UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ARTES, CIÊNCIAS E HUMANIDADES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

IZABELA DANIEL SARDINHA CALDEIRA

Mecanismos moleculares associados à citocina FAM3B/PANDER nos processos de invasão e migração no câncer de mama

São Paulo
2022

IZABELA DANIEL SARDINHA CALDEIRA

Mecanismos moleculares associados à citocina FAM3B/PANDER nos processos de invasão e migração no câncer de mama

Versão Corrigida

Tese apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular

Área de Concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Humberto Miguel Garay Malpartida

São Paulo
2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Escola de Artes, Ciências e Humanidades, com os dados inseridos pelo(a) autor(a)
Brenda Fontes Malheiros de Castro CRB 8-7012; Sandra Tokarevicz CRB 8-4936

Daniel Sardinha Caldeira, Izabela
Mecanismos moleculares associados à citocina FAM3B/PANDER nos processos de invasão e migração no câncer de mama / Izabela Daniel Sardinha Caldeira; orientador, Humberto Miguel Garay Malpartida. -- São Paulo, 2022.
91 p: il.

Tese (Doutorado em Ciencias) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, 2022.
Versão corrigida

1. FAM3B/PANDER. 2. metástase. 3. câncer de mama. I. Garay Malpartida, Humberto Miguel, orient. II. Título.

Nome: Caldeira, Izabela Daniel Sardinha.

Título: Mecanismos moleculares associados à citocina FAM3B/PANDER nos processos de invasão e migração no câncer de mama

Tese apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular

Área de Concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

Aprovado em: ___/____/____

Prof. Dr._____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura: _____

Prof. Dr._____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura: _____

Prof. Dr._____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura: _____

Aos meus pais, Eliete e Luiz Roberto, minha irmã Carla e Guilherme por todo amor e apoio incondicional.

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por todas as oportunidades e a força necessária para alcançar meus objetivos. Agradeço, por ter me colocado em uma família maravilhosa com amigos e colegas incríveis para me apoiar nos momentos difíceis e compartilhar os momentos felizes.

Agradeço imensamente à minha família, que possibilitou toda essa jornada. A minha mãe Eliete, meu pai Luiz Roberto e minha irmã Carla, que são a razão domeu viver. Aqui o meu sentimento de gratidão, não poderia ser expresso apenas com palavras.

A minha vó Maria e a minha vó e amiga Conceição Luiza, que sempre me incentivou a estudar e que tinha o sonho que eu me tornasse professora. O sonho da minha vó foi, enfim, realizado. Ao meu avô Manuel, que acompanhou o começo e, quase, o fim deste longo e breve caminho e que foi um grande avô e amigo.

Gostaria de agradecer, especialmente, ao meu companheiro Guilherme que foi e tem sido minha fortaleza. A minha trajetória não seria possível sem ele. Obrigada pela paciência e pelo amor.

Eterna gratidão, as minhas amigas Aline, Bianca, Helena, Talita, Gabriela, Sophia e Lilian. Agradeço a Marília, minha ouvinte e amiga com quem eu pude compartilhar todo este caminho. Eu não poderia ter construído uma família melhor, meninas.

Ao meu amigo Raphael e Paula, por toda amizade, companheirismo e por terem começado esse trabalho comigo.

Minha gratidão à Patrícia Adriani (Pati), que além da amizade me apoiou de muitas maneiras. Foram horas de boas conversas, conselhos, cafés e doações que tornaram este trabalho possível.

Obrigada, também, especialmente ao Gustavo pela amizade e toda ajuda científica. Sempre soube e hoje tenho a certeza de que não fazemos ciência sozinhos.

Pati, Gustavo e Gabriel obrigada por tornarem a minha trajetória mais leve!

Obrigada aos meus colegas, queridos, e professores do laboratório da EACH. Foram 13 anos de muito aprendizado e boas amizades com aqueles que passaram e aqueles que ficaram.

Agradeço a professora Viviane, por ter me auxiliado e viabilizado este trabalho desde que entrei na EACH. Obrigada, por ter compartilhado o seu saber comigo e por estar sempre disposta a ajudar, da forma mais impecável possível. Sou extremamente grata pelo apoio e pelos momentos felizes.

Obrigada a Flávia pela amizade, generosidade e por despender seu tempo nos ajudando e colaborando, sempre! Não é possível descrever em palavras a minha gratidão!

A Clarissa Ribeiro Reily Rocha por nos ceder, gentilmente, o vetor lentiviral com a luciferase. Agradeço também, ao Gustavo Satoru, por toda ajuda com o *IVIS.*

Agradeço à professora Patrícia Braga e sua equipe pelo acolhimento quando mais precisei. A ajuda de vocês foi fundamental. Atravessar a cidade para cultivar minhas células com vocês foi leve e divertido!

Agradeço ao Guilherme Giovanini pela invalorável ajuda nas análises de bioinformatica, pelo tempo e dedicação despensados.

Agradeço aos meus colegas e amigos de trabalho na UNICID. A vida foi muito generosa comigo ao colocar amigos como Allysson, Arlete e Fernanda no meu caminho. Além de bons cafés, aprendo muito com vocês!

Finalmente, agradeço infinitamente, ao meu amigo e orientador Miguel, que acompanhou minha evolução, compartilhou as minhas conquistas e me levantou quando foi necessário. Parte de meu amadurecimento como cientista, minha formação e construção deste trabalho seria impossível sem essa relação de amizade, profissionalismo e respeito.

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre a mais, no meio da alegria, e inda mais alegre ainda no meio da tristeza! Só assim de repente, na horinha em que se quer, de propósito — por coragem.”

Guimarães Rosa

RESUMO

Caldeira, I.D.S. Mecanismos moleculares associados à citocina FAM3B/PANDER nos processos de invasão e migração no câncer de mama. 2022. 91 páginas. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular). Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022. Versão original.

FAM3B/PANDER (PANcreatic-DERived factor) é uma proteína secretada que foi amplamente estudada em diferentes condições patológicas, como diabetes tipo 2, síndrome metabólica e vários tipos de câncer. No câncer de cólon, próstata e esôfago, o FAM3B inibe a morte celular, aumenta as taxas de migração celular *in vitro* e promove o crescimento tumoral e a indução de metástases *in vivo*. Nossos resultados anteriores mostraram que FAM3B inibe a morte em células de câncer de mama e promove aumento da massa tumoral e indução de metástase *in vivo*. Neste trabalho avaliamos o papel da proteína FAM3B nos processos de invasão e migração no câncer de mama, através de análises *in silico* usando ferramentas de bioinformática e ensaios *in vitro* mediante a superexpressão do gene nas linhagens tumorais de mama MDA-MB-231 e MCF-7. Os dados de expressão de pacientes com câncer de mama foram acessados do Atlas do Genoma do Câncer (TAGC) e analisados usando ferramentas de bioinformática de forma remota pelo portal AUCAN e de forma local usando o *FirebrowseR*. As células MDA-MB-231 e MCF-7 foram transfectadas com vetor plasmidial contendo o cDNA de FAM3B. Ensaios de cicatrização da ferida foram usados para avaliar a migração celular *in vitro*. A expressão de genes envolvidos na migração e na invasão tumoral foi avaliada por qPCR em tempo real e western blot nos níveis de mRNA e proteína, respectivamente. Na análise por bioinformática observamos que não há diferenças de expressão de FAM3B entre os diversos estágios e subtipos de tumores de mama disponíveis no TACG. Por outro lado, as análises de correlação apontam que a expressão de FAM3B estaria associada a padrões antitumorais nos subtipos menos agressivos (hormônio-responsivos) e nos primeiros estágios da doença e a padrões mais metastáticos nos estágios mais avançados e subtipos mais agressivos (triplo negativo/basal-like). Nos ensaios experimentais, células que superexpressam FAM3B apresentaram uma taxa de migração celular aumentada, quando comparadas ao controle, sugerindo um possível mecanismo responsável pela invasão tumoral. Esse processo foi acompanhado pela expressão aumentada de genes envolvidos na EMT e metástases, como Slug, Snail, TGFBR2, vimentina, N-caderina, MMP-2, MMP-9 e MMP-14 em níveis de mRNA e proteína. Nossos resultados apresentam novas evidências sobre o papel do FAM3B na progressão tumoral e sugerem que o FAM3B pode ser um possível marcador de diagnóstico e um alvo molecular promissor para o tratamento do câncer de mama.

Palavras-chave: FAM3B/PANDER, metástase, câncer de mama

ABSTRACT

Caldeira, I.D.S. Molecular mechanisms of FAM3B-induced breast tumor progression. 2022. Number of pages 91. Thesis (Doctoral in Biochemistry and Molecular Biology). School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, 2022. Original version.

FAM3B/PANDER (PANcreatic-DERived factor) is a secreted protein that has been extensively studied in different pathological conditions such as type 2 diabetes, metabolic syndrome, and various types of cancer. In colon, prostate, and esophageal cancer, FAM3B inhibits cell death, increases cell migration rates *in vitro* and promotes tumor growth and induces metastases *in vivo*. Our previous results showed that FAM3B inhibits death in breast cancer cells and promotes tumor mass increase and metastasis *in vivo*. In this work, we evaluated the role of the FAM3B protein in the processes of invasion and migration in breast cancer, through *in silico* analysis using bioinformatics tools and *in vitro* assays by overexpression of the gene in the breast tumor lines MDA-MB-231 and MCF- 7. Expression data from breast cancer patients were accessed from the Atlas of the Cancer Genome (TAGC) and analyzed using bioinformatics tools remotely via the AUCAN portal and locally using *FirebrowseR*. MDA-MB-231 and MCF-7 cells were transfected with plasmid vector containing FAM3B cDNA. Wound healing assays were used to assess cell migration in vitro and the expression of genes involved in tumor migration and invasion was evaluated by real-time PCR and western blot at mRNA and protein levels, respectively. In the bioinformatics analysis, we observed that there are no differences in the expression of FAM3B between the different stages and subtypes of breast tumors available on TACG. On the other hand, the correlation analysis indicates that the expression of FAM3B would be associated with antitumor patterns in the less aggressive subtypes (hormone-responsive) and in the first stages of the disease and with more metastatic patterns in the more advanced stages and more aggressive subtypes (triple negative/basal-like). In experimental approaches, cells that overexpress FAM3B showed an increased rate of cell migration when compared to control, suggesting a possible mechanism responsible for tumor invasion. This process was accompanied by increased expression of genes involved in EMT and metastases, such as Slug, Snail, TGFBR2, vimentin, N-cadherin, MMP-2, MMP-9 and MMP-14 at mRNA and protein levels. Our results present new evidence for the role of FAM3B in tumor progression and suggest that FAM3B may be a possible diagnostic marker and a promising molecular target for the treatment of breast cancer.

Keywords: FAM3B/PANDER, metastasis, breast cancer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características adquiridas pelas células tumorais na progressão tumoral. Fonte: Adaptado de Hanahan D., Weinberg R. (2011). 19
Figura 2. Mecanismos reguladores da EMT na metástase. Fonte: Adaptado de Yastrebova M.A. et al. (2021). 27
Figura 3. Estrutura da mama feminina. 28
Figura 4. Tipos moleculares de câncer de mama. 30
Figura 5. Localização e estrutura do FAM3B. Localização genômica no cromossomo 21 31
Figura 6. Sinalização Celular do FAM3B na progressão tumoral 35
Figura 7. Análise do xenotransplante de células MDA-MB-231-FAM3B em camundongos imunodeficientes. 38
Figura 8. Possíveis vias ativadas pelo FAM3B no câncer de mama. 39
Figura 9. Análise da expressão gênica em amostras não pareadas do TGCA. 51
Figura 10. Análise da expressão gênica em amostras pareadas do TGCA. 52
Figura 11. Mapa de calor da correlação da expressão gênica do FAM3B em pacientes no estágio 1 do câncer de mama. 53
Figura 12. Mapa de calor da correlação da expressão gênica do FAM3B em pacientes no estágio 2 do câncer de mama. 56
Figura 13. Mapa de calor da correlação da expressão gênica do FAM3B em pacientes no estágio 3 do câncer de mama. 57
Figura 14. Mapa de calor da correlação da expressão gênica do FAM3B em pacientes com o subtipo luminal A do câncer de mama. 58
Figura 15. Mapa de calor da correlação da expressão gênica do FAM3B em pacientes com o subtipo luminal B de câncer de mama 59
Figura 16. Mapa de calor da correlação da expressão gênica do FAM3B em pacientes com o subtipo Her2+ de câncer de mama. 60
Figura 17. Mapa de calor da correlação da expressão gênica do FAM3B em pacientes com o subtipo Her2- de câncer de mama. 61
Figura 18. Mapa de calor da correlação da expressão gênica do FAM3B em pacientes com o subtipo triplo negativo (TNBC) de câncer de mama. 62

Figura 19. Análise da expressão gênica de FAM3B em diferentes linhagens da mama ao nível de mRNA. 63
Figura 20. Geração da Linhagem MDA-MB-231-FAM3B e MCF-7-FAM3B. O cDNA completo do FAM3B (710 bp) foi clonado no vetor pcDNA (A). 64
Figura 21. Avaliação da migração celular em células MDA-MB-231-FAM3B.. 66
Figura 22. Avaliação da migração celular em células MCF-7. 67
Figura 23. Análise da expressão gênica ao nível de mRNA de genes envolvidos na metástase 68
Figura 24. Análise da expressão gênica ao nível de mRNA de genes envolvidos na metástase.. 69
Figura 25. Análise da expressão gênica de genes envolvidos na metástase ao nível de proteína. 70
Figura 26. Análise da expressão gênica de genes envolvidos na metástase ao nível de proteína. em ambos os grupos. 71
Figura 27. Mecanismos de sinalização do FAM3B observados nas linhagens de câncer de mama 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação da expressão gênica através de ensaios de PCR quantitativo – qPCR 47
Tabela 2. Anticorpos utilizados para análise da expressão gênica por Western blot. 48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADAM	Desintegrina e Metaloproteinase
Akt	Proteína serina/treonina quinase
APS	Persulfato de amônio
ATP	Trifosfato de adenosina
Bax	Proteína X associada ao Bcl-2
Bcl-2	Célula B de Linfoma – 2
Bcl-xL	Célula B de Linfoma–Extra Grande
BMP	Proteínas ósseas morfogenéticas
Bp	Pares de bases
BRCA-1	*Breast cancer gene - 1*
BRCA-2	*Breast cancer gene - 2*
Cdc42	GTPase da família Rho
cDNA	DNA Complementar
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1- propanosulfonato hidrato
CREB	Proteína de ligação responsiva ao AMPc
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium – meio de cultura celular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
DU145	Linhagem celular de carcinoma de próstata
MEC	Exame clínico das mamas
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMT	Transição Epitélio Mesenquimal
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ERK1	Quinase regulada por sinal extracelular-1
ERK2	Quinase regulada por sinal extracelular-2
FAM3	*Family With Sequence Similarity* 3
GSK3β	Proteína Glicogênio Sintase Quinase 3 Beta
HCT116	Linhagem celular de carcinoma colorretal
HCT8	Linhagem celular de adenocarcinoma de cólon
HEPES	Ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1
HER-2	Receptores de fator de crescimento epidérmico-2
HI1-α	Fator Indutor de Hipóxia-1α
HS578T	Linhagem celular de carcinoma de mama
IARC	*International Agency for Research on Cancer*
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano

