## Vanessa Jacob Victorino

## Mecanismos de proliferação celular dependentes da atividade do coativador - 1 de receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PGC-1)

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

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza

São Paulo

2015

## Vanessa Jacob Victorino

Mecanismos de proliferação celular dependentes da atividade do coativador - 1 de receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PGC-1)

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

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza

São Paulo

2015

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Victorino, Vanessa Jacob Mecanismos de proliferação celular dependentes da atividade do coativador - 1 de receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PGC-1) / Vanessa Jacob Victorino. -- São Paulo, 2015. Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento, Hemodinâmicos e da Hemostasia. Orientador: Heraldo Possolo de Souza.
Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Proliferação de células 3.Metabolismo 4.Estresse oxidativo 5.Receptores estrogênicos
USP/FM/DBD-327/15

#### AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza, por ter aceitado me orientar e compartilhar seu conhecimento.

Aos meus pais, Antônio e Vanda Victorino e ao meu irmão, Maurício, por todo amor e suporte.

Ao Alessandro Lone pelo companheirismo, amor e apoio ao longo dessa caminhada.

À Thais Martins Lima por toda sua dedicação e auxílio nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco, por permitir minha pesquisa no LIM 51.

Ao Prof. Dr. Francisco Soriano pelos ensinamentos.

À minha amiga Carolina Panis por sempre me orientar e ajudar em todos os projetos. Obrigada!

À Isabela, pelo companheirismo ao longo dessa etapa.

Aos amigos Wermerson, Anne, Vivian, Joleen, Mariana, Ricardo, Rosângela, Graça, Ester pelo companheirismo e ajuda nos experimentos.

À Kelli, Suely, Denise, Hermes, Fátima e Geraldo. Obrigada por toda a ajuda!

Ao laboratório do Professor Doutor Francisco Laurindo, por permitir o uso de seus equipamentos para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À Professora Doutora Carolina Panis e à Doutora Ana Cristina do Amaral Herrera pela doação de amostras.

À CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à FAPESP
 – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro para a realização desse projeto.

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

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

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

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

#### LISTA DE ABREVIATURAS

AA= antimicina;

- CAT= catalase;
- CCCP= carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona;

CD1= ciclina D1;

CDK2= ciclina dependente de quinase 2;

CDK6= ciclina dependente de quinas K6;

COI= citocromo c oxidase subunidade I;

 $CoQ = coenzima Q_{10};$ 

DHE= dihidroetidina;

DTNB= 5',5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato);

ERNs= espécies reativas de nitrogênio;

EROs= espécies reativas de oxigênio;

ERR= receptores relacionados a estrógeno;

FADH<sub>2</sub>= hidrogeno flavina adenina dinucleotídeo;

FISH= do inglês, *fluorescence in situ hybridization*;

GSH/GSSG= glutationa reduzida/ glutationa oxidada;

 $H^+$  = próton;

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>= peróxido de hidrogênio;

HER2= receptor epitelial humano 2;

IBGE= Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;

ICL= Instituto de Câncer de Londrina;

INCA= Instituto Nacional de Câncer;

LumA= luminal A;

LumB= luminal B;

MEK-ERK= proteína quinase ativadora de mitógenos/ quinase regulada por sinais extracelulares;

miRNA= micro RNA;

mtDNA= DNA mitocondrial;

NADH= nicotinamida adenina dinucleótido hidreto;

NO= óxido nítrico;

NO<sub>2</sub><sup>-</sup>= dióxido de nitrogênio;

NRF= receptor do fator nuclear;

 $O_2 = \hat{a}nion$  superóxido;

O<sub>3</sub>= ozônio;

PGC-1= coativador - 1 do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR $\gamma$ ) -1;

PI3K= fosfatidil inositol-3-quinase;

PPAR= proliferadores de peroxissoma gama;

RE= receptor de estrógeno;

RNAi= RNA de interferência;

RP= receptor de progesterona;

SISNEP= Sistema Nacional de Informações Sobre Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;

SOD= superóxido dismutase;

TCA= ácido tricarboxílico;

TFAM= fator de transcrição mitocondrial A;

TN= triplo negativo;

UCP-2= do inglês, *uncoupled protein*;

USOD= Unidade de SOD.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Subtipos moleculares do câncer de mama e suas definições	clinico-patológicas.
Adaptado de Goldhirsch et al., 2013.	
Tabela 2: Grupos experimentais	
Tabela 3: Sequências de RNA de interferência (RNAi) utilizadas	
Tabela 4: Sequências utilizadas para realização de RT-PCRs	

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias de sinalização controladas por HER2	6
Figura 2: Estrutura e semelhança dos coativadores PGC-1α e PGC-1β.	9
Figura 3: Expressão de PGC-1α em células não tumorais de mama	25
Figura 4: Expressão de PGC-1β em células não tumorais de mama	26
Figura 5: Expressão proteica de PGC-1β de células não tumorais e células tumorais de mama	27
Figura 6: Curva de proliferação	28
Figura 7: Controle interno de knockdown da expressão de PGC-1β em células HER2- positiva	as
(SKBR3) utilizando RNA de interferência	29
Figura 8: Knockdown da expressão de PGC-1β em células HER2- positivas (SKBR3)	
utilizando sequências negativas (scrambles) de RNA de interferência	30
Figura 9: Knockdown da expressão de PGC-1β em células HER2- positivas (SKBR3)	
utilizando RNA de interferência	31
Figura 10: Expressão proteica de PGC-1β em células HER2- positivas (SKBR3) após	
tratamento com RNA de interferência	32
Figura 11: <i>Knockdown</i> da expressão de PGC-1β em células HER2- positivas (SKBR3)	
utilizando RNA de interferência e sua influência na proliferação celular	33
Figura 12: <i>Knockdown</i> da expressão de PGC-1β em células HER2- positivas (SKBR3)	
utilizando RNA de interferência e sua influência na proliferação celular- Correlação	34
Figura 13: Expressão de ciclina B após knockdown da expressão de PGC-1ß em células HER	2-
positivas (SKBR3)	35
Figura 14: Expressão de ciclina C após knockdown da expressão de PGC-1ß em células HER	2-
positivas (SKBR3)	36
Figura 15: Expressão de ciclina D após knockdown da expressão de PGC-1ß em células HER	.2-
positivas (SKBR3)	37
Figura 16: Expressão de ciclina E após knockdown da expressão de PGC-1ß em células HER	2-
positivas (SKBR3)	38
Figura 17: Quantidade mitocondrial após <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1β em células	
HER2- positivas (SKBR3) - TFAM	39
<b>Figura 18:</b> Quantidade mitocondrial após <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1β em células	
HER2- positivas (SKBR3) - NRF1	40
<b>Figura 19:</b> Quantidade mitocondrial após <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1β em células	
HER2- positivas (SKBR3) - NRF2	41
Figura 20: Avaliação do DNA mitocondrial (mtDNA) após knockdown da expressão de PGC	-
1β em células HER2- positivas (SKBR3) COI	42
Figura 21: Avaliação do DNA mitocondrial (mtDNA) após knockdown da expressão de PGC	-
1β em células HER2- positivas (SKBR3) - 16S	43
<b>Figura 22:</b> Influência do <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1β em células HER2- positivas	
(SKBR3) na produção de lactato intracelular	44
<b>Figura 23:</b> Influência do <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1β em células HER2- positivas	
(SKBR3) na produção de lactato liberado	45
<b>Figura 24:</b> Influência do <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1β em células HER2- positivas	
(SKBR3) na atividade da enzima citrato sintase	46

Figura 25: Taxa respiratória celular após knockdown da expressão de PGC-1β em células
HER2- positivas (SKBR3)
<b>Figura 26:</b> Respiração basal após <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1β em células HER2- positivas (SKBR3)
<b>Figura 27:</b> Taxa respiratória máxima após <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1β em células
HER2- positivas (SKBR3)
<b>Figura 28:</b> Capacidade respiratória sobressalente após <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1β em
células HER2- positivas (SKBR3)
Figura 29: Taxa respiratória ligada a produção de ATP após knockdown da expressão de PGC-
1β em células HER2- positivas (SKBR3)
<b>Figura 30:</b> Taxa de vazamento de prótons (H <sup>+</sup> ) após <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1 $\beta$ em
células HER2- positivas (SKBR3)
<b>Figura 31:</b> Influência do <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1β em células HER2- positivas
(SKBR3) na produção de espécies reativas de oxigênio
<b>Figura 32:</b> Influência do <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1β em células HER2- positivas
(SKBR3) na produção de espécies reativas de nitrogênio- Nitrito
<b>Figura 33:</b> Influência do <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1β em células HER2- positivas
(SKBR3) na produção de espécies reativas de nitrogênio - Nitrato
Figura 34: Influência do <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1β na expressão gênica da enzima
antioxidante superóxido dismutase (SOD) em células HER2- positivas (SKBR3)55
Figura 35: Influência do <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1β na expressão gênica da enzima
antioxidante catalase (CAT) em células HER2- positivas (SKBR3)
Figura 36: Influência do knockdown da expressão de PGC-1β na atividade da enzima
antioxidante superóxido dismutase (SOD) em células HER2- positivas (SKBR3)57
Figura 37: Influência do <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1β na atividade da enzima
antioxidante catalase em células HER2- positivas (SKBR3)58
<b>Figura 38:</b> Influência do <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1β na relação de glutationa oxidada
(GSSG) por glutationa reduzida (GSH) em células HER2- positivas (SKBR3)59
<b>Figura 39:</b> Influência do <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1β nos níveis de glutationa total em
células HER2- positivas (SKBR3)
<b>Figura 40:</b> Despolarização mitocondrial após <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1β em células
HER2- positivas (SKBR3)
Figura 41: Influência do <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1β em células HER2- positivas
(SKBR3) na expressão de ERRγ
Figura 42: Influência do <i>knockdown</i> da expressão de PGC-1β em células HER2- positivas
(SKBR3) na expressão de ERRα63
Figura 43: Mulheres portadoras do carcinoma mamário HER2- positivo apresentam maior
expressão de PGC-1 $\beta$
Figura 44: Expressão de PGC-1 $\beta$ em tumor ductal infiltrativo HER2- positivo de paciente
portadora do carcinoma de mama
Figura 45: Esquema simplificado do <i>knockdown</i> de PGC-1β em células tumorais de mama
HER2- positivas

Victorino VJ: *Mecanismos de proliferação celular dependentes da atividade do coativador – 1 de receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PGC-1)* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2015.

#### Resumo

Apesar dos avanços no tratamento dos diferentes subtipos moleculares do câncer de mama, diversos efeitos colaterais e resistência ao tratamento são observados. Nesse contexto, a busca por novos marcadores moleculares ainda é necessária. A família do coativador - 1 do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama-1 (PGC-1) exerce funções cruciais no metabolismo energético celular e alguns trabalhos na literatura mostram alterações de PGC-1 no desenvolvimento do câncer. Contudo, mecanismos envolvidos na proliferação celular do carcinoma de mama permanecem desconhecidos. O objetivo geral foi determinar os mecanismos pelos quais PGC-1 controla a proliferação de células tumorais de mama, com foco em vias metabólicas e de sinalização redox. Para alcançar os objetivos, foi determinada a expressão de PGC-1a e β em células tumorais de mama dos subtipos moleculares luminal (MCF-7), HER2superexpresso (SKBR3) e triplo negativo (MDAMB231) em relação a uma linhagem de mama não tumoral (MCF-10A). Foi encontrada maior expressão gênica e proteica de PGC-1ß na superexpressão de HER2, e maior taxa de crescimento para essa linhagem. Para investigar se PGC-1β pode estar envolvido na proliferação dessas células, utilizamos sequências específicas de RNA de interferência para o knockdown de PGC-1β nas células SKBR3. Após o tratamento houve diminuição de proliferação celular. Assim, investigamos os prováveis mecanismos pelos quais PGC-1B diminui a proliferação celular. Nossos resultados mostram que o knockdown de PGC-1β não influenciou a expressão de ciclinas (B, C, D e E) e não houve diferença na quantidade de DNA mitocondrial, fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), fator de respiração nuclear (NRF) 1 e 2. Em seguida, mostramos que o knockdown de PGC-1ß diminuiu a produção de lactato intracelular e aumentou a atividade da enzima citrato sintase, e houve tendência a maior taxa de respiração celular. Detectamos maiores níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) após knockdown de PGC-1ß enquanto que a produção de nitrito e nitrato, não diferiu. Não houve alteração na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e sistema glutationa. Os resultados revelam presenca de despolarização mitocondrial guando PGC-18 é diminuído nas células HER2. Como os receptores relacionados a estrógeno (ERR) possuem conhecido papel na regulação do metabolismo energético, avaliamos se sua expressão é modulada por PGC-1\beta. A diminuição de PGC-1\beta não influenciou a expressão gênica de ERR\geta e reduziu a expressão gênica de ERRa. Por fim, mostramos maior expressão de PGC-18 proveniente de tumores de pacientes com câncer de mama HER2- superexpresso em relação aos diferentes subtipos moleculares. Conclui-se que a diminuição da sinalização por HER2/ PGC-1B/ ERRa está envolvida com a diminuição da via glicolítica e aumento da via oxidativa com consequente aumento de EROs e perda do potencial de membrana mitocondrial, resultando em diminuição da proliferação celular. Espera-se que os resultados desse estudo ajudem na identificação de vias de sinalização importantes que controlam tanto o metabolismo energético quanto a proliferação de células tumorais, as quais poderão se tornar alvos terapêuticos no futuro.

**Descritores:** Neoplasias da mama; proliferação de células; metabolismo; estresse oxidativo; receptores estrogênicos.

Victorino VJ: Mechanisms of cellular proliferation dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 (PGC-1) [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo"; 2015.

#### Abstract

Despite a marked improvement in treatments for all breast cancer subtypes, several side-effects and resistance to therapy are noticed. In this context, the searching for new molecular targets for breast cancer treatment is still a challenge. Peroxisome proliferator-activated receptor- gamma coactivator 1 (PGC-1) is the main regulator of cell energy homeostasis and studies in the literature show alterations regarding PGC-1 in cancer development. However, mechanisms involved in cellular proliferation of breast cancer remain unknown. We aimed to determine the mechanisms by which PGC-1ß controls breast cancer cell proliferation, focusing on metabolic and redox signaling. To reach this goal, we determined PGC-1 $\alpha$  and  $\beta$  expression in breast cancer cell lines as luminal (MCF-7), HER2-overexpressed (SKBR3) and triple- negative (MDAMB231) as compared to a non-tumoral breast cell line (MCF-10A). We found increased gene and protein expression of PGC-1 $\beta$  in HER2- overexpressed cells and increased cellular proliferation. To investigate whether PGC-1ß could be involved in the proliferation of those cells, we used specific sequences of silencing interfering RNA for knockdown of PGC-1ß in SKBR3 cells. After treatment we observed a decrease in cellular proliferation. Thus, we next investigated the probable mechanisms by which PGC-18 could decrease cellular proliferation. Our results showed that knockdown of PGC-1ß did not influence on cyclin expression (B, C, D and E), mitochondrial DNA number, mitochondrial transcription factor – A (TFAM), nuclear receptor factor (NRF) 1 and 2 expression. We showed that knockdown of PGC-1ß induced a decrease intracellular lactate production, increase in citrate synthase activity and a trend to increase cellular respiration rate. Thereby, we detected greater amounts of reactive oxygen species (ROS) after knockdown of PGC-1<sup>β</sup>, and no alterations was found for nitrite and nitrate levels. No alterations regarding antioxidant enzymes activities as superoxide dismutase, catalase, and glutathione system were found. Results revealed loss of mitochondrial membrane potential when PGC-1 $\beta$  is decreased in HER2- overexpressed cells. As estrogen related receptors (ERR) have a recognized role in the regulation of energetic metabolism, we assessed whether their expression could be modulated by PGC-1<sup>β</sup>. The decrease in PGC-1 $\beta$  expression did not influence on ERR $\gamma$  expression, but it decreased the gene expression of ERR $\alpha$ . Finally, we demonstrated increased PGC-1 $\beta$  expression in HER2- overexpressing tumors from breast cancer patients. Taken together, we conclude that decrease in HER2/ PGC-1β/ ERRa signaling may be related to decrease in glycolytic pathway and increase in oxidative metabolism resulting in increased ROS production and loss of mitochondrial membrane potential, which can lead to decreased cellular proliferation. We hope that the findings may help in the identification of important cellular signaling that may control energetic metabolism regarding tumor cells proliferation, which can became future target therapies.

