliferação das células normais de mama, células MCF10, após 24 horas de transfecção com os oligos siPar-4 ou siC foram plaqueadas em meio contendo 5 ou 0,5% de soro. O ensaio colorimétrico por redução do MTT (Invitrogen) foi utilizado e avaliamos a proliferação das células nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. A inibição da tradução de Par-4 resultou em aumento da proliferação das células MCF10A em ambas as condições de soro (5% ou 0,5%) (Figura 23). Foi observado maior crescimento das

células MCF10A siPar-4 em relação aos controles no tempo de 48 horas da curva de crescimento, tempo correspondente a 96 horas pós-transfecção, ou seja, tempo de maior inibição de Par-4. As células MCF10A siPar-4 cultivadas em concentrações normais de soro apresentaram uma taxa de crescimento maior (21,7% ou 1,3 vezes; tempo de 48h $p=0,02$) (Figura 23A) comparado as células MCF10A com níveis basais de Par-4 (MCF10A siC). O mesmo ocorreu com as células cultivadas em condições de carênciamento de soro, com um crescimento maior das células com diminuição de Par-4 (19,7% ou 1,2 vezes; tempo de 48h $p=0,07$) (Figura 23B).

Figura 23 - Efeito da supressão de Par-4 na proliferação das células normais MCF10A. A. Curva de proliferação das células com supressão de Par-4 por siRNA comparado ao controle MCF10A siC em 5% de soro normal e gráfico do crescimento celular no tempo de 48 horas ou 96 horas pós-transfecção. B. Curva de proliferação das células MCF10A siPar-4 comparado às células MCF10A siC em 0,5% de soro normal e gráfico do crescimento celular no tempo de 48 horas ou 96 horas pós-transfecção (* refere-se ao valor de $p<0,05$).

Os resultados obtidos anteriormente foram confirmados em outro ensaio de proliferação utilizando células MCF10A transfectadas com os mesmos oligos de

siRNA (siPar-4 - TriFECTA™) para silenciamento transiente da tradução da proteína Par-4. Como mostrado na figura 24, as células MCF10A com expressão diminuída de Par-4 apresentaram maior proliferação celular em condições normais de cultivo (5% SN) comparado ao controle (MCF10A siC); o mesmo ocorreu com as células MCF10A siPar-4 cultivadas em condições de carecimento de nutrientes e fatores de crescimento (0,5% SN) ou mesmo na presença do inibidor da via mediada pela quinase ERK (PD 5 μ M). Ao analisar o crescimento celular no tempo de maior inibição da proteína Par-4 (48h ou 96h pós-transfecção), observamos uma maior taxa de crescimento para as células MCF10A siPar-4, encontrando um aumento significativo de 45,57% (1,83 vezes) para as células em 5% SN ($p=0,006$); 19,53% (1,24 vezes) para as células em 0,5 % de soro ($p=0,2$); e um aumento de 26,41% (1,35 vezes) para as células crescidas na presença do inibidor PD ($p=0,02$) (Figura 24B).

Figura 24 - Efeito da percentagem do soro ou do inibidor PD na proliferação das células MCF10A com expressão diminuída de Par-4. A. Curvas de proliferação das células MCF10A siPar-4 e MCF10A siC cultivados em 5% de soro, 0,5% de soro ou na presença de 5 μ M do inibidor PD. B. Gráfico da proliferação celular das células MCF10A siPar-4 e MCF10A siC no tempo de 48h ou 96 horas pós-transfecção.

4.9 Efeito do aumento da expressão de Par-4 nas células tumorais MCF-7

4.9.1 Caracterização dos clones MCF-7 transfectados com vetores de expressão para Par-4

Células da linhagem de adenocarcinoma de mama MCF-7 foram transfectadas com os vetores de expressão pCMV6-XL6-Par-4 ou com o vetor vazio pCMV6-NEO (Figura 25) e selecionadas com o antibiótico Geneticina (3000 µg/ml) conforme descrito no item 3 (Materiais e Métodos). Os clones foram expandidos para extração de RNA e posterior síntese de cDNA para análise do transcrito por PCR e por PCR em tempo real. O clone de expressão MCF-7 pcPar-4 apresentou um aumento de 2,86 vezes do transcrito Par-4 em relação ao controle MCF-7 pcNEO (Figura 26). A análise protéica por Western blot mostrou um aumento de 1,62 vezes da proteína Par-4 nas células MCF-7 pcPar-4 em relação às células MCF-7 pcNEO (Figura 27A e B).

Figura 25 - Imagem representativa das células MCF-7 e dos clones MCF-7 transfectados com vetores de expressão pCMV6-XL6-Par-4 e com o vetor vazio pCMV6-NEO (Aumento de 10X e 20X).

Figura 26 - Análise da expressão dos transcritos Par-4 nos clones MCF-7 pcPar-4 e MCF-7 pcNEO. As barras representam expressão relativa do transcrito Par-4 determinadas por PCR em tempo real, utilizando a célula MCF-7 pcNEO como amostra referência.

Figura 27 - Análise da expressão protéica de Par-4 das células MCF-7 pcPar-4 e MCF-7 pcNEO. A. Western Blot com 30 µg de proteína das células MCF-7 e dos clones transfectados MCF-7 pcPar-4 e MCF-7 pcNEO. Utilizou-se os anticorpos anti-Par-4 (Abcam) e anti-β-actina (Millipore), como controle de massa. B. Representação gráfica da razão dos valores densitométricos de Par-4 pela β-actina dos clones MCF-7.

4.9.2 Localização de Par-4 nos clones MCF-7 de expressão de Par-4

Para avaliar se o aumento de expressão de Par-4 nos clones MCF-7 altera sua localização intracelular foi feita uma imunofluorescência, utilizando o anticorpo Par-4 (sc-1666, Santa Cruz). Nas células MCF-7, a localização de Par-4 é predominantemente nuclear e o aumento de expressão não alterou localização subcelular de Par-4 em relação ao controle MCF-7 pcNEO (Figura 28).

Figura 28 - Localização de Par-4 nos clones de expressão MCF-7 pcPar-4 e MCF-7 pcNEO. Imagem representativa da localização de Par-4 nas células MCF-7 transfetadas com os vetores pCMV6-XL6-Par-4 ou controle pCMV6-NEO. Em vermelho, anti-Par-4 (sc-1666, Santa Cruz); em azul marcador nuclear Hoechst/DAPI (Aumento de 20X; zoom de 2X).

4.9.3 Efeito do aumento da expressão de Par-4 na proliferação das células MCF-7

Para avaliar o efeito do aumento da expressão de Par-4 na proliferação de células de câncer de mama, células MCF-7 transfetadas com os vetores de expressão foram cultivadas em meio contendo 5 % de soro fetal bovino (5 % SN). Utilizamos o método colorimétrico de redução do MTT (Invitrogen) nos tempos 24, 48, 72 horas. Os ensaios mostraram que as células com expressão aumentada de Par-4 (MCF-7 pcPar-4) apresentaram menor proliferação em relação aos controles MCF-7 pcNEO e MCF-7 sem o vetor (Figura 29). Esta diferença foi significativa ($p \leq 0,05$) nos tempos 24h e 48h em relação a MCF-7 pcNEO e nos tempos de 24h, 48h e 72h comparado a MCF-7 sem o vetor. Quando avaliamos a taxa de crescimento no tempo de 48 horas, foi observado uma inibição de 61,3% e 45,68% no crescimento das células MCF-7 pcPar-4 comparado as células controle MCF-7 sem o vetor e MCF-7 pcNEO, respectivamente.

Figura 29 - Efeito do aumento de expressão de Par-4 na proliferação das células MCF-7. A. Curva de proliferação do clone MCF-7 pcPar-4 comparado ao controle comparado ao controle MCF-7 sem o vetor e a percentagem de inibição de crescimento no tempo de 48h. B. Curva de proliferação do clone MCF-7 pcPar-4 comparado ao controle MCF-7 pcNEO e a percentagem de inibição de crescimento no tempo de 48h. As barras representam o desvio padrão dos valores em triplicata.

4.9.4 Avaliação do envolvimento da quinase ERK no controle da proliferação por Par-4 nas células MCF-7

A via de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK atua no controle da proliferação e sobrevivência das células, e encontra-se muitas vezes alterada em diversos tumores, incluindo o câncer de mama. Para avaliar se a quinase ERK (*Extracellular-signal-regulated kinases 1,2*) está envolvida no processo de proliferação mediado por Par-4 nas células tumorais MCF-7, analisamos a ativação desta quinase nas células com aumento de expressão de Par-4. Observamos que o clone MCF-7 pcPar-4 apresentou

menor ativação de p-ERK (Figura 30A). Estes dados, embora preliminares, sugerem que o efeito do gene Par-4 na proliferação celular ocorre pela fosforilação de ERK. A densitometria das bandas mostrou que as células MCF-7 pcPar-4 apresentaram uma redução de 35 % e 48 % da proteína p-ERK em relação aos controles MCF-7 pcNEO e MCF-7 sem vetor respectivamente (Figura 30B).