IL-6	Interleucina-6
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Jagged	*Jagged canonical Notch ligand*
JAM	Proteína de adesão juncional
JNK	c-Jun-N-terminal cinase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama
MDA-MB-231	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama
MDA-MB-435	Linhagem de melanoma descrita como de carcinoma ductal de mama
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinase
MMP-2	Metaloproteinase-2
MMP-9	Metaloproteinase-9
MMP-14	Metaloproteinase-14
MICs	Células iniciadoras de metástase
mRNA	RNA mensageiro
NF-kb	Fator nuclear Kappa B
NHGRI	Instituto de Pesquisa do Genôma Humano
NKs	Células Natural Killers
OMS	Organização Mundial da Saúde
Opti-MEM	*Minimum Essential Medium Eagle* - Meio de cultura com soro reduzido
ORF	Reconhecimento Ostensivo de Enovelamento
p53	Proteína de supressão tumoral
PANDER	*PANcreatic DERived Factor (FAM3B)*
PBS	Tampão fosfato salino
pcDNA	Vetor comercial
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Quinases
PKA	Proteína Quinase A
PKC	Proteína Quinase C
RE	Receptor de estrógeno
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Receptor de progesterona
RT-PCR	PCR em Tempo Real
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
Slug	Proteína *zinc finger* SNAI2
SMADs	Mensageiros intracelulares da via de sinalização das BMPs
SNAIL	Fatores de transcrição das famílias SNAIL
Snail	Proteína *zinc finger* SNAI1

TBST	Tampão de lavagem com tampão salinoTris e Tween 20
TEM	Migração Transendotelial
TEMED	N, N, N',N'-Tetrametiletilenodiamina
TGF-α	Fator transformador de crescimento α
TGF-BR1	Receptor de fator de transformação do crescimento-beta-1
TGF-BR2	Receptor de fator de transformação do crescimento-beta-2
TGF-β	Fator de transformação do crescimento-beta-1
TGF-β1	Fator de transformação do crescimento-beta-2
TGF-β2	Fator de transformação do crescimento-beta
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TNBC	Câncer de Mama Triplo Negativo
TNM	Classificação de tumores malignos
TWIST	Fatores de transcrição da família TWIST
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial
WNT	WNT Via de Sinalização *Wingless Type*
VIM	Vimentina
ZEB	Fatores de transcrição da família ZEB
Zeb-1	Proteína *zinc-finger E-box-binding homeobox* -1
Zeb-2	Proteína *zinc-finger E-box-binding homeobox* - 2
ZR-75-1	Linhagem celular de adenocarcinoma ductal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18
   1.1. Câncer 18
   1.2. Características Biológicas do Câncer 19
   1.3. Câncer e malignidade: a importância da metástase 21
   1.4. EMT e o "Intravasamento" 22
   1.5. "Extravasamento": Saída do Endotélio 24
   1.6. Colonização: Formação do Tumor Secundário 24
   1.7. Câncer de mama e marcadores tumorais 25
   1.8. FAM3B/PANDER, uma citocina multifatorial? 31
   1.9. FAM3B na progressão do câncer 32
   1.10. FAM3B no câncer de mama 36
2. OBJETIVOS 40
   2.1. Objetivo Geral 40
   2.2. Objetivos Específicos 40
3. JUSTIFICATIVA 41
4. MÉTODOS 42
   4.1. Análise Bioinformática 42
      4.1.1. Coleta de dados 42
      4.1.2. Análise dos dados de expressão gênica 43
      4.1.3. Análise de correlação da expressão gênica e elaboração de mapas de calor (*Heathmap*) 43
   4.2. Linhagens celulares 44
   4.3. Cultivo de células 45
   4.4. Superexpressão do FAM3B 45
   4.5. Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR) 46
   4.6. Análise da expressão gênica por Western blot 46
   4.7. Ensaio de migração celular: cicatrização de feridas (*Wound healing assay*) 48
   4.8. Análise estatística 49
5. RESULTADOS 49
   5.1. Análise *in sílico* de expressão gênica do FAM3B nas bases de dados públicas 49
   5.2. Expressão do FAM3B em linhagens tumorais da mama 63
   5.3. Superexpressão do FAM3B nas células MDA-MB-231 e MCF-7 63
   5.4. Migração celular nas células MDA-MB-231-FAM3B e MCF-7-FAM3B 65

5.5. Superexpressão de FAM3B em células MDA-MB-231 de genes relacionados à metástase ao nível de mRNA 68
5.6. Superexpressão de FAM3B em células MCF-7 de genes relacionados à metástase ao nível de mRNA 69
5.7. Superexpressão de FAM3B em células MDA-MB-231 de genes relacionados à metástase ao nível de proteína 70
5.8. Superexpressão de FAM3B em células MCF-7 promove fragmentação de E-caderina 71
6. DISCUSSÃO 72
7. CONCLUSÕES 79
REFERÊNCIAS 81
ANEXO I – Aprovação da Comissão de ética no uso de animais 86
ANEXO II – Correlações calculadas entre o FAM3B e 57 genes associados a câncer de mama e EMT de acordo aos estágios da doença 87
ANEXO III – Correlações calculadas entre o FAM3B e 57 genes associados a câncer de mama e EMT de acordo aos subtipos da doença 89

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer pode ser definido como um conjunto de mais de 100 tipos de doenças malignas, que apenas têm em comum a capacidade de proliferação desordenada das células que podem invadir órgãos e tecidos, disseminando-se para sítios distantes do tumor primário em um processo conhecido como metástase (1). Essa definição juntamente com o fato de que distintos tipos de câncer apresentam diferentes fatores de risco associados aos hábitos de vida do século XXI, fica evidente a heterogeneidade do câncer.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2019, o câncer foi apontado como umas das quatro primeiras causas de morte em indivíduos com menos de 70 anos, no mundo (2). Dados da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) revelaram que ocorreram, aproximadamente, 10 milhões de mortes por câncer em 2020, o que reforça seu impacto global nos sistemas de saúde (2). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o triênio de 2020-2022 foram estimados cerca de 625 mil novos casos de câncer (3).

As elevadas taxas de incidência e mortalidade por tumores malignos podem ser relacionadas com múltiplos fatores, tais como o envelhecimento da população e o desenvolvimento socioeconômico. Foi reportado que em países com maior Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), as taxas de incidência por câncer são maiores, do que em países com IDH menor. O maior número de casos novos e mortes em países desenvolvidos, parece estar associado ao consumo de alimentos processados, ao sedentarismo e exposições ao longo da vida aos fatores de risco para o câncer (2, 3).

Desde a metade do século passado numerosos avanços científicos na compreensão da patogênese dos tumores malignos têm permitido o desenvolvimento de novos fármacos e a identificação de novos marcadores moleculares para determinados tipos de tumores. Contudo, o caráter heterogêneo e multifatorial do câncer, bem como a ausência de fatores preditivos que permitam um diagnóstico precoce e um prognóstico confiável, tem sido o principal obstáculo para o controle da doença.

1.2. Características Biológicas do Câncer

Em 2011 Hanahan e Weinberg, sugeriram algumas características essenciais adquiridas por células tumorais, ao longo da progressão tumoral, para se tornarem invasivas e malignas (Figura 1). Dentre estas habilidades adquiridas, os autores apontaram: 1. instabilidade genômica e mutações; 2. capacidade de evadir dos sinais supressores do crescimento; 3. capacidade de promover sinalização para proliferação celular sustentada; 4. capacidade replicativa ilimitada (imortalização); 5. capacidade de promover desregulação energética da célula, em benefício próprio, sustentando suas demandas metabólicas; 6. capacidade de resistir à morte celular; 7. capacidade de evasão da vigilância do sistema imunológico; 8. promoção da inflamação; 9. indução de angiogênese e 10. capacidade de invadir e formar metástase (4).

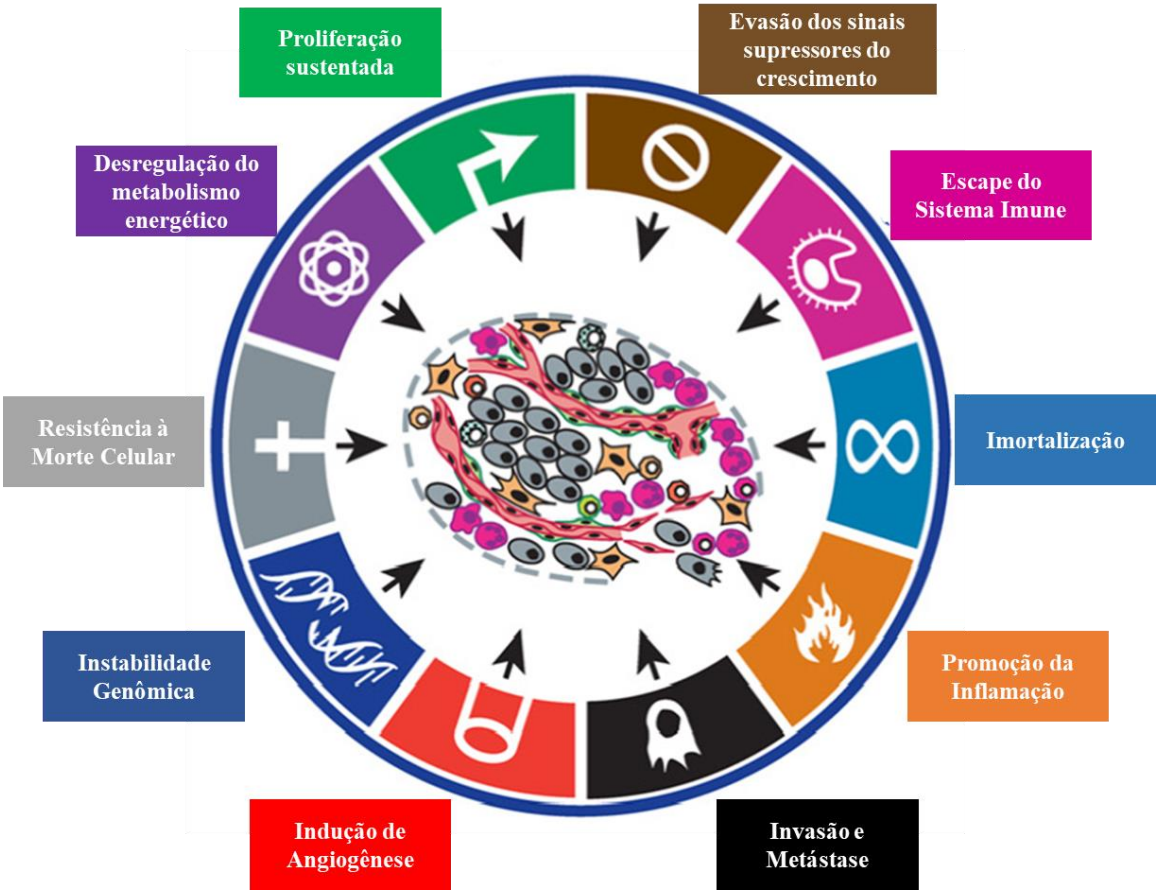


Figura 1. Características adquiridas pelas células tumorais na progressão tumoral. Fonte: Adaptado de Hanahan D., Weinberg R. (2011).

É bem descrito na literatura o envolvimento do acúmulo de mutações observadas em células somáticas, na progressão tumoral (5). A instabilidade genômica das células tumorais é determinada por mutações em genes supressores de tumor (p53, p21, Rb) com a consequente

perda do controle nos sistemas de reparo do DNA. Desta forma, células tumorais amplificam as alterações no seu genoma e conseguem expandir e perpetuar seus clones mutados, propiciando a continuidade do ciclo celular e evitando a senescência. Além disso, estas células também são capazes de alterar o equilíbrio de genes da família Bcl-2 e a expressão da família das caspases tornando-se, em paralelo, mais resistentes à morte celular (4).

Adicionalmente, um ponto em comum para diferentes tipos de câncer é alta taxa de proliferação celular sustentada por ajustes metabólicos que suportam sua grande demanda energética. Otto Warburg, em 1926 descreveu as alterações no metabolismo energético em células tumorais, como sendo um processo quase que exclusivamente direcionado para obtenção de ATP pela via glicolítica, devido aos prováveis danos mitocondriais nas células tumorais, que prejudicariam a obtenção de energia através da fosforilação oxidativa(6).

Contudo, estudos recentes sugerem que nem sempre são observados danos mitocondriais que impediriam a cadeia respiratória e que embora, em alguns tumores, o metabolismo possa ser principalmente sustentado pela glicólise as rotas metabólicas para obtenção de energia podem ser diversas, visto que as massas tumorais hipóxicas podem se adaptar mesmo quando há menor disponibilidade de oxigênio (4, 6, 7).

Outra característica importante das células tumorais é a capacidade de escapar da vigilância do sistema imunológico e promover condições supressoras do sistema imune, o que parece ser fundamental para promover a expansão tumoral pelo sistema sanguíneo e linfático. Todavia, paradoxalmente, processos inflamatórios crônicos também estão associados com a progressão tumoral e, nestes casos, moléculas denominadas citocinas, envolvidas na resposta inflamatória, estariam associadas aos tumores, funcionando em prol da progressão do câncer (4).

Além destas habilidades, as células tumorais também podem desenvolver a capacidade de formar novos vasos sanguíneos, processo conhecido como angiogênese. O Fator de Crescimento Endotelial (VEGF), cuja expressão pode ser regulada por oncogenes ou por situações de hipóxia, é o componente apontado como um dos principais envolvidos nessa neovascularização tumoral. A angiogênese possibilita a chegada de mais nutrientes, oxigênio e meio para eliminação de produtos advindos do metabolismo tumoral, assim como permite a disseminação metastática das células tumorais (4).

1.3. Câncer e malignidade: a importância da metástase

A metástase pode ser considerada uma das últimas etapas da progressão tumoral, que determina o caráter maligno dos tumores. É um processo caracterizado pela disseminação das células tumorais, a partir da remodelação das adesões com as células vizinhas e/ou matriz extracelular com adaptações que também permitam a migração celular, acesso à circulação sanguínea e/ou linfática para que consigam colonizar e se proliferar em parênquimas distantes e diferentes do tumor inicial. Estima-se, que independentemente do tipo de tumor a presença de metástase está, frequentemente, associada com mau prognóstico e a impossibilidade de cura da doença, pela dificuldade na obtenção de respostas aos tratamentos quimioterápicos e radioterápicos disponíveis, que nesta situação precisarão incluir abordagens sistêmicas para o tratamento da doença (5, 8, 9).

Muitos estudos adotam o termo “cascata da colonização metastática” para descrever as diversas etapas, prováveis, pelas quais as células tumorais metastáticas passam para colonizar diferentes tecidos no organismo. Dentro deste conceito a primeira etapa da cascata, seria: 1. Invasão/ “Intravasamento”, ou seja, entrada das células tumorais nos vasos sanguíneos e/ou linfáticos, após terem superado as conexões célula-célula no tecido de origem com a remodelação da matriz extracelular e aquisição da capacidade migratória, que são possíveis devido a plasticidade tumoral, que em carcinomas pode ser resultado de um processo chamado de Transição Epitélio Mesênquima (EMT); 2. “Extravasamento”, condição em que as células após migrarem durante a circulação e sobrepujarem os obstáculos, que certamente encontraram ao longo do percurso, devem sair dos vasos sanguíneos e/ou linfáticos; 3. Colonização, após o sucesso obtido nas duas etapas anteriores, as células ao saírem dos vasos conseguem, então, invadir, aderir-se e proliferar em um novo local com características distintas do tumor inicial (5, 8).

Avançar para diferentes estágios da metástase não é simples e para migrar e se estabelecer em diferentes tecidos, as células tumorais precisam ultrapassar as barreiras inerentes ao processo, o que resulta na seleção de clones mais adaptados. Desta forma, as células selecionadas, que sobreviverem e que contém a habilidade de reestabelecer o tumor em etapas críticas da metástase são também denominadas de células iniciadoras de metástase (MICs) (9).