**Descriptors:** Breast neoplasms; cell proliferation; metabolism; oxidative stress; receptors, estrogen.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas
Lista de tabelas
Lista de figuras
Resumo
Abstract
<b>1. Introdução</b>
2. Revisão de literatura
2.1 O câncer de mama
2.2 O subtipo molecular HER2
2.3 Metabolismo e produção de espécies reativas de células tumorais de mama7
2.4 Coativador 1 do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR $\gamma$ ) (PGC-1): papel no controle do metabolismo e EROs
<b>3. Hipótese</b>
<b>4. Objetivos</b>
4.1 Geral
4.2 Específicos
4.2.1 Determinar a expressão de PGC-1 $\alpha$ e $\beta$ em células tumorais de mama 13
4.2.2 Determinar se a diminuição da expressão de PGC-1β altera a proliferação e sobrevivência de células tumorais de mama HER2- positivas
4.2.3 Analisar se alterações da expressão de PGC-1β influencia a proliferação celular de tumor de mama HER2- positivo via alterações no ciclo celular
4.2.4 Verificar se alterações da expressão de PGC-1β influencia a proliferação celular por alterar a quantidade mitocondrial de tumor de mama HER2- positivo. 13
4.2.5 Determinar se alterações da expressão de PGC-1β em células de câncer de mama HER2- positivas afetam a proliferação celular via regulação do metabolismo energético
4.2.6 Verificar se a expressão de PGC-1β modula a produção de EROs, ERNs e o perfil antioxidante
4.2.7 Determinar se alterações da expressão de PGC-1β em células de câncer de mama HER2- positivas afetam a proliferação celular via ERRs
4.2.8 Determinar a expressão de PGC-1β em tumores de pacientes com câncer de mama de diferentes subtipos moleculares

5.	Material e Métodos	15
	5.1. Cultivo celular	15
	5.2. Pacientes	15
	5.3. Análise imunohistoquímica para subtipagem molecular dos tumores de mama.	16
	5.4. Determinação de curvas de crescimento	17
	5.5. Silenciamento de PGC-1β por RNA de interferência (RNAi)	18
	5.6. Detecção da expressão proteica por Western Blotting	18
	5.7. Extração de RNA e PCR	19
	5.8. Quantificação de proteínas	21
	5.9. Produção de lactato	21
	5.10. Determinação da atividade da enzima citrato sintase	21
	5.11. Consumo de oxigênio	21
	5.12. Detecção de espécies reativas de oxigênio por citometria de fluxo	22
	5.13. Detecção de nitrito e nitrato como estimativa de NO por NO-Analyzer	22
	5.14. Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	23
	5.15. Determinação da atividade da enzima catalase	23
	5.16. Quantificação de glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG) níveis de glutationa totais	) e 23
	5.17. Avaliação de desacoplamento mitocondrial por citometria de fluxo	24
	5.18. Análise Estatística	24
6.	Resultados	25
	6.1. Expressão de PGC-1s em células tumorais de mama	25
	6.2. Proliferação de células tumorais de mama	27
	6.3. Relação entre a expressão de PGC-1β e proliferação de células tumorais de ma HER2- positivas	ima 28
	6.4. Alteração na expressão de PGC-1β em células tumorais de mama HEI positivas não influencia a expressão de ciclinas	R2- . 34
	6.5. Alteração na expressão de PGC-1β em células tumorais de mama HEI positivas não influencia a quantidade mitocondrial	R2- . 38
	6.6. Influência da expressão de PGC-1β no perfil metabólico de células tumorais mama HER2- positivas	de 43
	6.7. Influência da expressão de PGC-1β no equilíbrio redox de células tumorais mama HER2- positivas	de 51
7.	Discussão	66

7.1. Expressão de PGC-1s em tumor de mama de diferentes subtipos moleculares 66
<ul> <li>7.2. Relação entre a expressão de PGC-1β e proliferação de células tumorais de mama</li> <li>HER2- positivas</li> </ul>
7.3. Expressão de PGC-1β em células tumorais de mama HER2- positivas não influencia a expressão de ciclinas
7.4. Expressão de PGC-1β em células tumorais de mama HER2- positivas não influencia a quantidade mitocondrial
7.5. <i>Knockdown</i> de PGC-1β em células tumorais de mama HER2- positivas diminui o perfil glicolítico e aumenta a via oxidativa
7.6. Influência da expressão de PGC-1β no equilíbrio redox de células tumorais de mama HER2- positivas
7.7. PGC-1β controla a expressão de ERRα75
8. Conclusão
<b>9. Referências Bibliográficas</b>

#### 1. Introdução

O câncer de mama é classificado como a neoplasia que mais atinge mulheres em todo o mundo. Na clínica os tumores de mama são classificados em subtipos moleculares de acordo com a presença ou ausência de receptores hormonais de estrógeno (RE) e progesterona (RP), presença ou ausência de HER2 (receptor epitelial humano 2) e quanto a expressão do marcador de proliferação tumoral Ki-67. É de extrema importância classificar os subtipos moleculares no câncer de mama visto os distintos tratamentos clínicos e prognósticos de cada subtipo.

Os avanços no conhecimento para desenvolver novos tratamentos para os diversos tipos de cânceres crescem de modo exponencial. No que diz respeito ao tratamento dos diferentes subtipos moleculares do câncer de mama é possível observar algumas terapias focadas em inibir vias de sinalização controladas pelos receptores hormonais ou HER2. Contudo, diversos efeitos colaterais e resistência ao tratamento quimioterápico ainda são observados e os tratamentos mais específicos são de alto custo. Nesse contexto, a busca ativa por novos marcadores moleculares e alvos terapêuticos ainda se faz extremamente necessária.

O status de atividade metabólica é essencial para a célula determinar se irá proliferar ou ativar mecanismos de morte. A família de coativadores da transcrição gênica PGC-1 exerce funções celulares cruciais. No que diz respeito ao metabolismo energético celular, sabe-se que PGC-1s controlam primariamente a biogênese mitocondrial, mas também regulam a entrada de substratos energéticos na célula, regulam a atividade de enzimas relacionadas à  $\beta$ - oxidação de ácidos graxos, ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), conversão de piruvato à lactato, e os complexos da cadeia respiratória. Durante a fosforilação oxidativa que ocorre na cadeia respiratória mitocondrial, há produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e PGC-1s são capazes de controlar a expressão de enzimas antioxidantes a fim de regular a sinalização redox. PGC-1s controlam também a biogênese mitocondrial, onde regulam a atividade de fatores de transcrição, e a fusão e fissão de mitocôndria.

Alguns trabalhos na literatura mostram alterações de PGC-1 no desenvolvimento do câncer de mama. O primeiro destes trabalhos data 2003 e mostra uma diminuição da expressão de PGC-1 $\alpha$  no desenvolvimento da doença. Mais tarde alguns trabalhos na literatura mostraram que parece haver uma relação entre a expressão de PGC-1 $\beta$  e a superexpressão de HER2. Contudo, os trabalhos acerca de PGC-1 $\beta$  e câncer de mama

são escassos e os mecanismos envolvidos na proliferação celular do carcinoma de mama em diferentes subtipos moleculares e sua relação com metabolismo e sinalização redox permanecem desconhecidos. Assim, nesse trabalho, o objetivo foi determinar os mecanismos pelos quais PGC-1β controla a proliferação de células tumorais de mama.

Espera-se que os resultados desse estudo ajudem na identificação de vias de sinalização importantes que controlam tanto o metabolismo energético e de sinalização redox quanto à proliferação de células tumorais, as quais poderão se tornar alvos terapêuticos no futuro para doenças onde a expressão de PGC-1β estiver alterada.

#### 2. Revisão de literatura

#### 2.1 O câncer de mama

O câncer de mama é a neoplasia feminina mais incidente em todo o mundo (WHO, 2014). Estimativas para o ano de 2014, válidas para o ano de 2015, apontam ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer no Brasil. Desses, 57.120 representam o câncer de mama para a população feminina, com risco estimado de 56,09 casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2014).

Clinicamente os tumores de mama podem ser agrupados em subtipos moleculares de acordo com a presença ou ausência de receptores hormonais de estrógeno (RE) e progesterona (RP), e presença ou ausência do receptor epitelial humano 2 (HER2) e quanto a expressão do marcador de proliferação tumoral Ki-67 (Voduc et al., 2010). Os guias atuais definem 4 subtipos moleculares: luminal A, luminal B, HER2- positivo e triplo-negativo (Senn, 2013; Untch et al., 2013), conforme Tabela 1 abaixo.

SUBTIPO	DEFINIÇÃO CLINICO-PATOLÓGICA
T	
Luminal A	RE e RP positivos
	HER2 negativo
	Baixo Ki-67
Luminal B	Luminal B (HER2 negativo)
	RE positivo
	HER2 negativo
	Vi 67 alta a/au DD nagativa/haiva
	K1-07 allo e/ou RP negalivo/dalxo
	Luminal B (HER2 positivo)
	RE positivo
	HER2 superexpresso
	Qualquer Ki-67
	Qualquer RP
HER2- positivo	HER2 superexpresso
-	RE e RP ausente
Triplo- negativo	RE e RP ausente
	HER2 negativo

**Tabela 1:** Subtipos moleculares do câncer de mama e suas definições clinico-patológicas. Adaptado de Goldhirsch et al., 2013.

Legenda: RE= receptor de estrógeno, RP= receptor de progesterona, HER2= receptor epitelial humano 2.

O subgrupo luminal A é caracterizado por expressão positiva dos receptores hormonais e sem superexpressão de HER2, juntamente com baixa expressão do marcador Ki-67. O subgrupo luminal B pode ser ainda subdividido em luminal B com expressão negativa de HER2 ou luminal B com expressão positiva de HER2. Em ambos os subgrupos há expressão positiva para RE. São classificados como luminais A ou B 60-70% dos tumores de mama e pacientes portadoras desses tumores recebem quimioterapia e/ ou terapia endócrina (Chavez et al., 2010).

O subgrupo HER2 apresenta positividade para a amplificação de HER2 e negatividade para RE e RP. Cerca de 20-30% das pacientes portadoras do câncer de mama apresentam superexpressão de HER2 (Gutierrez et al., 2011) e atualmente sua terapia consiste em inibir sua sinalização (Hynes et al., 2005).

O subtipo molecular triplo negativo é definido por ausência de RE, RP e HER2, e compreende cerca de 10% dos tumores de mama. Esse subgrupo possui um pior prognóstico visto que há falta de alvos terapêuticos validados para esse subtipo que frequentemente está associado a casos familiares de câncer de mama (Goldhirsch et al., 2013; Harbeck et al., 2013; Senn 2013; Untch et al., 2013; Hynes et al., 2005).

Classificar os subtipos moleculares no câncer de mama é de grande importância visto que subgrupos distintos devem receber diferentes tratamentos clínicos. Nos últimos anos foram observados avanços significativos no tratamento dos diferentes subtipos moleculares do câncer de mama. Contudo, diversos efeitos colaterais e resistência ao tratamento quimioterápico ainda são observados (Nahta, Esteva 2006; Nahta et al., 2006; Azambuja et al., 2009, Panis et al., 2012; Panis et al., 2011a; Panis et al., 2011b, Victorino et al., 2014a,b,c). Nesse contexto, a busca ativa por novos marcadores moleculares e alvos terapêuticos ainda se faz extremamente necessária.

#### 2.2 O subtipo molecular HER2

Durante o desenvolvimento do câncer de mama, 20-30% das pacientes apresentam positividade para HER2. A superexpressão de HER2 pode ser decorrente de amplificação genética ou desregulação transcricional (Gutierrez; Schiff 2011).

Receptores HER2 estão inclusos na subclasse I de receptores tirosina quinase, a qual abrange 4 membros: HER1, HER2, HER3 e HER4. Através de diferentes vias de sinalização esses receptores controlam diversos fatores de transcrição que atuam em vias de apoptose, migração, crescimento, adesão e diferenciação celular (Yarden, Sliwkowski, 2001; Gutierrez, Schiff, 2011; Victorino et al., 2014b).

Atualmente são conhecidos diversos mecanismos pelos quais as vias de ativação dependentes da superexpressão de HER2 em tumores de mama podem atuar na sinalização intracelular configurando características muito agressivas a esse tumor, conforme mostra a Figura 1.

Pode-se observar que as vias de sinalização celular ativadas por ligantes ao heterodímero HER2/ HER1 atuam diretamente em vias relacionadas com o aumento da migração e progressão tumoral (Dittmar et al., 2002). Essa via pode, ainda, favorecer a progressão tumoral e hiperproliferação, influenciando a atividade dos fatores nucleares ciclina D1 (CD1), ciclina dependente de quinas K6 (CDK6), ciclina E e p27<sup>KIP1</sup> (Janes et al., 1994).

Uma vez que HER2 se apresenta na forma de homodímero na membrana celular não há ligante conhecido (Yarden, Sliwkowski, 2001; Gutierre, Schiff, 2011) e esse age sobre a organização normal do epitélio, levando a proliferação descontrolada (Aranda et al., 2006). A superexpressão de HER2 pode ativar a via de proteína quinase ativadora de mitógenos/ quinase regulada por sinais extracelulares (MEK-ERK) como um mecanismo a fim de inibir a apoptose (Tanizaki et al., 2011).

A sinalização via heterodímero HER2/ HER3 é conhecida principalmente pela ativação de fosfatidil inositol-3-quinase (PI3K)- AKT que estimula a formação de metástase e invasão tumoral (Smirnova et al., 2011). Além disso, essa sinalização pode resultar em aumento da atividade de ciclina dependente de quinase 2 (CDK2), de síntese de DNA e da fase S do ciclo celular, acarretando em síntese de proteínas e crescimento celular (Dan et al., 2002), sobrevivência (Kim et al., 2001; Tang et al., 1999), proliferação e progressão do ciclo celular (Zhou et al., 2001).

Já a forma heterodímera HER2/ HER4 é receptora para um grupo de proteínas denominadas neuregulinas e está associada a processos de quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular (Yarden, Sliwkowski, 2001).



Figura 1: Vias de sinalização controladas por HER2 (fonte: IPA Ingenuity Systems), vide texto.

Pacientes portadoras de tumores de mama HER2 positivos são tratadas com bloqueadores de HER2. Atualmente as drogas mais utilizadas na prática clínica consistem na inibição do domínio extracelular de HER2 inibindo assim sua sinalização, como exemplo o Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>). Novas terapias com anticorpos monoclonais para o tratamento do tumor de mama HER2- positivo também visam o bloqueio do domínio extracelular de HER2, como o Pertuzumab<sup>®</sup> (Lamond, Younis, 2014). Contudo, a utilização dessas drogas levam a diversos efeitos colaterais como mielossupressão, hipersensitividade, danos cardíacos e oxidativos (Genentech, 2004; Fallah-Rad et al., 2011; Zeglinski et al., 2011; ElZarrad et al., 2013).

Recentemente, Panis e colaboradores (2015)mostraram ainda que aproximadamente 16% das pacientes portadoras do câncer de mama que apresentam negatividade para HER2 nos exames clínicos específicos (como imunohistoquímica e FISH) são, na verdade, pacientes positivas para o domínio tirosina quinase intracelular de HER2 que perderam o domínio transmembrana extracelular. Observa-se nessas pacientes a presença do domínio extracelular na circulação e amplificação genética para HER2. Assim, pacientes que apresentam positividade para o domínio intracelular de HER2, mas são diagnosticadas como HER2- negativas, possuem tumores com comportamento de HER2- positivas. Além do mais, tratamentos que visam o bloqueio do domínio extracelular de HER2 não podem ser utilizados para tais pacientes. Atualmente o único bloqueador do domínio intracelular de HER2 consiste no Lapatinib<sup>®</sup> e sua ação nessas pacientes ainda precisa ser investigada. Assim, a busca por bloqueio de vias intracelulares ativadas por HER2 que estão relacionadas à sua agressividade é de extrema importância.

Nas últimas décadas, nosso conhecimento sobre as vias de sinalização e alterações moleculares em células cancerosas cresceram de maneira exponencial, porém algumas lacunas ainda necessitam ser preenchidas. Um dos processos ainda pouco esclarecidos sobre o funcionamento das células tumorais são as interações entre a sua homeostase energética e os sinais que desencadeiam a proliferação. O status de atividade metabólica é essencial para a célula determinar se irá proliferar ou ativar mecanismos de morte. A célula tumoral possui alta demanda energética e quanto maior a demanda, maior taxa de crescimento e proliferação (Buchakjian, Kornbluth, 2010). Contudo, os mecanismos pelos quais as células tumorais alcançam uma reprogramação do seu metabolismo, de maneira a suprir suas altas demandas energéticas e manter altas taxas de proliferação ainda é um assunto controverso e pouco esclarecido.

#### 2.3 Metabolismo e produção de espécies reativas de células tumorais de mama

Desde 1918 modificações mitocondriais em tumores dependentes de sua taxa de crescimento têm sido estudadas (Goodpasture, 1918). Warburg em 1956 demonstrou que células tumorais derivam sua energia preferencialmente através da glicólise em oposição ao processo mais eficiente de fosforilação oxidativa, com concomitante produção de lactato (Warburg, 1956). Durante décadas essa ideia foi um dos paradigmas aceitos pelos pesquisadores da área, a ponto desse fenômeno ser denominado como "Efeito Warburg" (Cairns et al., 2011), o qual previa uma função restrita das mitocôndrias no metabolismo de células tumorais.

As células tumorais podem apresentar disfunção mitocondrial devido a fatores como sinais oncogênicos e mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) (Wen et al., 2013). Em um trabalho original, Kaipparettu e colaboradores (2013) objetivaram investigar o papel da mitocôndria no controle do desenvolvimento tumoral. Os autores levantaram a hipótese de que uma mitocôndria proveniente de uma célula não tumoral poderia reverter propriedades oncogênicas de uma célula tumoral agressiva. Para investigar essa hipótese, os autores geraram cíbridos onde mitocôndrias de células não tumorais de mama MCF-10A e mitocôndrias de células metastática de mama MDA-MB-468 foram implantadas em células 143B  $\rho^0$  livres de mtDNA, os quais serviram de doadoras nucleares com propriedades oncogênicas. Os autores observaram defeito na respiração mitocondrial com aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) em cíbridos com mitocôndria de células tumorais. Já os cíbridos com mitocôndria proveniente de célula não tumoral apresentaram aumento da síntese de ATP, consumo de oxigênio e atividade da cadeia respiratória e tiveram os sinais tumorais agressivos revertidos, provando o papel da função mitocondrial na regulação oncogênica.

Múltiplas vias de sinalização parecem ser ativadas para que ocorram interações entre metabolismo, proliferação e o status bioenergético de células metastáticas de mama. Atualmente alguns pesquisadores vêm mostrando um cenário mais complexo quando considerando o metabolismo de tumor sólido de mama e seu microambiente. Os trabalhos mostram que em fases iniciais da carcinogênese de mama, as células epiteliais tumorais aumentam sua produção de EROs e induzem desequilíbrio da sinalização redox às células adjacentes. Essas células adjacentes sofrem uma disfunção mitocondrial e alteram seu metabolismo. Em fases mais avançadas, as células adjacentes não tumorais privilegiam a via glicolítica e produzem compostos altamente energéticos nesse processo, como lactato e corpos cetônicos. Esses metabólitos energéticos são liberados no microambiente e são então utilizados pelas células tumorais de mama. Dessa forma, as células tumorais de mama utilizam os compostos derivados do metabolismo glicolítico das células adjacentes enquanto realizam a fosforilação oxidativa, gerando assim mais ATP. Além do mais, a produção de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) podem por si só modular a sinalização e vias metabólicas no microambiente tumoral. Para distinguir esse fenômeno do Efeito Warburg tradicional esse foi então denominado Efeito Warburg Reverso e foi relatado apenas em tumores sólidos de mama (Pavlides et al., 2009; Pavlides et al., 2012). Em conjunto, os estudos sobre metabolismo energético em tumores de mama mostram grande complexidade e os mecanismos envolvidos na reprogramação metabólica necessitam ser investigados.

# 2.4 Coativador 1 do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPARγ) (PGC-1): papel no controle do metabolismo e EROs

O PGC-1 foi primeiramente descrito por Puigserver e colaboradores em 1998 como um coativador induzido em gordura marrom por exposição ao frio, possuindo importante papel como regulador de diversos genes mitocondriais que controlam a termogênese adaptativa (Puigserver et al., 1998). PGC-1s, mais especificamente PGC-1 $\alpha$  e  $\beta$  (Figura 2), têm sido descritos como os principais reguladores da homeostase energética da célula (Lin et al., 2005) e essa função é exercida através da capacidade dos PGC-1s em se ligarem a fatores de transcrição ou receptores nucleares diretamente ligados à respiração mitocondrial, como receptor do fator nuclear 1 e 2 (NRF-1 e NRF-2), receptores  $\alpha$  relacionados a estrógeno (ERR $\alpha$ ) e PPARs ou outros que controlam a disponibilidade de nutrientes, ácidos graxos e carboidratos (Scarpulla, 2011).



**Figura 2**: **Estrutura e semelhança dos coativadores PGC-1** $\alpha$  e PGC-1 $\beta$ . Os coativadores PGC-1 $\alpha$  e PGC-1 $\beta$  compartilham alto grau de homologia, cada um apresentando um domínio de ativação e um domínio de repressão transcricional, um domínio rico em arginina e serina e um domínio de ligação ao RNA (Adaptado de Scarpulla, 2011 e Girnun, 2012).