Figura 30 - Análise da expressão protéica de p-ERK das células MCF-7 com aumento de Par-4. A. Western Blot com 30 µg de proteína das células MCF-7 e dos clones transfectados MCF-7 pcPar-4 e MCF-7 pcNEO. Utilizou-se os anticorpos anti-p-ERK (Cell Signalling) e o anticorpo anti-β-actina (Millipore), como controle de massa. B. Representação gráfica da razão dos valores densitométricos de p-ERK pela β-actina dos clones MCF7.

4.9.5 Efeito da expressão de Par-4 no ciclo e morte celular das células MCF-7

Avaliamos o efeito do aumento da expressão de Par-4 no ciclo celular das células MCF-7 após cultivá-las em condições normais de soro fetal bovino (5% SN) ou em soro tratado (5% ST) por 48 horas. A análise por citometria revelou 56,38% das células na fase G0-G1 e 43,7% em S/G2-M para as células com aumento de

expressão de Par-4; enquanto que para as células controle MCF-7 pcNEO observamos 64,71% das células em G0-G1 e 35,49% em S/G2-M, quando cultivadas em 5% de soro normal. Para a percentagem de células em sub-G1, que representa as células em morte celular, verificamos 2,82% para as células MCF-7 pcPar-4 e 1,28% para MCF-7 pcNeo (Figura 31A). As células cultivadas em condições de ausência de hormônios esteróidicos e fatores de crescimento apresentaram aumento significativo da percentagem de células na fase G0-G1 (parada do ciclo celular), mas sem diferenças entre MCF-7 pcNEO e MCF-7 pcPar-4. Encontramos 0,78% de células MCF-7 pcNEO em sub-G1 e 1,27% para as células com aumento de Par-4 (Figura 31B). Novos experimentos estão sendo realizados para confirmar os resultados acima.

Figura 31 - Efeito do aumento da expressão de Par-4 no ciclo e morte celular das células MCF-7 cultivadas em 5% de SN e ST. A e C. Histogramas referentes às fases do ciclo das células MCF-7 pcNEO e MCF-7 pcPar-4 cultivadas em 5% de soro normal e 5% soro tratado, respectivamente; gráficos em pizza mostrando a percentagem de células nas diferentes fases do ciclo: G0-G1 (2N); G2-M (4N) e sub-G1 (% morte celular). B e D. Gráfico de percentagem de morte celular das células MCF-7 pcNEO e MCF-7 pcPar-4 cultivadas em 5% de soro normal ou soro tratado.

4.9.6 Efeito do aumento da expressão de Par-4 no perfil de expressão dos genes envolvidos nos processos de Apoptose e Autofagia

Ao analisar o perfil de expressão dos genes envolvidos nos processos de morte celular, observamos que as células com aumento de Par-4 apresentaram expressão aumentada do gene pró-apoptótico *BID* (1,3 vezes; $p=0,06$) enquanto que a expressão do gene anti-apoptótico *BCL-2* e do gene *BECLIN* não apresentaram alterações significativas comparadas às células controle (Figura 32).

Figura 32 - Efeito do aumento da expressão de Par-4 no perfil de expressão dos genes *BAX*, *BID*, *BCL-2* e *BECLIN*. Análise da expressão dos genes envolvidos nos processos de apoptose e autofagia dos clones MCF-7 pcPar-4 e MCF-7 pcNEO, utilizando PCR em tempo real.

4.10 Efeitos da diminuição da expressão de Par-4 nas células tumorais MCF-7

4.10.1 Caracterização dos clones de supressão de Par-4 com vetor pRS shPar-4

Para avaliar o efeito da inibição transcricional e protéica de Par-4, células MCF-7 foram transfectadas com o vetor de supressão pRS shRNA-Par-4 (Origene, Rockville, EUA). Os clones de supressão MCF-7 siPar-4 e os clones MCF-7 siC (controle) foram selecionados com Puromicina (1 µg/ml) conforme descrito no item 3. Após expansão dos clones para extração de RNA e síntese de cDNA, foi feita uma reação de PCR em tempo real para avaliar quantitativamente a diminuição do transcrito Par-4 (Figura 33). O clone MCF-7 siPar-4 SEQ 1 apresentou uma redução da expressão do transcrito Par-4 de 61% e o clone MCF-7 siPar-4 SEQ2/3 apresentou uma redução de 80% do transcrito.

Figura 33 - Análise dos transcritos Par-4 nos clones MCF-7 siPar-4 e MCF-7 siC. As barras representam expressão relativa dos transcritos Par-4 determinadas por PCR em tempo real nos clones transfectados com os vetores de supressão pRS shRNA-Par-4 (SEQ1, SEQ2/3) e com vetor controle (siC-).

Posteriormente, os clones MCF-7 de supressão de Par-4 foram avaliados em relação à expressão da proteína Par-4. Observou-se uma redução de 48% da proteína Par-4 no clone MCF-7 siPar-4 (SEQ2/3) comparado ao controle MCF-7 siC- e uma redução de 30% de Par-4 no clone MCF-7 siPar-4 (SEQ1) (Figura 34).

Figura 34 - Expressão protéica de Par-4 nos clones de supressão MCF-7 siPar-4. A. Western Blot dos clones MCF-7 transfectados com os vetores de supressão para Par-4 pRS shRNA-Par-4 (SEQ1, SEQ2/3) ou com o vetor controle siC. B. Representação gráfica da razão dos valores densitométricos de Par-4 pela β -actina dos clones MCF-7 com supressão para Par-4.

4.10.2 Efeito da diminuição de Par-4 na proliferação das células tumorais MCF-7

Para avaliar o efeito da supressão de Par-4 no crescimento das células MCF-7, foram realizados ensaios de proliferação (MTT) com os clones MCF-7 siPAR-4 (SEQ2/3). Embora preliminares, as curvas de proliferação mostraram que os clones com expressão diminuída de Par-4 apresentam uma tendência a proliferar mais que os controles, quando cultivados em meio contendo 5% soro fetal bovino (Figura 35).

Figura 35 - Curvas de proliferação dos clones MCF-7 de supressão para Par-4. A. Curva de proliferação do clone MCF-7 siPar-4 (SEQ2/3) comparado a MCF-7 sem o vetor. B. Curva de proliferação do clone MCF-7 siPar-4 (SEQ2/3) comparado a MCF-7 siC.

4.10.3 Efeito da diminuição da expressão de Par-4 por siRNA transiente nas células MCF-7

Para confirmar o efeito da supressão de Par-4 nas células MCF-7 também realizamos ensaios de RNAi com oligos transientes (siPar-4 - TriFECTA™), uma vez que os clones anteriores obtidos da transfecção com os vetores shRNA perderam a estabilidade da supressão. Os ensaios mostraram que o efeito do siRNA na inibição da expressão de Par-4 foi maior no tempo de 96 horas e que os oligos siPar-4 (SEQ1 e SEQ3) apresentaram maior eficiência na inibição de Par-4 (Figura 36B). Portanto os ensaios seguintes foram feitos com a mistura destas duas sequências de RNAi

(SEQ1/SEQ3). Os níveis do transcrito Par-4 foram avaliados por PCR em tempo real (96 horas pós-transfecção) e observou-se uma redução de 66 % do transcrito Par-4 em relação ao controle (Figura 36A). Analisou-se também a ativação de p-ERK (Figura 36C), verificando um aumento significativo de ERK fosforilado nas células com silenciamento de Par-4 em relação às células com oligo controle siC- (1,22 vezes para siPar-4 seq1; 2,06 vezes para siPar-4 seq3 e 2,17 vezes para siPar-4 seq1/3).

Figura 36 - Análise da expressão dos transcritos e das proteínas Par-4 e p-ERK nas células MCF-7 com supressão transiente de Par-4. A. Barras representam expressão relativa de Par-4 determinadas por PCR em tempo real. B. Western Blot das células MCF-7 transfectadas com os oligos transientes siPar-4 (seq1, seq2 e seq3) ou com controle siC utilizando os anticorpos Par-4 (Abcam) e anti- β -actina (Millipore). C. Western blot das células MCF7 transfectadas com os oligos (seq1, seq3 e seq1/3) utilizando anti-p-ERK (Cell Signalling) e anti- β -actina (Millipore).