Por outro lado, vale ressaltar, que evidências obtidas com células tumorais da medula óssea, câncer de pâncreas e mesmo dados de modelos com animais para estudo do câncer de mama sugerem que lesões pré-malignas podem ser capazes de originar focos de metástases latentes e micrometástases, que nem sempre estão associadas à evolução dos tumores primários para estágios avançados e finais da metástase, conforme descrito anteriormente (10). De fato, é

razoável supor que diferentes mecanismos possam ser encontrados em tumores distintos e estes dados que se contrapõem às etapas propostas para a metástase como sendo um evento tardio do desenvolvimento de tumores malignos, corroboram a complexidade do câncer.

1.4. EMT e o "Intravasamento"

Acredita-se que células epiteliais malignas possam passar pela EMT, que pode ser definida como um processo em que células tumorais perdem durante a transição que as tornam invasivas as suas características epiteliais, ao passo em que superam as conexões célula-célula, sobrevivem à perda de adesão ao substrato em uma troca de marcadores epiteliais por mesenquimais, que conferem às células de um carcinoma o fenótipo mesenquimal. As células que passam pela EMT, desprendem-se do epitélio ao qual faziam parte e, assim, também ganham um incremento na sua motilidade em um processo de constante transformação, dada a aparente plasticidade destas células tumorais (Figura 2). Vale ressaltar, que em tumor talvez seja possível encontrar um grupo heterogêneo de células, em um estado de EMT que pode ser, inclusive, parcial. No entanto, o fato é que estas células em diferentes estágios de transformação podem coletivamente ou sozinhas, eventualmente alcançar vasos linfáticos ou capilares e iniciar a primeira etapa da metástase, também conhecida como "Intravasamento" (8, 10).

Inúmeros trabalhos reportaram que a EMT possivelmente seja resultado da interação das células tumorais com as células normais e do estroma associados, mediado por fatores autócrinos e parácrinos. Por outro lado, sabe-se que o resultado da via de sinalização da EMT que ocorre em carcinomas, é a expressão e ativação funcional de fatores de transcrição como Twist, Snail, Slug, Zinc Finger E-box-binding homeobox (Zeb) -1 e – 2 (Figura 2) (4, 8, 9, 11).

Fatores de transcrição como as proteínas da família Snail (Fatores de Transcrição Associados ao Zinco) como Snail/*SNAI1* e Slug/*SNAI2*, além de estarem envolvidos na embriogênese e na vida adulta, à cicatrização de feridas, estão associados à invasão e aumento da migração de células tumorais durante a metástase, no contexto patológico. Tem sido descrito extensivamente que Snail e Slug no câncer podem exercer ações centrais na metástase tanto como repressores transcricionais de moléculas de adesão epiteliais, quanto ativadores da transcrição de genes de proteínas como N-caderina, vimentina e fibronectina, mais expressas em células mesenquimais e compatíveis com a EMT observada em células metastáticas. A expressão de proteínas da família Snail em muitos tumores está relacionada com pouca diferenciação histológica, sendo apontados como um dos principais indutores da EMT (12).

Neste contexto, diversos reguladores foram sugeridos como prováveis reguladores da EMT induzida por Snail, dentre os quais estão: os receptores tirosina quinase ativados por fatores de crescimento que levariam à ativação da via Ras/PI3K; proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) e o Fator de transformação do crescimento-beta (TGF-β) como ativadores da via das Smads; proteínas Wnt que se ligam aos receptores Frizzles, bloqueando o complexo de destruição de Snail, com estabilização de beta catenina; sinalização via Notch que levaria à EMT induzida por hipóxia com ativação do Fator Indutor de Hipóxia-1α (HI1-α) e aumento da Lisil oxidase (Lox), o que promoveria estabilização de Snail e via Fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) com consequente envolvimento das quinases I-kappa-B (IKKs) e ativação do Fator Nuclear Kappa-B (NF-ĸB). Independentemente dos reguladores propostos para Snail e Slug, o que se espera são os efeitos observados no aumento da motilidade celular, sobrevivência, acompanhados da diminuição de marcadores epiteliais como claudinas, citoqueratinas, ocludinas, desmoplaquinas e E-caderina, acompanhados do aumento da expressão de marcadores mesenquimais como fibronectina, vimentina e N-caderina, todos observados em células que estão passando pela EMT durante a metástase (13).

Além disso, acredita-se que também no microambiente tumoral as metaloproteinases de matriz (MMPs), que são endopeptidases dependentes do cálcio e do zinco para a catálise, executem ações cruciais para a EMT, participando não só da degradação de componentes da matriz extracelular como o colágeno IV, laminina -5 e fibronectina, como também da proteólise de proteínas como a E-caderina, integrinas e CD44 que são também fundamentais para as junções adesivas intercelulares, de células epiteliais (14, 15). Dentre as 24 metaloproteinases identificadas em humanos, as denominadas gelatinases que são as MMP-2 e MMP-9, parecem ser relevantes dentro da progressão tumoral(15).

Desta forma na primeira etapa da metástase, o intravasamento - que implica na entrada dentro de vasos sanguíneos e/ou linfáticos- as células tumorais adquirem a capacidade de sobreviver a perda de adesão à um substrato, resistir ao fluxo hemodinâmico dentro da corrente sanguínea, suportar a tensão de cisalhamento e, principalmente, de impedir a destruição pelo sistema imunológico, através das células *Natural Killers* (NKs). Dados recentes sugerem, que as células tumorais fazem interações importantes com as plaquetas, neutrófilos, monócitos, macrófagos e com células endoteliais, que lhes permite escapar da vigilância imunológica (8).

1.5. “Extravasamento”: Saída do Endotélio

Espera-se que a interconexão das vias de sinalização celular propostas, promovam as etapas sugeridas para a cascata metastática, possibilitando a aquisição de características necessárias para o desprendimento das conexões previamente encontradas entre as células epiteliais, alcance e invasão de vasos acompanhada da resistência para sobreviver na via hematogênica em meio ao fluxo hemodinâmico para que, finalmente, as células possam sair da circulação sanguínea e/ou linfática em um processo denominado de extravasamento (8, 10).

Eventualmente, as células metastáticas circulantes ao se aderirem ao endotélio microvascular, aumentam a permeabilidade dos vasos e podem sair da circulação através da chamada Migração Transendotelial (TEM), por meio da ação de proteínas que também atuam no intravasamento, como o VEGF, MMPs e Metaloproteinase e Desintegrina-12 (ADAM-12). Além disso, as interações com células do sistema imune como os monócitos inflamatórios e outras células encontradas no sangue, parecem auxiliar no extravasamento(8).

Ademais, tem sido demonstrado que outra forma de ocorrer o extravasamento de células tumorais é através de um tipo de necrose, denominada de necroptose, que pode ocorrer no endotélio. Membros da família ADAM, como ADAM-17 tem sido sugerido como importante para o extravasamento das células tumorais circulantes através da regulação da via do TNF/TNFR, envolvida na necroptose (16).

Contudo além das etapas descritas é possível que, em alguns casos, as células de um carcinoma consigam se estabelecer e proliferar dentro do lúmen destes vasos, o que pode levar à ruptura do próprio endotélio e, assim, a liberação das células tumorais que poderão desta forma se estabelecer em diferentes tecidos (8, 17).

Atualmente, além de tentar elucidar os processos envolvidos no extravasamento estratégias terapêuticas que têm como alvo o processo de saída das células tumorais dos vasos tem sido investigado (17).

1.6. Colonização: Formação do Tumor Secundário

A última etapa da cascata metastática é a colonização, ou seja, a formação do tumor secundário que é formado por células tumorais que saíram do tumor inicial (primário), que migraram e conseguiram superar todas as barreiras do Intravasamento, assim como do extravasamento. Estima-se que inúmeras transformações são necessárias para que as células de um carcinoma consigam adquirir características muito diferentes das suas células de origem e se estabelecer em locais distintos do tecido, onde ocorreu a iniciação tumoral. Por outro lado,

mesmo tendo sido considerada notável a plasticidade tumoral, das milhares de células tumorais circulantes poucas conseguem avançar e formar tumores em órgãos e tecidos distantes, o que demonstra o quão, apesar de árduo, o processo pode ser considerado pouco eficiente (8, 10).

Evidências apontam para o fato de que diferentes carcinomas, podem ter preferências para determinados sítios de metástase (8). No câncer de mama, por exemplo, os principais focos de metástase usualmente são ossos, pulmão e fígado (18). No entanto, pouco se sabe sobre quais são os mecanismos que medeiam o possível tropismo de células metastáticas por determinados tecidos (8).

Portanto, considerando a diversidade dos processos envolvidos se fazem necessários estudos que busquem elucidar as vias metabólicas ativadas durante a metástase, para que seja possível a identificação de marcadores moleculares específicos envolvidos no processo, que são essenciais para diagnósticos mais efetivos e para que, desta forma, no futuro tenhamos tratamentos mais eficazes através da caracterização de diferentes tumores por meio de assinaturas genéticas.

1.7. Câncer de mama e marcadores tumorais

De acordo com INCA, depois do câncer de pele do tipo não melanoma, a maior incidência o câncer de mama é o mais frequente e o que mais mata entre as mulheres. Em 2018 foram registrados mais de 2 milhões de novos casos de câncer de mama no mundo. Em relação ao Brasil, para 2020-2022 foram esperados 66.280 novos casos de câncer de mama. Com relação à mortalidade, em 2019, foram registradas18.068 mortes de mulheres por câncer de mama e 227 homens. O câncer de mama masculino é raro e corresponde a cerca de 1% de todos os casos de câncer de mama no mundo (1, 19).

O câncer de mama deve ser compreendido como um conjunto de doenças, que demonstram uma ampla heterogeneidade biológica ao nível molecular, histopatológico e clínico, em que nem sempre as diferenças moleculares estão em paralelo com os subtipos histopatológicos, conhecidos. Além disso, tão importante quanto estas variações, é a complexidade entre cada indivíduo, o que certamente aumenta ainda mais a variedade subclonal entre estes tumores, as quais podem ser resultados tanto de variações genéticas, quanto de variações epigenéticas (20).

A mama é composta por um sistema ducto lobular e cerca de 80% dos tumores de mama parecem estar localizados inicialmente nos epitélios ductais da mama e, por isto, as primeiras lesões encontradas são denominadas de hiperplasias intraductais *in situ*, cujo estágio as células

estão restritas à uma membrana basal íntegra, caracterizando sua delimitação. Contudo, em casos invasivos as células tumorais não mais delimitadas pela membrana basal entram em contanto com o estroma mamário, disseminando-se para diferentes sítios distantes do tumor primário (Figura 3) (21, 22).

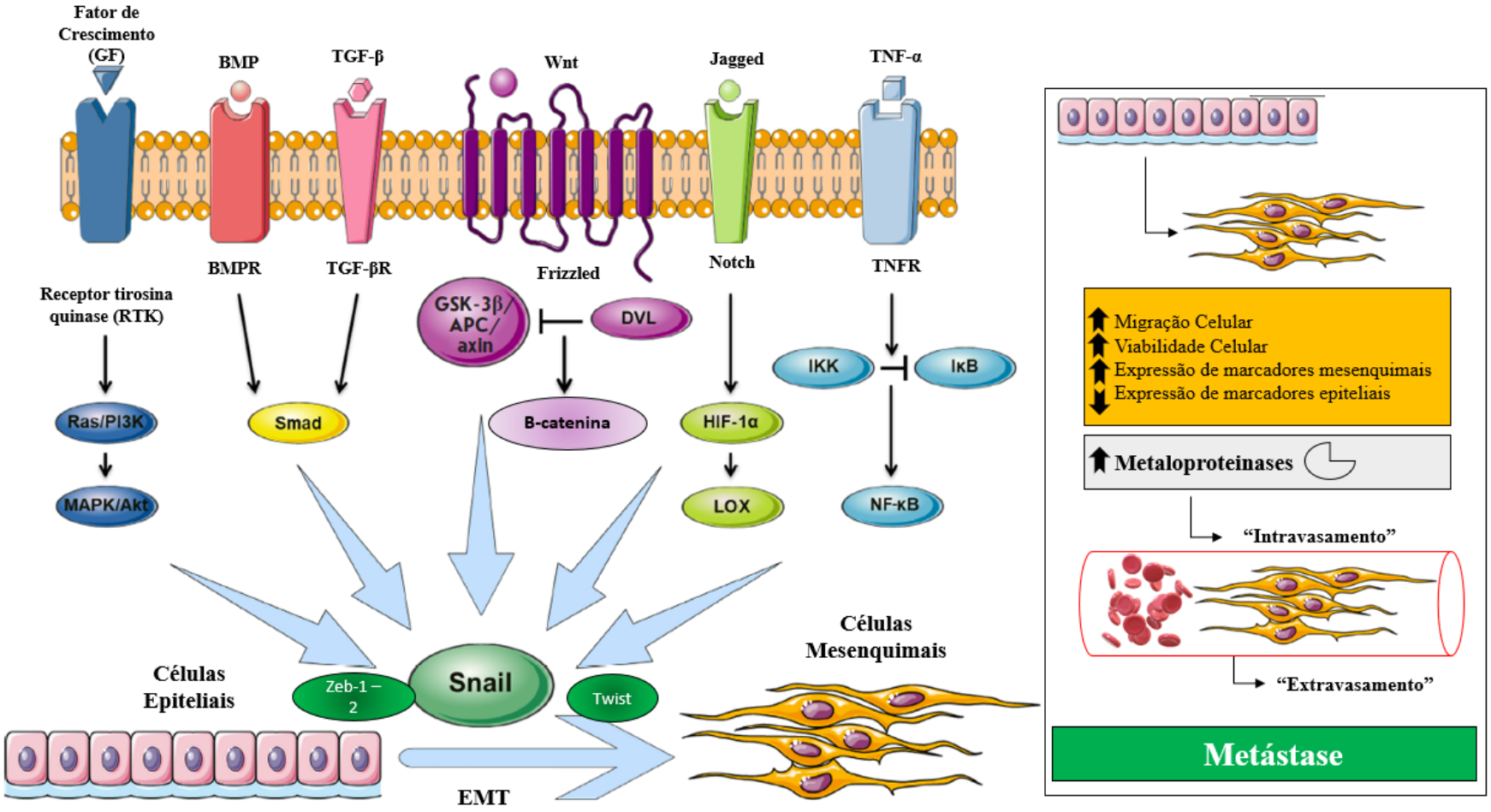


Figura 2. Mecanismos reguladores da EMT na metástase. Fonte: Adaptado de Yastrebova M.A. et al. (2021).