O fato de PGC-1s estimularem o aumento da respiração mitocondrial traz como consequência um concomitante aumento da geração de EROs derivadas da mitocôndria. É interessante notar que PGC-1s podem aumentar também a expressão de enzimas antioxidantes, como mecanismo de manter a homeostase redox intracelular (St-Pierre et al., 2006). Os dados a respeito dos mecanismos que controlam esse equilíbrio entre a expressão de PGC-1 e a sinalização redox ainda são escassos e seu papel na tumorigênese permanece pouco conhecido.

As variações dos níveis de expressão de membros da família PGC-1 em células cancerígenas podem configurar um efeito pró-sobrevivência. Alterações na expressão de membros da família PGC-1 em cânceres vem sendo avaliada por diversos autores em diferentes modelos de câncer. Entretanto, os resultados diferem de acordo com o tipo de câncer e ainda são controversos.

Um dos primeiros trabalhos a respeito do envolvimento de PGC-1 e câncer de mama foi publicado em 2003 por Jiang e colaboradores. Os autores conduziram experimentos *in vitro* e *in vivo* analisando a expressão de PGC-1 $\alpha$  em câncer de mama e mostraram que a expressão PGC-1 $\alpha$  não diferiu entre tecido normal e tecido tumoral de

mama. Além do mais, uma redução da expressão de PGC-1 $\alpha$  foi observada durante o desenvolvimento do tumor.

Nos últimos anos houve maiores investigações sobre o envolvimento de membros da família de PGC-1s em diferentes cânceres. Em 2012, Klimcakova e colaboradores analisaram o papel de PGC-1 $\alpha$  em tumores de mama com a superexpressão de HER2 induzida. Nesse modelo, os autores caracterizaram o Efeito Warburg através do aumento da produção de lactato, aumento de genes relacionados ao metabolismo glicolítico e diminuição da expressão de genes relacionados ao metabolismo mitocondrial e PGC-1 $\alpha$ . Aumentando a expressão de PGC-1 $\alpha$  nessas células, os autores reduziram a proliferação celular e aumentaram a função mitocondrial. No entanto, os dados *in vivo* foram conflitantes e mostraram que, no camundongo, os tumores expressando PGC-1 $\alpha$  cresceram mais rapidamente e foram maiores do que os dos controles.

A respeito de PGC-1 $\beta$ , Eichner e colaboradores (2010) investigaram sua expressão em células de mama que superexpressam HER2. Os autores identificaram que PGC-1 $\beta$  e seu micro RNA intrônico (miRNA378\*) são co-regulados pela superexpressão de HER2. Nesse modelo, o *knockdown* de HER2 diminuiu a expressão de PGC-1 $\beta$  em aproximadamente 50%. Os autores mostram um importante papel de ERR $\alpha$  e ERR $\gamma$  na regulação do metabolismo. Ao bloquear ERR $\gamma$  nas células superexpressando HER2, não houve ativação do eixo PGC-1 $\beta$ / ERR $\gamma$  o qual parece favorecer a via oxidativa, e assim PGC-1 $\beta$  se mantém para ativar ERR $\alpha$  favorecendo a via glicolítica.

A expressão de PGC-1s em diferentes linhagens de câncer de mama também foi avaliada por Chang e colaboradores (2011). Os autores revelaram que a expressão de PGC-1 $\beta$  é encontrada em diversas linhagens, ao contrario de PGC-1 $\alpha$  que é expressa apenas em algumas. Além do mais, os mesmos autores (Chang, McDonnell, 2012) mostraram também um importante papel para o eixo PGC-1 $\beta$  e ERR $\alpha$ , onde PGC-1 $\beta$ parece ser o coativador mais relevante para ERR $\alpha$  quando se tratando de tumor de mama HER2- positivo.

Ainda são escassos os trabalhos na literatura que mostram alterações de PGC- $1\alpha/\beta$  no desenvolvimento do câncer de mama e os resultados são controversos. Os mecanismos envolvidos na proliferação celular do carcinoma de mama em diferentes subtipos moleculares *in vitro* e em pacientes e sua relação com metabolismo e produção de espécies reativas ainda permanecem desconhecidos. Elucidar por quais mecanismos o coativador PGC-1 age em um modelo de câncer de mama é de grande importância para pesquisas futuras que visam sua modulação. Nesse contexto, espera-se com esse trabalho contribuir para embasamento de pesquisas futuras para o tratamento alternativo do câncer, assim como em outras doenças em que PGC-1 apresentar sua expressão desregulada.

#### 3. Hipótese

Trabalhos ainda não publicados em nosso laboratório (Passos, 2014) e de outros autores (Vazquez et al., 2013) mostram que a expressão de PGC-1 está aumentada em células de melanoma e tem uma correlação direta com a agressividade do tumor. Ainda não existe um consenso sobre os níveis de expressão e atividade dos membros da família dos coativadores PGC-1 em tumores de mama. Além disso, os mecanismos pelos quais PGC-1s controlam a proliferação e/ou sobrevivência de células tumorais ainda não foram totalmente esclarecidos.

Nossa hipótese principal é que a expressão de PGC-1 em células tumorais de mama obedeça a um padrão distinto da expressão em células não tumorais. Além disso, considerando as diferentes características moleculares dos subtipos tumorais, também fazemos a hipótese de que a expressão de PGC-1 pode variar de acordo com os marcadores moleculares expressos. Assim, a expressão de PGC-1 pode modular positivamente ou negativamente vias relacionadas à proliferação de células tumorais e sua inibição pode alterar vias de sinalização redox e/ ou de vias metabólicas.

#### 4. Objetivos

#### 4.1 Geral

Elucidar as vias dependentes da atividade de PGC-1 que influenciam a proliferação de células tumorais de mama.

#### 4.2 Específicos

4.2.1 Determinar a expressão de PGC-1 $\alpha$  e  $\beta$  em células tumorais de mama. Estratégia: Foram utilizadas as linhagens tumorais de mama luminal (MCF7), HER2positiva (SKBR3) e triplo negativa (MDAMB231). Como linhagem não tumoral, foi utilizada a célula imortalizada derivada de tecido mamário benigno (MCF-10A). A expressão de PGC-1 $\alpha$  e  $\beta$  foi avaliada por PCR quantitativo e a proteína por western blotting.

4.2.2 Determinar se a diminuição da expressão de PGC-1β altera a proliferação e sobrevivência de células tumorais de mama HER2- positivas.

Estratégia: Células tumorais de mama HER2- positivas foram transfectadas com RNA de interferência (RNAi) para diminuição da expressão de PGC-1β. A proliferação celular foi analisada por contagem celular em câmera de Newbauer e a viabilidade utilizando a solução de exclusão Azul de Tripan.

4.2.3 Analisar se alterações da expressão de PGC-1β influencia a proliferação celular de tumor de mama HER2- positivo via alterações na expressão de ciclinas.

Estratégia: Foram analisadas a expressão de ciclinas B, C, D e E na linhagem celular HER2- positiva transfectadas com duas sequências negativas versus duas sequências específicas para diminuição da expressão de PGC-1β por PCR quantitativo.

4.2.4 Verificar se alterações da expressão de PGC-1β influencia a proliferação celular por alterar a quantidade mitocondrial de tumor de mama HER2- positivo.

Estratégia: Foi analisada a quantidade de mitocôndrias na linhagem celular HER2positiva transfectadas para PGC-1β. A quantidade mitocondrial foi avaliada medindo-se o mtDNA por RT-PCR e fatores relacionados à replicação como TFAM, e fatores relacionados à respiração mitocondrial como NRF1 e NRF2. 4.2.5 Determinar se alterações da expressão de PGC-1 $\beta$  em células de câncer de mama HER2- positivas afetam a proliferação celular via regulação do metabolismo energético. Estratégia: Foi avaliada a produção de lactato intracelular e liberado através da utilização de um kit colorimétrico específico, a atividade da enzima citrato sintase por ensaio enzimático e respiração mitocondrial através do sistema Oroboros nas células tumorais HER2- positivas transfectadas para PGC-1 $\beta$ .

4.2.6 Verificar se a expressão de PGC-1 $\beta$  modula a produção de EROs, ERNs e o perfil antioxidante.

Estratégia: A avaliação da sinalização redox intracelular na linhagem de mama HER2positiva transfectadas para PGC-1β foi realizada através da detecção, por citometria de fluxo, de adutos fluorescentes resultantes da reação de EROs com fluoróforos específicos. A produção de ERNs foi avaliada pela mensuração de nitrito e nitrato utilizando o equipamento Nitric Oxide (NO)- Analyzer de alta sensibilidade. O perfil antioxidante foi analisado pela mensuração da expressão gênica da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). A atividade da enzima SOD e CAT e o sistema glutationa reduzida/ glutationa oxidada (GSH/GSSG) também foram avaliadas através de um ensaio espectrofotométrico. Para avaliar a presença de desacoplamento mitocondrial utilizamos o marcador DIOC6 e realizamos citometria de fluxo.

4.2.7 Determinar se alterações da expressão de PGC-1 $\beta$  em células de câncer de mama HER2- positivas afetam a proliferação celular via ERRs.

Estratégia: Foi avaliada a expressão dos fatores de transcrição ERR $\alpha$  e ERR $\gamma$  por PCR quantitativo.

4.2.8 Determinar a expressão de PGC-1 $\beta$  em tumores de pacientes com câncer de mama de diferentes subtipos moleculares.

Estratégia: Foram utilizados cDNAs de tumores provenientes de pacientes portadoras do câncer de mama. Os tumores foram classificados nos subtipos moleculares luminal A e B, HER2- superexpresso e triplo negativos por imunohistoquímica. A expressão de PGC-1β foi avaliada por PCR quantitativo e por imunohistoquímica

#### 5. Material e Métodos

#### 5.1. Cultivo celular

Foi utilizada a linhagem tumoral de mama SKBR3 como equivalente ao subtipo molecular HER2- positivo, MDA-MB-231 equivalente ao subtipo molecular triplonegativo, e MCF-7 como luminal. Como linhagem não tumoral, foi utilizada a célula imortalizada derivada de tecido mamário benigno MCF-10A. As células MCF10A foram mantidas em meio MEGM (Lonza) contendo 100ng/ mL de toxina de cólera. As células SKBR3 foram mantidas em meio McCoy, pH 7,2 e 10% de soro fetal bovino (Gibco). As células MCF-7 foram mantidas em meio RPMI 1640 (Cultilab), pH 7,2 e 10% de soro fetal bovino (Gibco). A cultura foi mantida em atmosfera contendo 95%  $O_2$  e 5%  $CO_2$  a 37°C. As células da linhagem MDA-MB-231 foram mantidas em meio Leibovitz L-15, pH 7,2, 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100%  $O_2$ , 37 °C.

#### 5.2. Pacientes

Amostras de cDNA provenientes de tumores de pacientes portadoras do câncer de mama foram gentilmente cedidas pela Professora Doutora Carolina Panis da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). O projeto foi aprovado pelo Sistema Nacional de Informações Sobre Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (SISNEP) (CAAE 35524814.4.0000.0107) e as pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Para a determinação do N amostral foi utilizada a seguinte fórmula (Herrera et al., 2014; Victorino et al., 2014c):

$$n_{0} = \frac{Z^{2} \cdot p(1-p)}{D^{2}} \qquad n_{0} = \frac{(1,96)^{2} \cdot 0,5(1-0,5)}{(0,05)^{2}} = 384,16$$
$$n = \frac{n_{0}}{1+\frac{n_{0}}{N}} \qquad n = \frac{384,16}{1+\frac{384,16}{61,74}} = 53$$

Sendo:  $n_0$ = número dimensionado (=384,16), Z= nível de confiança/ distribuição normal (1,96, considerando Z= 95%), p= probabilidade (50%), D= margem de erro (5%), n= tamanho da amostra e N= tamanho da população (61,74).

A cidade de Londrina possui população estimada para o ano de 2014 de 543.003 habitantes, segundo dados do IBGE (2015). Destas, 107.790 são mulheres e estão na faixa etária entre 35 e 80 anos. Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer, válidos para 2015 (INCA, 2014), é estimado uma taxa de 61,74 novos casos de câncer de mama a cada 100 mil mulheres no estado do Paraná. Assim, utilizando a fórmula do cálculo amostral faz-se necessário um número amostral desejável de 53 pacientes portadoras do câncer de mama.

Os tumores de mama foram coletados durante cirurgia no Instituto de Câncer de Londrina (ICL) pela Doutora Ana Cristina do Amaral Herrera. As pacientes inclusas nesse estudo apresentavam tumor operável sem prévio tratamento quimioterápico. Durante esse estudo, 978 mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama. Para essas pacientes foram incluídos critérios de exclusão como fumantes, consumidoras frequentes de álcool, usuárias de suplemento antioxidante, grávidas, praticantes excessivas de exercícios físicos, usuárias de reposição hormonal e/ ou presença de outras doenças crônicas e uso prévio de quimioterapia. Após os critérios de exclusão foram elegíveis para esse estudo 23 pacientes que foram subdivididas de acordo com o subtipo molecular em Luminal A (n=8), Luminal B sem superexpressão de HER2 (n=4), HER2 superexpresso (n= 6) e Triplo Negativa (n= 5).

#### 5.3. Análise imunohistoquímica para subtipagem molecular dos tumores de mama

A análise imunohistoquímica foi realizada pelo Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Londrina, utilizando amostras de tecido mamário das pacientes. As amostras foram previamente fixadas em formol, inclusas em parafina e processadas pelo método da avidina-peroxidase. Os cortes foram analisados em microscopia de luz e classificados como positivos ou negativos para a expressão dos marcadores tumorais para RE (clone 1D5 a 1:600; Dako, Dinamarca), RP (clone PGR 636 a 1:500; Dako, Dinamarca) e HER2 (clone PN2A a 1:500; Dako, Dinamarca). Os cortes em parafina foram aquecidos por 30 minutos a 65 ° C, desparafinizadas em xilol, e re-hidratadas em etanol graduado a temperatura ambiente. Os cortes foram tratados com 2% de soro albumina bovino por 40 minutos a temperatura ambiente. Os cortes foram incubados overnight a 4 ° C com os anticorpos primários para RE, RP e HER2. O anticorpo secundário foi adicionado no dia seguinte e reagiu durante 2 horas. A atividade da Horseradish peroxidase foi visualizada após o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 3,3'diaminobenzidina por 5 minutos. No último passo, os cortes foram contrastados fracamente com hematoxilina de Harry (Merck). A intensidade e imunoreatividade foram avaliadas com um fotomicroscópio (Leica DM 2500 e Leica DFC280; Leica, Alemanha). As amostras foram consideradas positivas para RE e RP quando ao menos 10% do núcleo da célula tumoral foi corada. As amostras foram categorizadas e consideradas como HER2 positivas quando o score foi de 3+ por imunohistoquímica e consideradas como HER2 negativas quando o score foi de 1+ ou 0. As amostras com score 2+ foram analisadas por FISH para detectar a amplificação de HER2 (HER2 FISH pharmDx<sup>TM</sup>; Dako, Dinamarca). As amostras com score 2+ pela imunohistoquímica e com resultado amplificado em FISH foram então consideradas como positivas, enquanto que as amostras com score 2+ pela imunohistoquímica e com resultado não amplificado em FISK foram consideradas HER2 negativas. As lâminas foram avaliadas por um patologista.

#### 5.4. Determinação de curvas de crescimento

As células foram plaqueadas individualmente em placas de 6 poços a  $1 \times 10^5$  células/poço. O meio de cultura foi retirado e mantido em tubo de ensaio. Os poços foram lavados com PBS com posterior adição de 200µL de tripsina. As células foram ressuspendidas em meio de cultura previamente retirado. Foi realizada a centrifugação do tubo a 1800 RPM durante 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 1 ml de meio de cultura. Desta suspensão de células final foi retirada uma alíquota de 10 µl, a qual foi adicionada 10 µl de azul de Tripan. 10 µL da solução foi transferida para a câmara de Neubauer e submetida à microscopia óptica para a contagem de células. Foram determinados o crescimento e a viabilidade celular através da contagem, sendo que a adição do azul de Tripan foi critério de exclusão de células mortas, as quais apresentaram coloração azulada no interior. A contagem foi realizada por cinco dias em intervalos de 24 horas.

#### 5.5. Silenciamento de PGC-1β por RNA de interferência (RNAi)

As células tumorais de mama HER2- positivas foram plaqueadas em placas de 6 poços a  $2,5 \times 10^5$  células/poço. Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com PBS. Foram realizados 6 grupos de acordo com a tabela 2:

Grupo	Reagentes
Controle	Opti-MEM I
Lipofectamina	Opti-MEM I e lipofectamina
Negativo 1	Opti-MEM I, lipofectamina e sequência negativa 1
Negativo 2	Opti-MEM I, lipofectamina e sequência negativa 2
Sequência 1	Opti-MEM I, lipofectamina e sequência 1 específica para PGC-1β
Sequência 2	Opti-MEM I, lipofectamina e sequência 2 específica para PGC-1β

 Tabela 2: Grupos experimentais.

Foi adicionado 1 nM de concentração final de RNAi e 5  $\mu$ l de Lipofectamina RNAi MAX (Invitrogem) para cada grupo. Essa solução reagiu por 20 minutos para a formação dos complexos em temperatura ambiente. Foi adicionado meio de transfecção Opti-MEM I (Invitrogen) para totalizar o volume final de 2,5 mL/poço. As sequências específicas para PGC-1 $\beta$  (Ambion by life technologies) foram de acordo com a tabela 3:

 Tabela 3: Sequências de RNA de interferência (RNAi) utilizadas.

RNAi	Sequências	
Sequência 1	Sense	GAG CCG AAG UUG UAC AGA Att
	Antisense	UUC UGU ACA ACU UCG GCU Ctg
Sequência 2	Sense	CAG AUA CAC UGA CUA CGA Utt
	Antisense	AUC GUA GUC AGU GUA UCU Ggg

As células em cultura foram avaliadas 72 horas após a transfecção com RNAi. As células foram recolhidas para posterior mensuração da expressão de PGC-1s e posteriores experimentos.