4.11.1 Efeito da diminuição de expressão de Par-4 por siRNA na proliferação das células MCF-7

Avaliou-se a proliferação das células MCF-7 transfectadas com os oligos siPar-4 para diminuição de Par-4 (SEQ1/3) ou com os oligos controle (siC-) nos tempos de

0, 48, 96 e 144 horas. Os ensaios de proliferação pelo método colorimétrico de redução do MTT (Invitrogen) foram feitos com as células cultivadas em 5% ou 0,5% de soro fetal bovino. Os resultados obtidos foram significativos e confirmam os dados anteriores: células MCF-7 com expressão diminuída de Par-4 apresentaram maior taxa de proliferação em relação às células MCF-7 siC, tanto em 5 % (0h, $p=0,002$; 48h, $p=0,004$; 96h, $p=0,002$; 144h, $p<0,0001$) quanto em 0,5 % de soro fetal bovino (0h, $p=0,001$; 48h, $p=0,012$; 96h, $p=0,010$; 144h, $p=0,001$) (Figura 37A). Quando analisamos a percentagem de proliferação, as células MCF-7 siPar-4 apresentaram um aumento de 44,88% ou 1,81 vezes em relação ao controle MCF-7 siC em 5% de soro normal enquanto que as células MCF-7 siPar-4 cultivadas em 0,5% de soro apresentaram um aumento de 50,92% ou 2,03 vezes na taxa de proliferação, no tempo de 96 horas.

Figura 37 - Efeito da supressão de Par-4 na proliferação das células MCF-7. A. Curva de proliferação das células MCF-7 transfectadas com siPar-4 transiente (siSEQ1/3) ou com siC em meio contendo 5% ou 0,5% de soro fetal bovino (SN). As barras representam o desvio padrão dos valores em triplicata. B. Gráfico da percentagem de inibição de crescimento no tempo de 96 horas.

4.11.2 Efeito da diminuição de expressão de Par-4 no perfil de expressão dos genes envolvidos nos processos de Apoptose e Autofagia

A análise do perfil de expressão dos genes envolvidos nos processos de apoptose e autofagia nas células MCF-7 transfectadas com oligos transientes siPar-4 confirmou o papel de Par-4 como mediador da apoptose. As células com supressão de Par-4 apresentaram significativa redução da expressão do gene pró-apoptótico *BID* (88% ou 8,1 vezes; $p=0,0003$) e um aumento expressivo do gene anti-apoptótico *BCL-2* (4,66 vezes; $p=0,06$) em relação ao controle MCF-7 siC. O gene regulador da autofagia Beclin também apresentou expressão aumentada em relação ao controle (2,12 vezes; $p=0,23$) (Figura 38).

Figura 38 - Efeito da diminuição de Par-4 no perfil de expressão dos genes *BAX*, *BID*, *BCL-2* e *BECLIN*. Perfil de expressão dos genes envolvidos nos processos de apoptose e autofagia determinado por PCR em tempo real nos clones MCF-7 transfectados com os oligos siPar-4 transientes (96h pós transfecção).

4.12 Efeitos do aumento da expressão de Par-4 na sensibilidade ao quimioterápico docetaxel nas células MCF-7

Células MCF-7 transfectadas com o vetor de expressão pCMV6-Par4 ou com vetor controle pCMV6-Neo após atingirem aproximadamente 70% de confluência foram mantidas em 5% ou em 0,1% de soro fetal bovino por 24 horas. Em seguida foram tratadas com o quimioterápico docetaxel nas concentrações de 5 nM ou 100 nM por mais 24 horas. Por imunofluorescência, avaliou-se a proteína Par-4 e a ativação da caspase-7 nas células tratadas. Observamos que nas células com características de apoptose Par-4 mostrava-se menos expressivo com marcação mais intensa para caspase-7, no núcleo condensado das células (Figura 39).

Figura 39 - Efeito do aumento da expressão de Par-4 na ativação da caspase-7 após tratamento das células MCF-7 com docetaxel. Imagem representativa de células MCF-7 transfectadas com o vetor pCMV6-Par-4 ou com respectivo vetor controle tratadas com docetaxel (5 nM) por 24 horas. As células foram marcadas com os anticorpos Par-4 (em vermelho) e *cleaved* caspase - 7 (em verde) (aumento de 63X).

Uma análise semi-quantitativa do número de células em apoptose foi feita pela técnica de marcação dupla *Hoechst/Acridina Orange* descrito por (Xin Kai et al., 2010). Primeiramente foi avaliado o efeito do carenciamento do soro (0,1 % de soro) nas células MCF-7 transfectadas sem tratamento com quimioterápico. Notamos que as células com aumento de expressão de Par-4 apresentaram maior proporção de células em apoptose em relação aos controles (12,52 versus 4,14; $p=0,005$) (Figura

40).

Figura 40 - Efeito do carenciamento de soro nas células MCF7-pcPar-4 e MCF7-pcNEO. Barras representam médias das porcentagens de apoptose com erro padrão das células MCF7 transfectadas com o vetor pCMV6-Par-4 ou com respectivo vetor vazio, cultivadas em meio contendo 0,1% de soro fetal bovino por 48 horas. Contagem de 10 campos para cada grupo ($p \leq 0.05$).

Os clones mantidos em soro carenciado e tratados com docetaxel (5 nM e 100 nM) por 24 horas também foram avaliados. Observamos que os clones MCF-7 com aumento de expressão para Par-4 apresentaram mais células em apoptose (cromatina condensada, fragmentação nuclear, desaparecimento de nucléolo, aumento da fluorescência laranja nuclear e aparecimento de corpos apoptóticos) comparado às células com vetor vazio em ambas as concentrações de docetaxel (Figura 40). As células com aumento de Par-4 apresentam características de apoptose (cromatina condensada e fragmentada, *blebbings* e formação de corpos apoptóticos) que ficam evidentes no aumento de 63 vezes (Figura 41B).

A quantificação das células em apoptose através do software *ImageJ Launcher* mostrou um aumento significativo de apoptose nas células com aumento de expressão para Par-4 em relação às células MCF-7 pcNEO tratadas com 5 nM de docetaxel (13,24% apoptose versus 3,89% ; $p=0,001$). O mesmo ocorreu com as células tratadas com 100 nM docetaxel (24,81% apoptose para as células MCF-7 pcPar-4 versus 6,07% para as células controle; $p<0.0001$) (Figura 41C).

Figura 41 - Aumento da expressão de Par-4 sensibiliza as células ao tratamento com docetaxel. A. Imagens representativas das células marcadas com *Hoechst/Acriflavina Orange* para análise das células em apoptose (em laranja). Células MCF-7 transfectadas com o vetor pCMV6-Par-4 ou com vetor vazio tratadas com docetaxel (DOC – 5 nM) por 24 horas (Imagens com aumento de 20X; e em detalhe com zoom de 4X. B. Células MCF-7 pcPar-4 em aumento de 63 vezes com detalhe das figuras apoptóticas após tratamento com 5 nM e 100 nM de docetaxel C. Barras representam médias das porcentagens de apoptose com erro padrão após tratamento com docetaxel (5 nM e 100 nM). Dez campos foram contados para cada grupo ($p \leq 0.001$).

A apoptose também foi avaliada utilizando o método de marcação da anexina por citometria de fluxo. As células MCF-7 com aumento de Par-4 apresentaram maior percentagem de células marcadas com anexina (13,77%) comparado as células controle MCF-7 pcNEO (7,5%) (Figura 42A). Após tratamento com 100 nM de docetaxel por 24 horas verificamos 15,07 % de apoptose precoce para MCF-7 pcPar-4 e 11,51 % para MCF-7 pcNEO (Figura 42B). Quando analisamos a quantidade total de anexina após tratamento com 100 nM de docetaxel, ou seja, apoptose precoce e tardia, verificamos 30,56 % para as células MCF-7 pcPar-4 enquanto que as células controle apresentaram menor percentagem de células em apoptose, 22,4 % (Figura 42B). Para confirmar os resultados anteriores, foi avaliado a sensibilidade ao docetaxel das células MCF-7 com expressão diminuída de Par-4, utilizando siRNA transiente. As células MCF-7 siPar-4 apresentaram menor percentagem de apoptose (28,53 %) comparado às células com níveis basais de Par-4 (36,97 %) após

tratamento com 100 nM de docetaxel (Figura 42C).

Figura 42 - Efeito da expressão de Par-4 na apoptose das células MCF-7 após tratamento com docetaxel. A e B. Dot plot das células MCF-7 pcNeo e pcPar-4 mostrando percentagem de células em apoptose precoce (vermelho) e apoptose tardia (preto) e gráficos mostrando marcação de anexina total sem tratamento e após tratamento com 100 nM de docetaxel. C. Dot plot das células MCF-7 transfetadas com siRNA para inibição da expressão de Par-4 comparado ao controle MCF-7 siC, mostrando a percentagem de células em apoptose precoce (vermelho) e apoptose tardia (preto) e gráfico mostrando marcação de anexina total após tratamento com docetaxel.