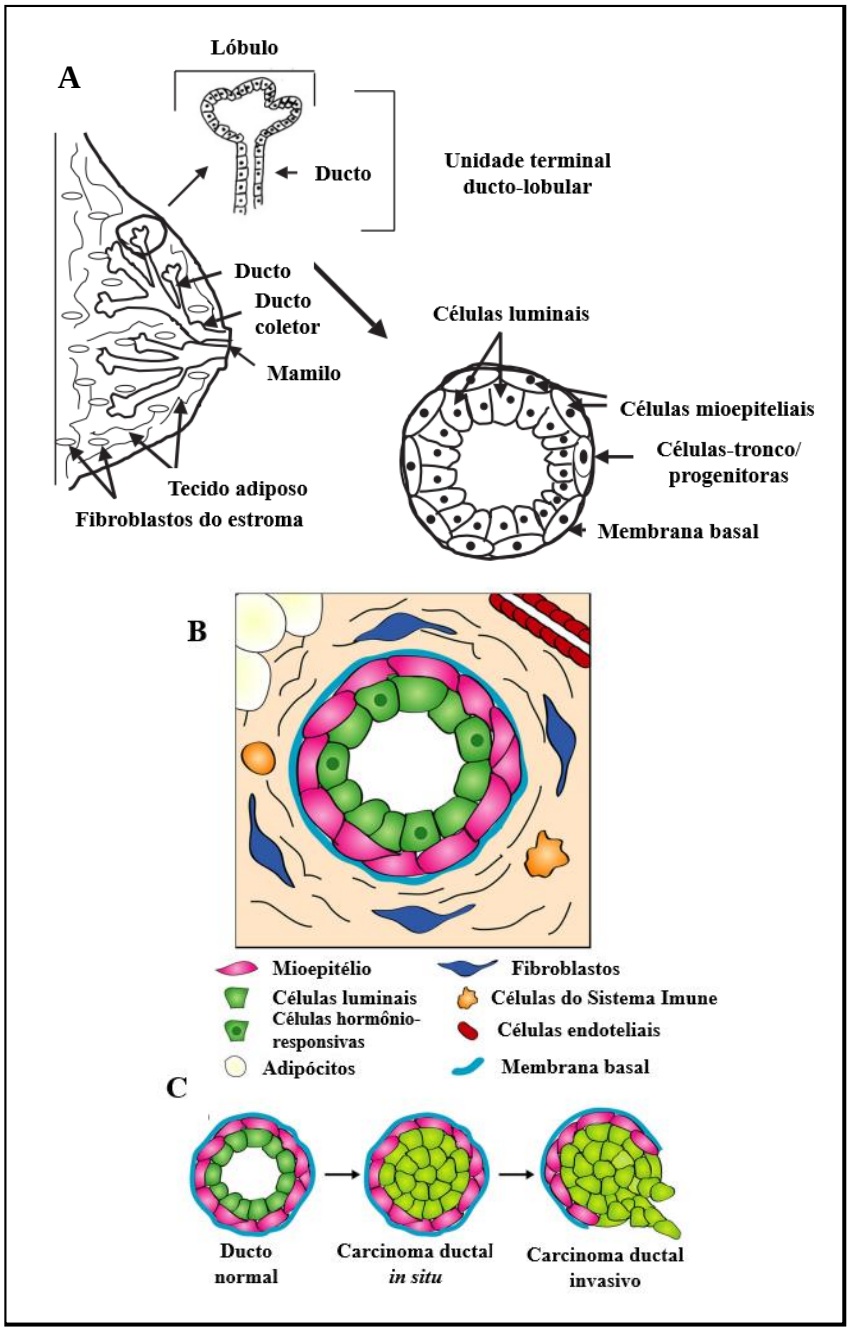


Figura 3. Estrutura da mama feminina. A unidade terminal ducto-lobular é o sítio primário mais frequente dos casos de câncer de mama. A mama é composta por um sistema ducto-lobular, com 15 a 20 lóbulos (A). O estroma da mama é formado por tecido adiposo, fibroblastos, vasos sanguíneos, células hormônio-responsivas e células do sistema imune (A, B). Os ductos conectam os lóbulos das mamas à extremidade oposta que desemboca no mamilo (A). Na unidade ducto-lobular estão presentes as células contráteis mioepiteliais, que fazem o revestimento externo e as células luminais que fazem o revestimento interno (A, B). É possível observar que as células mioepiteliais estão em contato com a membrana basal íntegra no ducto normal e no carcinoma ductal in situ. Em carcinomas invasivos, as células tumorais podem extravasar a membrana basal e disseminar-se durante a metástase (C). Fonte: Adaptado de Dimri G., Band H., Band V. (2005); Srivastava V., et al (2021).

Os métodos de rastreamento mais comuns para câncer de mama, atualmente, são o exame clínico das mamas (ECM) e a mamografia. No entanto, o diagnóstico só pode ser feito a partir da confirmação da lesão suspeita, a partir de análises histopatológicas. O estadiamento da doença, após a confirmação diagnóstica segue o padrão Internacional de Classificação de Tumores Malignos (TNM) que considera o tamanho do tumor, características dos linfonodos regionais (axilares, infraclaviculares, mamários internos, supraclaviculares) e a presença ou ausência de focos de metástases à distância (pulmonar, medula óssea, pleural hepática, peritoneal, cerebral, supra-renal, linfonadal, pele, outras) (23).

Contudo, também contamos com os chamados marcadores tumorais ou biomarcadores, que são substâncias secretadas pelo tumor ou pelo próprio indivíduo em resposta ao tumor. Estes biomarcadores auxiliam na caracterização e, portanto, no diagnóstico, prognóstico e tratamento de muitos tumores de mama. Dentre eles os indicados pelos Comitês de Consenso Oncológico para pesquisa de rotina, em casos de câncer de mama, são os receptores hormonais estrógeno (RE) e progesterona (RP) e o Her2 (c-erbB-2) (24, 25). Por meio da identificação destes marcadores foi possível desenvolver estratégias terapêuticas, como as voltadas para tumores hormônio-responsivos, a partir de terapias ablativas de RE com o uso do tamoxifeno ou inibindo a conversão de andrógenos na mama em estrógenos, com os inibidores da aromatase. Outro exemplo, é o anticorpo monoclonal anti-Her2 (Herceptin®), utilizado para tratamento de alguns tipos de carcinoma com o Her2 amplificado (24, 26).

A partir destes biomarcadores também foi possível determinar clinicamente os 3 tipos moleculares principais de câncer de mama (Figura 4), que são: 1. RE positivos, subdivididos entre luminal A e B; 2. Her2-positivo; 3. câncer de mama basal símile (“*basal-like”)*, que não expressa RE, RP ou Her2 (26-28) .

Outros marcadores importantes em câncer de mama são os genes BRCA 1 e BRCA2. Mutações nestes genes, originalmente supressores de tumor, são responsáveis pela maior parte de tumores de mama hereditários. Estima-se que mutações no gene BRCA-1 aumente em até 57% e para BRCA-2 em 49%, o risco para desenvolver câncer de mama (29). Casos em que o rastreamento seja positivo, as condutas baseiam-se em vigilância, e em alguns casos, quimioterapia preventiva e até mesmo cirurgias radicais (30).

Apesar dos avanços na biologia molecular, ainda existem muitos desafios na identificação de biomarcadores e, assim, na caracterização dos subtipos tumorais. As recentes descobertas abrem caminho na direção das denominadas “assinaturas genéticas” para tornar o rastreamento e o diagnóstico cada vez mais eficientes e o tratamento cada vez mais personalizado e, sendo, portanto, mais efetivos e menos agressivos. Neste cenário, proteínas

secretadas e de baixo peso molecular, de fácil detecção nos exames de rotina, são alvos promissores não apenas para contribuir ao desenho de um perfil molecular e identificar diferentes subtipos tumorais, mas também para o desenvolvimento de tratamentos alvo-específicos.

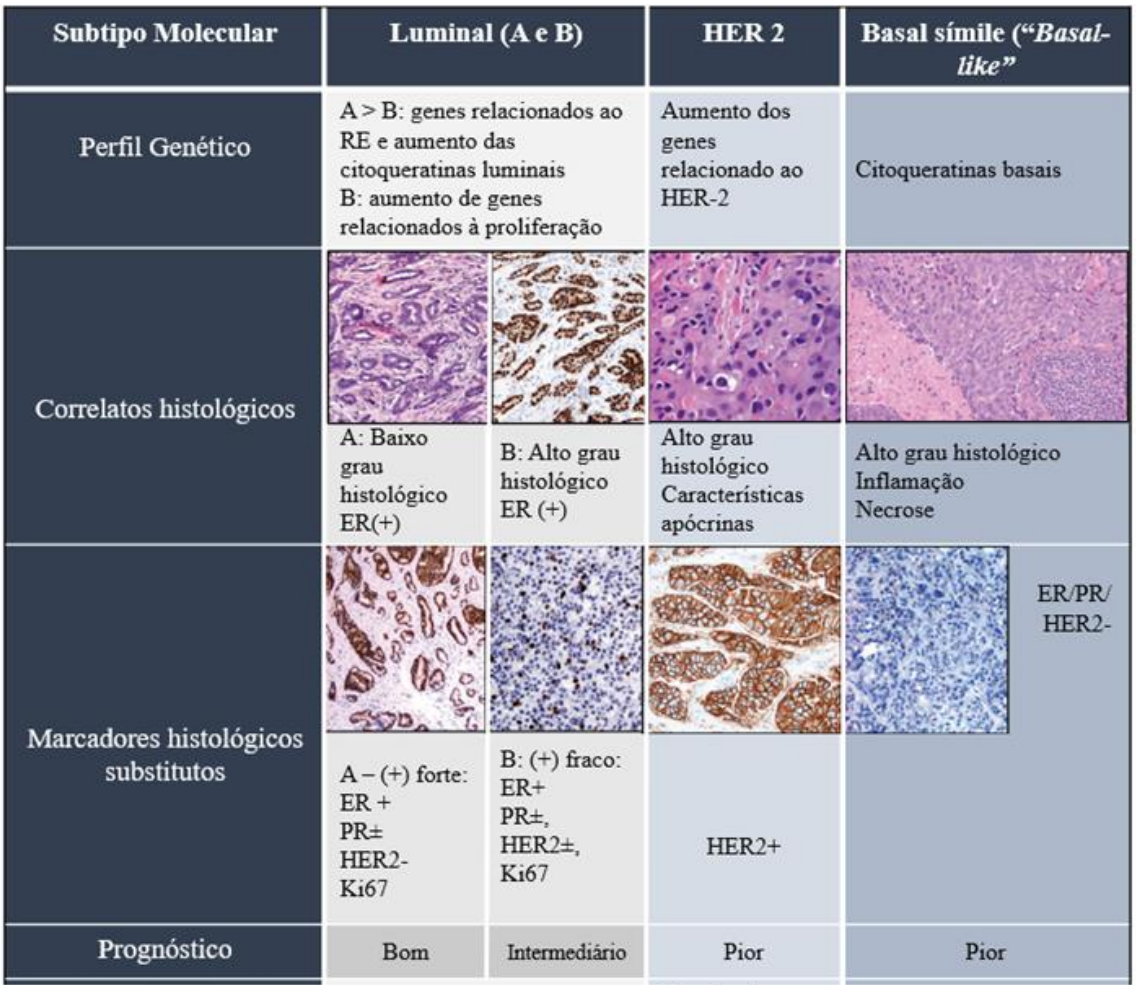


Figura 4. Tipos moleculares de câncer de mama. O subtipo de câncer de mama Luminal é caracterizado por células que se assemelham às células luminais normais dos ductos da mama. O subtipo tipo Luminal A é positivo para RE e/ou RP e negativo para HER2 acompanhado de menor expressão de Ki67, marcador de proliferação celular. As taxas de proliferação celular são menores no subtipo Luminal A e o prognóstico é considerado melhor, que o subtipo luminal B. O subtipo Luminal B, frequentemente, apresenta receptores hormonais (RE e RP) e alguns subtipos Luminal B podem também expressar HER2 e possuem maiores taxas de proliferação celular (maior expressão de Ki67). O subtipo HER2 apresenta amplificação de HER2, possui características apócrinas (glandulares) e é considerado mais agressivo em relação aos que não têm superexpressão deste marcador. O Tipo Basal símile (*Basal Like*) é considerado mais agressivo e não possui uma terapia-alvo, visto que é negativo para RE, PR e HER2. Fonte: Adaptado de Allison, K.H. (2017).

1.8. FAM3B/PANDER, uma citocina multifatorial?

Em 2002 Zhu e colaboradores, desenvolveram um algoritmo computacional denominado Reconhecedor Ostensivo de Enovelamento (ORF) para identificação de novas possíveis sequências de proteínas com a estrutura secundária comum às citocinas, altamente conservada através da evolução. Este algoritmo permitiu a identificação de uma nova família de proteínas "tipo-citocinas" *(like-cytokine)*, denominada de FAM3 (*Family With Sequence Similarity 3)*, composta por 4 membros: FAM3A, FAM3B, FAM3C e FAM3D (31).

FAM3B humano, está localizado na região 21q22 do cromossomo 21 e sua proteína contém 235 aminoácidos, um peptídeo sinal (aminoácidos1-29) e quatro cisteínas conservadas (Cys 61, 69, 91, 229) responsáveis pela formação das pontes dissulfeto intermoleculares (Figura 5). O *FAM3B* também é conhecido como PANDER (*PAN*creatic *DER*ived Factor), devido à sua alta expressão no tecido pancreático endócrino, verificada inicialmente através de análises de *Norhen blot* (31, 32). Estudos iniciais e muitos trabalhos posteriores dedicaram-se a caracterizar as possíveis funções desta proteína no pâncreas endócrino, uma vez que é expresso nas células beta pancreáticas e que parece estar localizado e ser co-secretado com os grânulos de insulina (31, 33).

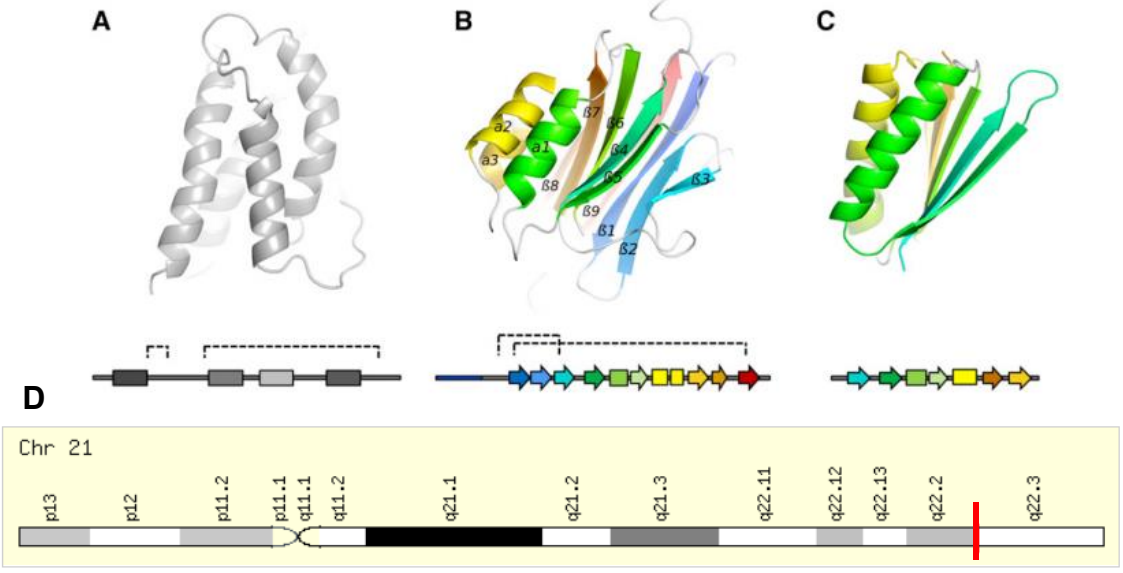


Figura 5. Localização e estrutura do FAM3B. Localização genômica no cromossomo 21 (D). Fonte: (D) Retirado do site Genecards® (2022) (www.genecards.org). (A, B.C) Adaptado: Johansson et al. (2013).

Além disso, foi descrito que o FAM3B pode ser regulado pela glicose e que mediante a estimulação com este carboidrato a secreção e clivagem, assim como a produção da proteína inteira do FAM3B, elevam-se em células de insulinoma e ilhotas primárias (32, 34). A glicose induz a expressão de FAM3B através de diversas vias de sinalização, dentre as quais estão a Ca^{2+} proteína quinase A (PKA), Ca^{2+} proteína quinase C (PKC), ERK1/2 e a proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB). Além destas vias, as fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K) e as vias das espécies reativas de oxigênio (EROS), também estão envolvidas (34, 35). Tem sido extensivamente descrita a atuação do FAM3B na regulação da glicose e muitos trabalhos têm demonstrado suas ações tanto na manutenção da fisiologia das células beta pancreáticas, quanto na indução da expressão gênica na gliconeogênese hepática e na captação de glicose no estado de jejum (36-38).

Vale ressaltar, que estudos iniciais apontavam o FAM3B como possivelmente envolvido na patogênese do diabetes do tipo 1(32, 39). No entanto, ao contrário do que se pensava, dados recentes demonstraram que não há relação entre a secreção de FAM3B com a resistência à insulina e a função da célula beta (40). Atualmente, o FAM3B é considerado um marcador prognóstico de diabetes tipo II e síndrome metabólica, pois altos níveis de FAM3B circulantes foram relacionados com aumento da glicemia e a insulina plasmática no jejum, níveis de Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL), triglicérides e pressão arterial (41, 42).