#### 5.6. Detecção da expressão proteica por Western Blotting

Foi avaliada a expressão proteica de PGC-1 $\beta$  em células de cultura. Para tal, as células foram plaqueadas individualmente em placas de 6 poços a 2,5x10<sup>5</sup> células/poço. O meio de cultura foi retirado e as amostras foram homogeneizadas em tampão de lise RIPA acrescido de inibidores de proteases (1mg/ml pepstatina A, 100mM PMSF). Em

seguida, as amostras de lisado foram centrifugadas a 15000RPM por 10 minutos a 4 ° C. O sobrenadante foi coletado, e a concentração de proteínas foi quantificada pelo método de Bradford. Amostras de 50 µg/ml de proteínas foram acrescidas de tampão de amostra (2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 60 mM Tris pH 6,8, 5% de mercaptoetanol, e 0,01% de azul de bromofenol) e submetidas à eletroforese em um sistema SDS-PAGE, gel 10% de poliacrilamida (1,5 M Tris-HCl, 10% SDS, 30% bis-acrilamida, 10% de persulfato de amônia e TEMED). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Biorad) em aparelho semi-drytransfer (Biorad). As membranas foram incubadas em solução de bloqueio 1% de BSA (albumina bovina) em tampão TBST (50 mM de tampão Tris, pH 8,0, 100mM NaCl, 0,1% Tween 20) por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas em TBST e incubadas com anticorpos primários (Santa Cruz) contra as proteínas de interesse overnight, 4 ° C. Posteriormente, as membranas foram incubadas em solução contendo anticorpo secundário conjugado a peroxidase e expostas ao sistema de detecção SuperSignal (Pierce). A expressão das proteínas foi comparada por densitometria de gel, utilizandose o programa de domínio público "Image J", criado por Wayne Rasband do National Institute of Mental Health, NIH, USA (Panis et al., 2013).

#### 5.7. Extração de RNA e PCR

Para a extração do RNA total, foi adicionado 1 ml de TRIzol (Invitrogen) em cada poço de cultura celular, sendo mantido por 5 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µl de clorofórmio por amostra, com posterior homogeneização e incubação por 3 minutos a temperatura ambiente. Foi realizada centrifugação por 15 minutos a 12000RPM, temperatura de 4 ° C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e as demais frações desprezadas. Foram adicionados 500 µl de isopropanol, com incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. O produto foi centrifugado por 10 minutos na mesma velocidade e temperatura anterior, e o sobrenadante desprezado. Posteriormente foi adicionado 1 ml de etanol 70%, sendo realizada nova centrifugação, durante 5 minutos a 7500RPM a 4 ° C. O falcool residual foi retirado e a amostra ressuspendida em 20 µL de água DEPC. O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria utilizando biofotômetro (NanoVeu, GE Heathcare) em comprimento de onda de 260nm. Os níveis de transcritos foram determinados por Real-Time PCR (AppliedBiosystems) com primers específicos (Invitrogen), como segue abaixo (Tabela

4), e o resultado foi calculado sob a razão da expressão do gene *housekeeping* B2M, também determinado por Real-Time PCR.

Gene	Sequências	
B2M	Sense	GAT GAG TAT GCC TGC CGT TGC
	Antisense	CAA TCC AAA TGC GGC ATC T
PGC1a	Sense	CAC CAG CCA ACA CTC AGC TA
	Antisense	GTG TGA GGA GGG TCA TCG TT
PGC1β	Sense	TGT TCA GAC AGA ACG CCA AG
	Antisense	ACA CCG GTA GGT GAT GAA GC
COI	Sense	ACC CTA GAC CAA ACC TAC GCC AAA
	Antisense	TAG GCC GAG AAA GTG TTG TGG GAA
16S rRNA	Sense	CGC ATA AGC CTG CGT CAG ATA AAA
	Antisense	TGT GTT GGG TTG ACA GTG AGG GTA
18S	Sense	GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT
	Antisense	CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG
TFAM	Sense	AAT GGA TAG GCA CAG GAA ACC
	Antisense	CAA GTA TTA TGC TGG CAG AAG TC
NRF1	Sense	GGC ACT GTC TCA CTT ATC CAG GTT
	Antisense	CAG CCA CGG CAG AAT AAT TCA
NRF2	Sense	CAG CCT GAA CTG GTT GCA CAG AAA
	Antisense	TCA ACT CCG CTG CAC TGT ATC CAA
Ciclina B	Sense	TACTGGGTCGGGAAGTCACTGG
	Antisense	GCAGCATCTTCTTGGGCACAC
Ciclina C	Sense	ATCCAAGCATTAGGTGAACATC
	Antisense	AGCAGCAGCAATCAATCTTG
Ciclina D	Sense	CCAGAGGCGGAGGAGAACAAAC
	Antisense	TGGAGGGCGGATTGGAAATG
Ciclina E	Sense	TTCAGGGTATCAGTGGTGCGAC
	Antisense	TTGCTCGGGCTTTGTCCAG
Superóxido	Sense	ACA GGC CTT ATT CCA CTG CT
dismutase	Antisense	CAG CAT AAC GAT CGT GGT TT
Catalase	Sense	TAA GAC TGA CCA GGG CAT C
	Antisense	CAA ACC TTG GTG AGA TCG AA
ERRa	Sense	GGC AAA GTG CTG GCC CAT TTC TAT
	Antisense	TCG AGC ATC TCC AAG AAC AGC TTG
ERRγ	Sense	CCATCAGAACGGACTTGACTCG
	Antisense	CAGAAGCGATGTCACCACACAC

Tabela 4: Sequências utilizadas para realização de RT-PCRs.

A reação de RT-PCR foi realizada com 15  $\mu$ l de volume total, sendo 1,6  $\mu$ l de água deionizada estéril, 7,5  $\mu$ l SYBR Green qPCRsuperMix-UDG (Invitrogen), 0,3  $\mu$ l de cada primer (sense e antisense) a 10 pmol/ml, 0,3  $\mu$ l de ROX e 5  $\mu$ l de RNA a 100 ng diluído em água DEPC. A reação foi realizada em aparelho StepOne<sup>TM</sup> Real-Time PCR System (Applied Biosystem).

#### 5.8. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976). As amostras foram diluídas 100x para quantificação e foi utilizada uma diluição seriada de soro albumina como padrão. A leitura foi realizada a 595nm em espectrofotômetro.

#### 5.9. Produção de lactato

Para avaliar a produção de lactato intracelular e liberado no meio de cultura de células SKBR3 tratadas com RNAi, foi utilizado um kit colorimétrico para detecção de lactato e a metodologia seguiu conforme protocolo do fabricante (BioVision). Para dosagem da produção de lactato as células e o sobrenadante das células SKBR3 tratadas com RNAi foram diluídas em tampão. O lactato presente na amostra é oxidado pela lactato desidrogenase gerando um produto que interage com o probe para gerar cor. A leitura foi realizada a 450nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nmol de lactato.

#### 5.10. Determinação da atividade da enzima citrato sintase

Para dosagem da atividade da enzima citrato sintase as células SKBR3 tratadas com RNAi foram homogeneizadas em 50  $\mu$ L de tampão TRIS-HCl 50 mM/ EDTA 1mM, pH 7,4 contendo inibidor de protease. As células foram lisadas em sonicador por 10 segundos e centrifugadas a 1200RPM por 1 minuto a 25 ° C. O sobrenadante foi recolhido para quantificação de proteína pelo método de Bradford e as amostras foram diluídas para 2,5 mg/mL. A atividade da enzima citrato sintase foi avaliada em um meio de incubação contendo 5',5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB) 0,1 mM, ácido oxaloacético 0,2 mM, Triton X-100 10% e acetil-CoA 0,1 mM, em um tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. A redução do DTNB foi medida espectrofotometricamente a 412 nm por 10 minutos a 25 ° C (Srere, 1969).

#### 5.11. Consumo de oxigênio

A taxa respiratória foi mensurada utilizando  $1 \times 10^6$  células intactas em meio de cultura McCoy suplementado com 10% de soro albumina utilizando o sistema de alta resolução Oroboros (Innsbruck, Áustria). As análises foram realizadas através da adição
sequêncial de 1  $\mu$ M de oligomicina, 2  $\mu$ M de carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona (CCCP) e 1  $\mu$ M de antimicina (AA) a 37 ° C (Chausse et al., 2014).

### 5.12. Detecção de espécies reativas de oxigênio por citometria de fluxo

Para detecção de EROs foi utilizado o protocolo para dihidroetidina (DHE) conforme manual do fabricante (Invitrogen). As células do grupo experimental e controle foram incubadas com DHE. A DHE apresenta fluorescência azul quando no citoplasma até ser oxidada. Quando oxidada, a DHE se intercala com o DNA da célula, corando o núcleo com fluorescência vermelha. A fluorescência derivada da DHE foi avaliada por citometria de fluxo e os resultados foram expressos por intensidade relativa (%).

#### 5.13. Detecção de nitrito e nitrato por NO-Analyzer

A determinação da concentração de nitrato e nitrito, como estimativa de óxido nítrico (NO), foi realizada através de uma técnica de quimiluminescência NO/ozônio utilizando-se um analisador de NO (Sievers 280 NO Analyzer, Boulder CO. USA). O sobrenadante de cultura de células SKBR3 tratadas com RNAi foi centrifugado a 2000RPM, 5 minutos a 4 ° C e estocado em ultra freezer -80 ° C para posterior leitura no analisador. Para mensuração de nitrato, 5 µl da amostra foi colocada na câmara de reação do analisador contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em HCl 1N à 95 ° C) que converte nitrato em NO, em quantidades equimolares. Para medir o nitrito utiliza-se um agente redutor (1% wt/vol de NaI ou KI em ácido acético) para converter nitrito em NO. O NO é dragado para a câmara de quimiluminescência do analisador, que por sua vez, reage com o ozônio  $(O_3)$ , formando dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). O NO<sub>2</sub><sup>-</sup> apresenta-se numa forma instável e tem a capacidade de emitir fótons que se chocam contra uma superfície foto- sensível de uma célula fotomultiplicadora. O fóton emitido pela reação é detectado e convertido em sinal elétrico. Essa corrente de elétrons é captada, amplificada e processada por um transdutor analógico-digital, dando origem a um traçado gráfico, em que a área sob a curva gerada corresponde a concentração de nitrato na amostra. Os valores de nitrito e nitrato foram expressos em µM (Alves et al., 2002).

#### 5.14. Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

O composto pirogalol é auto-oxidante a 37 ° C e gera radical superóxido e compostos que absorvem comprimentos de onda a 420 nm. Assim, sem a presença da enzima SOD, a absorbância aumenta com o tempo. Para dosagem da atividade da enzima SOD as células SKBR3 tratadas com RNAi foram homogeneizadas em 50  $\mu$ L de tampão TRIS-HCl 50 mM/ EDTA 1 mM, pH 7,4 contendo inibidor de protease. As células foram lisadas em sonicador por 10 segundos e centrifugadas a 1200RPM por 1 minuto a 25 ° C. O sobrenadante foi recolhido para quantificação de proteína pelo método de Bradford e as amostras foram diluídas para 1 mg/mL. A atividade da enzima SOD foi avaliada em solução contendo 150  $\mu$ L de água destilada, 20  $\mu$ L de tampão TRIS 1M, pH 8, 20  $\mu$ L de amostra e 10  $\mu$ L de pirogalol. Para avaliar a auto-oxidação do pirogalol foi realizada uma curva contendo 170  $\mu$ L de água destilada, 20  $\mu$ L de tampão TRIS 1 M, pH 8 e 10  $\mu$ L de pirogalol. A auto-oxidação do pirogalol foi avaliada por meio de uma cinética durante 4 minutos, a 37 ° C. A leitura foi realizada em aparelho VersaMax® a 420 nm. Os resultados foram expressos como unidade de SOD (USOD) (Victorino et al., 2014c).

### 5.15. Determinação da atividade da enzima catalase

As células foram lisadas em 60  $\mu$ L de água destilada. Para leitura em espectrofotômetro, foram adicionados 20  $\mu$ L de água destilada e 160  $\mu$ L de solução tampão Tris 1 M, onde foi acrescentado 10  $\mu$ L de amostra e em seguida 10  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio adicionado na reação é degradado pela enzima catalase presente na amostra e assim foi observada queda de absorbância na cinética devido à absorção no comprimento de onda de 240 nm pelo peróxido de hidrogênio. A leitura foi realizada em aparelho SpectraMax® a 240 nm e os resultados foram expressos em velocidade de absorbância / minuto/ mg proteína (Victorino et al., 2014c).

# 5.16. Quantificação de glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG) e níveis de glutationa totais

O ensaio para quantificação do sistema glutationa foi realizado utilizando um kit comercial (BioVision) e o protocolo seguiu instruções do fabricante. As células SKBR3 tratadas com RNAi para PGC-1 $\beta$  foram diluídas em 60  $\mu$ L de solução tampão e desproteínizadas utilizando 20  $\mu$ L de ácido perclórico 6 N. As amostras foram centrifugadas a 13.000RPM por 2 minutos a 4 ° C e o sobrenadante recolhido. Foi adicionado então 20  $\mu$ L de KOH 6 N em 40  $\mu$ L do sobrenadante para precipitar o ácido perclórico e estabilizar as amostras. As amostras foram centrifugadas a 13.000RPM por 2 minutos a 4 ° C e o sobrenadante recolhido. 10  $\mu$ L dessa solução foram transferidos para microplaca de 96 poços para dosagem. Foi realizada uma curva padrão de GSH seguindo instruções do fabricante. Para detecção de GSH foi adicionado 90  $\mu$ L da solução tampão à amostra seguido de 10  $\mu$ L de OPA probe. Para detecção de GSSG foi adicionado à amostra 80  $\mu$ L de tampão e 10  $\mu$ L de agente redutor para conversão do GSSG em GSH. Após 10 minutos de reação, foi adicionado 10  $\mu$ L de OPA probe. Para detecção de 10  $\mu$ L de GSH quencher, o qual remove o GSH da amostra. Após reação, foram adicionados 10  $\mu$ L de agente redutor para destruir o excesso de GSH quencher e para converter o GSSG em GSH. Em seguida, foi adicionado 10  $\mu$ L de OPA probe. 10  $\mu$ L de OPA probe também foram adicionados à curva padrão de GSH. Após 40 minutos de reação, a reação foi lida em aparelho SpectraMax® em Excitação 340nm e Emissão 420nm.

### 5.17. Avaliação de desacoplamento mitocondrial por citometria de fluxo

Para avaliação de desacoplamento mitocondrial utilizando o marcador DIOC6 seguimos o protocolo de acordo com o fabricante (Molecular Probes <sup>TM</sup>). As células SKBR3 tratadas com RNA de interferência para PGC-1 $\beta$  foram lavadas com 1 mL de PBS e centrifugadas a 1600RPM por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguidas, as células foram incubadas por 30 minutos a 37 ° C em 1 mL de solução PBS contendo 50 nM de DIOC6. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1.600RPM por 5 minutos e lavadas com solução PBS. Por fim, as células foram incubadas por 30 minutos a 37 ° C em 1 mL de solução procenta e a solução PBS, centrifugadas a 1.600RPM por 5 minutos e lavadas com solução PBS, centrifugadas a 1.600RPM por 5 minutos e ressuspendidas em 200  $\mu$ L de PBS para análise em citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como porcentagem de células com perda de potencial de membrana.

#### 5.18. Análise Estatística

As análises foram realizadas com N= 6. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com pósteste de Tukey para comparação entre os grupos. Foi considerado como significativa diferença com p< 0,05.

#### 6. Resultados

### 6.1. Expressão de PGC-1s em células tumorais de mama

Inicialmente nós investigamos a expressão de PGC-1s ( $\alpha \in \beta$ ), em células tumorais de mama MCF7 (luminal), SKBR3 (HER2) e MDAMB231 (triplo negativa) em relação a uma linhagem de mama não tumoral imortalizada espontaneamente (MCF10A). Nossos resultados mostram menor expressão de PGC-1 $\alpha$  nas linhagens tumorais MCF7 e SKBR3 quando comparada com a linhagem não tumoral (p< 0,05) e não houve alteração significativa para MDAMB231 (Figura 3).



PGC1-α

Figura 3: Expressão de PGC-1a em células não tumorais de mama imortalizadas espontaneamente (MCF10-A), e células tumorais de mama luminais (MCF7), HER2- positivas (SKBR3) e triplo negativas (MDAMB231). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro das médias. \* p< 0,05 indica diferença estatística entre a linhagem não tumoral (MCF10-A) e as linhagens tumorais (MCF7, SKBR3 e MDAMB231) utilizando o teste estatístico One-Way ANOVA seguido de Tukey como pós- teste.

A expressão de RNAm para PGC-1 $\beta$  foi 4x mais elevada na linhagem celular HER2- positiva do que na célula de mama não tumoral (p < 0,001), enquanto que a

expressão de PGC-1 $\beta$  nas linhagens luminal e triplo negativa foi significativamente menor (p < 0,001) (Figura 4).



Figura 4: Expressão de PGC-1 $\beta$  em células não tumorais de mama imortalizadas espontaneamente (MCF10-A), e células tumorais de mama luminais (MCF7), HER2- positivas (SKBR3) e triplo negativas (MDAMB231). Os resultados estão expressos como média ± erro das médias. \* p< 0,05 indica diferença estatística entre a linhagem não tumoral (MCF10-A) e as linhagens tumorais (MCF7, SKBR3 e MDAMB231) utilizando o teste estatístico One-Way ANOVA seguido de Tukey como pós- teste.

Em seguida foi avaliada também a expressão proteica de PGC-1 $\beta$  por Western Blotting. Observamos aumento da expressão proteica de PGC-1 $\beta$  nas células tumorais de mama em relação à célula não tumoral MCF-10A (p<0,05) (Figura 5).



Figura 5: Expressão proteica de PGC-1 $\beta$  por Western Blotting de células não tumorais de mama imortalizadas espontaneamente (MCF10-A), e células tumorais de mama luminais (MCF7), HER2-positivas (SKBR3) e triplo negativas (MDAMB231). O painel acima mostra qualitativamente a expressão de PGC-1 $\beta$  (10A= MCF10A; 7= MCF7; SK= SKBR3; 231= MDAMB231). O gráfico abaixo mostra quantitativamente a expressão de PGC-1 $\beta$ . \* p< 0,05 indica diferença estatística entre a linhagem MCF10-A e as linhagens tumorais (MCF7, SKBR3 e MDAMB231) utilizando o teste estatístico One-Way ANOVA seguido de Tukey como pós- teste.

#### 6.2. Proliferação de células tumorais de mama

Foi determinada a curva de proliferação de células MCF10A e das linhagens tumorais de mama. A linhagem tumoral SKBR3 apresentou maior taxa de proliferação celular comparado com a linhagem não tumoral MCF10A (p< 0,001), enquanto que as linhagens luminal e triplo negativas não diferiram. Em 120 horas, a linhagem SKBR3 apresentou maior taxa de proliferação também quando comparada a MCF-7 e MDAMB231 (p<0,001) (Figura 6).



Figura 6: Curva de proliferação de células não tumorais de mama imortalizadas espontaneamente (MCF10-A), e células tumorais de mama luminais (MCF7), HER2- positivas (SKBR3) e triplo negativas (MDAMB231). Curva de crescimento durante 120 horas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro das médias. \* p< 0,001 indica diferença estatística entre células HER2- positivas (SKBR3) e MCF10-A, MCF-7 e MDAMB-231 utilizando o teste *t* de Student e Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni como pós- teste.