4.13 Efeito do aumento de expressão de Par-4 na sensibilidade ao Farnesol (FOH) nas células MCF-7

Células MCF-7 transfetadas com o vetor de expressão pCMV6-Par4 ou com vetor controle pCMV6-Neo foram mantidas em soro normal ou soro carenciado (0,1 % SFB) por 24 horas e em seguida foram tratadas com o álcool isoprenyl Farnesol (FOH) na concentração de 30 μ M durante 24 horas. Posteriormente foi feita uma

análise semi-quantitativa do número de células em apoptose pela técnica de marcação dupla *Hoechst/Acridina Orange* descrito por (Xin Kai et al., 2010). Observou-se que as células MCF-7 com aumento de Par-4 apresentaram mais células em apoptose comparado às células controle (MCF-7 pcNEO) após tratamento com FOH (5,8 versus 2,83; $p=0,011$) (Figura 43).

Figura 43 - Efeito do aumento da expressão de Par-4 na sensibilidade ao Farnesol nas células MCF-7. A. Imagens representativas das células MCF-7 pcNEO e MCF-7 pcPar-4 tratadas com 30 μ M de Farnesol por 24 horas e marcadas com laranja de acridina para visualização das células em apoptose (em laranja). B. Barras representam médias das porcentagens de apoptose com erro padrão após tratamento com Farnesol (30 μ M) por 24 horas. Dez campos foram contados para cada grupo ($p \leq 0.05$).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Alterações nas vias que regulam a proliferação e apoptose são eventos freqüentes na tumorigênese. O estudo de genes que regulam estes processos celulares é de fundamental importância para a busca de novos marcadores para prognóstico, diagnóstico e preditivos de resposta terapêutica para os diversos tipos tumorais. O gene *Par-4*, objeto deste estudo, mostra-se um candidato em potencial como alvo terapêutico ou como marcador prognóstico em diversos tipos de tumores (Gurumurthy e Rangekar, 2004; Zhao et al., 2007; Kline et al., 2009; Nagai et al., 2010).

Avaliamos a expressão protéica basal de *Par-4* nas diferentes linhagens de mama e observamos uma expressão menor de *Par-4* nas células tumorais hormônio-independentes MDA-MB-231 em relação às células hormônio-dependentes MCF-7. As células MDA-MB-231 de fenótipo agressivo apresentam potencial tumorigênico em camundongos imunossuprimidos e capacidade invasiva, o que não ocorre com a linhagem MCF-7 (Tsai et al., 2003), indicando uma possível relação entre expressão diminuída de *Par-4* com um fenótipo mais agressivo dentro das linhagens tumorais de mama. Outros estudos também mostram uma correlação da expressão negativa de *Par-4* com pior prognóstico. Um estudo do nosso grupo (Nagai et al., 2010) analisou 1.161 amostras de pacientes com câncer de mama e observou que 57% foram negativas para expressão de *Par-4* apresentando pior prognóstico comparado aos tumores positivos para *Par-4*.

Observamos no presente estudo que as células normais de mama MCF10A, por sua vez, apresentaram menor expressão de *Par-4*, em relação às células tumorais. Uma possível explicação é que *Par-4* se encontra com expressão diminuída ou indetectável nas células ductais da mama diferenciadas. Boghaert e colaboradores (1997) avaliaram a expressão protéica de *Par-4* nos diversos tecidos de ratos e verificaram a presença de *Par-4* nas células basais mas não nas células ductais diferenciadas dos parênquimas mamário ou prostáta, sugerindo que *Par-4* diminui durante a diferenciação. A linhagem MCF10A é de origem epitelial e apresenta características morfológicas de células luminais ductais e não das células

mioepiteliais, apesar de sua caracterização molecular sugerir uma origem basal (Charafe-Jauffret et al., 2006). O estudo de Zapata-Benavides et al. (2009) também avaliou a expressão de Par-4 em tecidos normais e tumorais de mama e relatou a ausência de marcação para Par-4 na glândula mamária normal. Entretanto, um trabalho recente do laboratório (Rieger, 2011) avaliou a expressão de Par-4 em diferentes tipos de lesões proliferativas mamárias, observando marcação nuclear e citoplasmática da proteína Par-4 nestas lesões e no parênquima mamário normal.

Observamos que as células MCF-7 hormônio-responsivas quando cultivadas em soro tratado com carvão dextrana (ST - soro livre de esteróides e fatores de crescimento) apresentaram aumento significativo da proteína Par-4 em relação às células cultivadas em soro normal. Este resultado confirma dados anteriores do laboratório (de Bessa Garcia et al., 2009) em relação ao transcrito Par-4, que também mostrou-se aumentado (2-4 vezes) nas células MCF-7 quando cultivadas em soro tratado por 48 horas. No presente estudo investigamos qual seria o efeito da ausência de hormônios e fatores de crescimento em relação ao aumento de Par-4 no ciclo celular e morte das células tumorais MCF-7. Nós observamos que a ausência de esteróides e fatores de crescimento induziu uma parada (*cell arrest*) na fase G0/G1 do ciclo celular e um aumento na população sub-G1, que representa células em apoptose. Este resultado corrobora outros estudos publicados, no qual células MCF-7 cultivadas na presença de soro tratado com carvão dextrana ou na ausência de estrógenos param de proliferar e se acumulam significativamente na fase G0/G1 do ciclo celular (Osborne et al., 1984; Villalobos et al., 1995). Embora nós verificássemos uma pequena proporção de células em sub-G1, encontramos um aumento significativo da expressão de BAX, sugerindo que o soro tratado levou a indução da via intrínseca do processo de apoptose. Este resultado corrobora outro estudo, no qual células tumorais de colangiocarcinoma cultivadas na ausência de soro mostraram aumento da proteína Par-4 associado ao aumento significativo da proteína BAX e das atividades das caspases 3 e 8 (Franchitto, 2010). Um estudo de Chan et al., 1999 observou que os níveis transcricionais e protéicos de Par-4 aumentam rapidamente e progressivamente em decorrência da retirada de fatores de crescimento de neurônios do hipocampo. Além disso, confirma-se que Par-4 foi um mediador da apoptose induzida pela ausência de fatores de crescimento e sua ação

ocorre precocemente no processo apoptótico, antes da disfunção mitocondrial, ativação de caspases e alterações nucleares. Também analisamos o perfil de expressão de outro gene indutor da apoptose *BID* e do gene anti-apoptótico *BCL-2*, pertencentes a família Bcl-2 (*The B-cell lymphoma protein-2 family*) que apresentam papéis importantes na regulação da via “intrínseca” mitocondrial da apoptose (Boehrer et al., 2002). Nas células MCF-7 cultivadas em soro tratado, notamos que estes dois genes encontravam-se aumentados, o mesmo ocorrendo com o gene associado ao processo de autofagia *BECLIN*. Considerando que a proteína Par-4 encontrou-se aumentada nas células cultivadas em ST, este resultado, embora preliminar, corrobora dados da literatura de que o tratamento do soro é um estímulo pró-apoptótico, além de possivelmente possuir função indutora de autofagia, sugerindo que o aumento de Par-4 está associado ao estímulo de morte celular nas células de adenocarcinoma de mama MCF-7.

Verificamos neste estudo que o aumento da expressão de Par-4 nas células epiteliais normais de mama MCF10A causou um efeito inibitório na proliferação destas células. A célula tumoral MCF-7 também teve sua taxa de crescimento diminuída com o aumento de expressão de Par-4. Corroborando este dado, células MCF-7 com expressão diminuída de Par-4 pela técnica de siRNA, tiveram uma maior taxa de proliferação em relação às células controle. Estes resultados indicam pela primeira vez, o papel de Par-4 no controle da proliferação das células normais e tumorais de mama. Outro estudo do nosso grupo publicado recentemente (Casolari et al., 2011) mostrou que a expressão de Par-4 é regulada negativamente pelo fator de crescimento IGF-1 (*Insulin-like growth factor-1*) e pelo hormônio 17 β -Estradiol. O papel destes mitógenos como indutores da proliferação e carcinogênese da glândula mamária podem estar vinculados a diminuição da expressão de Par-4. O estudo de Franchitto e colaboradores (2010) também mostrou o envolvimento de Par-4 na proliferação nas células tumorais de HuH-28 e TFK-1 (intra e extra-hepática CCA, respectivamente). O silenciamento de Par-4 por siRNA nestas células induziu a proliferação celular e aumentou a expressão da proteína PCNA (*Proliferating cellular nuclear antigen*), um marcador de proliferação. Fibroblastos embriogênicos imortalizados (EFs) deficientes em Par-4 e com PTEN silenciado por shRNA apresentaram proliferação aumentada, demonstrando o efeito sinérgico da inibição

destes dois supressores na ativação das vias de NF- κ B e Akt (Fernandez-Marcos et al., 2009).