Deste modo, no âmbito das doenças metabólicas principalmente do Diabetes do tipo 2elucidar as funções do *FAM3B* e identificar o seu receptor parece ser promissor.

1.9. FAM3B na progressão do câncer

Considerando o pleiotropismo das citocinas, existem algumas evidências de que o FAM3B estaria envolvido na progressão tumoral da mama, tais quais: 1) Existência de similaridades entre o FAM3B e outras citocinas relacionadas ao câncer de mama, como a Interleucina- 6 (IL-6); 2) Localização cromossômica do gene FAM3B; 3) Similaridade estrutural ao nível 3D com FAM3C, outro membro da família FAM3, também conhecido como Interleucina indutora de EMT (ILEI), associado à promoção da malignidade (43-45).

Através de mutagênese sítio-dirigida, foram reveladas similaridades entre as regiões funcionais do FAM3B e da IL-6. De acordo com análises realizadas, a região entre a Cys_{91} - Phe_{152} e a segunda ponte dissulfeto, formada entre Cys_{91} - Cys_{229} foram localidades pontuais identificadas como funcionalmente importantes para as ações tóxicas desempenhadas pelo *FAM3B*. Do mesmo modo, a função das quatro cisteínas conservadas no *FAM3B*, necessárias

para execução de sua atividade biológica, também tem a mesma função no caso da IL-6 humana (43).

Por outro lado, análises do cromossomo 21 revelaram que o *FAM3B* está localizado em uma região altamente suscetível a rearranjos cromossomais, ou seja, uma região de alta instabilidade genética, entre os genes *TMPRSS2* e genes da família de fatores de transcrição ETS, como o ERG e ETV1, alterados em amostras de câncer de próstata (38, 46).

A similaridade estrutural entre FAM3B/PANDER e FAM3C/ILEI sugere que ambas citocinas poderiam interagir com uma classe similar de receptores que, no entanto, ainda não foram encontrados (44). Contudo, FAM3C/ILEI já foi amplamente associado à EMT e a metástase em tumores como os de mama, câncer gástrico e carcinoma de células escamosas do esôfago (47-52), o que reforçaria a ideia de que FAM3B também poderia participar da progressão tumoral, o que posteriormente foi confirmado por vários estudos realizados nos últimos 10 anos que evidenciaram a relação da expressão de FAM3B com a progressão de tumores malignos.

Uma das primeiras associações do FAM3B com o câncer foi observada em linhagens celulares de carcinoma de cólon, em que a expressão de FAM3B foi associada à proteção contra morte das células tumorais, uma vez que o aumento do FAM3B foi capaz de inibir a p53, relacionada à ativação da via intrínseca apoptose. Reforçando estes achados, o silenciamento do FAM3B em células HCT8 de carcinoma de cólon foi capaz de aumentar a expressão de receptores de morte - Fas- de membrana (CD95), com clivagem de caspase -8 acompanhada da diminuição dos membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 e aumento de Bax, membro pró-apoptótico (53).

Além disso, a expressão da isoforma do FAM3B, denominada FAM3B-258 em células tumorais de cólon foi capaz de aumentar a migração e as taxas de invasão celular, reforçando os achados previamente mencionados. Os resultados obtidos em células HCT116 com superexpressão de FAM3B-258 demonstraram mudanças na morfologia celular, aumento da motilidade, migração e invasão celular em conjunto com aumento da expressão cdc42, uma pequena GTPase da família Rho relacionada à reorganização da actina do citoesqueleto e modulação das interações da matriz extracelular. Além disso, foi demonstrado que as ações pró-tumorais poderiam estar relacionadas ao Slug, cuja expressão acompanharia o aumento de FAM3B-258. Dados *in vivo* com esta isoforma do FAM3B comprovaram os achados *in vitro*, pois a inoculação intravenosa de FAM3B-258 foi capaz de promover focos de metástases nos pulmões em camundongos nude (54).

Em outros tipos de tumores como os de esôfago e câncer gástrico a expressão de FAM3B também foi relacionada à progressão tumoral. Em concordância com os achados anteriores, o aumento da expressão de FAM3B foi associado a proteção contra morte celular, aumento das taxas de migração e invasão celular em carcinoma de células escamosas de esôfago (ESCC) e assim como foi apontado nos dados de carcinoma colorretal, também, foi sugerido um possível envolvimento da via AKT-MDM2-p53 (55) nas ações desempenhadas pelo FAM3B nestes tumores. No câncer de estômago, a superexpressão de FAM3B foi observada em células tumorais resistentes à cisplatina, que é um quimioterápico utilizado para tratamento de câncer gástrico. Além disso, reforçando todos os dados da literatura, o aumento de FAM3B também foi acompanhado pelo aumento da expressão de Snail (56).

Finalmente, dados do nosso grupo revelaram que o FAM3B confere proteção contra apoptose em células da linhagem tumoral de próstata DU145, bem como aumento da massa tumoral e invasividade em camundongos nude inoculados com células DU145 superexpressando esta proteína. Estes efeitos seriam mediados pelo aumento da expressão de Bcl-2 e Bcl-X_L, genes envolvidos em mecanismos anti-apoptóticos e inativação das caspases -3, -7 e -9. Estes dados sugerem que assim como foi observado em tumores de cólon, é possível que a superexpressão de FAM3B em tumores de próstata iniba a via intrínseca da apoptose, uma vez que diferentes tratamentos das células em cultura com TNF-α resultaram em diferentes respostas (57).

Contudo, também existem evidências da relação inversa entre a expressão de *FAM3B* e o desenvolvimento tumoral. Um estudo realizado por Shiiba et al. (2012) com carcinoma oral de células escamosas, sugeriu que a baixa expressão do *FAM3B*, estaria associada com mau prognóstico em pacientes portadores deste tipo de tipo de tumor contrariando todos os outros dados com modelos de superexpressão e até mesmo, os com modelos de RNA de interferência que indicaram que o silenciamento de *FAM3B*, resultaria em maior número de morte das células tumorais (53, 54, 58).

Em síntese, os estudos publicados sugerem o envolvimento do FAM3B na progressão tumoral, na maioria dos tipos de tumores, através da ativação de mecanismos moleculares que induzem a proteção contra morte celular, o aumento da proliferação celular, o aumento das taxas de migração celular e ativação da EMT (Figura 6).

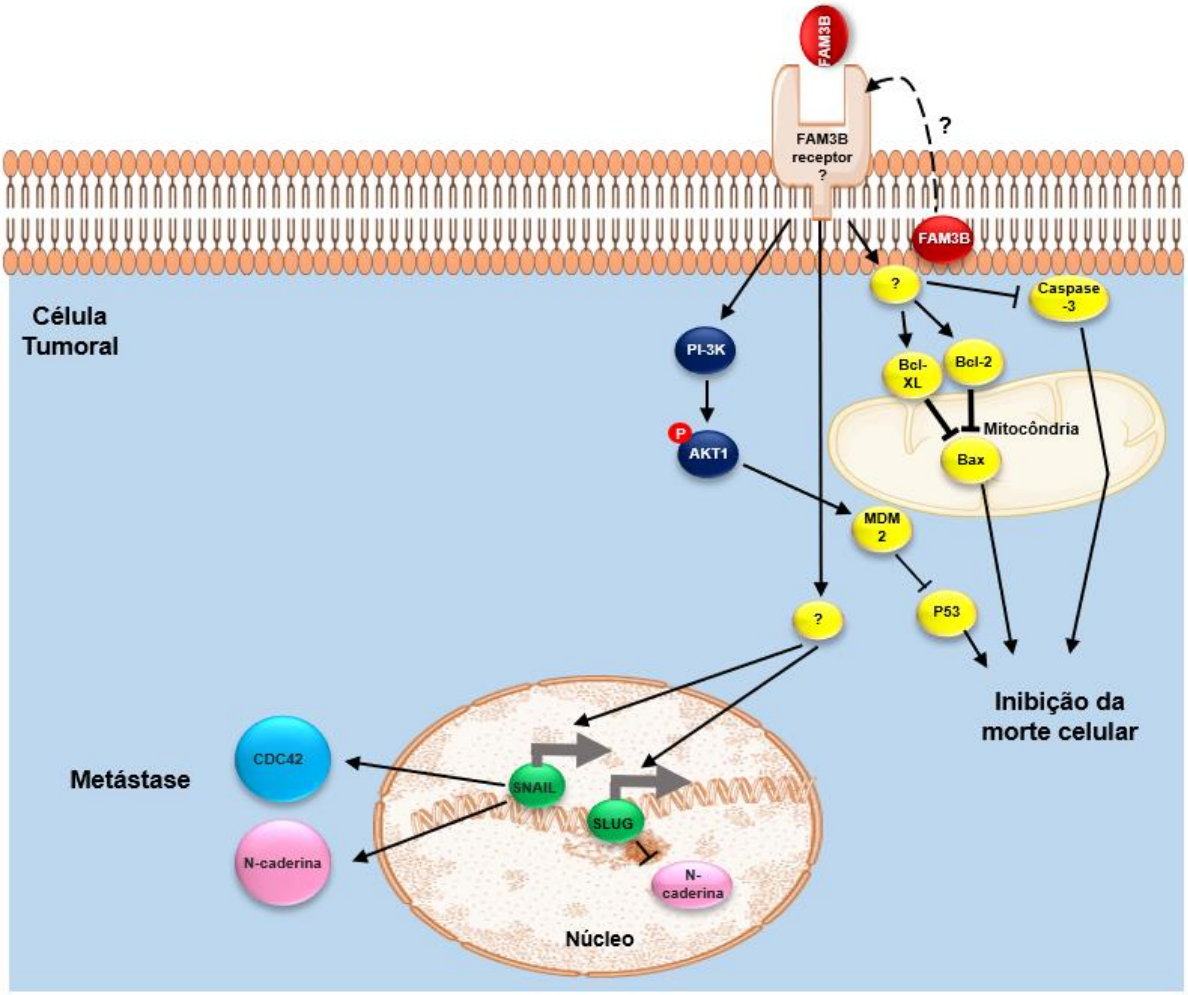


Figura 6. Sinalização Celular do FAM3B na progressão tumoral. A ação do FAM3B, cujo receptor ainda não foi identificado, poderia levar à resistência à apoptose via expressão de membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, acompanhada da diminuição da expressão de Bax e da caspase -3. FAM3B ao induzir a fosforilação de AKT1, também poderia levar à expressão de MDM2, principal inibidor transcricional da p53, inibindo, desta forma, a via intrínseca da apoptose. Foi reportado que a expressão de FAM3B está relacionada ao aumento dos fatores de transcrição Snail e Slug, associados a EMT. Snail e Slug poderiam levar ao aumento na expressão de CDC42 levando ao aumento das taxas de migração celular. Ademais, Snail e Slug reprimem a transcrição de E-caderina, proteína de adesão epitelial, enquanto levam ao aumento na expressão de N-caderina, que é um marcador mesenquimal observado na EMT. Partes da figura foram desenhadas utilizando imagens do *Servier Medical Art. Servier*. *Medical Art by Servier* é licenciado sob uma licença da Creative Commons Attribution 3.0 unported.

1.10. FAM3B no câncer de mama

Nos últimos anos nosso laboratório trabalha na caracterização do papel da FAM3B no câncer de mama. Usando células de adenocarcinoma de mama da linhagem tripo negativa MDA-MB-231, demostramos pela primeira vez os efeitos anti-apoptóticos e as vias ativadas pelo FAM3B nestas células (59).

Verificamos inicialmente, que de maneira similar ao que também já havíamos observado *in vitro* e *in vivo* em tumores de próstata, no câncer de mama o FAM3B parece ser capaz de conferir proteção contra morte celular aumentando a evasão da apoptose, que é uma característica da progressão tumoral. Análises da viabilidade celular e de núcleos subdiploides (núcleos fragmentados), após tratamento com diferentes indutores de morte celular (TNF-α + Cicloheximida, Estaurosporina e Peróxido de Hidrogênio), resultaram em aumento da viabilidade celular e menores taxas de morte na linhagem MDA-MB-231 com superexpressão do FAM3B, em relação às células transfectadas com o vetor vazio (grupo controle) (59).

Através de análises da expressão gênica confirmamos que, assim como foi visto em tumores de próstata pelo nosso grupo e em tumores de cólon por Mou H. et al, o aumento do FAM3B é acompanhado pela ativação de genes da família Bcl-2. Análises ao nível de RNA e proteína demonstraram que a superexpressão do FAM3B em células MDA-231 estava acompanhada do aumento de, aproximadamente, 10 vezes na razão de expressão de Bcl-2 e de 1,5 vezes de Bcl-xL em relação ao gene pró-apoptótico Bax. Este aumento da expressão gênica de Bcl-2 e Bcl-xL, foi confirmado ao nível de proteína. Possivelmente, a ação exógena do FAM3B também esteja envolvida na sua ação anti-apoptótica, visto que a superexpressão do FAM3B foi capaz de reduzir a atividade proteolítica da caspase -3, principal enzima efetora da apoptose (59).

No entanto, a partir dos dados publicados com outros tumores (53, 54, 56, 57) levantamos a hipótese que o FAM3B também poderia ter um papel chave do FAM3B na progressão tumoral do câncer de mama, via a indução de EMT e aumento da formação de metástases. Cogitamos, inclusive, que o aumento da expressão dos membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, além da proteção contra morte celular, poderiam estar relacionados a este processo metastático, inclusive pelo fato de terem sido reportados possíveis efeitos da família Bcl-2 na metástase de tumores sólidos, de maneira independente da redução das taxas de morte celular (59, 60).

Para verificar o possível envolvimento do FAM3B no aumento da migração celular no câncer de mama realizamos o ensaio de fechamento da ferida, que consiste na realização de uma lacuna na monocamada de células em cultura, com carenciamento de soro, associando o

fechamento do espaço aberto entre as células ao aumento de migração celular. Nossos resultados demonstraram, de forma interessante, que as células que superexpressam FAM3B tiveram uma redução significativa da lacuna (“ferida”) realizada, sugerindo aumento da migração celular acompanhada de mudanças morfológicas compatíveis associadas, entre elas a adoção de um formato fusiforme (59).

Adicionalmente, realizamos ensaios de xenotransplante *in vivo* com camundongos fêmeas imunodeficientes da linhagem Balb-c nude inoculadas na glândula mamária com células MDA-231 superexpressando FAM3B, marcadas com luciferase. Imagens obtidas no tomógrafo *IVIS Spectrum* demonstraram que houve um aumento da massa tumoral, um aumento do volume tumoral, e sugeriram invassividade local e migração das células superexpressando FAM3B, com formação de focos metastáticos em alguns órgãos (Figura 7A-D). Análises posteriores dos tumores dos animais corroboraram o aumento do número de vasos sanguíneos aumento da expressão de Bcl-2 e diminuição de Bax nestes tumores (Figura 7E) , reforçando nossa hipótese de que o FAM3B possa aumentar a malignidade dos tumores, promovendo a metástase, pelo menos em parte, devido ao aumento de expressão dos membros antiapoptóticos da família Bcl-2 (59).

Assim, este trabalho se dedicou a estudar o aumento de expressão de genes característicos da metástase e a sua associação com superexpressão da proteína FAM3B em linhagens tumorais, com o intuito de explicar os possíveis mecanismos de indução de metástase mediados pelo FAM3B em câncer de mama (Figura 8).