Considerando que as células SKBR3 apresentam alta expressão de PGC1 e alta taxa de proliferação, nos próximos experimentos procuramos definir se existe alguma relação causal entre esses fenômenos.

# 6.3. Relação entre a expressão de PGC-1β e proliferação de células tumorais de mama HER2- positivas

Para investigar se a expressão de PGC-1 $\beta$  pode estar envolvida diretamente na proliferação de células tumorais de mama HER2- positivas, foram realizados experimentos utilizando sequências específicas de RNAi com a finalidade de diminuir a expressão de PGC-1 $\beta$  nessas células.

Como controle interno, foram realizados 2 grupos controles utilizando apenas o meio de cultura de transfecção (grupo controle) e outro utilizando o meio de cultura de transfecção e lipofectamina (grupo lipofectamina). Os reagentes utilizados para os testes de transfecção não influenciam a expressão de PGC-1 $\beta$  (p> 0,05) (Figura 7).



**Figura 7:** Controle interno de *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3) utilizando RNA de interferência. Resultado após 72 horas de tratamento com OPT-MEM (controle- CTR) e lipofectamina (lipo). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste *t* de Student.

Como controle negativo, utilizamos duas sequências negativas de RNAi, as quais entram na célula, mas não interferem na expressão gênica. Nossos resultados confirmam que as sequências negativas 1 e 2 não interferem na expressão de PGC-1 $\beta$  quando comparado ao grupo lipofectamina (p > 0,05) (Figura 8).



Figura 8: *Knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3) utilizando sequências negativas (*scrambles*) de RNA de interferência. Expressão gênica de PGC-1 $\beta$  nos grupos controle negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) após 72 horas de tratamento com RNA de interferência. Os resultados estão expressos como média ± erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

Em seguida, utilizamos duas sequências desenhadas especificamente para interferir na expressão de PGC-1 $\beta$ . A sequência 1 específica para PGC-1 $\beta$  diminuiu significativamente em 50% de sua expressão gênica comparando com os controles negativos (p < 0,01), enquanto que a sequência 2 específica para PGC-1 $\beta$  diminuiu em aproximadamente 20% de sua expressão quando comparada às sequências negativas 1 e 2 e não teve diferença significante (p > 0,05) (Figura 9).



**Figura 9:** *Knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3) utilizando RNA de interferência. Expressão gênica de PGC-1 $\beta$  nos grupos lipofectamina (Lipo), controle negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). \* p< 0,05 indica diferença estatística entre as sequências específicas 1 ou 2 e o controle negativo 1. # p< 0,05 indica diferença estatística entre as sequências específicas 1 ou 2 e o controle negativo 2. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pósteste de Tukey.

Após 72 horas de tratamento com RNAi, a sequência 1 específica para PGC-1 $\beta$  diminuiu significativamente sua expressão proteica quando comparada ao controle negativo 1 (p< 0,05) (Figura 10).



Figura 10: Expressão proteica de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3) após tratamento com RNA de interferência. O painel acima mostra qualitativamente a expressão de PGC-1 $\beta$  (N1= negativo 1; N2= negativo 2; S1= sequência 1; S2= sequência 2). O gráfico abaixo mostra quantitativamente a expressão de PGC-1 $\beta$ . Os resultados estão expressos como média ± erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

Após 72 horas de tratamento com RNAi avaliamos a proliferação das células SKBR3 e houve diminuição significativa de proliferação celular para a sequência 1 e até mesmo para a sequência 2 quando comparados aos controles negativos (p< 0,001), sem diferença em relação a viabilidade celular (p> 0,05) (Figura 11).



Figura 11: *Knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3) utilizando RNA de interferência e sua influência na proliferação celular. Taxa de proliferação e viabilidade celular após 72 horas de tratamento com RNA de interferência para PGC-1 $\beta$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro das médias. \* p< 0,05 indica diferença estatística entre as sequências específicas 1 ou 2 e o controle negativo 1. # p< 0,05 indica diferença estatística entre as sequências específicas 1 ou 2 e o controle negativo 2. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

Em seguida, avaliamos se os níveis de expressão de PGC-1 $\beta$  estariam correlacionados com a proliferação das células SKBR3. Nossa análise mostrou que houve correlação positiva (R<sup>2</sup>= 0,85, *p*< 0,01) entre a expressão de PGC-1 $\beta$  e a proliferação de células tumorais SKBR3 após tratamento com RNAi (Figura 12).



Figura 12: *Knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3) utilizando RNA de interferência e sua influência na proliferação celular. Correlação positiva entre a proliferação celular e a expressão de PGC-1 $\beta$  (r<sup>2</sup>= 0,85; p< 0,01) em células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando os controles (CTR), lipofectamina (Lipo), as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste de correlação de Pearson.

O conjunto de resultados indica que a expressão de PGC-1β em células HER2positivas está relacionada à maior taxa de proliferação celular e que sua manipulação genética diminuindo sua expressão é capaz de reduzir essa taxa de proliferação celular.

## 6.4. Alteração na expressão de PGC-1β em células tumorais de mama HER2positivas não influencia a expressão de ciclinas

Visto que a diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  em células tumorais de mama HER2- positivas diminui sua taxa de proliferação celular, procuramos investigar os prováveis mecanismos pelos quais PGC-1 $\beta$  pode influenciar a proliferação dessas células. Primeiramente avaliamos se a expressão de PGC-1 $\beta$  poderia influenciar na expressão de ciclinas causando assim menor proliferação dessas células. Para tal, analisamos a expressão de ciclinas B, C, D e E e não encontramos diferença para a expressão gênica das ciclinas avaliadas (p> 0,05) após *knockdown* de PGC-1 $\beta$  (Figuras 13, 14, 15 e 16).



## Ciclina B

Figura 13: Expressão de ciclina B após *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2positivas (SKBR3). Foi avaliada a expressão de ciclina B em células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média ± erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

## Ciclina C



Figura 14: Expressão de ciclina C após *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2positivas (SKBR3). Foi avaliada a expressão de ciclina C em células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média ± erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

# Ciclina D



Figura 15: Expressão de ciclina D após *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2positivas (SKBR3). Foi avaliada a expressão de ciclina D em células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média ± erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

## Ciclina E



Figura 16: Expressão de ciclina E após *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2positivas (SKBR3). Foi avaliada a expressão de ciclina E em células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média ± erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

## 6.5. Alteração na expressão de PGC-1β em células tumorais de mama HER2positivas não influencia a quantidade mitocondrial

Os coativadores de transcrição gênica PGC-1s estão relacionados principalmente à biogênese mitocondrial e ao metabolismo energético celular. Avaliamos a expressão do fator de transcrição mitocondrial TFAM (Figura 17) e dos fatores de respiração nuclear NRF2 (Figura 18) e NRF1 (Figura 19), relacionados à transcrição e replicação do mtDNA. Apenas a sequência 1 específica para PGC-1 $\beta$  diminuiu significativamente a expressão de NRF1 quando comparado à sequência negativa 2 (*p*>0,05) (Figura 20).

# TFAM



Figura 17: Quantidade mitocondrial após *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2positivas (SKBR3). O DNA mitocondrial foi avaliado através do fator transcrição mitocondrial TFAM em células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média ± erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

## NRF2



Figura 18: Quantidade mitocondrial após *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2positivas (SKBR3). O DNA mitocondrial foi avaliado através do fator de respiração nuclear 1 (NRF1) em células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média ± erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

## NRF1



Figura 19: Quantidade mitocondrial após *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2positivas (SKBR3). O DNA mitocondrial foi avaliado através do fator de respiração nuclear 2 (NRF2) em células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média ± erro das médias. # p< 0,05 indica diferença estatística entre a sequência específica 1 e o controle negativo 2. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

Para confirmar se o *knockdown* de PGC-1 $\beta$  pode influenciar a quantidade de mitocôndrias em células tumorais HER2- positivas, analisamos também a expressão dos marcadores de quantidade mitocondrial COI e 16S. Nossos resultados não mostram diferenças significativas na quantidade de DNA mitocondrial (*p*> 0,05) dependentes de PGC-1 $\beta$  em células SKBR3 após tratamento com RNAi (Figuras 20 e 21). Assim, a somatória de nossos resultados indica que não houve alterações significativas na quantidade de MER2- positivas causadas pela diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$ .

## COI



Figura 20: Avaliação do DNA mitocondrial (mtDNA) após *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3). O DNA mitocondrial foi avaliado através do marcador COI em células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.



Figura 21: Avaliação do DNA mitocondrial (mtDNA) após *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3). O DNA mitocondrial foi avaliado através do marcador 16S em células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

# 6.6. Influência da expressão de PGC-1β no perfil metabólico de células tumorais de mama HER2- positivas

Devido a grande importância dos coativadores de transcrição gênica PGC-1s no controle do metabolismo energético celular, nosso próximo passo foi investigar se alterações na expressão de PGC-1 $\beta$  pode influenciar a proliferação celular por causar alterações no perfil metabólico. Com a finalidade de avaliar se o *knockdown* de PGC-1 $\beta$ pode influenciar o Efeito Warburg, avaliamos a produção de lactato, sendo esse o principal metabólito produzido pela ativação da via glicolítica. A diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  diminuiu significativamente a produção de lactato intracelular das células HER2- positivas (*p*< 0,05) (Figura 22), enquanto não houve alteração nos níveis de lactato liberado no meio de cultura celular (*p*> 0,05) (Figura 23).





Figura 22: Influência do *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3) na produção de lactato intracelular. Foi avaliada a produção de lactato intracelular de células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média ± erro das médias. \* p< 0,05 indica diferença estatística entre a sequência específicas 1 e o controle negativo 1. # p< 0,05 indica diferença estatística entre as sequências específicas 1 e o controle negativo 2. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

## Lactato intracelular



Figura 23: Influência do *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3) na produção de lactato liberado. Foi avaliada a produção de lactato liberado no meio de cultura celular de células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média ± erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

Para avaliar a função da via oxidativa, mensuramos a atividade da enzima citrato sintase nas células SKBR3 após tratamento com RNAi. Nossos resultados indicam que há aumento significativo na atividade da enzima citrato sintase nas células tratadas com a sequência 1 quando comparada com os grupos controles (p< 0,05) (Figura 24).



Figura 24: Influência do *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3) na atividade da enzima citrato sintase. Foi avaliada a atividade da enzima citrato sintase de células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro das médias. \* p< 0,05 indica diferença estatística entre a sequência específicas 1 e o controle negativo 1. # p< 0,05 indica diferença estatística entre as sequências específicas 1 e o controle negativo 2. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

Para avaliar se o *knockdown* de PGC-1 $\beta$  poderia interferir com a respiração celular, analisamos o consumo de oxigênio pelas células tumorais HER2- positivas após diminuir a expressão de PGC-1 $\beta$ . Os resultados mostram que após o *knockdown* de PGC-1 $\beta$  com a sequência 1, essas células apresentam uma tendência (p= 0,1) a maior respiração celular avaliada através do traçado da taxa respiratória (Figura 25), da taxa de respiração basal (Figura 26), sem diferença entre taxa respiratória máxima (Figura 27) e capacidade respiratória sobressalente (p> 0,05) (Figura 28). Essa maior taxa respiratória pode estar ligada a maior produção de ATP (p= 0,1) (Figura 29), sem diferença em ralação a taxa de vazamento de prótons (H<sup>+</sup>) (p> 0,05) (Figura 30). Assim, alteração na expressão de PGC-1 $\beta$  parece influenciar vias metabólicas em células tumorais de mama HER2- positivas.



Figura 25: Taxa respiratória celular após *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2positivas (SKBR3). Foi avaliada a taxa respiratória celular de células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média ± erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.



Figura 26: Respiração basal após *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3). Foi avaliada a de respiração basal de células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.



Figura 27: Taxa respiratória máxima após *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2positivas (SKBR3). Foi avaliada a respiração máxima celular de células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média  $\pm$ erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.



**Figura 28: Capacidade respiratória sobressalente após** *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3). Foi avaliada a capacidade respiratória sobressalente de células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média ± erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.



Figura 29: Taxa respiratória ligada a produção de ATP após *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3). Foi avaliada a taxa respiratória ligada a produção de ATP de células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média ± erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.



Figura 30: Taxa de vazamento de prótons (H<sup>+</sup>) após knockdown da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3). Foi avaliada o vazamento de prótons de células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média ± erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

# 6.7. Influência da expressão de PGC-1β no equilíbrio redox de células tumorais de mama HER2- positivas

Devido à importância da produção de espécies reativas na proliferação celular, nós avaliamos se a diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  afeta a produção de EROs e ERNs. A produção de EROs aumentou significativamente nas células SKBR3 após diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  (*p*<0,001) (Figura 31).



Figura 31: Influência do *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3) na produção de espécies reativas de oxigênio. Foi avaliada a produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente ânion superóxido, de células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média ± erro das médias. \* p< 0,05 indica diferença estatística entre as sequências específicas 1 ou 2 e o controle negativo 1. # p< 0,05 indica diferença estatística entre as sequências específicas 1 ou 2 e o controle negativo 2. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

A produção de ERNs, avaliada pela produção de nitrito (Figura 32) e nitrato (Figura 33), não diferiu significativamente entre os grupos (p> 0,05). Dessa forma, PGC-1 $\beta$  parece interferir apenas na produção de EROs.

# Nitrito



Figura 32: Influência do *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3) na produção de espécies reativas de nitrogênio. Foi avaliada a produção de nitrito como estimativa de óxido nítrico de células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

## Nitrato



Figura 33: Influência do *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3) na produção de espécies reativas de nitrogênio. Foi avaliada a produção de nitrato como estimativa de óxido nítrico de células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

Em seguida analisamos o perfil antioxidante das células SKBR3 após knockdown de PGC-1 $\beta$ . Os resultados apontam uma diminuição significativa da expressão gênica da enzima antioxidante SOD quando PGC-1 $\beta$  é diminuído nas células HER2 (p< 0,05) (Figura 34). A expressão gênica da enzima antioxidante CAT não foi alterada (p> 0,05) (Figura 35).

## Superóxido Dismutase



Figura 34: Influência do *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  na expressão gênica da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) em células HER2- positivas (SKBR3). Foi avaliada a expressão gênica da enzima SOD em células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro das médias. \* p< 0,05 indica diferença estatística entre as sequências específicas 1 ou 2 e o controle negativo 1. # p< 0,05 indica diferença estatística entre as sequências específicas 1 ou 2 e o controle negativo 2. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

## Catalase



Figura 35: Influência do *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  na expressão gênica da enzima antioxidante catalase (CAT) em células HER2- positivas (SKBR3). Foi avaliada a expressão gênica da enzima CAT em células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2), sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

A atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e sistema GSSG/GSH também foi avaliada após *knockdown* de PGC-1 $\beta$  nas células SKBR3. Após 72 horas de tratamento com RNAi para PGC-1 $\beta$  não houve alteração na atividade da enzima antioxidante SOD (Figura 36), CAT (Figura 37) e sistema GSSG/GSH (Figuras 38 e 39) (*p*>0,05).

# Superóxido Dismutase



Figura 36: Influência do *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) em células HER2- positivas (SKBR3). Foi avaliada a atividade da enzima SOD em células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.
## Catalase



Figura 37: Influência do *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  na atividade da enzima antioxidante catalase em células HER2- positivas (SKBR3). Foi avaliada a atividade da enzima Catalase em células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.



**Figura 38: Influência do** *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  na relação de glutationa oxidada (GSSG) por glutationa reduzida (GSH) em células HER2- positivas (SKBR3). Foi quantificado os níveis de GSSG e GSH em células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.



Figura 39: Influência do *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  nos níveis de glutationa total em células HER2- positivas (SKBR3). Foi quantificado os níveis de glutationa totais em células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

Como houve aumento na produção de EROs, avaliamos também a presença de desacoplamento mitocondrial em células SKBR3 após *knockdown* de PGC-1 $\beta$ . Os resultados revelam presença significativa de desacoplamento mitocondrial quando PGC-1 $\beta$  é diminuído nas células HER2 (p< 0,001) (Figura 40).



### Perda de Potencial de Membrana Mitocondrial

Figura 40: Despolarização mitocondrial após *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3). Foi quantificado a porcentagem de despolarização mitocondrial de células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro das médias. \* p< 0,05 indica diferença estatística entre as sequências específicas 1 ou 2 e o controle negativo 1. # p< 0,05 indica diferença estatística entre as sequências específicas 1 ou 2 e o controle negativo. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

Visto que PGC-1s possuem um importante papel na ativação e indução de expressão dos fatores de transcrição ERRs, e que esses fatores de transcrição possuem importante papel na regulação do metabolismo energético de células tumorais de mama, avaliamos sua expressão nas células SKBR3 após *knockdown* de PGC-1 $\beta$ . A diminuição de PGC-1 $\beta$  não influenciou a expressão gênica de ERR $\gamma$  (Figura 41). No entanto, nossos resultados mostram redução em aproximadamente 50% da expressão gênica de ERR $\alpha$  (*p*< 0,01) nos grupos tratados com RNAi para PGC-1 $\beta$  (Figura 42).

## ERRγ



**Figura 41: Influência do** *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3) na expressão de ERR $\gamma$ . Foi avaliada a expressão de ERR $\gamma$  em células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2), sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro das médias. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

### ERRα



Figura 42: Influência do *knockdown* da expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2- positivas (SKBR3) na expressão de ERR $\alpha$ . Foi avaliada a expressão de ERR $\alpha$  em células HER2- positivas após tratamento com RNA de interferência utilizando as sequências negativo 1 (Neg1), negativo 2 (Neg2) e diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  para as sequências específicas 1 (Seq1) e 2 (Seq2). Os resultados estão expressos como média ± erro das médias. \* p< 0,05 indica diferença estatística entre as sequências específicas 1 ou 2 e o controle negativo 1. # p< 0,05 indica diferença estatística entre as sequências específicas 1 ou 2 e o controle negativo 2. A análise entre os grupos foi realizada utilizando o teste One-Way ANOVA seguida pelo pós- teste de Tukey.

Por fim, investigamos se a expressão de PGC-1 $\beta$  também está alterada em tumores HER2- positivos provenientes de mulheres portadoras do câncer de mama em relação aos diferentes subtipos moleculares. Nossos resultados foram semelhantes aos achados em cultura celular onde a superexpressão de HER2 está associada positivamente com a maior expressão gênica de PGC-1 $\beta$  comparado com os subtipos moleculares luminal A, luminal B sem superexpressão de HER2 e triplo negativo (p< 0,001) (Figura 43). A Figura 44 ilustra um tumor de mama ductal infiltrativo HER2-positivo com marcação nuclear para PGC-1 $\beta$ .