Ao avaliarmos a ativação da quinase ERK, observamos que as células MCF-7 com aumento da expressão de Par-4 mostrou menor fosforilação da quinase ERK (*Extracellular-signal-regulated kinases 1,2*), ou seja, menor ativação desta quinase. As células MCF-7 com supressão de Par-4 por siRNA mostraram, por sua vez, maior ativação de ERK. Embora novos estudos sejam necessários para comprovar esta hipótese, nossos resultados indicam que o papel funcional de Par-4 no controle da proliferação celular e sobrevivência das células tumorais de mama é mediado pela quinase ERK e possivelmente pela via Ras/Raf/MEK/ERK. O envolvimento de Par-4 com a via MEK-ERK já foi relado no estudo de Qiu et al (1999), mostrando que a expressão ectópica de Par-4 em células transformadas pelo oncogene Ras impede a formação de colônias no ágar. Este papel anti-transformação celular de Par-4 é atribuído a inibição da expressão de ERK pela proteína Par-4. Outro estudo verifica que os níveis transcricionais e protéicos de Par-4 são reduzidos pela proteína Ras em vários tipos celulares através da via MEK-ERK, indicando que a diminuição de Par-4 é um evento importante para a progressão tumoral (Barradas et al., 1999). A quinase ERK pode diretamente ou indiretamente fosforilar muitos fatores de transcrição envolvidos no controle do ciclo celular e ativação da proliferação e sobrevivência celular, incluindo NF- κ B, Ets-1, c-jun e c-myc (Nakano et al., 1998; McCubrey et al., 2007). Vários componentes da via ERK estão mutados ou são aberrantemente expressos nos tumores humanos, incluindo o câncer de mama (McCubrey et al., 2007).

Na literatura, a principal função de Par-4 está relacionada à sua atividade sensibilizadora ou indutora da apoptose (Gurumurthy e Rangnekar, 2004; Shrestha-Bhattarai e Rangnekar, 2010). Ao avaliar a expressão dos genes reguladores do processo de morte celular, observamos que as células MCF10A com aumento de expressão de Par-4 apresentaram aumento de expressão dos genes pró-apoptóticos, especialmente de *BID*. Membro da subclasse “*BH3-only*”, ou seja, possui somente o domínio 3 dos quatro domínios pertencentes a família BCL-2 (BH1, BH2, BH3 e BH4), Bid mostra-se uma proteína chave do processo apoptótico, uma vez que conecta a via extrínseca ativada pelas citocinas pró-apoptóticas e pró-inflamatórias (FasL, TNF- α) a via intrínseca mitocondrial (Degterer e Yuan, 2008). Após ativação

dos receptores de morte (TRAIL, CD95L) pelos seus ligantes, um domínio de morte denominado DISC (*Death inducing signaling complex*), é formado com a proteína adaptadora FADD que se liga as moléculas de pro-caspase-8. DISC cataliza a ativação da caspase-8 que por sua vez cliva Bid, ativando-o. Bid ativo (tBid – forma truncada) pode diretamente induzir a ativação da caspase-3 ou interagir com Bak e Bax, induzindo a permeabilização da membrana mitocondrial para liberação do citocromo c. Assim, Bid atua amplificando o sinal apoptótico, ativando também a via intrínseca (mitocondrial) (Degterer; Yuan, 2008; Galluzzi et al., 2011). Embora preliminares, os resultados obtidos nas células MCF10A sugerem que o aumento de Par-4 aumenta a expressão de Bid, sinalizando primariamente para via apoptótica extrínseca com posterior potencialização do sinal para ativação da via mitocondrial. O estudo de MacLean et al. (2011) mostrou que o extrato de *cranberry* (*Vaccinium macrocarpon*), rico em compostos fenólicos, induz as células tumorais de próstata (DU145) a apoptose via clivagem da proteína pró-apoptótica Bid pela caspase-8. Esta indução da apoptose pode ser em decorrência do aumento dos níveis de Par-4, que por sua vez causa a ativação da caspase-8. Caspase-8 ativada aumenta a clivagem de Bid que cataliza a oligomerização de Bax para formação do poro na mitocôndria com consequente liberação de citocromo c. Outro estudo verificou que a expressão de Par-4 aumenta a clivagem da caspase-8 e da proteína Bid, translocando-a para a mitocôndria com consequente aumento da liberação do citocromo c (Boehrer S, 2004). Também confirmamos a importância de Bid na via apoptótica induzida por Par-4 nas células MCF-7 com supressão de Par-4. Células MCF-7 transfectadas com siRNA para silenciamento de Par-4 apresentaram significativa redução da expressão de *BID*.

Observamos um aumento de expressão do transcrito anti-apoptótico *BCL-2* nas células MCF-7 cultivadas em soro tratado e nas MCF10A com aumento de Par-4, sugerindo um possível mecanismo de defesa contra indução de apoptose por Par-4. Os dados encontrados em relação à modulação da expressão de Bcl-2 por Par-4 diferem de alguns estudos da literatura que mostram uma correlação inversa entre a expressão destas duas proteínas. Nas células tumorais MCF-7 com expressão diminuída de Par-4 por siRNA, verificamos um aumento ainda maior (de 4,5 vezes) do transcrito *BCL-2*, corroborando os dados de correlação inversa da literatura. Um

estudo de Qiu et al. (1999) mostra que Par-4 induz a diminuição da expressão protéica de Bcl-2 em fibroblastos (NIH3T3) e nas células de próstata PC-3. Neste estudo mostrou-se que a expressão transiente de Bcl-2 impede a apoptose dependente de Par-4 nos fibroblastos cultivados na ausência de fatores de crescimento presentes no soro, indicando que a diminuição de expressão de Bcl-2 é exigida para apoptose induzida por Par-4. Boehrer e colaboradores (2002) verificaram que o aumento da expressão de Par-4 nas células de linfócitos T (Jurkat) diminui a expressão de Bcl-2 enquanto que os níveis de Bax não são alterados, mesmo com adição dos quimioterápicos doxorubicina e *cytosin- arabinose*, sugerindo que nestas células Par-4 age *upstream* de Bcl-2 para sensibilizá-las aos estímulos pró-apoptóticos. Outro estudo mostrou que o aumento de Par-4 sensibiliza as células tumorais de próstata PC-3 a apoptose induzida por radiação e que este aumento de morte celular deve-se a inibição de atividade de NFκB com consequente diminuição de expressão de Bcl-2 (Chendil et al., 2002). Neste trabalho observou-se que o aumento de Par-4 não alterou a expressão da proteína pró-apoptótica Bax. Este dado corrobora com nossos resultados, uma vez que verificamos uma não-modulação significativa de Bax por Par-4 nas duas linhagens de mama estudadas. No entanto, o estudo de Azmi e colaboradores (2008) observou um aumento de Par-4 e Bax nas células tumorais pancreáticas após tratamento prévio com B-DIM (3,3 dindolylmetano) seguido dos tratamentos com os quimioterápicos gemcitabina ou cisplatina. B-DIM sensibiliza as células tumorais a apoptose induzida pelos quimioterápicos através da diminuição de Bcl-2 e Bcl-X decorrentes da ativação de Par-4.

A linhagem MCF-7 apresenta expressão aumentada da proteína Bcl-2, o que a torna resistente a vários estímulos apoptóticos, incluindo diversos quimioterápicos (Cyr et al., 2008). El-Guendy et al. (2003) relataram que as células não tumorais imortalizadas, como a linhagem MCF10A e as células hormônio-dependentes, incluindo a linhagem MCF-7 são resistentes à ação apoptótica de Par-4 na ausência de um segundo estímulo apoptótico. Os altos níveis basais de Bcl-2 nas células MCF-7 sugerem uma possível explicação para resistência destas células a apoptose induzida pelo aumento ectópico de Par-4.

Nas células MCF-7 com expressão diminuída de Par-4, observamos um aumento significativo da expressão do gene regulador da autofagia *BECLIN*. Beclin

foi identificado como uma proteína que interage com Bcl-2, que por sua vez inibe sua atividade pró-autofágica (Patingre et al., 2005). O processo de autofagia induzido por Beclin1 é um mecanismo de morte celular que elimina organelas danificadas para remover fontes genotóxicas, incluindo produtos de DNA danificados. Esta função previne estresse oxidativo das organelas danificadas. Além disso, a autofagia regula negativamente a proliferação das células (Liang et al., 1999). Won e colaboradores (2010) analisaram por imunohistoquímica tumores invasivos de mama e observaram uma correlação inversa da expressão de Bcl-2 com Beclin nos tumores de mama, sugerindo que Beclin-1 apresenta um papel de inibidor do desenvolvimento tumoral e que esta inibição é devido sua interação com Bcl-2. Liang et al. (1999) mostraram que Beclin funciona como um regulador negativo do crescimento das células da mama e da tumorigênese, bem como na indução da autofagia nas células de câncer de mama. Além disso, neste estudo foi observado uma significativa perda da expressão de Beclin-1 em 56% das células tumorais de mama em relação às células normais. Beclin-1 é deletado em 40 a 75% dos tumores esporádicos de mama, próstata e ovário (Won et al., 2010). Todos estes estudos sugerem que Beclin-1 seria um supressor de tumor haploinsuficiente. Nossos resultados, embora preliminares, indicam uma possível modulação da expressão gênica de Beclin pela proteína Par-4; mas novos estudos precisam ser realizados para investigar melhor esta possível associação.