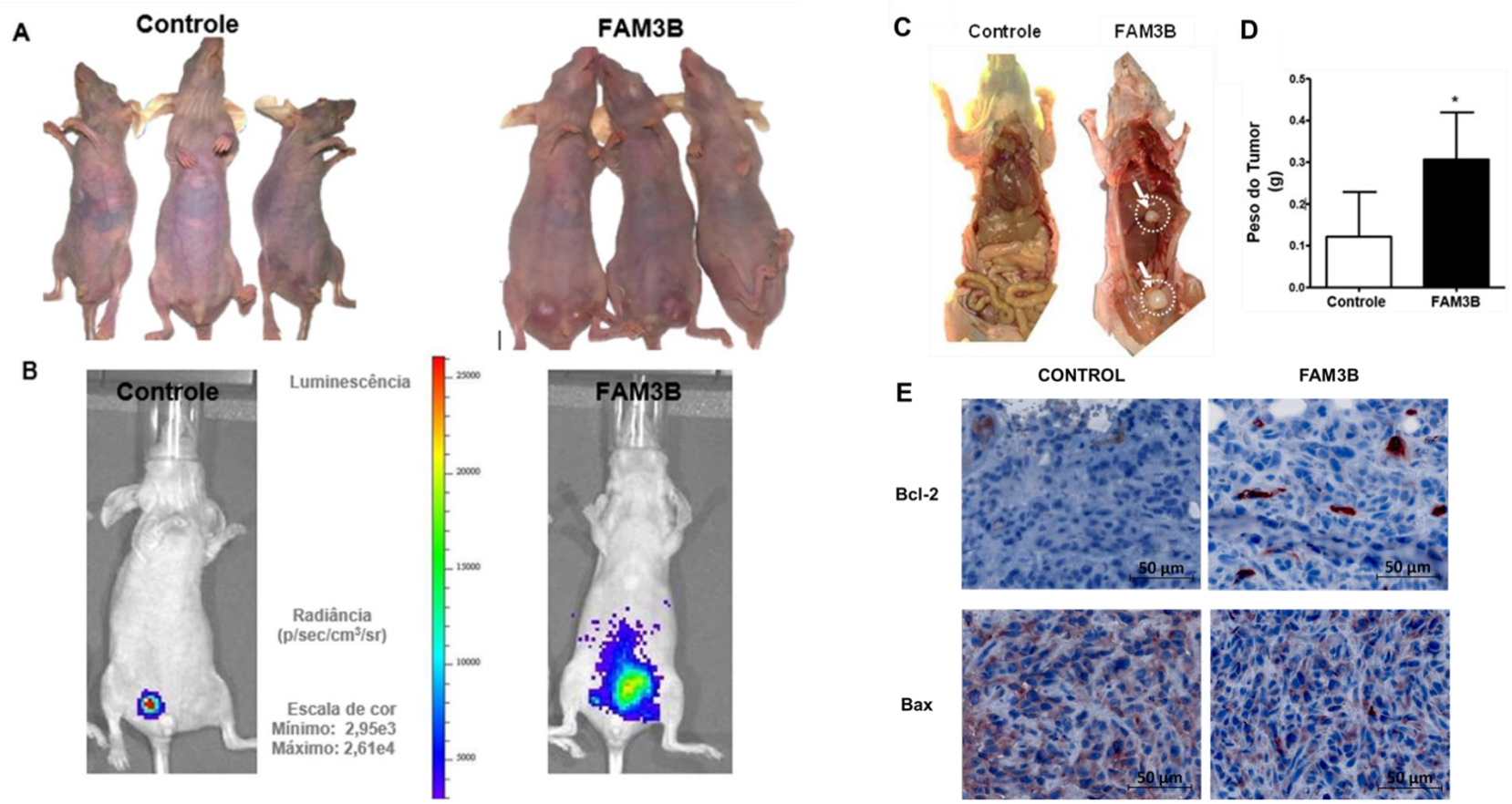


Figura 7. Análise do xenotransplante de células MDA-MB-231-FAM3B em camundongos imunodeficientes. Camundongos fêmeas da linhagem Balb/c nude, com 6-8 semanas de idade, foram inoculadas FAM3B na glândula mamária com 1 x 10^6 células MDA-MB-231-FAM3B (n=3). (A) Tumores visíveis após 30 dias. (B) Possível aumento da migração celular no grupo FAM3B observado pela migração de células marcadas com luciferase (C). Animal do grupo FAM3B, com possíveis focos de metástase, nas proximidades dos ovários e do fígado (D). Após a eutanásia foi verificado aumento do peso tumoral nos animais contendo células MDA-MB-231-FAM3B, em relação ao grupo controle (E) Imagens representativas de cortes histológicos dos tumores de ambos os grupos marcados com anticorpos anti-Bcl-2 e anti-Bax. (Modificado de Caldeira, I, 2017).

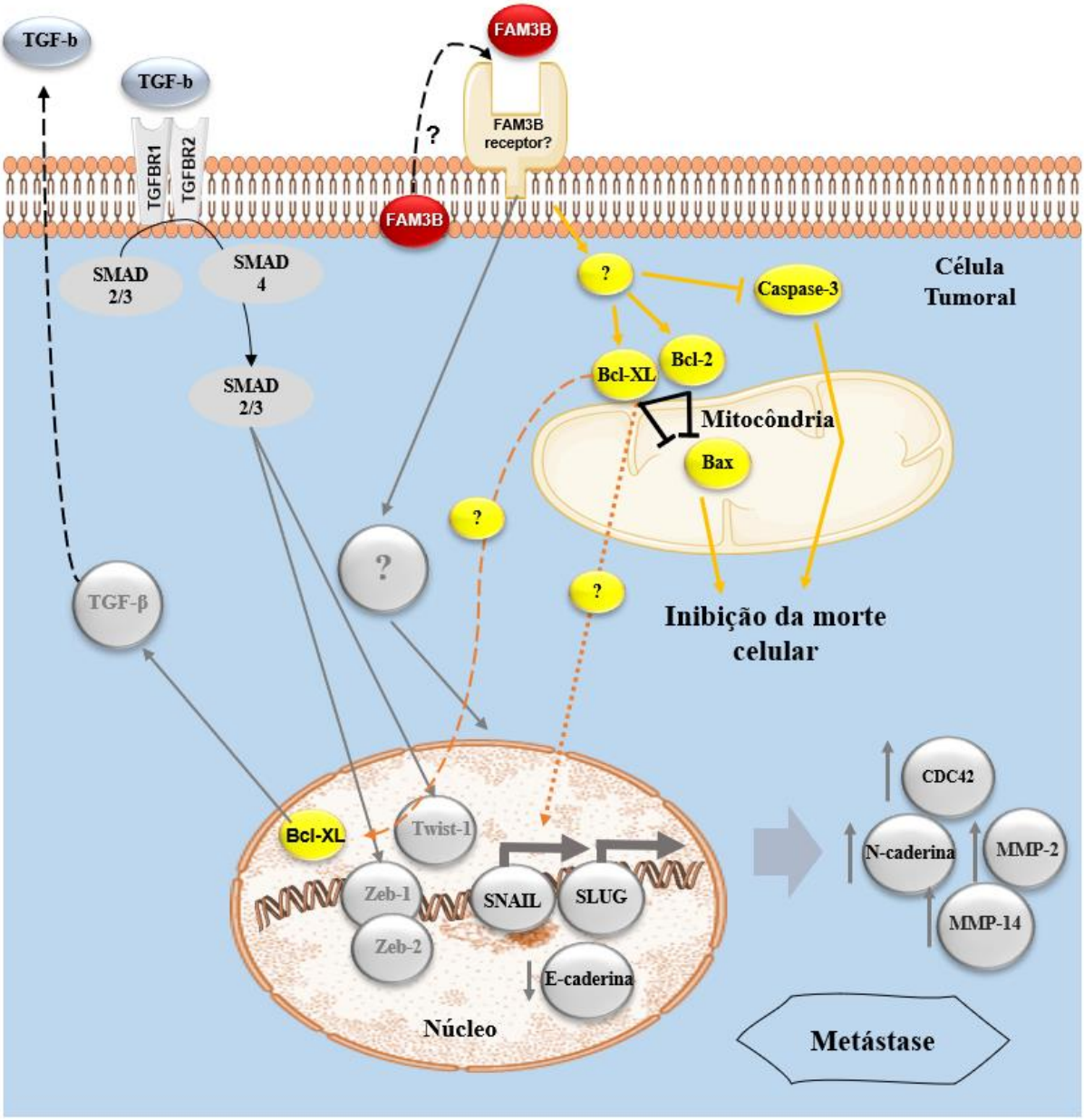


Figura 8. Possíveis vias ativadas pelo FAM3B no câncer de mama. Foi demonstrado previamente que o aumento da expressão de FAM3B em células tumorais da mama foi capaz conferir proteção contra morte celular induzida, em conjunto com o aumento dos níveis das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL, acompanhado da redução da expressão de Bax e inibição de caspase -3. Foi sugerido, que além das ações anti-apoptóticas observadas, que moléculas ativadas pelo FAM3B façam também conexões com vias de sinalização da metástase, uma vez que parece ser possível que Bcl-2 e Bcl-xL possam participar da sinalização do TGF-β e de membros da família Snail. Em continuidade com o que foi proposto, neste trabalho, buscou-se explorar possíveis vias ativadas pelo FAM3B na metástase. É possível que a ação autócrina e/ou parácrina de FAM3B promova a ativação da via do TGF-β, assim como a ativação de fatores de transcrição como Twis-1, Zeb 1/2, Snail, Slug envolvidos na redução da expressão de marcadores epiteliais como E-caderina e aumento da expressão de N-caderina acompanhado pelo aumento da expressão das metaloproteinases envolvidas na degradação de matriz extracelular, sabidamente envolvidas na progressão metastática do câncer de mama (Modificado de Caldeira, I, 2017). **Partes da figura foram desenhadas utilizando imagens do *Servier Medical Art. Servier. Medical Art by Servier* é licenciado sob uma licença da Creative Commons Attribution 3.0 unported.**

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o papel da proteína FAM3B nos processos de invasão e migração no câncer de mama, através de análises *in sílico* usando ferramentas de bioinformática e ensaios *in vitro* mediante a superexpressão do gene nas linhagens tumorais de mama MDA-MB-231 e MCF-7.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar os perfis de expressão do FAM3B nas amostras de pacientes com câncer de mama, disponíveis nas bases de dados públicas usando ferramentas de bioinformática;
- Avaliar o potencial invasivo da superexpressão do FAM3B, nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, através da quantificação da taxa de migração celular *in vitro*;
- Explorar as vias metabólicas possivelmente ativadas pelo FAM3B no aumento da migração celular em células MDA-MB-231 e MCF-7, através da avaliação da expressão de genes envolvidos na metástase ao nível de mRNA e proteína.

3. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama apresenta uma ampla variabilidade clínica, caracterizada por diferentes subtipos tumorais. Atualmente, novos estudos têm sidos direcionados para identificação molecular destes subtipos tumorais em busca de métodos de diagnóstico, prognóstico e tratamento cada vez mais personalizados (23).

A identificação de novos marcadores tumorais é importante para o desenho e planejamento de novas abordagens para o tratamento da doença, isolados ou em combinação com estratégias terapêuticas usadas como a cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Além disso, novos biomarcadores são necessários para diagnósticos precoces, uma vez que dada a heterogeneidade da doença os marcadores disponíveis, nem sempre são suficientemente sensíveis e nem todos contemplam os diferentes subtipos tumorais encontrados (24, 61).

Considerando a importância da descoberta de novos alvos terapêuticos derivados de proteínas secretadas de baixo peso molecular, a consecução dos objetivos propostos neste trabalho irá auxiliar na possível caracterização do FAM3B como um novo biomarcador de progressão tumoral que possa auxiliar no diagnóstico e terapêutica do câncer de mama.

4. MÉTODOS

4.1. Análise Bioinformática

4.1.1. Coleta de dados

Os dados de expressão foram extraídos do Atlas do Genoma do Câncer (TCGA), um programa de genômica do câncer organizado conjuntamente entre o Instituto Nacional do Câncer (NCI) e o Instituto de Pesquisa do Genoma Humano (NHGRI). Esta iniciativa gerou, entre 2006 e 2018, mais de 2,5 petabytes de dados disponíveis publicamente (https://www.cancer.gov/tcga), que representam características de mais de 20.000 amostras de tumores primários e amostras normais, provenientes de 33 tipos de câncer, entre eles o carcinoma invasivo de mama (BRCA) que foi objeto do nosso estudo.

Utilizamos o *FirebrowseR* (62) uma ferramenta computacional escrita em linguagem R para acessar os dados do TCGA previamente armazenados pelo *Broad Institute* (https://gdac.broadinstitute.org/). Com esta ferramenta selecionamos os valores resultantes de experimentos de sequenciamento de RNA para a análise dos níveis de expressão gênica de 57 genes referentes ao câncer de mama: ATM, BACH1, BAX, BCL2, BIRC2, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDC42, CDH1, CHEK2, DNAJA4, DST, ERBB2, ERG, ESR1, ETS1, ETS2, ETV1, FAM3A, FAM3B, FAM3C, FAM3D, FOXP4, HIF1A, IL6, JAM2, KRAS, MCL1, MDM2, MKI67, MMP2, MMP9, MX1, MX2, MYC, PALB2, PEBP1, PGR, RAD51, RB1, RPGR, SAMD9, SNAI1, SNAI2, SYNE1, TGFB1, TMPRSS2, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TP53, TWIST1, VEGFA, VIM, XIAP, ZEB1, ZEB2.

A catalogação do TCGA nos permitiu agrupar os dados especificando o indivíduo participante da amostragem, o estágio patológico do tumor (de 1 a 4) e os subtipos definidos pelo perfil imuno-histoquímico do Receptor de Estrogênio (ER), Receptor de Progesterona (PR) e Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2 (HER2) conforme descrito anteriormente (63): Luminal A: ER+/HER2− Baixa Proliferação (Ki67 < 10%), Luminal B: ER+/HER2− Alta Proliferação (Ki67 ≥ 10%) ou ER +/HER2 + , classe HER2-positiva: HER2 + independentemente do status de ER, Câncer de Mama Triplo Negativo (TNBC): exibindo expressão negativa de ER, PR e HER2.

As análises de variação nos níveis de expressão gênica foram realizadas em duas abordagens diferentes: 1) considerando a variação dos níveis de expressão por participante, em amostras pareadas acessadas diretamente pelo TGCA; ou 2) considerando as comparações entre as amostras normais e tumores, sem pareamento das amostras.

4.1.2. Análise dos dados de expressão gênica

Na análise de amostras pareadas, para cada gene escolhido, foram selecionados apenas os dados de expressão gênica que continham pares de valores para tecido normal e tumoral de um mesmo participante. Considerando a razão entre os valores de expressão de um gene *a* em um tecido específico de um tumor n_i e seu respectivo tecido normal *n*i*, para o participante *i*, podemos escrever a razão em escala logarítmica na base 2, como:

$$a_i = \log2(n_i \ / n*i)$$

onde chamamos a_i de *fold change* ocorrido na expressão do gene *a* para o participante *i*. A coleção de a_i de todos os participantes disponíveis formam o conjunto amostral de valores de expressão para o gene *a*. Todas as analises foram feitas localmente, usando a ferramenta *FirebrowseR*.

Para a análise de expressão gênica nas amostras não pareadas usamos os resultados disponíveis no portal *The University of Alabama at Birmingham Cancer data analysis Portal* - UALCAN (http://ualcan.path.uab.edu/), uma plataforma online que também acessa aos dados do TCGA (64).