**Figura 43:** Mulheres portadoras do carcinoma mamário HER2- positivo apresentam maior expressão de PGC-1 $\beta$ . Expressão de PGC-1 $\beta$  em tumor de mama de pacientes classificadas como luminal A (LumA, n= 8), luminal B sem superexpressão de HER2 (LumB, n= 4), HER2- superexpresso (HER2, n= 6) e triplo negativo (TN, n= 5). Os resultados estão expressos como média ± erro das médias. \* p< 0,05 indica diferença estatística entre o subtipo molecular HER2 e outros subtipos (luminal A, luminal B e triplo negativo) utilizando o teste estatístico One-Way ANOVA seguido de Tukey como pósteste.



Figura 44: Expressão de PGC-1 $\beta$  em tumor ductal infiltrativo HER2- positivo de paciente portadora do carcinoma de mama. Imagem ilustrativa com marcação nuclear (setas) para PGC-1 $\beta$  em tecido mamário de mulher portadora do câncer de mama HER2- positivo.

#### 7. Discussão

#### 7.1. Expressão de PGC-1s em tumor de mama de diferentes subtipos moleculares

Neste estudo, mostramos que ocorre uma baixa expressão gênica de PGC-1 $\alpha$  nos subtipos moleculares das linhagens celulares de câncer de mama em relação a uma linhagem de mama não tumoral. Em relação à expressão gênica de PGC-1 $\beta$ , essa se apresenta elevada somente em células onde há também superexpressão de HER2. Diferentemente da expressão gênica, o produto proteico de PGC-1 $\beta$  está aumentada em todos os subtipos moleculares quando comparado à linhagem não tumoral.

Após o processamento do RNAm, esse é transportado para o citoplasma para ser traduzido e originar o produto proteico. No citoplasma, PGC-1β é reconhecido para ser importado novamente para o núcleo, onde terá atividade de coativador da transcrição gênica. A expressão de muitos genes podem ser regulados em nível de transcrição do RNAm e/ou em nível de síntese proteica (Watson et al., 2015). Além disso, a proteína PGC-1 controla sua própria transcrição por um mecanismo de auto-regulação positiva (Handshin, Spiegelman 2006). Assim, o nível da expressão gênica pode diferir da expressão proteica em um dado tempo.

As linhagens tumorais de mama são agrupadas dentro de diferentes classes moleculares por apresentarem um padrão distinto de marcadores, que são utilizados como alvos terapêuticos. As linhagens MCF-7, SKBR-3 e MDAMB-231 diferem entre si e da linhagem não tumoral MCF-10A não apenas em relação a seus marcadores moleculares, mas também na expressão de diversas proteínas. A grande maioria das alterações proteicas entre as linhagens tumorais de mama está relacionada a processos metabólicos. Dentre as proteínas com atividade metabólica com expressão elevada em células tumorais destacam-se proteínas relacionadas ao metabolismo de carbono e via pentose fosfato (exemplo: PGLS, PGD) dentre outras, enquanto que proteínas com expressão diminuídas estão relacionadas à glicólise e gliconeogênese (exemplo: ALDH7A1), metabolismo de purinas (exemplo: Ak2), metabolismo de carboidrato e ácidos graxos (exemplo: HADHA), dentre outras (Calderón-González et al., 2015). As diferentes proteínas expressas nas linhagens celulares tumorais de mama podem ser decorrentes da diferença na ativação de cofatores e fatores de transcrição, como de PGC-1s.

O padrão de expressão de PGC-1s em determinados subtipos moleculares do câncer de mama ainda não é estabelecido. Entretanto, sabe-se que há uma relação entre a expressão de PGC-1β e o subtipo molecular HER2. A amplificação da região cromossômica 17q12-21 leva a superexpressão de HER2 e de diversos genes que são co-amplificados (Kauraniemi, Kallioniemi 2006). A análise de regiões regulatórias ocupadas por PGC-1 $\beta$  e ERR $\alpha$  mostram que ambos são reguladores chave para a expressão de HER2 e também de seus genes co-amplificados. Experimentos conduzidos em células SKBR3 identificaram a ligação de PGC-1 $\beta$  a diversos segmentos da região 17q12, sendo muitos deles comuns também a ERR $\alpha$ . Conclui-se então que PGC-1 $\beta$  tem importante papel na regulação da expressão de genes co-amplificados em células HER2- positivas (Deblois et al., 2010). Além do mais, PGC-1 $\beta$  pode ser co-recrutado, juntamente com ERR $\alpha$ , em locais genômicos específicos em células SKBR3 (Deblois et al., 2009). Esses resultados mostram a importância de PGC-1 $\beta$  na configuração da agressividade de tumores HER2- positivos, visto que estes estão relacionados tanto com a superexpressão de HER2 quanto a seus genes co-amplificados. De forma inversa, observa-se que ao diminuir a expressão de PGC-1 $\beta$  (Eichner et al., 2010).

O conjunto de resultados da literatura juntamente com os achados nesse trabalho aponta uma importante relação entre a expressão de PGC-1 $\beta$  e a superexpressão de HER2. Aqui, apenas a linhagem HER2- positiva apresentou aumento da expressão gênica e proteica de PGC-1 $\beta$  em associação ao aumento na taxa de proliferação celular. Portanto, será discutido em seguida o papel da expressão de PGC-1 $\beta$  na proliferação de células tumorais HER2- positivas.

# 7.2. Relação entre a expressão de PGC-1β e proliferação de células tumorais de mama HER2- positivas

As células HER2- positivas apresentam maior taxa de proliferação em relação a uma linhagem celular de mama não tumoral e em relação a outras linhagens de diferentes subtipos moleculares de câncer de mama. Para avaliar o impacto da expressão de PGC-1 $\beta$  na proliferação celular de células tumorais HER2- positivas e os prováveis mecanismos pelos quais PGC-1 $\beta$  pode interferir na proliferação, utilizamos a técnica de RNAi. A tecnologia de RNAi é baseada no silenciamento gênico pós- transcricional de uma região de interesse (aqui, PGC-1 $\beta$ ). A transfecção de um RNA dupla fita no meio de cultura induz a degradação da região de interesse do RNAm através da ação de nucleases. Esse processo resulta em perda ou redução da atividade gênica da região de interesse, permitindo que essa seja investigada (Kole et al., 2012).

Através do knockdown de PGC-1ß nós investigamos sua influência na proliferação de células HER2- positivas. A expressão de PGC-1ß nessas células correlacionou positivamente com a taxa de proliferação, indicando que quanto maior a expressão gênica de PGC-1 $\beta$ , maior a taxa de proliferação celular. A relação entre a expressão de PGC-1s em tumores e proliferação celular ainda é pouco conhecida. Por exemplo, em melanoma foi demonstrado que a expressão de PGC-1a se correlaciona com a agressividade do tumor e com alterações de respostas metabólicas e produção de EROs, definindo características específicas desses tumores (Vazquez et al., 2013). Em relação à PGC-1β, trabalhos em nosso laboratório mostraram que seu knockdown em cultura de melanócitos causa diminuição da proliferação dessas células. O tratamento com antissenso para PGC-1ß em melanoma murinho diminuiu o tamanho desse tumor em 50%. Esses resultados indicam que a expressão de PGC-1ß age sob a proliferação celular de tumores, tanto in vitro como in vivo (Passos 2014). Para tumores de mama, como já discutido, a sinalização por HER2 induz a expressão de PGC-1β (Chang et al., 2011) e PGC-1β promove a expressão de HER2. Visto essa relação entre HER2 e PGC-1β, Deblois e colaboradores (2010) mostraram que PGC-1β e/ou o fator de transcrição ERRα influenciam a proliferação de células SKBR3.

O conjunto de resultados nesse trabalho juntamente com os trabalhos publicados na literatura indica uma relação estreita entre a sinalização de HER2 e PGC-1 $\beta$  com importante papel na proliferação tumoral. Contudo, há uma lacuna a ser preenchida no que diz respeito aos mecanismos envolvidos na proliferação de células HER2 e PGC-1 $\beta$ . Assim, investigamos os prováveis mecanismos pelos quais PGC-1 $\beta$  pode interferir na proliferação de células tumorais de mama HER2- positivas. Primeiramente avaliamos se há alterações no padrão de expressão de ciclinas e fatores relacionados à quantidade mitocondrial e, em seguida, discutiremos o seu papel em vias metabólicas e de sinalização redox.

# 7.3. Expressão de PGC-1β em células tumorais de mama HER2- positivas não influencia a expressão de ciclinas

A proliferação celular pode ser influenciada por diversos fatores independentes, como desregulação na expressão de ciclinas ou metabolismo celular (Feitelson et al., 2015). Durante a progressão do câncer de mama, as ciclinas, juntamente com ciclinas dependentes de quinases (CDKs), podem promover a progressão do ciclo celular através de estágios específicos (denominados "checkpoints") por regular a expressão de fatores de transcrição e componentes chave do ciclo celular (Zafonte et al., 2000). Além do mais, a sinalização induzida por HER2 pode por si só influenciar a expressão de diferentes ciclinas envolvidas no controle do ciclo celular (Victorino et al., 2014a; Dan et al., 2002; Janes et al., 1994).

A ciclina B regula a transição G2/M do ciclo celular. Em 2009, Aaltonen e colaboradores, e Boström e colaboradores, em diferentes publicações, mostraram uma correlação entre altos níveis de expressão de ciclina B1, HER2 e pior prognóstico. Quanto à ciclina C, seu papel no câncer de mama ainda é pouco conhecido. A ciclina C controla a transição G0/G1 do ciclo celular, onde sua expressão é mais elevada em células na fase de G0 (Sage, 2004).

Dentre as ciclinas conhecidas, a ciclina D é a mais estudada em relação ao desenvolvimento do câncer de mama. A superexpressão de ciclina D1 é encontrada dentre 30-45% dos casos de câncer de mama e está relacionada com a proliferação e crescimento tumoral (Zhou, Hung 2003; Hulit et al., 2002; Zafonte et al., 2000). Na clínica, alguns alvos terapêuticos para tumores com superexpressão de HER2 diminuem a expressão de ciclina D1 como um de seus mecanismos de ação (Yakes et al., 2002).

Já a ciclina E, em complexo com CDK2, promove a progressão do ciclo celular (Zafonte et al., 2000) e parece haver uma relação positiva entre sua expressão com alto índice proliferativo, grau tumoral e presença de HER2, determinando um pior prognóstico (Boström et al., 2009). De fato, pacientes HER2- positivas com alta expressão de ciclina E possuem menor sobrevida (Mittendorf et al., 2010).

A fim de investigar os mecanismos pelos quais as células HER2- positivas com menor expressão de PGC-1 $\beta$  diminuem sua proliferação celular, avaliamos se o *knockdown* de PGC-1 $\beta$  poderia interferir na expressão de ciclinas B, C, D e E. Apesar das células HER2- positivas com *knockdown* de PGC-1 $\beta$  proliferarem menos, nossos resultados mostraram que a manipulação da expressão de PGC-1 $\beta$  não influenciou na expressão das ciclinas avaliadas. Visto que a proliferação celular também pode ser influenciada por outros fatores além do controle de ciclinas, como metabolismo celular e sinalização redox, tivemos como foco essas vias nos próximos experimentos.

# 7.4. Expressão de PGC-1β em células tumorais de mama HER2- positivas não influencia a quantidade mitocondrial

O coativador PGC-1 $\beta$  tem importância conhecida no controle da função mitocondrial, respiração e termogênese. PGC-1 $\beta$  interage com fatores de transcrição,

como NRF1, NRF2 e TFAM, resultando na expressão de genes necessários para a biogênese mitocondrial. PGC-1 $\beta$  é um potente regulador da atividade transcricional de NRF1, interagindo fisicamente com esse fator de transcrição. Em relação à NRF2, sabese que PGC-1 $\beta$  é capaz de ativá-lo (Shao et al., 2010; Scarpulla 2002; Lin et al., 2001; Shao et al., 2010). O TFAM é uma proteína ligante de DNA e controla o número de cópias de mtDNA por regular a iniciação da transcrição mitocondrial, sendo essencial para sua manutenção (Campbell et al., 2012; Kang et al., 2007). A indução da expressão gênica de TFAM por PGC-1 $\beta$  foi demonstrada em células diferenciadas C2C12, um modelo de mioblasto (Shao et al., 2010).

Em nosso laboratório foi mostrado que, em melanoma, o *knockdown* de PGC-1 $\beta$  age na regulação de RNAm de NRF1 e TFAM (Passos 2014). Desse modo, utilizamos aqui os níveis de transcritos de RNAm para NRF1, NRF2 e TFAM, e não a função desses fatores, como marcadores da ação de PGC-1 $\beta$  sob a quantidade mitocondrial. O *knockdown* de PGC-1 $\beta$  também não influenciou a expressão de NRF1, NRF2 e TFAM em células HER2- positivas.

A regulação da transcrição, replicação e *turnover* do DNA mitocondrial são essenciais para a manutenção da capacidade oxidativa e homeostase celular. O DNA das mitocôndrias tem como característica a replicação independente do DNA nuclear. Alguns fatores de transcrição estão relacionados com o controle da replicação do mtDNA, como o TFAM (Campbell et al., 2012; Kang et al., 2007). Após averiguar os níveis transcritos de NRF1, NRF2 e TFAM, utilizamos também os marcadores COI e 16S, normalizados pelo marcador nuclear 18S por RT-PCR (Wan et al., 2012) para confirmação da quantidade de DNA mitocondrial. Apesar da importância dos PGC-1s no controle da biogênese mitocondrial, não observamos alterações na quantidade mitocondrial com o *knockdown* de PGC-1β em células HER2- positivas em relação aos marcadores COI e 16S. De modo similar, o *knockdown* de PGC-1β em melanoma também não influenciou na quantidade mitocondrial (Passos 2014). Assim, o *knockdown* de PGC-1β não interfere na quantidade de mitocôndrias.

# 7.5. *Knockdown* de PGC-1β em células tumorais de mama HER2- positivas diminui a via glicolítica e aumenta a via oxidativa

O perfil metabólico é crucial para respostas proliferativas no câncer de mama (Diers et al., 2014). Sabendo a importância dos coativadores PGC-1s no controle do metabolismo energético, avaliamos a produção de um marcador da via glicolítica, o lactato, nas células HER2- positivas com a expressão de PGC-1 $\beta$  diminuída. Houve menor produção de lactato intracelular após o *knockdown* de PGC-1 $\beta$ , sem diferença em relação ao lactato liberado.

O metabolismo de uma célula normal diferenciada e não proliferativa difere daquele encontrado em uma célula tumoral. Desde 1918 as modificações mitocondriais dependentes da taxa de crescimento em tumores têm sido estudadas (Goodpasture, 1918). Em 1956, Otto Warburg postulou que células tumorais preferencialmente derivariam seu metabolismo através da glicólise em oposição ao processo mais eficiente de fosforilação oxidativa. De acordo com o postulado, uma célula não tumoral converte a glicose em piruvato a CO<sub>2</sub> através do ciclo TCA e gera 36 ATPs nesse processo. Quando a disponibilização de oxigênio é baixa, as células não tumorais convertem piruvato a lactato pelo processo menos energético de glicólise. No entanto, uma célula tumoral converte preferencialmente a glicose em piruvato e desvia o ciclo oxidativo para a produção de lactato, gerando apenas 2 ATPs nesse processo, mesmo em condições adequadas de oxigênio (Mencalha et al., 2014; Marie, Shinjo, 2011; Warburg, 1956).

Qual seria a vantagem metabólica da célula tumoral em desviar sua produção energética para o ciclo glicolítico com menor produção de ATP? O desvio metabólico nas células tumorais permite que intermediários para a síntese de ácidos nucleicos, aminoácidos e de lipídeos sejam favorecidos, vias essas necessárias para a proliferação celular. Além do mais, esse processo ocorre mais rapidamente e a célula tumoral compensa a menor produção de ATP pela via glicolítica aumentando seu consumo de glicose. Esse fenômeno foi intitulado mais tarde como Efeito Warburg (Mencalha et al., 2014; Marie, Shinjo 2011; Warburg, 1956). Contudo, para a síntese de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, a célula utiliza intermediários da via glicolítica e também do ciclo do TCA (Morandi, Chiarugi, 2014).

O conceito sobre Efeito Warburg tem se atualizado e sabe-se hoje que ocorre uma super-regulação da via glicolítica; contudo, sem que ocorra disfunção mitocondrial. Dessa forma, o metabolismo oxidativo opera normalmente no tumor como em uma célula não tumoral (Chen et al., 2015). A modulação de PGC-1β influenciou o Efeito Warburg por diminuir a produção de lactato. A linhagem tumoral de mama HER2positiva apresenta maior taxa de proliferação celular e consequentemente requer uma produção rápida de biomassa para a síntese de novas células. A via glicolítica fornece diversos metabólitos intermediários que são utilizados como precursores de vias que incluem a via das pentoses-fosfatos, síntese de triacilgliceróis e serinas para a síntese *de novo* de nucleotídeos, aminoácidos e lipídeos que são necessários para a biossíntese. Assim, a proliferação de células HER2- positivas pode ser influenciada negativamente após o *knockdown* de PGC-1β através da diminuição da via glicolítica. Investigamos em seguida se PGC-1β pode influenciar também a via oxidativa.

Na via oxidativa, durante o ciclo do TCA, são produzidas moléculas de NADH e FADH<sub>2</sub>. Esses carreadores quando ativados doam elétrons de alta energia que são utilizados na cadeia transportadora de elétrons para a formação de água a partir do oxigênio. Conforme os elétrons movem-se pela cadeia respiratória, a energia é armazenada na forma de um gradiente eletroquímico de prótons (H<sup>+</sup>). Esse processo gera um gradiente de pH e um gradiente de voltagem (potencial de membrana) através da membrana mitocondrial interna, direcionando a síntese de ATP durante o processo de fosforilação oxidativa, através da ATP-sintase (Perry et al., 2011; Mailloux, 2015).

Deste modo, a respiração mitocondrial pode gerar um *turnover* de ATP ou vazamento de próton. Quando a taxa de respiração mitocondrial é alterada, a eficiência metabólica só é mantida se a produção de ATP e o vazamento de prótons forem afetados da mesma forma. (St-Pierre et al., 2003). Após o *knockdown* de PGC-1β utilizando a sequência 1 houve aumento da atividade da enzima citrato sintase, indicando que o ciclo do TCA está mais ativo. Também foi encontrada uma tendência a maior taxa de respiração basal e capacidade respiratória máxima que parecem estar ligadas a produção de ATP.

A mitocôndria é considerada uma ferramenta em potencial para fins terapêuticos por ser capaz de reverter sinais oncogênicos. Como mostrado por Kaipparettu e colaboradores (2013), a mitocôndria de uma célula normal de mama apresenta maior síntese de ATP, maior consumo de oxigênio e atividade da cadeia respiratória quando comparada a uma mitocôndria proveniente de uma célula tumoral de mama. Mostramos aqui que o *knockdown* de PGC-1β diminuiu a via glicolítica e aumentou a via oxidativa, visto que há uma diminuição da produção de lactato intracelular, uma maior atividade da enzima citrato sintase e uma tendência a maior taxa de respiração celular ligada à produção de ATP. Os achados indicam que a diminuição da expressão de PGC-1β nessas células possa auxiliar na reversão de algumas características tumorais como a super-regulação da via glicolítica e alta taxa de proliferação celular.