No presente estudo, observamos pela primeira vez que Par-4 sensibilizou as células de adenocarcinoma de mama MCF-7 ao quimioterápico docetaxel. Células MCF-7 com aumento de expressão de Par-4 apresentaram maior proporção de células apoptóticas em relação às células com níveis basais de Par-4, indicando que esta proteína pró-apoptótica poderia ser modulada para melhor eficiência do tratamento do paciente. Docetaxel (Taxotere) é um taxano estabilizador de microtúbulos utilizado na clínica para tratamento de pacientes com câncer de mama, próstata e carcinoma de pequenas células do pulmão (Crown e O'Leary, 2000). Taxanos são drogas anti-microtúbulos mais utilizadas na quimioterapia e incluem dois membros: docetaxel e paclitaxel. O docetaxel é sintetizado a partir do precursor taxóide, 10-deacetyl baccatin III, extraído das folhas (“agulhas”) de uma planta conhecida como teixo europeu, *Taxus baccata* (Hernandez-Vargas et al., 2007). O

tratamento com docetaxel causa inibição dos principais eventos celulares, tais como divisão mitótica, secreção e transporte além de desencadear apoptose ou outras formas de morte celular, como catástrofe mitótica, senescência e necrose lítica (Morse et al., 2005). Apoptose tem sido o mecanismo de morte predominante aceito em resposta ao tratamento com docetaxel (Wang et al., 1999). Verificamos células com características morfológicas de apoptose (cromatina condensada, fragmentação nuclear, desaparecimento de nucléolo, e aparecimento de corpos apoptóticos) em ambas as concentrações de docetaxel utilizadas neste estudo. O estudo de Hernandez-Vargas et al. (2007) mostrou que o quimioterápico docetaxel pode agir por dois mecanismos dependendo da concentração utilizada. Concentrações baixas de docetaxel (2-4 nM) induzem mitose aberrante seguida de necrose tardia enquanto que as concentrações maiores (100 nM) induzem uma parada no ciclo celular prolongada (*mitotic arrest*) com posterior apoptose. Este mecanismo dual de ação do docetaxel encontrado nas células tumorais de mama é independente da atividade de p53. Diversos estudos na literatura mostram o papel sensibilizador de Par-4 frente aos diferentes quimioterápicos e agentes quimiopreventivos. Em células de câncer de cólon, a superexpressão de Par-4 levou ao aumento da apoptose na presença do quimioterápico 5-fluoracil através da inibição da atividade de NFκB tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Kline et al., 2009). Brieger e colaboradores (2004) também mostraram que a superexpressão de Par-4 aumentou a sensibilidade das células mielóides (bcr-abl positivas) aos novos agentes quimioterápicos imatinib (inibidor tirosina quinase STI571) e aos inibidores das histonas deacetylases (HDAC-inibitor LAQ824). Em células de carcinoma renal resistentes ao tratamento com o indutor apoptótico TRAIL, o aumento da expressão de Par-4 sensibilizou estas células ao tratamento com este indutor, aumentando a atividade das caspases-8 e 3 e reduzindo a expressão de XIAP (Lee et al., 2010). Nossos dados também mostraram uma maior sensibilidade ao farnesol nas células MCF-7 com aumento de Par-4 comparado às células com vetor vazio. Farnesol é um isoprenóide não-esterol produzido pela defosforilação do farnesil-PP (*farnesyl pyrophosphate*), um metabólito da via biossintética do colesterol. Os isoprenóides são essenciais na regulação da proliferação, apoptose, diferenciação e biossíntese lipídica (incluindo o colesterol e derivados) e estão envolvidos na prenilação de muitas proteínas (Joo e Jetten, 2010).

Além de ser produzido endogenamente, farnesol e outros isoprenóides são encontrados como componentes naturais de frutas e plantas aromáticas, incluindo camomila, capim cidreira, hortelã, dentre outras (Crowell, 1999; Joo e Jetten, 2010). Farnesol tem ação inibitória da proliferação, induzindo parada no ciclo celular na fase G0/G1 em diversos tipos celulares, incluindo células de adenocarcinoma de pulmão, hepatoma, melanoma e leucemia (Joo e Jetten, 2010). A presença de uma população sub-G1 sugere que na maioria das células a inibição de crescimento pelo farnesol é acompanhado por apoptose (fragmentação do DNA, presença de corpos apoptóticos). Farnesol pode induzir apoptose por diferentes mecanismos como: redução da enzima 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA), com possível inibição da prenilação de proto-oncogenes (membros da família Ras); inibição da biosíntese do colesterol, necessária para as células tumorais devido as altas taxas proliferativas; além de induzir o estresse do retículo endoplasmático (Joo et al., 2007; Joo e Jetten, 2010).

O estudo funcional de Par-4 nas diferentes linhagens de mama utilizando ensaios de expressão ou inibição de expressão por siRNA mostrou pela primeira vez o envolvimento de Par-4 nos processos de proliferação, sobrevivência e sensibilidade ao quimioterápico Docetaxel.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- A ausência de hormônios esteroídicos e fatores de crescimento no soro aumentou a expressão de Par-4, levou ao acúmulo das células na fase G0-G1, além de aumentar a percentagem de apoptose das células MCF-7, modulando os genes envolvidos na via intrínseca com aumento significativo de *BAX*.
- O aumento da expressão de Par-4 reduziu a proliferação das células normais e tumorais de mama.
- A inibição da expressão de Par-4 por siRNA aumentou a proliferação das células tumorais de mama, confirmando seu papel como supressor tumoral.
- A via de sinalização mediada por ERK parece estar envolvida no controle da proliferação das MCF-7 pela proteína Par-4.
- A expressão de Par-4 (superexpressão ou supressão) modulou principalmente a expressão do gene pró-apoptótico *BID*, corroborando dados da literatura de que Par-4 age ativando a via extrínseca mitocondrial.
- A expressão do gene *BCL-2* aumentou significativamente após supressão gênica de Par-4 por siRNA, confirmando a correlação inversa destes dois genes descritos na literatura.
- Embora preliminares, os resultados sugerem pela primeira vez que o aumento da expressão de Par-4 aumenta a sensibilidade das células MCF-7 ao quimioterápico docetaxel e ao isoprenóide farnesol.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

- Ali S, Coombes RC. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer*. 2002 Feb;2(2):101-12. Review.
- Allred DC, Mohsin SK, Fuqua SA. Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. *Endocr Relat Cancer*. 2001 Mar; 8(1):47-61.
- Azmi AS, Ahmad A, Banerjee S, Rangnekar VM, Mohammad RM, Sarkar FH. Chemoprevention of pancreatic cancer: characterization of Par-4 and its modulation by 3,3' diindolylmethane (DIM). *Pharm Res*. 2008 Sep;25(9):2117-24.
- Barradas M, A Monjas, M T Diaz-Meco, M Serrano, and J Moscat. The downregulation of the pro-apoptotic protein Par-4 is critical for Ras-induced survival and tumor progression. *EMBO J*. 1999. November 15; 18(22): 6362–6369.
- Boehrer S, Chow KU, Beske F, Kukoc-Zivojnov N, Puccetti E, Ruthardt M, Baum C, Rangnekar VM, Hoelzer D, Mitrou PS, Weidmann E. In lymphatic cells par-4 sensitizes to apoptosis by down-regulating bcl-2 and promoting disruption of mitochondrial membrane potential and caspase activation. *Cancer Res*. 2002 Mar 15;62(6):1768-75.
- Boehrer S, Kukoc-Zivojnov N, Nowak D, Bergmann M, Baum C, Puccetti E, Weidmann E, Hoelzer D, Mitrou PS, Chow KU. Upon drug-induced apoptosis expression of prostate-apoptosis-response-gene-4 promotes cleavage of caspase-8, bid and mitochondrial release of cytochrome c. *Hematology*. 2004 Oct-Dec;9(5-6):425-31.
- Björnström L, Sjöberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol*. 2005 Apr; 19(4):833-42.
- Boghaert ER, Sells SF, Walid AJ, Malone P, Williams NM, Weinstein MH, Strange R, Rangnekar VM. Immunohistochemical analysis of the proapoptotic protein Par-4 in normal rat tissues. *Cell Growth Differ*. 1997 Aug;8(8):881-90.
- Boosen M, Vetterkind S, Kubicek J, Scheidtmann KH, Illenberger S, Preuss U. Par-4 is an essential downstream target of DAP-like kinase (Dlk) in Dlk/Par-4-mediated apoptosis. *Mol Biol Cell*. 2009 Sep; 20(18):4010-20.
- Brieger A, Boehrer S, Schaaf S, Nowak D, Ruthardt M, Kim SZ, Atadja P, Hoelzer D, Mitrou PS, Weidmann E, Chow KU. In bcr-abl-positive myeloid cells resistant to conventional chemotherapeutic agents, expression of Par-4 increases sensitivity to imatinib (STI571) and histone deacetylase-inhibitors. *Biochem Pharmacol*. 2004 Jul 1; 68(1):85-93.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://inca.gov.br>.