4.1.3. Análise de correlação da expressão gênica e elaboração de mapas de calor (*Heathmap*)

Foi calculada a correlação em escala logarítmica (log2) entre os *folds changes* normal vs. tumor na expressão gênica para um grupo de 57 genes usando o teste de Pearson. Estas correlações foram representadas usando um mapa de calor (*Heathmap*). Cada posição no mapa indica a correlação entre os *folds changes* dos genes indicado na linha e na coluna da respectiva posição em questão. Os valores de correlação positiva (*r* de 0 a 1) indicam que os *fold changes* dos genes envolvidos tem padrões de expressão similares. A máxima correlação positiva (do gene com si próprio) é representada pela cor vermelha. Já os valores de correlação negativa (r de 0 a -1) estão indicados pela coloração azul e indicam que os *fold changes* dos genes envolvidos não tem padrões de expressão similares. Para inferir uma possível relação de co-expressão entre os genes estudados, foram elaborados dendrogramas calculados pela medida de distância Euclidiana e função de ligação média parametrizado para 5 agrupamentos (*clusteres*). Os dados dos TCGA foram analisados pelo pacote computacional *FirebrowseR* e as correlações e mapas de calor com dendrogramas foram gerados respectivamente pelos pacotes *corrplot* e *heatmaply*, respectivamente, todos escritos para a linguagem R (65).

4.2. Linhagens celulares

Foram utilizadas, para todos os experimentos, as seguintes linhagens celulares:

*Células MDA-MB-231***:** Células derivadas de adenocarcinoma de mama e obtidas de sítios metastáticos de efusão pleural, da glândula mamária de uma mulher caucasiana de 51 anos. Segundo Brinkley et al. (1980), essas células foram removidas de um foco de metástase nos pulmões em dezessete de outubro de 1973. A paciente já havia sido submetida a uma mastectomia no quadrante tumoral, em 1969. Além disso, também foi realizada ooforectomia, tratamento com Adriamicina, Ciclofosfamida e Metotrexato, cinco dias antes das células serem obtidas para a cultura (66).

Com morfologia epitelial e aspecto fusiforme as células MDA-MB-231 são aderentes e expressam o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator transformante do crescimento-α (TGF-α) e o oncogene *WNT7B*. No entanto, não apresentam expressão de receptores hormonais, como estrógeno e progesterona e não apresentam amplificação do gene *ER2*, sendo designadas, portanto, como triplo-negativas. São capazes de formar adenocarcinoma grau III em camundongons Balb/c *nude*.

*Células MCF-7***:** Células da glândula mamária, derivadas de um adenocarcinoma de mama e obtidas de um sítio metastático de efusão pleural, de uma mulher caucasiana de 69 anos de idade. Cerca de 7 anos antes do estabelecimento da cultura primária das células, que deram origem à linhagem, a paciente já havia passado por uma mastectomia da mama direita e, posteriormente, por uma mastectomia radical da mama esquerda 4 anos depois (67). A reincidência do câncer, segundo dados da literatura, foi controlada por 3 anos com terapia hormonal e radioterapia. Antes do tamoxifeno, a paciente recebeu tratamento com altas doses do estrogênio sintético dietilestilbestrol e, assim, o tumor foi considerado controlado três vezes mais do que o esperado, provando que o câncer, neste caso, era hormônio-responsivo. Cerca de dois meses depois, ocorreu reincidência com o surgimento de focos de metástases nodulares e, em junho de 1970, as amostras foram coletadas de um sítio de efusão pleural para serem cultivadas e estudadas em laboratório. Atualmente, sabe-se que a linhagem celular MCF-7 é responsiva à estrógeno e progesterona e que também responde aos fatores de crescimento associados à membrana plasmática. As células apresentam morfologia poligonal, são aderentes e têm capacidade de formar colônias de células justapostas. Estas células expressam o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que é ativado pelo fator de crescimento epidérmico (EGF) e o receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2 (HER2) (67). Além disso, as células MCF-7 são positivas para alguns marcadores epiteliais como E-caderina, β-catenina e

citoqueratina 18 (CK18), o que confere algumas de suas características diferenciadas do epitélio mamário.

Foram utilizadas, apenas para avaliação da expressão de FAM3B, as seguintes linhagens celulares:

Células ZR-75-1: Célula epitelial, proveniente da glândula mamária de uma mulher de 63 anos com carcinoma ductal. Esta linhagem é classificada como subtipo molecular luminal B sendo responsiva à estrógeno, progesterona e positiva para HER2(68).

Células MDA-MB-435: Previamente descrita como sendo uma linhagem celular de carcinoma ductal, atualmente, sabe-se que a linhagem MDA-MB-435 é uma linhagem de melanoma(69).

Células Hs578T: Célula epitelial, isolada da glândula mamária de uma mulher de 74 anos de idade com carcinoma de mama. Esta é considerada uma linhagem triplo negativa, ou seja, que não apresenta amplificação de HER2 e negativa para receptores de estrógeno e progesterona(68).

4.3. Cultivo de células

As células foram mantidas em cultura usando meio de cultura DMEM (Gibco, New York, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, New York, USA) com adição de 1% do antibiótico penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), na temperatura de 37 ºC com pressão de CO_2 (4,9%) controladas. Ao atingirem a confluência de, aproximadamente, 70-80% as células foram utilizadas para os experimentos ou congeladas. O congelamento das células foi feito com meio de cultura completo suplementado com 10% do crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) em criotubos (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Os criotubos foram inseridos em container de congelamento *Mr. Frosty*^{TM} (ThermoFisher, Massachussetts, USA) a -80ºC por 1 dia para, após este período, serem transferidos para o tanque de nitrogênio líquido.

4.4. Superexpressão do FAM3B

O cDNA completo que codifica o gene *FAM3B* humano (710 bp) foi amplificado por RT-PCR a partir de RNA de Ilhotas de Langerhans, como descrito anteriormente (57). Este cDNA do *FAM3B* foi clonado no vetor comercial pcDNA 3.1 (Invitrogen- Life Technologies, California, USA) usando T4 DNA ligase nos sítios de restrição *EcoR1* e *BamH1*. Para realizar

os ensaios de superexpressão, 2 x 10^5 células MDA-MB-231 e MCF-7 foram plaqueadas em placas de 3 cm de diâmetro (P6), contendo meio de cultura DMEM completo e deixadas em crescimento até atingir uma confluência de 90%. Posteriormente, o meio completo foi removido e a mistura contendo os plasmídeos pcDNA e pcDNA-*FAM3B* (em concentrações de 2500 ng) em meio Opti-MEM, com 5uL de P3000 *Reagent* e 3,75 uL de Lipofectamina 3000® (Invitrogen- Life Technologies, California, USA). A seleção clonal foi feita usando o antibiótico *Geneticin® (*G418). Durante 15 dias as células MDA-MB-231 foram tratadas com meio DMEM com 10% de soro fetal bovino contendo 700 ug de G418 e as células MCF-7 com 450 ug de G418 e, desta forma, foram obtidas as células MDA-MB-231 e MCF-7 que superexpressam o FAM3B. Células transfectadas com o vetor vazio denominadas MDA-MB-231-controle e MCF-7- controle foram usadas como controle nos ensaios.

4.5. Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR)

Para realização da análise de expressão gênica foram coletadas aproximadamente 1 x 10^6 células. A extração de RNA total foi realizada pelo método do Trizol® (Invitrogen- Life Technologies, California, USA) seguindo as especificações e protocolos do fabricante. A síntese do cDNA foi feita pelo método da transcriptase reversa SuperScript ® (Invitrogen- Life Technologies, California, USA) a partir de 2 µg de RNA total e oligo dT, seguindo os protocolos descritos pelo fabricante. A expressão gênica foi quantificada por qPCR usando o sistema *Sybr®Green,* com *primers* específicos desenhados pelo programa *Primer* 3 descritos na Tabela 1. O equipamento utilizado para analisar as amostras foi o *Ilumina Eco® Real-Time PCR*. Os experimentos de qPCR foram programados da seguinte maneira: 1 ciclo de desnaturação inicial de 10 min. A 95 ºC, e 40 ciclos de amplificação (30 segundos de desnaturação a 95 ºC e 1 min. De anelamento e extensão a 60 ºC). A normalização foi realizada considerando a expressão do gene constitutivo *HPRT*. Os resultados foram interpretados usando o modelo de eficiência calibrada proposto por Pfaff (70). As variações de expressão foram calculadas em função da expressão observada nas células transfectadas com o vetor pcDNA vazio.

4.6. Análise da expressão gênica por Western blot

As proteínas totais das células foram extraídas por lise com detergentes não-desnaturantes (10 mM HEPES, pH 7.4, 0,1% CHAPS, 10% glicerol, 5 mM DTT, 2 mM EDTA e coquetel de inibidores de proteases) e coletadas por centrifugação a 12000 rpm durante 30

min. A quantificação foi feita pelo método de *Bradford*® (Bio- Rad, CA, USA). As amostras foram colocadas em tampão de amostra (500 mM pH 6.8Tris-HCl, 10% Glicerol, 10% SDS, B-mercaptoetanol e 0,05% de azul de bromofenol) a uma concentração final de 50 µg de proteína total e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS a 12% de concentração (Acrilamida 30%, 1M pH 8.8 Tris-HCl, SDS 10%, APS 10% e TEMED 1%), com 100 V de tensão elétrica e durante 2 h. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueadas com leite e incubadas com os anticorpos primários (diluição 1:1.000) para a proteína *FAM3B*, e as demais proteínas (MMP-2, MMP-9, Slug e E-caderina). Após lavagens com tampão de lavagem (TBST) foi feita a incubação com os anticorpos secundários Anti-IgG de camundongo e anti-IgG de coelho por 1h. A revelação foi feita usando a enzima estreptavidina-peroxidase pelo método ECL® (*GE Healthcare*, *USA*). A normalização foi realizada, em todos os casos, considerando a expressão das proteínas β-actina. A intensidade das bandas do ensaio de Western blot, foi realizada por meio análise de pixels no software ImageJ, disponível em: https://imagej.nih.gov/ij/.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação da expressão gênica através de ensaios de PCR quantitativo – qPCR

Genes		**Sequência 5'- 3'**
E-CADERINA	*Forward*	TTAAACTCCTGGCCTCAAGCAATC
	Reverse	TCCTATCTT GGGCAAAGCAACTG
N-CADERINA	*Forward*	GGTGGAGGAGAAGAAGACCAG
	Reverse	GGCATCAGGCTCCACAGT
TGF-β1	*Forward*	GGCCCTGCCCCTACATTT
	Reverse	TGTACAACCAGCATAACCCGG
TGF-β2	*Forward*	TCAAGAGGGATCTAGGGTGGAA
	Reverse	GGCATGCTCCAGCACAGAA
TGF-BR1	*Forward*	GATGGGCTCTGCTTTGTCTC
	Reverse	CAAGGCCAGGTGATGACTTT
TGF-BR2	*Forward*	AATATCCTCGTGAAGAACGACCTAA
	Reverse	TCCCACCTGCCCACTGTTA
SLUG	*Forward*	ATGCATAT TCG GACC CACACATTA
	Reverse	AGATTTGACCTGTCTGC AAATGCTC
SNAIL	*Forward*	GCTGCAGGACTCTAATCCAGA
	Reverse	ATCTCCGGAGGTGGGATG
TWIST1	*Forward*	TGCATGCATTCTCAAGAGGT
	Reverse	AGGCCAGTTTGATCCCAGTA
ZEB -1	*Forward*	GGAGGATGACACAGGAAAGG
	Reverse	GGTGCCTCAGGAAAAATGAC
ZEB-2	*Forward*	AAGGAGCAGGTAATCGCAAG

	Reverse	GAACCAGAATGGGAGAAACG
VIMENTINA	*Forward*	GAGAGAGGAAGCCGAAAACA
	Reverse	ACATCGATTTGGACATGCTG
MMP-9	*Forward*	GAGGTTGACGTGAAGGCGCAGTG
	Reverse	ATAGCAGCTGCCTCAGTACT
MMP-2	*Forward*	AGCTTTGACGATGACCGCAAATGG
	Reverse	GCCAATGGCTTGTCTGTTGGTTCT
MMP-14	*Forward*	GCAGAAGTTTTACGGCTTGCA
	Reverse	TCGAACATTGGCCTTGATCTC
TIMP-2	*Forward*	CGACATTTATGGCAACCCTATCA
	Reverse	GGGCCGTGTAGATAAACTCTATATCC
HPRT	*Forward*	GAAGGTCTTGCTCGAGATGTG
	Reverse	TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT
FAM3B	*Forward*	CCAAAATCCCTGCTCTTCATG
	Reverse	GCATTCTTGGCATCGTTATTCA

Tabela 2. Anticorpos utilizados para análise da expressão gênica por Western blot.

Antígeno	**Tipo de anticorpo**	**Procedência**	**Utilidade**
MMP-9	Policlonal rabbit IgG	Cell Signalling	WB
MMP-2	Policlonal rabbit IgG	Cell Signalling	WB
Bcl-X_L	Policlonal rabbit IgG	Cell Signalling	WB
Bcl-2	Policlonal rabbit IgG	Cell Signalling	WB
Slug	Rabbit mAb	Cell Signalling	WB
Snail	Rabbit mAb	Cell Signalling	WB
E-caderina	Mouse mAb	Cell Signalling	WB
FAM3B	N-term	Cell Signalling	WB, IHQ
Rabbit IgG	Bovine anti-rabbit IgG HRP	Santa Cruz	WB
Mouse IgG	Bovine anti-mouse IgG HRP	Santa Cruz	WB
β -actina	Mouse mAb	Cell Signalling	WB

4.7. Ensaio de migração celular: cicatrização de feridas (*Wound healing assay*)

O ensaio de cicatrização de feridas é um método simples, que de certa forma mimetiza o processo de migração celular observado *in vivo.* Este ensaio baseia-se na realização de uma lacuna ou risca em uma monocamada de células confluentes, que resulta na migração das células ao redor da lacuna, a fim de fechar a abertura realizada para o reestabelecimento de novos contatos célula-célula. As etapas deste método compreendem imagens capturadas no

início do experimento (realização da lacuna na monocamada celular) e em intervalos entre a migração das células, até o fechamento da abertura. A comparação das imagens permite inferir a taxa de migração celular (71).

Neste ensaio, as células subconfluentes em crescimento foram ressuspendidas, lavadas duas vezes com Tampão Fosfato Salino 1X (*Phosphate-Buffered Saline* – PBS) e coletadas por tripsinização. Após serem coletadas, 5 x 10^5 células da linhagem MDA-MB-231-FAM3B e 1 x 10^6 das células MCF-7 e seus respectivos controles, foram plaqueadas em placas de 6 poços, já contendo meio de cultura completo (DMEM, 10% SFB e antibiótico), onde foram incubadas a 37 ^oC, para adesão celular. Após obtenção de uma monocamada confluente destas células, foi realizada uma lacuna nas respectivas placas, usando uma pipeta do tipo p200. Posteriormente à realização da abertura entre as células, as placas foram lavadas para remoção do debri celular resultante e, após esta etapa, foi instituído o carenciamento de soro. Foram capturadas imagens nos tempos: 0, 6h, 12h, 24, 48 e 72h. Estas imagens foram capturadas no microscópio Zeiss Axio e analisadas quantitativamente, através do *software Tscratch* (72), disponível em: http://cse-lab.ethz.ch/software/.

4.8. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística realizada com o auxílio do programa computacional *GraphPad Prism* versão 4.0 (*GraphPad Software, Inc.CA, USA*). Para dados com distribuição paramétrica os valores dos grupos foram expressos como média ± desvio padrão e a significância estatística da diferença entre as medias foi inferida pelo teste *t* de *student*. Para dados não paramétricos os valores dos grupos foram expressos como mediana e valores máximos e mínimos. Em ensaios de comparação múltipla foi usado o teste *two-way* ANOVA ajustado pelo post-teste de Bonferroni. A significância estatística das diferenças entre os grupos foi inferida pelo teste Mann-Whitney. Nas análises de correlação com dados paramétricos foi usado o teste de Pearson e com dados não paramétricos o teste de correlação de Spearman. Em todas as analises os resultados obtidos foram considerados estatisticamente significativos aqueles com valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Análise *in sílico* de expressão gênica do FAM3B nas bases de dados públicas

Em primeiro lugar, os dados de expressão gênica disponíveis no TGCA foram analisados de duas formas: A) amostras não pareadas (n= 1211; tecido normal = 114, tecido

tumoral = 1097) acessadas de forma remora pelo portal UALCAN; e B) amostras pareadas (n=111) analisadas localmente usando o *FirebrowseR*. Ambos os grupos foram divididos por dois critérios: a) Estágio do câncer; e b) Subtipo do câncer. Posteriormente os dados de expressão de FAM3B nas amostras pareadas foram correlacionados e os mapas de calor (*Hethmap*) elaborados considerando a lista de 57 genes associados a câncer de mama usando o teste de correlação de Pearson. A lista completa de correlação de todos os genes é mostrada nos anexos II e III.