# 7.6. Influência da expressão de PGC-1β no equilíbrio redox de células tumorais de mama HER2- positivas

Alterações na função mitocondrial em células tumorais de mama podem levar ao aumento na produção de EROs (Mencalha et al., 2014; Kanchan et al., 2012; Kaipparettu et al., 2013) e influenciar a progressão tumoral dessas células (Yadav, Chandra, 2013; Penney, Roy, 2013). Alterações na atividade de PGC-1s podem levar a desequilíbrios na sinalização redox, seja por aumento na geração de EROs, ou seja por diminuição das defesas antioxidantes (St-Pierre et al., 2006; Scarpulla et al., 2012). Dados na literatura acerca do envolvimento de espécies reativas e PGC-1s no câncer ainda são escassos, principalmente no que se refere à PGC-1 $\beta$ . Em modelo de melanoma a alta expressão de PGC-1 $\alpha$  aumenta a capacidade mitocondrial e resistência ao estresse oxidativo, configurando características mais agressivas (Vazquez et al., 2013). Contudo, dados em relação ao envolvimento de PGC-1 $\beta$  e produção de EROs e ERNs em células tumorais de mama ainda não foram publicados.

A fim de detectar EROs, utilizamos a sonda fluorescente DHE. A DHE entra na célula e é oxidada na presença de EROs. A oxidação de DHE forma o produto etídio, o qual pode se intercalar ao DNA da célula e emitir fluorescência, refletindo o status redox geral da célula. Nossos resultados mostram pela primeira vez que a diminuição da expressão de PGC-1 $\beta$  induz um aumento na produção de EROs em células tumorais de mama HER2- positivas, o qual pode ser decorrente do aumento da via oxidativa, a qual está relacionada a maior produção de ATP.

Ao observar um aumento na produção de EROs, avaliamos também a capacidade antioxidante das células HER2- positivas após a diminuição da expressão de PGC-1β. Mostramos aqui, pela primeira vez, que apenas a expressão gênica da enzima antioxidante SOD foi diminuída após tratamento com RNAi para PGC-1β, indicando que a expressão da enzima SOD pode ser dependente de PGC-1β. Contudo, em relação à atividade enzimática mostramos que a atividade das enzimas SOD, CAT e sistema GSH/GSSG não foram alterados por PGC-1β.

Visto o aumento na produção de EROs, procuramos investigar alterações quanto a produção de ERNs dependentes de PGC-1β. Para tal, mensuramos os níveis de nitrito e nitrato como estimativa de NO. Apesar do NO possuir um importante papel no metabolismo (Caneba et al., 2014) e proliferação de células tumorais de mama (Choudhari et al., 2013; Sen et al., 2013; Panis et al., 2011; Contestabile 2010), a

produção de ERNs não foi afetada pela expressão de PGC-1 $\beta$  em células HER2-positivas.

É reconhecido um importante papel para as espécies reativas como intermediárias de diversas vias de sinalização que regulam processos biológicos. A sinalização celular mediada por EROs é complexa e depende de vários fatores, como em qual compartimento celular são geradas, quando e em qual quantidade são produzidas, e do tipo de espécie reativa a ser gerada. O citoplasma das células tumorais forma um ambiente mais redutor que uma célula não tumoral (Fernandes et al., 2010; Nathan, Cunningham-Bussel, 2013). A importância de um status mais oxidado para a célula tumoral parece ser vantajoso por favorecer a proliferação celular (Halliwell, 2007). Apesar da importância do status mais oxidado para a proliferação tumoral, altos níveis de EROs ou a redução de antioxidantes suprime o crescimento tumoral e pode até mesmo levar a morte celular se não controlada (Nathan, Cunningham-Bussel, 2013).

Como PGC-1s controlam a sinalização redox e têm importância na proteção contra EROs (Kemper et al., 2013), é esperado um aumento na expressão de enzimas antioxidantes como SOD, catalase e glutationa peroxidase a fim de manter o equilíbrio redox. Além do mais, em modelo animal foi demonstrado que PGC-1s estimulam a expressão de UCP-2 (*uncoupled protein-2*) e UCP-3 para dissipar o gradiente de prótons e baixar o potencial de membrana para reduzir a produção de EROs pela mitocôndria (St-Pierre et al., 2003; Lin et al., 2005). Apesar do aumento de EROs, o *knockdown* de PGC-1β não causou compensação em relação à atividade das enzimas antioxidantes SOD, catalase e sistema GSSG/GSH.

Após o *knockdown* de PGC-1 $\beta$  as células tumorais apresentaram um ambiente mais oxidado que pode ser decorrente do aumento na taxa metabólica mitocondrial e síntese de ATP. Altos níveis de EROs podem diminuir o potencial de membrana mitocondrial por mecanismos ainda não completamente conhecidos, a fim de controlar sua própria produção (Giaime et al., 2012). De forma inversa, alterações no potencial de membrana também podem inibir a ATP-sintase e parar a cadeia transportadora de elétrons, reduzindo os carreadores de elétrons nos complexos I, III e coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ). O excesso de elétrons pode ser então transferido diretamente para o O<sub>2</sub> para gerar ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), que pode ser dismutado e gerar peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), aumentando os níveis de EROs (Martínez-Reyes, Cuezva 2014). Sugerimos aqui que a perda de potencial de membrana mitocondrial causado pelo *knockdown* de PGC-1β pode ser então decorrente da maior produção de EROs.

#### 7.7. PGC-1β controla a expressão de ERRα

Diversos fatores de transcrição controlam o metabolismo energético de células tumorais. Membros da família ERR, principalmente ERR $\alpha$  e ERR $\gamma$ , são reguladores chefes de vias metabólicas que regulam a via glicolítica, o ciclo do TCA, e os componentes da fosforilação oxidativa (Deblois et al., 2013). Paradoxalmente, ERR $\alpha$  e ERR $\gamma$  parecem ter papeis opostos no que diz respeito ao câncer de mama. A expressão de ERR $\gamma$  está associada à supressão do crescimento tumoral de mama em camundongo (Tiraby et al., 2011). Enquanto isso, ERR $\alpha$  tem sido apontado como um potencial marcador de prognóstico desfavorável de resposta à quimioterapia, onde pode participar da adaptação metabólica de células tumorais de mama (Deblois et al., 2013) e está correlacionado com a presença da superexpressão de HER2 (Ariazi et al., 2002). Além do mais, ERRs regulam a proliferação e progressão tumoral de forma independente de sua ação no metabolismo (Bianco et al., 2012). Dessa forma, os fatores de transcrição ERRs têm sido cogitados como possíveis alvos terapêuticos para o tratamento de tumores (Ariazi, Jordan 2006; Jarzabek et al., 2009; Stein et al., 2009).

PGC-1s participam da ativação de ERR $\alpha$  e ERR $\gamma$  (Huppunen et al., 2004; Chang 2011). Os coativadores PGC-1 regulam ERR $\alpha$  em dois níveis: induzindo a expressão gênica e proteica de ERR $\alpha$  e interagindo fisicamente com ERR $\alpha$  permitindo sua ação ativadora de transcrição. Apesar de ERR $\alpha$  ser ativado por outros coativadores, na ausência de PGC-1, ERR $\alpha$  se torna um ativador de transcrição fraco (Schreiber et al., 2003; Villena, Kralli, 2008). A ativação da expressão gênica de ERR $\alpha$  por PGC-1 $\beta$  foi mostrada também por Shao e colaboradores (2010) em modelo não tumoral. Mostramos aqui que no câncer de mama a expressão gênica de ERR $\alpha$  é diminuída com o *knockdown* de PGC-1 $\beta$ , enquanto que a expressão de ERR $\gamma$  não é alterada.

Por ser um cofator de transcrição gênica, PGC-1 $\beta$  controla a maquinaria genética de acordo com a disponibilidade de seus ligantes transcricionais, como ERR $\alpha$  e ERR $\gamma$ , que então controlam vias metabólicas. Para manter o controle metabólico em células tumorais e manter a alta taxa de proliferação celular é necessária a regulação entre consumo de glicose, entrega dos intermediários da glicólise para a via oxidativa e/ ou glicolítica, e de vias para síntese de lipídeos, ácidos graxos e nucleotídeos. Aproximadamente 200 genes foram identificados como sendo regulados por ERR $\alpha$ , onde a maioria está relacionada a genes que controlam o ciclo do TCA, fosforilação oxidativa, flavoproteínas transportadoras de elétrons, constituintes da maquinaria oxidativa, e genes envolvidos na transferência de energia e metabolismo de aminoácidos (Deblois et al., 2009). Em modelo animal, a ausência de ERR $\alpha$  acarretou em desregulação de genes envolvidos no metabolismo de glicose e ácidos graxos (Dufour et al., 2007).

A atividade transcricional de ERRa pode ser modulada por PGC-1ß através da ativação de HER2 nas células tumorais de mama (Deblois et al., 2013). Nesse trabalho, os autores induziram a superexpressão de HER2 em células tumorais de mama e observaram que a sinalização por HER2 aumentou a expressão de genes alvo de ERRa (Deblois et al., 2013). Existe também uma correlação positiva entre a expressão gênica de ERRa e crescimento de células tumorais de mama (Stein et al., 2009) e esse fato é atribuído à ação de PGC-1 $\beta$  em aumentar a atividade de ERR $\alpha$  (Chang et al., 2011; Ochnik, Yee, 2012). Assim, sugerimos um importante papel para a sinalização por HER2/PGC-1β/ ERRa no controle do metabolismo energético em tumores de mama HER2 positivos, o que pode influenciar a proliferação celular desse tumor (Figura 45 a, b). Por fim, confirmamos aqui que a expressão gênica e proteica de PGC-1ß em mulheres portadoras do câncer de mama está aumentada na presença de HER2 em relação àquelas mulheres com tumores de mama sem superexpressão de HER2 (luminal A, luminal B sem superexpressão de HER2 e triplo- negativas) e sugerimos futuras investigações acerca do perfil metabólico e redox desses tumores de mama. Até o momento não há testes clínicos para modulação da expressão de PGC-1<sup>β</sup>. Esperamos que esse trabalho contribua para futuras pesquisas para sua modulação em tumores com superexpressão de HER2.



Figura 45: Esquema simplificado do *knockdown* de PGC-1 $\beta$  em células tumorais de mama HER2positivas. a) Células tumorais de mama HER2- positivas apresentam maior expressão de PGC-1 $\beta$ . PGC-1 $\beta$  controla a expressão gênica de ERR $\alpha$ , o qual regula a expressão de genes relacionados ao metabolismo. A expressão de PGC-1 $\beta$  controla a produção de lactato, a atividade do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), gerando energia através da cadeia respiratória mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). b) Após diminuir a expressão de PGC-1 $\beta$ , a expressão de ERR $\alpha$  também é diminuída, diminuindo a produção de lactato intracelular e aumentando a via oxidativa com consequente aumento na produção de EROs, sem alterações na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e sistema glutationa reduzida/ oxidada (GSH/GSSG). O aumento na produção de EROs pode ter acarretado em perda de potencial de membrana. As alterações metabólicas e redox avaliadas culminaram em menor proliferação tumoral.

#### 8. Conclusão

Esse estudo mostrou maior expressão de PGC-1 $\beta$  em células tumorais de mama SKBR3, um modelo HER2 positivo, e em pacientes portadoras do carcinoma de mama HER2- positivo.

O *knockdown* de PGC-1 $\beta$  levou a uma diminuição significativa da proliferação dessas células. Os prováveis mecanismos responsáveis por esse achado foram a diminuição da expressão de ERR $\alpha$ , um fator de transcrição envolvido tanto na homeostase metabólica quanto no controle da sinalização redox.

#### 9. Referências Bibliográficas

Aaltonen K, Amini RM, Heikkilä P, Aittomäki K, Tamminen A, Nevanlinna H, Blomqvist C. High cyclin B1 expression is associated with poor survival in breast cancer. *Br J Cancer*. 2009; 100(7):1055-60. doi: 10.1038/sj.bjc.6604874.

Alves GM, Barão MA, Odo LN, Nascimento Gomes G, Franco Md Mdo C, Nigro D, Lucas SR, Laurindo FR, Brandizzi LI, Zaladek Gil F.\_Arginine effects on blood pressure and renal function of intrauterine restricted rats. *Pediatr. Nephrol.* 2002; 17:856-862.

Aranda V, Haire T, Nolan ME, Calarco JP, Rosenberg AZ, Fawcett JP, Pawson T, Muthuswamy SK. MuthuswamyPar6–aPKC uncouples ErbB2 induced disruption of polarized epithelial organization from proliferation control. *Nat Cell Biol.* 2006; 8: 1235-1245.

Ariazi EA, Clark GM, Mertz JE. Estrogen-related receptor alpha and estrogen-related receptor gamma associate with unfavorable and favorablebiomarkers, respectively, in human breast cancer. *Cancer Res.* 2002; 62(22):6510-8.

Ariazi EA, Jordan VC. Estrogen-related receptors as emerging targets in cancer and metabolic disorders. *Curr Top Med Chem*. 2006; 6(3):203-15.

Azambuja E, Bedard PL, Suter T, Piccart-Gebhart M. Cardiac toxicity with anti-HER-2 therapies-what have we learned so far? *Targ Oncol*. 2009; 4: 77–88.

Bianco S, Sailland J, Vanacker JM. ERRs and cancers: effects on metabolism and on proliferation and migration capacities. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2012; 130(3-5):180-5. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.03.014.

Boström P, Söderström M, Palokangas T, Vahlberg T, Collan Y, Carpen O, Hirsimäki P. Analysis of cyclins A, B1, D1 and E in breast cancer in relation to tumour grade and other prognostic factors. *BMC Res Notes*. 2009; 2:140. doi: 10.1186/1756-0500-2-140.

Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal Biochem*. 1976; 72: 248–254.

Buchakjian MR, Kornbluth S. The engine driving the ship: metabolic steering of the cell proliferation and death. Nature Reviews. *Mol Cell Biol*. 2010; 11: 715-727.

Cairns RA, Harris I, Mccracken S, Mak TW. Cancer cell metabolism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2011; 76: 299-311.

Calderón-González KG, Valero Rustarazo ML, Labra-Barrios ML, Bazán-Méndez CI, Tavera-Tapia A, Herrera-Aguirre ME, Sánchez Del Pino MM,Gallegos-Pérez JL, González-Márquez H, Hernández-Hernández JM, León-Ávila G, Rodríguez-Cuevas S, Guisa-Hohenstein F, Luna-Arias JP. Determination of the protein expression profiles of breast cancer cell lines by quantitative proteomics using iTRAQ labelling and tandem mass spectrometry. *J Proteomics*. 2015; 124:50-78. doi: 10.1016/j.jprot.2015.04.018.

Campbell CT, Kolesar JE, Kaufman BA. Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genomecopy number. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1819(9-10): 921-9. doi: 10.1016/j.bbagrm.2012.03.002.

Caneba CA, Yang L, Baddour J, Curtis R, Win J, Hartig S, Marini J, Nagrath D. Nitric oxide is a positive regulator of the Warburg effect in ovarian cancer cells. *Cell Death Dis.* 2014; 5:1302. doi: 10.1038/cddis.2014.264.

Chang CY, Kazmin D, Jasper JS, Kunder R, Zuercher WJ, McDonnell DP. The metabolic regulator ERRα, a downstream target of HER2/IGF-1R, as a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Cell*. 2011; 20(4): 500-10. doi: 10.1016/j.ccr.2011.08.023.

Chang CY, McDonnell DP. Molecular pathways: the metabolic regulator estrogenrelated receptor  $\alpha$  as a therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(22):6089-95. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3221.

Chausse B, Solon C, Caldeira da Silva CC, Masselli Dos Reis IG, Manchado-Gobatto FB, Gobatto CA, Velloso LA, Kowaltowski AJ. Intermittent fasting induces hypothalamic modifications resulting in low feeding efficiency, low body mass andovereating. *Endocrinol.* 2014; 155(7):2456-66. doi: 10.1210/en.2013-2057.

Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis.* 2010; 32(1-2):35-48. doi: 10.3233/BD-2010-0307.

Chen X, Qian Y, Wu S. The Warburg effect: evolving interpretations of an established concept. *Free Radic Biol Med.* 2015; 79: 253-63. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.027.

Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. *World J Surg Oncol.* 2013; 11:118. doi:10.1186/1477-7819-11-118.

Contestabile A. Targeting Nitric Oxide for Tumor Therapy. *Curr Pharm Des.* 2010;16(4):378-80.

Dan HC, Sun M, Yang L, Feldman RI, Sui XM, Ou CC, Nellist M, Yeung RS, Halley DJ, Nicosia SV, Pledger WJ, Cheng JQ. Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway Regulates Tuberous Sclerosis Tumor Suppressor Complex by Phosphorylation of Tuberin. *J Biol Chem.* 2002; 277: 35364–35370.

Deblois G, Chahrour G, Perry MC, Sylvain-Drolet G, Muller WM, Giguere V. Transcriptional Control of the ERBB2 Amplicon by ERRa and PGC-1b Promotes Mammary Gland Tumorigenesis. *Cancer Res.* 2010; 70:10277-10287. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2840.

Deblois G, Giguère V. Oestrogen-related receptors in breast cancer: control of cellular metabolism and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13(1):27-36. doi: 10.1038/nrc3396

Deblois G, Hall JA, Perry MC, Laganière J, Ghahremani M, Park M, Hallett M, Giguère V. Genome-wide identification of direct target genes implicates estrogen-

related receptor alpha as a determinant of breast cancer heterogeneity. *Cancer Res.* 2009; 69(15):6149-57. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1251.

Diers AR, Broniowska KA, Chang CF, BlakeHill R, Hogg N. S-nitrosation of monocarboxylate transporter 1: Inhibition of pyruvate-fueled respiration and proliferation of breast cancer cells. *Free Radic Biol Med.* 2014; 69 229–238. doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.031.

Dittmar T, Husemann A, Schewe Y, Nofer J, Niggemann B, Zänker KS, Brandt BH. Induction of cancer cell migration by epidermal growth factor is initiated by specific phosphorylation of tyrosine 1248 of c-erbB-2 receptor via EGFR1. *FASEB J*. 2002; 1823-1825.

Dufour CR, Wilson BJ, Huss JM, Kelly DP, Alaynick WA, Downes M, Evans RM, Blanchette M, Giguère V. Genome-wide orchestration of cardiac functions by the orphan nuclear receptors ERRalpha and gamma. *Cell Metab.* 2007; 5(5):345-56.

Eichner LJ, Perry MC, Dufour CR, Bertos N, Park M, St-Pierre J, Giguère V. miR-378(\*) mediates metabolic shift in breast cancer cells via the PGC-1 $\beta$ /ERR $\gamma$  transcriptional pathway. *Cell Metab.* 2010; 12(4):352-61. doi: 10.1016/j.cmet.2010.09.00.