Burikhanov R, Zhao Y, Goswami A, Qiu S, Schwarze SR, Rangnekar VM. The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis. *Cell*. 2009 Jul 23; 138(2):377-88.

Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem*. 2001 Mar 30; 276(13):9817-24.

Carter CL, Jones DY, Schatzkin A, Brinton LA. A prospective study of reproductive, familial and socioeconomic risk factors for breast cancer using NHANES I data. *Public Health Rep*. 1989 Jan-Feb;104(1):45-50.

Casolari DA, Pereira MC, de Bessa Garcia SA, Nagai MA. Insulin-like growth factor-1 and 17 β -estradiol down-regulate prostate apoptosis response-4 expression in MCF-7 breast cancer cells. *Int J Mol Med*. 2011 Sep;28(3):337-42.

Clarke RB, Anderson E, Howell A. Steroid receptors in human breast cancer. *Trends Endocrinol Metab*. 2004 Sep; 15(7):316-23.

Chakraborty M, Qiu SG, Vasudevan KM, Rangnekar VM. Par-4 drives trafficking and activation of Fas and FasL to induce prostate cancer cell apoptosis and tumor regression. *Cancer Res*. 2001 Oct 1;61(19):7255-63.

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

Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Monville F, Finetti P, Adélaïde J, Cervera N, Fekairi S, Xerri L, Jacquemier J, Birnbaum D, Bertucci F. Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene*. 2006 Apr 6; 25(15):2273-84.

Chaudhry P, Singh M, Parent S, Asselin E. Prostate Apoptosis Response 4(Par-4), a Novel Substrate of Caspase-3 during Apoptosis Activation. *Mol Cell Biol*. 2012 Feb;32(4):826-39.

Chendil D, Das A, Dey S, Mohiuddin M, Ahmed MM. Par-4, a pro-apoptotic gene, inhibits radiation-induced NF kappa B activity and Bcl-2 expression leading to induction of radiosensitivity in human prostate cancer cells PC-3. *Cancer Biol Ther*. 2002 Mar-Apr;1(2):152-60.

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

Apr;162(1):156-9.

Cook J, Krishnan S, Ananth S, Sells SF, Shi Y, Walther MM, Linehan WM, Sukhatme VP, Weinstein MH, Rangnekar VM. Decreased expression of the pro-apoptotic protein Par-4 in renal cell carcinoma. *Oncogene*. 1999 Feb 4;18(5):1205-8.

Crown J, O'Leary M. The taxanes: an update. *Lancet*. 2000 Apr 1;355(9210):1176-8. Review

Crowell PL. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *J Nutr*. 1999 Mar;129(3):775S-778S. Review

Cyr L, Langler R, Lavigne C. Cell cycle arrest and apoptosis responses of human breast epithelial cells to the synthetic organosulfur compound p-methoxyphenyl p-toluenesulfonate. *Anticancer Res*. 2008 Sep- Oct; 28(5A):2753-63.

de Bessa Garcia S.A, Michelly C. Pereira, and Maria A. Nagai. Expression Pattern of the Pro-apoptotic Gene *PAR-4* During the Morphogenesis of MCF-10A Human Mammary Epithelial Cells. *Cancer Microenviron*. 2011 April; 4(1): 33–38.

Debnath J, Brugge JS. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer*. 2005 Sep; 5(9):675-88.

Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 May;9(5):378-90. Review.

Díaz-Meco MT, Municio MM, Frutos S, Sanchez P, Lozano J, Sanz L, Moscat J. The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell*. 1996 Sep 6;86(5):777-86.

Donninger H, Hesson L, Vos M, Beebe K, Gordon L, Sidransky D, Liu JW, Schlegel T, Payne S, Hartmann A, Latif F, Clark GJ. The Ras effector RASSF2 controls the PAR-4 tumor suppressor. *Mol Cell Biol*. 2010 Jun; 30(11):2608-20.

Duan W, Zhang Z, Gash DM, Mattson MP. Participation of prostate apoptosis response-4 in degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 1999 Oct;46(4):587-97.

Dunning AM, Healey CS, Pharoah PD, Teare MD, Ponder BA, Easton DF. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Câncer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999 Oct; 8(10):843-54.

Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med*. 2005 Jan-Mar; 9(1):208-21.

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

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

El-Guendy N, Zhao Y, Gurumurthy S, Burikhanov R, Rangnekar VM. Identification of a unique core domain of par-4 sufficient for selective apoptosis induction in cancer cells. *Mol Cell Biol*. 2003b Aug; 23(16):5516-25.

Feigelson HS, Henderson BE. Future possibilities in the prevention of breast cancer: role of genetic variation in breast cancer prevention. *Breast Cancer Res*. 2000; 2(4):277-82.

Fernandez-Marcos PJ, Abu-Baker S, Joshi J, Galvez A, Castilla EA, Cañamero M, Collado M, Saez C, Moreno-Bueno G, Palacios J, Leitges M, Serrano M, Moscat J, Diaz-Meco MT. Simultaneous inactivation of Par-4 and PTEN in vivo leads to synergistic NF-kappaB activation and invasive prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 4;106(31):12962-7.

Franchitto A, Torrice A, Semeraro R, Napoli C, Nuzzo G, Giuliente F, Alpini G, Carpino G, Berloco PB, Izzo L, Bolognese A, Onori P, Renzi A, Cantafora A, Gaudio E, Alvaro D. Prostate apoptosis response-4 is expressed in normal cholangiocytes, is down-regulated in human cholangiocarcinoma, and promotes apoptosis of neoplastic cholangiocytes when induced pharmacologically. *Am J Pathol*. 2010 Oct;177(4):1779-90.

Fu J, Jeffrey SS. Transcriptomic signatures in breast cancer. *Mol Biosyst*. 2007 Jul; 3(7):466-72.

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 2012 Jan;19(1):107-20. doi: 10.1038/cdd.2011.96.

Garcia S.A.B. *Estudo da interação entre as vias de sinalização dos estrógenos e fatores de crescimento no controle da transcrição dos genes HNRPK, PAWR e PHLDA1* [tese]. São Paulo: Butantã/IPT, Universidade de São Paulo; 2009.

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

Goswami A, Burikhanov R, de Thonel A, Fujita N, Goswami M, Zhao Y, Eriksson JE, Tsuruo T, Rangnekar VM. Binding and phosphorylation of par-4 by akt is essential for cancer cell survival. *Mol Cell*. 2005 Oct 7;20(1):33-44.

Goswami A, Ranganathan P, Rangnekar VM. The phosphoinositide 3-kinase/Akt1/Par-4 axis: a cancer-selective therapeutic target. *Cancer Res.* 2006 Mar 15; 66(6):2889-92.

Gurumurthy S, Rangnekar VM. Par-4 inducible apoptosis in prostate cancer cells. *J Cell Biochem.* 2004 Feb 15; 91(3):504-12.

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

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.

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

Hebner C, Weaver VM, Debnath J. Modeling morphogenesis and oncogenesis in three-dimensional breast epithelial cultures. *Annu Rev Pathol.* 2008; 3:313-39.

Hennighausen L, Robinson GW. Information networks in the mammary gland. *NatRev Mol Cell Biol.* 2005 Sep;6(9):715-25. Review.

Johnstone RW, Tommerup N, Hansen C, Vissing H, Shi Y. Mapping of the human PAWR (par-4) gene to chromosome 12q21. *Genomics.* 1998 Oct 15; 53(2):241-3.

Joo JH, Liao G, Collins JB, Grissom SF, Jetten AM. Farnesol-induced apoptosis in human lung carcinoma cells is coupled to the endoplasmic reticulum stress response. *Cancer Res.* 2007 Aug 15;67(16):7929-36.

Joo JH, Jetten AM. Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 2010 Jan 28;287(2):123-35. Epub 2009 Jun 10. Review.

Jun Xie, and Qing Guo. Par-4 Is involved in regulation of beta -secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J Biol Chem.*, 2005; 280(14): 13824-13832.