ElZarrad MK, Mukhopadhyay P, Mohan N, Hao E, Dokmanovic M, Hirsch DS, Shen Y, Pacher P, Wu WJ. Trastuzumab alters the expression of genes essential for cardiac function and induces ultrastructural changes of cardiomyocytes in Mice. *PLoS ONE*. 2013; 8: e79543-e79543. doi: 10.1371/journal.pone.0079543.

Fallah-Rad N, Walker JR, Wassef A, Lytwyn M, Bohonis S, Fang T, Tian G, Kirkpatrick ID, Singal PK, Krahn M, Grenier D, Jassal DS. The utility of cardiac biomarkers, tissue velocity and strain imaging and cardiac magnetic resonance imaging in predicting early left ventricular dysfunction in patients with human epidermal growth factor receptor II-positive breast cancer treated with adjuvant trastuzumab therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 57: 2263-70. doi: 10.1016/j.jacc.2010.11.063.

Feitelson MA, Arzumanyan A, Kulathinal RJ, Blain SW, Holcombe RF, Mahajna J, Marino M, Martinez-Chantar ML, Nawroth R, Sanchez-Garcia I, Sharma D, Saxena NK, Singh N, Vlachostergios PJ, Guo S, Honoki K, Fujii H, Georgakilas AG, Bilsland A, Amedei A, Niccolai E, Amin A, Ashraf SS, Boosani CS, Guha G, Ciriolo MR, Aquilano K, Chen S, Mohammed SI, Azmi AS, Bhakta D, Halicka D, Keith WN, Nowsheen S. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin Cancer Biol.* 2015. pii: S1044-579X(15)00014-0. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.02.006.

Fernandes DC, Bonatto D, Laurindo FRM. The Evolving Concept of Oxidative Stress. Studies on Cardiovascular Disorders. *Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice* 2010, pp 1-41.

Genetech. Herceptin (trastuzumab): Full prescribing information. 2004; South San Francisco, CA: Genentech.

Giaime E, Yamaguchi H, Gautier CA, Kitada T, Shen J. Loss of DJ-1 does not affect mitochondrial respiration but increases ROS production and mitochondrial permeability transition pore opening. *PLoS One*. 2012; 7(7):e40501. doi: 10.1371/journal.pone.0040501.

Girnun GD. The diverse role of the PPARγ coactivator 1 family of transcriptional coactivators in cancer. *Sem Cell Develop Biol*. 2012; 23: 381–388.

Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013; 24(9):2206-23. doi: 10.1093/annonc/mdt303.

Goodpasture EW. Observations on mitochondria of tumors. J Med Res. 1918; 38(2):213-224.

Gutierrez C, Schiff R. HER2 Biology, Detection, and Clinical Implications. *Arch Pathol Lab Med.* 2011; 135:55–62.

Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J*. 2007; 401: 1–11.

Handschin C, Spiegelman BM. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Coactivator 1 Coactivators, Energy Homeostasis, and Metabolism. *Endoc Rev.* 2006; 27(7):728–735.

Harbeck N, Thomssen C, Gnant M. St. Gallen 2013: brief preliminary summary of the consensus discussion. *Breast Care (Basel)*. 2013; 8(2):102-9. doi: 10.1159/000351193.

Herrera AC, Victorino VJ, Campos FC, Verenitach BD, Lemos LT, Aranome AM, Oliveira SR, Cecchini AL, Simão AN, Abdelhay E, Panis C, Cecchini R. Impact of tumor removal on the systemic oxidative profile of patients with breast cancer discloses lipid peroxidation at diagnosis as a putative marker of disease recurrence. *Clin Breast Cancer*. 2014; 14(6):451-9. doi: 10.1016/j.clbc.2014.05.002.

Hulit J, Lee RJ, Russell RG, Pestell RG. ErbB-2-induced mammary tumor growth: the role of cyclin D1 and p27Kip1. *Biochem Pharmacol*. 2002; 64(5-6):827-36.

Huppunen J, Wohlfahrt G, Aarnisalo P. Requirements for transcriptional regulation by the orphan nuclear receptor ERRgamma. *Mol Cell Endocrinol*. 2004; 219(1-2):151-60.

Hynes NE, Lane HA. Erbb receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Reviews*. 2005; 5: 341-354.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: Inca, 2014. 124 p.

Instituto Brasileiro de Geografia e estatística (IBGE). 2015; www.ibge.gov.br.

Janes PW, Daly RJ, deFazio A, Sutherland RL. Activation of the rassignalling pathway in human breast cancer cells overexpressing erbB-2. *Oncogene*. 1994; 9(12):3601-8.

Jarzabek K, Koda M, Kozlowski L, Sulkowski S, Kottler ML, Wolczynski S. The significance of the expression of ERRalpha as a potential biomarker in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009; 113(1-2):127-33. doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.12.005.

Jiang WG, Douglas-Jones A, Mansel RE. Expression of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma (PPARgamma) and the PPARgamma co-activator, PGC-1, in human breast cancer correlates with clinical outcomes. *Int J Cancer*. 2003; 106(5):752-757.

Jones AWE, Yao Z, Vicencio JM, Wieckowska AK, Szabadkai G. PGC-1 family coactivators and cell fate: Roles in cancer, neurodegeneration, cardiovascular disease and retrograde mitochondria–nucleus signalling. *Mitochondrion*. 2012; 12: 86–99. doi:10.1016/j.mito.2011.09.009.

Kaipparettu BA, Ma Y, Park JH, Lee TL, Zhang Y, Yotnda P, Creighton CJ, Chan WY, Wong LJ. 2013. Crosstalk from non-cancerous mitochondria can inhibit tumor properties of metastatic cells by suppressing oncogenic pathways. *PLoS ONE*. 2013; 8(5): e61747. doi:10.1371/journal.pone.0061747.

Kanchan RK, Tripathi C, Baghel KS, Dwivedi SK, Kumar B, Sanyal S, Sharma S, Mitra K, Garg V, Singh K, Sultana S, Tripathi RK, Rath SK, Bhadauria S. Estrogen receptor potentiates mTORC2 signaling in breast cancer cells by upregulating superoxide anions. *Free Radic Biol Med.* 2012; 53: 1929–1941.

Kang D, Kim SH, Hamasaki N. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion*. 2007; 7(1-2):39-44.

Kauraniemi P, Kallioniemi A. Activation of multiple cancer-associated genes at the ERBB2 amplicon in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13(1):39-49.

Kemper MF, Zhao Y, Duckles SP, Krause DN. Endogenous ovarian hormones affect mitochondrial efficiency in cerebral endothelium via distinct regulation of PGC-1 isoforms. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013; 33(1):122-8. doi: 10.1038/jcbfm.2012.159.

Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV. Akt Phosphorylates and Negatively Regulates Apoptosis Signal-Regulating Kinase. *Mol Cell Biol.* 2001; 21: 893–901.

Klimcakova E, Chénard V, McGuirk S, Germain D, Avizonis D, Muller WJ, St-Pierre J. PGC-1α promotes the growth of ErbB2/Neu-induced mammary tumors by regulating nutrient supply. *Cancer Res.* 2012; 72(6):1538-46, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2967.

Kole R, Krainer AR, Altman S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov.* 2012; 11(2):125-40. doi: 10.1038/nrd3625.

Lamond NW, Younis T. Pertuzumab in human epidermal growth-factor receptor 2positive breast cancer: clinical and economicconsiderations. *Int J Womens Health*. 2014; 6:509-21. doi: 10.2147/IJWH.S47357.

Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferatoractivated receptor gamma coactivator lbeta (PGC-1beta), a novel PGC-1relatedtranscription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem.* 2002; 277(3):1645-8.

Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* 2005; 1(6): 361-70.

Mailloux RJ. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. *Redox Biol*. 2015; 4:381-98. doi: 10.1016/j.redox.2015.02.001.

Marie SK, Shinjo SM. Metabolism and brain cancer. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011; 66:33-43.

Martínez-Reyes I, Cuezva JM. The H(+)-ATP synthase: a gate to ROS-mediated cell death or cell survival. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1837(7):1099-112. doi: 10.1016/j.bbabio.2014.03.010.

Mencalha A, Victorino VJ, Cecchini R, Panis C. Mapping oxidative changes in breast cancer: understanding the basic to reach the clinics. *Anticancer Res.* 2014; 34(3):1127-40.

Mittendorf EA, Liu Y, Tucker SL, McKenzie T, Qiao N, Akli S, Biernacka A, Liu Y, Meijer L, Keyomarsi K, Hunt KK. A novel interaction between HER2/neu and cyclin E in breast cancer. *Oncogene*. 2010; 29(27):3896-907. doi: 10.1038/onc.2010.151.

Morandi A, Chiarugi P. Metabolic implication of tumor:stroma crosstalk in breast cancer. *J Mol Med (Berl)*. 2014; 92(2):117-26. doi: 10.1007/s00109-014-1124-7.

Nahta R, Esteva FJ. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res.* 2006; 8(6):215.

Nahta R, Yu D, Hung MC, Hortobagyi GN, Esteva FJ. Mechanisms of disease: Understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2006; 3 269-280. doi: 10.1038/ncponc0509.

Nathan C, Cunningham-Bussel A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13(5):349-61. doi: 10.1038/nri3423.

Ochnik AM, Yee D. Estrogen-related receptor alpha: an orphan finds a family. *Breast Cancer Res.* 2012; 14(3):309.

Panis C, Herrera AC, Victorino VJ, Campos FC, Freitas LF, De Rossi T, Colado Simão AN, Cecchini AL, Cecchini R. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2011b; 133(1): 89-97. doi: 10.1007/s10549-011-1693-x.

Panis C, Lemos LG, Victorino VJ, Herrera AC, Campos FC, Colado Simão AN, Pinge-Filho P, Cecchini AL, Cecchini R. Immunological effects of Taxol and Adryamicin in breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2012; 61(4):481-8. doi: 10.1007/s00262-011-1117-0.

Panis C, Pizzatti L, Corrêa S, Binato R, Lemos GF, Herrera AC, Seixas TF, Cecchini R, Abdelhay E. The positive is inside the negative: HER2-negative tumors can express the HER2 intracellular domain and present a HER2-positive phenotype. *Cancer Lett.* 2015; 357(1):186-95. doi: 10.1016/j.canlet.2014.11.029.

Panis C, Pizzatti L, Herrera ACSA, Cecchini R, Abdelhay E. Putative circulating markers of the early and advanced stages of breast cancer identified by high-resolution label-free proteomics. *Cancer Lett.* 2013; 330: 57-66.

Panis C, Victorino VJ, Herrera AC, Freitas LF, De Rossi T, Campos FC, Simão AN, Barbosa DS, Pinge-Filho P, Cecchini R, Cecchini AL. Differential oxidative status and immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011a; 133(3):881-8. 10.1007/s10549-011-1851-1.

Passos LAAC. A sinalização do coativador de transcrição  $PGC-1\beta$  e sua relevância para a proliferação celular e desenvolvimento de melanoma [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014.

Pavlides S, Vera I, Gandara R, Sneddon S, Pestell RG, Mercier I, Martinez-Outschoorn EU, Whitaker-Menezes D, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP. Warburg Meets Autophagy: Cancer-Associated Fibroblasts Accelerate Tumor Growth and Metastasis via Oxidative Stress, Mitophagy, and Aerobic Glycolysis. *Antioxid Redox Signal*. 2012; 16: 1264–1284. doi: 10.1089/ars.2011.4243.

Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, Casimiro MC, Wang C, Fortina P, Addya S, Pestell RG, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle*. 2009; 8(23):3984-4001.

Penney RB, Roy D. Thioredoxin-mediated redox regulation of resistance to endocrine therapy in breast cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1836: 60–79.

Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques*. 2011; 50(2):98-115. doi: 10.2144/000113610.

Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell*. 1998; 92: 829–839.

Sage J. Cyclin C makes an entry into the cell cycle. Dev Cell. 2004; 6(5):607-8.

Scarpulla RC, Vega RB, Kelly DP. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol Metabol.* 2012; 23(9): 459- 466. doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.006.

Scarpulla RC. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1576(1-2):1-14.

Scarpulla RC. Nucleus-encoded regulators of mitochondrial function: Integration of respiratory chain expression, nutrient sensing and metabolic stress. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1819(9-10):1088-97.

Schreiber SN, Knutti D, Brogli K, Uhlmann T, Kralli A. The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptorestrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *J Biol Chem.* 2003; 278(11):9013-8.

Sen S, Kawahara B, Chaudhuri G. Mitochondrial-associated nitric oxide synthase activity inhibits cytochrome c oxidase: Implications for breast Cancer. *Free Radic Biol Med.* 2013; 57: 210–220. doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.545.

Senn HJ. St. Gallen consensus 2013: optimizing and personalizing primary curative therapy of breast cancer worldwide. *Breast Care (Basel)*. 2013; 8(2):101. doi: 10.1159/000351222.

Shao D, Liu Y, Liu X, Zhu L, Cui Y, Cui A, Qiao A, Kong X, Liu Y, Chen Q, Gupta N, Fang F, Chang Y. PGC-1 beta-regulated mitochondrial biogenesis and function in myotubes is mediated by NRF-1 and ERR alpha. *Mitochondrion*. 2010; 10(5):516-27. doi: 10.1016/j.mito.2010.05.012.

Smirnova T, Zhou ZN, Flinn RJ, Wyckoff J, Boimel PJ, Pozzuto M, Coniglio SJ, Backer JM, Bresnick AR, Condeelis JS, Hynes NE, Segall JE. Phosphoinositide 3-kinase signaling is critical for ErbB3-driven breast cancer cell motility and metastasis. *Oncogene*. 2011; 31: 706-15. doi: 10.1038/onc.2011.275.

Srere PA. Citrate synthase. *Method Enzymol.* 1969; 13: 3-11.

Stein RA, Gaillard S, McDonnell DP. Estrogen-related receptor alpha induces the expression of vascular endothelial growth factor in breast cancercells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009; 114(1-2):106-12. doi: 10.1016/j.jsbmb.2009.02.010.

St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM. Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. *Cell*. 2006; 127: 397–408.

St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB, Spiegelman BM. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J Biol Chem.* 2003; 278(29):26597-603.

Tang ED, Nunez G, Barri FG, Guan KL. Negative Regulation of the Forkhead Transcription Factor FKHR by Akt. *J Biol Chem.* 1999; 274: 16741–16746.

Tanizaki J, Okamoto I, Fumita S, Okamoto W, Nishio K, Nakagawa K. Roles of BIM induction and survivin downregulation in lapatinib-induced apoptosis in breast cancer cells with HER2 amplification. *Oncogene*. 2011; 30: 4097-106. doi: 10.1038/onc.2011.111.

Tiraby C, Hazen BC, Gantner ML, Kralli A. Estrogen-related receptor gamma promotes mesenchymal-to-epithelial transition and suppresses breast tumorgrowth. *Cancer Res.* 2011; 71(7):2518-28. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1315.

Untch M, Gerber B, Harbeck N, Jackisch C, Marschner N, Möbus V, von Minckwitz G, Loibl S, Beckmann MW, Blohmer JU, Costa SD, Decker T,Diel I, Dimpfl T, Eiermann W, Fehm T, Friese K, Jänicke F, Janni W, Jonat W, Kiechle M, Köhler U, Lück HJ, Maass N, Possinger K,Rody A, Scharl A, Schneeweiss A, Thomssen C, Wallwiener D, Welt A. 13th st. Gallen international breast cancer conference 2013: primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus - opinion of a german team of experts (zurich 2013). *Breast Care (Basel)*. 2013; 8(3):221-9. doi: 10.1159/000351692.

Vazquez F, Lim JH, Chim H, Bhalla K, Girnun G, Pierce K, Clish CB, Granter SR, Widlund HR, Spiegelman BM, Puigserver P. PGC1α Expression Defines a Subset of Human Melanoma Tumors with Increased Mitochondrial Capacity and Resistance to Oxidative Stress. *Cancer Cell*. 2013; 23: 287–301.

Victorino VJ, Aranome AMF, Campos FC, Herrera ACSA, Cecchini R, Panis C. Crosstalk between Oxidative Stress Signaling and HER2 Pathway in Breast Cancer. *Am J Immunol.* 2014a; 10 (4): 177-183. doi: 10.3844/ajisp.2014.177.183.

Victorino VJ, Campos FC, Herrera AC, Colado Simão AN, Cecchini AL, Panis C, Cecchini R. Overexpression of HER-2/neu protein attenuates the oxidative systemic profile in women diagnosed with breast cancer. *Tumour Biol.* 2014c; 35(4):3025-34. doi: 10.1007/s13277-013-1391-x.

Victorino VJ, Pizzatti L, Michelletti P, Panis C. Oxidative Stress, Redox Signaling and Cancer Chemoresistance: Putting Together the Pieces of the Puzzle. *Curr Med Chem.* 2014b; 21(28):3211-26.

Villena JA, Kralli A. ERRalpha: a metabolic function for the oldest orphan. *Trends Endocrinol Metab.* 2008; 19(8):269-76. doi: 10.1016/j.tem.2008.07.005.

Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, Gelman K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010; 28:1684–1691.

Warburg O. On the origin of cancer cells. Science. 1956; 123(3191): 309-314.

Watkins G, Douglas-Jones A, Mansel RE, Jiang WG. The localisation and reduction of nuclear staining of PPARgamma and PGC-1 in human breast cancer. *Oncol Rep.* 2004; 12(2):483-8.

Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. *Biologia Molecular do Gene*. 7<sup>a</sup> ed. São Paulo: Artmed; 2015.

Wen S, Zhu D, Huang P. Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach. *Future Med Chem.* 2013; 5(1): 53–67. doi:10.4155/fmc.12.190.

WHO - World Health Organization. Health topics: Cancer. 2015.

Yadav N, Chandra D. Mitochondrial DNA mutations and breast tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1836(2):336-44. doi:org/10.1016/j.bbcan.2013.10.002.

Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA, King W, Seelig S, Arteaga CL. Herceptininduced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt Is required for antibodymediated effectson p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res.* 2002; 62(14):4132-41.

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling The Erbb Signalling Network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2: 127-137.

Zafonte BT, Hulit J, Amanatullah DF, Albanese C, Wang C, Rosen E, Reutens A, Sparano JA, Lisanti MP, Pestell RG. Cell-cycle dysregulation in breast cancer: breast cancer therapies targeting the cell cycle. *Front Biosci.* 2000; 5: 938-61.

Zeglinski M, Ludke A, Jassal DS, Singal PK. Trastuzumab-induced cardiac dysfunction: A 'dual-hit'. *Exp Clin Cardiol*. 2011; 16: 70-4.

Zhou BP, Hung MC. Dysregulation of cellular signaling by HER2/neu in breast cancer. *Semin Oncol.* 2003; 30:38-48.

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu overexpressing cells. *Nat Cell Biol.* 2001; 3: 245-252.