Kline CL, Shanmugavelandy SS, Kester M, Irby RB. Delivery of PAR-4 plasmid in vivo via nanoliposomes sensitizes colon tumor cells subcutaneously implanted into nude mice to 5-FU. *Cancer Biol Ther.* 2009 Oct; 8(19):1831-7.

Kluttig A, Schmidt-Pokrzywniak A. Established and Suspected Risk Factors in Breast Cancer Aetiology. *Breast Care (Basel).* 2009;4(2):82-87.

Kögel D, Reimertz C, Mech P, Poppe M, Frühwald MC, Engemann H, Scheidtmann KH, Prehn JH. Dlk/ZIP kinase-induced apoptosis in human medulloblastoma cells: requirement of the mitochondrial apoptosis pathway. *Br J Cancer.* 2001 Nov 30;85(11):1801-8.

Lanigan F, O'Connor D, Martin F, Gallagher WM. Molecular links between mammary gland development and breast cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2007 Dec; 64(24):3159-84.

Lee TJ, Lee JT, Kim SH, Choi YH, Song KS, Park JW, Kwon TK. Overexpression of Par-4 enhances thapsigargin-induced apoptosis via down-regulation of XIAP and inactivation of Akt in human renal cancer cells. *J Cell Biochem*. 2008 Feb 1;103(2):358-68.

Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*. 1999 Dec 9;402(6762):672-6.

Lösel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jan; 4(1):46-56.

MacLean MA, Scott BE, Deziel BA, Nunnolley MC, Liberty AM, Gottschall-Pass KT, Neto CC, Hurta RA. North American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) stimulates apoptotic pathways in DU145 human prostate cancer cells in vitro. *Nutr Cancer*. 2011;63(1):109-20.

Mattson MP, Duan W, Chan SL, Camandola S. Par-4: an emerging pivotal player in neuronal apoptosis and neurodegenerative disorders. *J Mol Neurosci*. 1999 Aug-Oct;13(1-2):17-30. Review.

McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti, Martelli AM, Franklin RA. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2007. Aug; 1773(8):1263-84.

Mehrotra A, Kaul D, Joshi K. LXR- α selectively reprogrammes cancer cells to enter into apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 2011 Mar;349(1-2):41-55.

Moreno-Bueno G, Fernandez-Marcos PJ, Collado M, Tendero MJ, Rodriguez-Pinilla SM, Garcia-Cao I, Hardisson D, Diaz-Meco MT, Moscat J, Serrano M, Palacios J. Inactivation of the candidate tumor suppressor par-4 in endometrial cancer. *Cancer Res*. 2007 Mar 1;67(5):1927-34.

Morse DL, Gray H, Payne CM, Gillies RJ. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2005

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

Nagai MA, Gerhard R, Salaorni S, Fregnani JH, Nonogaki S, Netto MM, Soares FA. Down-regulation of the candidate tumor suppressor gene PAR-4 is associated with poor prognosis in breast cancer. *Int J Oncol*. 2010 Jul; 37(1):41-9.

Nakano H, Shindo M, Sakon S, Nishinaka S, Mihara M, Yagita H, Okumura K. Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:3537–3542.

Navarrete MA, Maier CM, Falzoni R, Quadros LG, Lima GR, Baracat EC, Nazário AC. Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. *Breast Cancer Res*. 2005;7(3):R306-13.

O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol*. 2004 Aug; 18(8):1859-75.

Osborne CK, Boldt DH, Estrada P. Human breast cancer cell cycle synchronization by estrogens and antiestrogens in culture. *Cancer Res*. 1984 Apr;44(4):1433-9.

Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 2005 Sep 23; 122(6): 927-39.

Payette DJ, Xie J, Shirwany N, Guo Q. Exacerbation of apoptosis of cortical neurons following traumatic brain injury in par-4 transgenic mice. *Int J Clin Exp Pathol*. 2008 Jan 1; 1(1):44-56.

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

Poirier J, Ribadeau J., Catala M., André J., Gherardi R., Histologia molecular: texto e Atlas. 1ª Ed. São Paulo: Santos; 2003.

Polyak K. On the birth of breast cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Nov 30; 1552(1): 1-13.

Ponder BA. Cancer genetics. *Nature*. 2001 May 17; 411(6835):336-41.

Qiu SG, Krishnan S, el-Guendy N, Rangnekar VM. Negative regulation of Par-4 by oncogenic Ras is essential for cellular transformation. *Oncogene*. 1999 Nov 25;18(50):7115-23.

Ramakrishnan R, Khan SA, Badve S. Morphological changes in breast tissue with menstrual cycle. *Mod Pathol*. 2002 Dec;15(12):1348-56.

Rieger R.B. [Tese] Doutorado em Oncologia Básica - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2010.

Rosman DS, Kaklamani V, Pasche B. New insights into breast cancer genetics and impact on patient management. *Curr Treat Options Oncol*. 2007 Feb; 8(1):61-73.

Schulz W.A., Molecular Biology of Human Cancers: An advanced student's textbook. Springer; 2005.

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

Shaw KRM, Wrobel CN, Brugge JS. (2004). Use of three-dimensional basement membrane cultures to model oncogene-induced changes in mammary epithelial morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9: 297–310.

Shoker BS, Sloane JP. DCIS grading schemes and clinical implications. *Histopathology*. 1999 Nov; 35(5):393-400.

Shrestha-Bhattarai T, Rangnekar VM. Cancer-selective apoptotic effects of extracellular and intracellular Par-4. *Oncogene*. 2010 Jul 8;29(27):3873-80.

Simstein R, Burow M, Parker A, Weldon C, Beckman B. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. *Exp Biol Med* (Maywood). 2003 Oct;228(9):995-1003. Review.

Smith CL. Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol Reprod*. 1998 Mar; 58(3):627-32.

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

Stull MA, Richert MM, Loladze AV, Wood TL. Requirement for IGF-I in epidermal growth factor-mediated cell cycle progression of mammary epithelial cells. *Endocrinology*. 2002 May;143(5):1872-9.

Tsai MS, Shamon-Taylor LA, Mehmi I, Tang CK, Lupu R. Blockage of heregulin expression inhibits tumorigenicity and metastasis of breast cancer. *Oncogene*. 2003 Feb 6;22(5):761-8.

Vargo Gorgola T., Rosen J.M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature Reviews*. 2007; v.7, p.659-672.

Villalobos M, Olea N, Brotons JA, Olea-Serrano MF, Ruiz de Almodovar JM, Pedraza V. The E-screen assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. *Environ Health Perspect*. 1995 Sep;103(9):844-50.

Wang Bi-Dar, Kline C.L.B., Pastor D.M., Olson T.L., Frank B., Luu T., et al., Prostate apoptosis response protein 4 sensitizes human colon cancer cells to chemotherapeutic

5-FU through mediation of an NF κ B and microRNA network. *Molecular Cancer*. 2010; 9:98.

Wang LG, Liu XM, Kreis W, Budman DR. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1999;44(5):355-61.

World Health Organization. Are the number of cancer cases increasing or decreasing in the world? [Internet]. 2008 [citado 2008, April 1]. Disponível em: <http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html>.

Won KY, Kim GY, Kim YW, Song JY, Lim SJ. Clinicopathologic correlation of beclin-1 and bcl-2 expression in human breast cancer. *Hum Pathol*. 2010 Jan;41(1):107-12.

Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Jan; 9(1):47-59.

Xie J, Guo Q. Par-4 is involved in regulation of β -secretase cleavage of the Alzheimer Amyloid Precursor Protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280:13824-13832.

Xin Kai, Juan Li, Sexin Huang, and Zengliang Bai. Apoptosis Induced by Low-concentration Ethanol in Hepatocellular Carcinoma Cell Strains and Down-regulated AFP and Survivin Analysis by Proteomic Technology. *International Journal of Biological and Life Sciences*. 2010; 6:1.

Zapata-Benavides P, Méndez-Vázquez JL, González-Rocha TR, Zamora-Avila DE, Franco-Molina MA, Garza-Garza R, Rodriguez-Padilla C. Expression of prostate apoptosis response (Par-4) is associated with progesterone receptor in breast cancer. *Arch Med Res*. 2009 Oct;40(7):595-9.

Zhao Y, Burikhanov R, Qiu S, Lele SM, Jennings CD, Bondada S, Spear B, Rangnekar VM. Cancer resistance in transgenic mice expressing the SAC module of Par-4. *Cancer Res*. 2007 Oct 1; 67(19):9276-85.

Zhao Y, Burikhanov R, Brandon J, Qiu S, Shelton BJ, Spear B, Bondada S, Bryson S, Rangnekar VM. Systemic Par-4 inhibits non-autochthonous tumor growth. *Cancer Biol Ther*. 2011 Jul 15;12(2):152-7.