Nas amostras não pareadas podemos observar que não existe uma diminuição significativa da expressão global de FAM3B nos tumores de mama, quando comparadas as amostras de tecido normal (Figura 9A). Por outro lado, observamos uma diminuição significativa ($p<0,05$) da expressão de FAM3B entre o subtipo triplo negativo (TNBC) de câncer de mama (Figura 9B) e os estágios 1 e 4 da doença (Figura 9C), quando comparados as amostras controle. No entanto, nas amostras pareadas, não é possível observar nenhuma variação significativa da expressão de FAM3B, tanto nos estágios (Figura 10A) como nos subtipos de câncer de mama (Figura 10B).

As análises de correlação da expressão gênica de FAM3B com outros genes foi feita apenas para os dados pareados, onde a amostra controle é correspondente a amostra tumoral no mesmo participante. Para estabelecer relações relevantes entre a expressão dos genes usamos os limiares de $r >0.20$ ou $r > -0,20$ e $p<0.05$ calculados pelo teste de Pearson.

Considerando a progressão da doença, no estágio 1 poucos genes se correlacionam com FAM3B, destacando a correlação positiva com o gene RPGR e negativa com o DNAJA4 (Figura 11), este último uma proteína de choque térmico, que atua como um promotor de metástase em melanoma e como supressor de tumor em câncer de estômago (73).

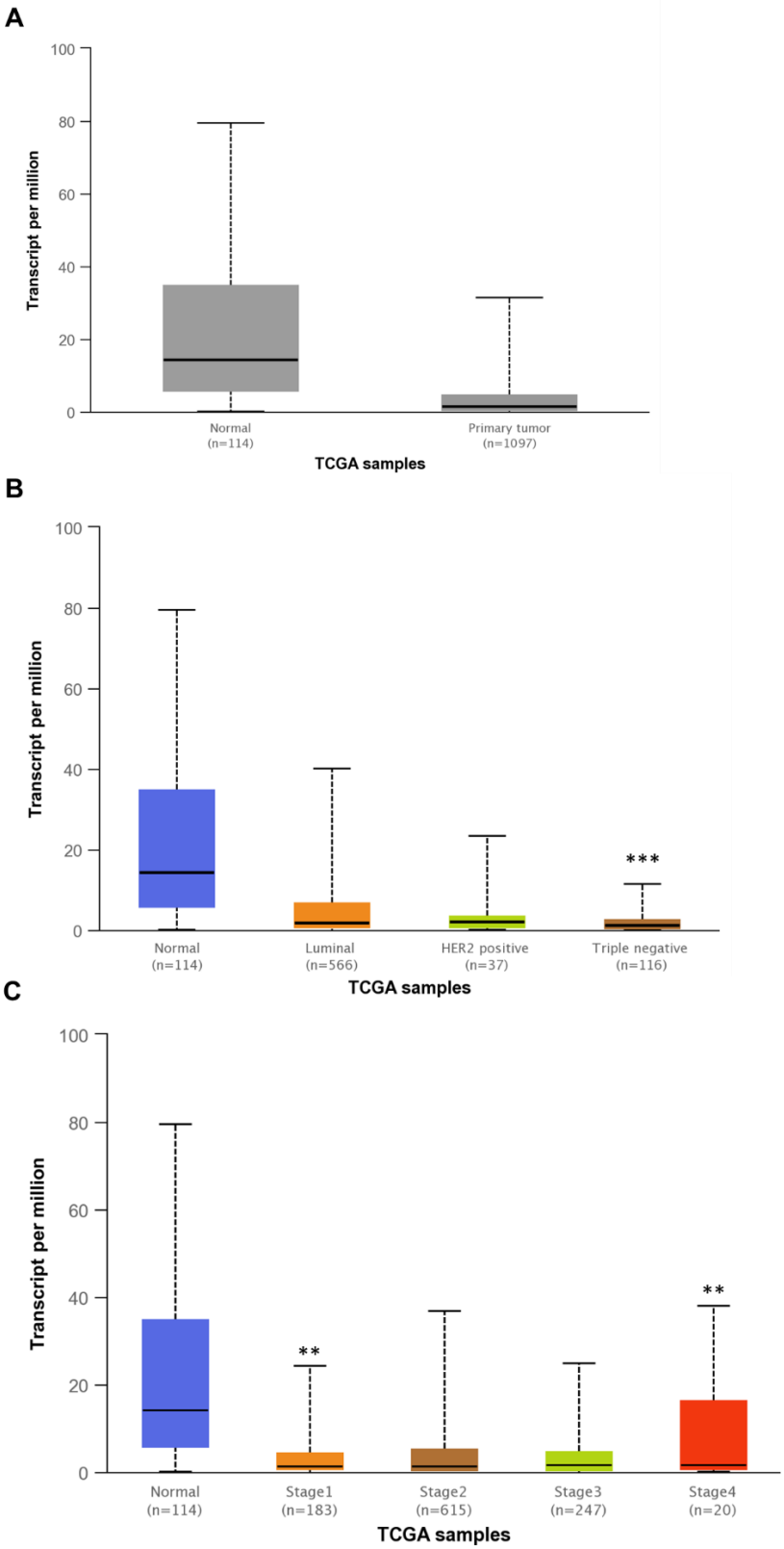


Figura 9. Análise da expressão gênica em amostras não pareadas do TGCA. Amostras não pareadas de câncer de mama (BRCA) depositadas no TGCA (n= 1211; tecido normal = 114, tecido tumoral = 1097) foram analisadas de forma remota pelo portal UALCAN, calculadas em transcritos por milhão e representadas por A) tipo de amostra, B) Subtipo de câncer de mama e C) Estágio do câncer de mama. *** p <0,0001, ** p < 0,001 vs. normal.

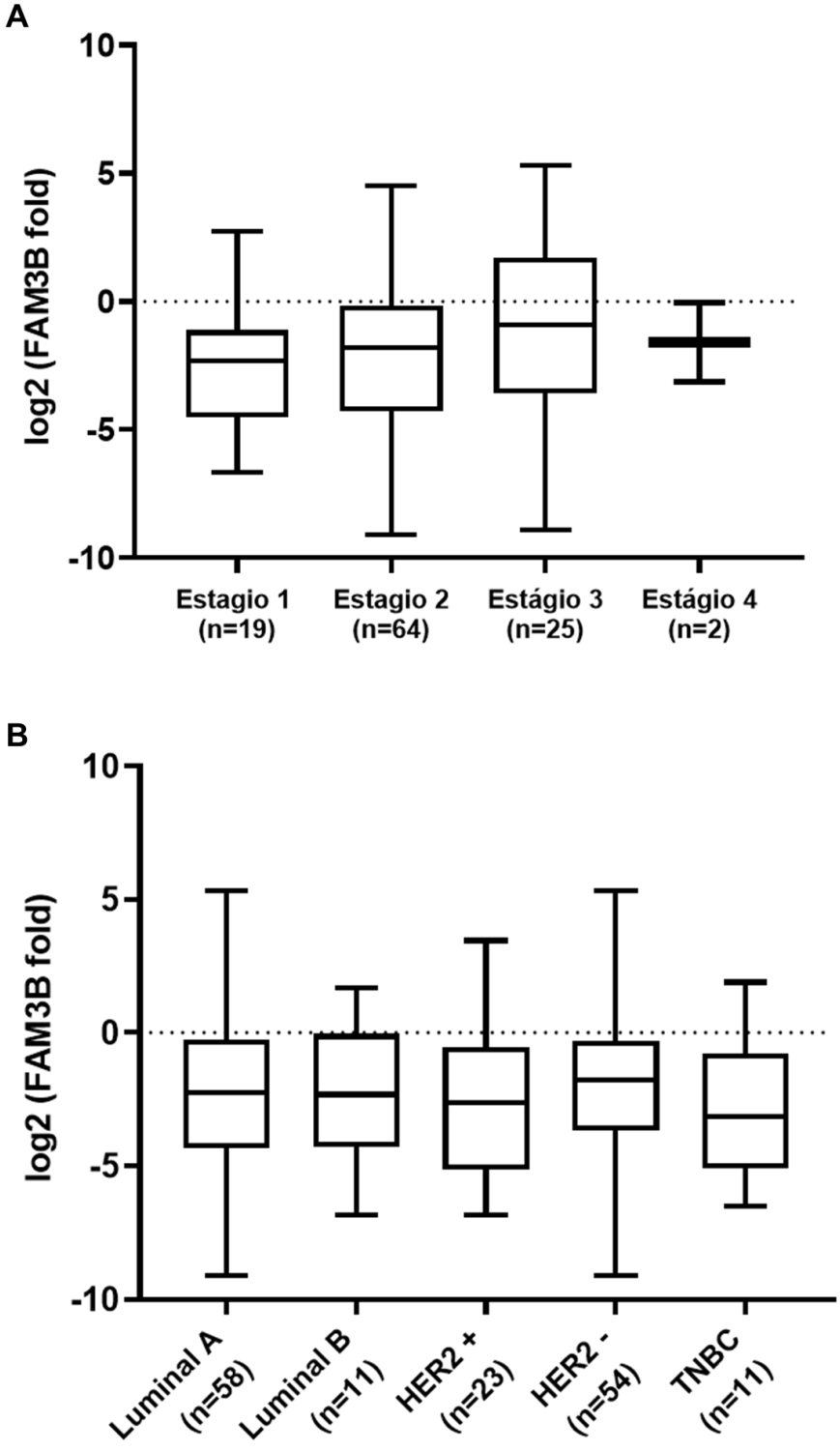
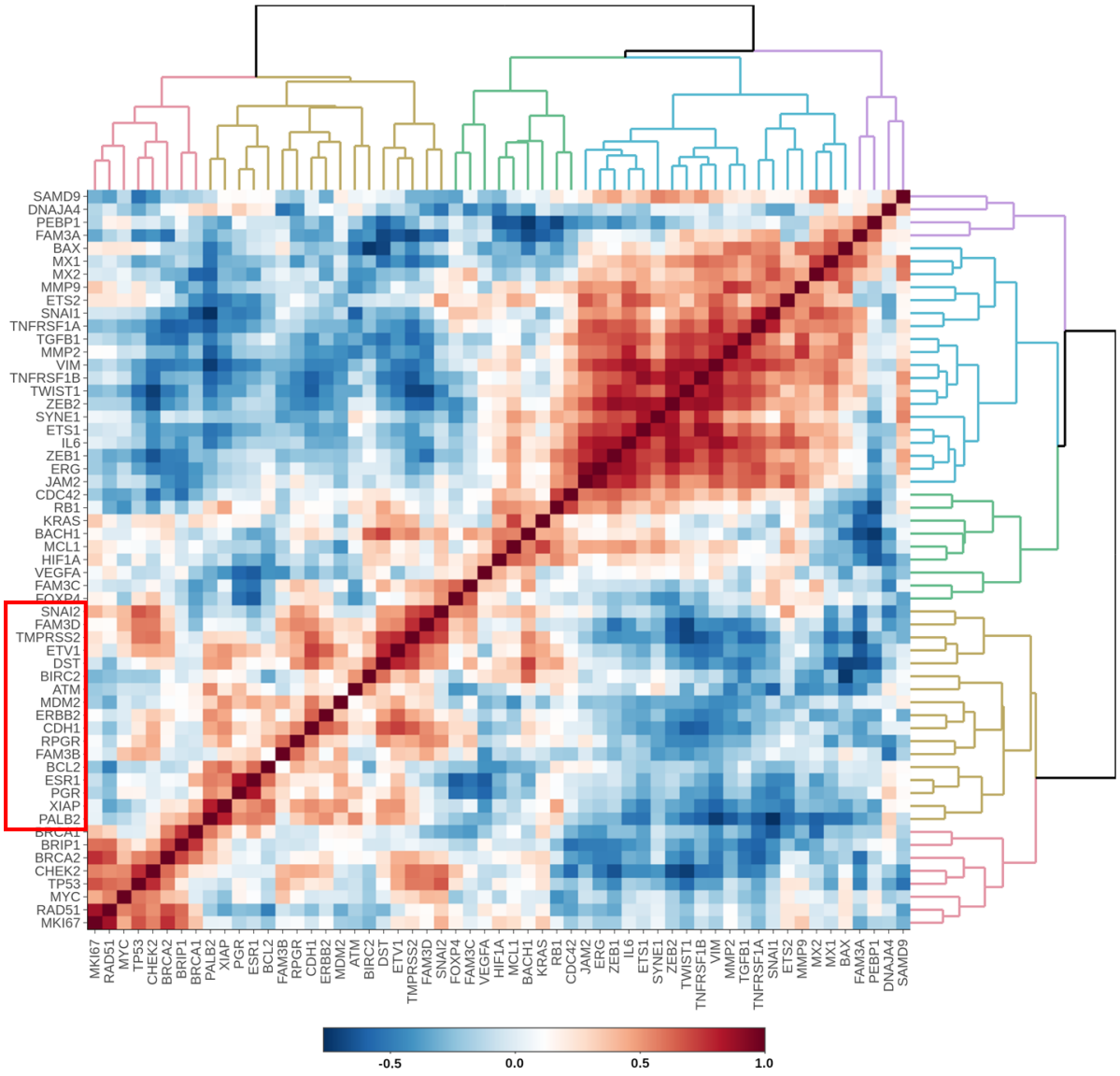


Figura 10. Análise da expressão gênica em amostras pareadas do TGCA. Amostras pareadas de câncer de mama (BRCA) depositadas no TGCA (n= 111) foram analisadas localmente usando o *FirebrowseR*, calculadas em log2 (FAM3 *fold*) que significa a variação em relação a amostra controle do mesmo indivíduo. Um valor igual a 0 (zero) significa que não há variação de expressão entre o tecido tumoral e normal do mesmo paciente. As análises foram representadas em A) Estágio do câncer de mama e B) Subtipo de câncer de mama.



Positivamente

Gene ID	*r*	*p-value*
RPGR	0.6010	**0.0065**
FAM3D	0.4504	0.0530
TP53	0.4381	0.0606
MDM2	0.4293	0.0666
CHEK2	0.4030	0.0871
CDH1	0.3846	0.1039
MYC	0.3626	0.1270
ETV1	0.3453	0.1476
TMPRSS2	0.3311	0.1662
ESR1	0.3301	0.1676
SNAI2	0.2852	0.2367
PGR	0.2694	0.2646
XIAP	0.2312	0.3410
BAX	0.2195	0.3665
FAM3C	0.2156	0.3754

Negativamente

Gene ID	*r*	*p-value*
DNAJA4	-0.5365	**0.0179**
VEGFA	-0.4263	0.0688
TWIST1	-0.4109	0.0805
SYNE1	-0.3886	0.1002
ZEB2	-0.3510	0.1406
TNFRSF1B	-0.3394	0.1552
VIM	-0.3046	0.2048
ZEB1	-0.2753	0.2539
CDC42	-0.2022	0.4064
MMP2	-0.1969	0.4190

Figura 11. Mapa de calor da correlação da expressão gênica do FAM3B em pacientes no estágio 1 do câncer de mama. Os mapas de calor e os dendrogramas foram elaborados a partir da correlação dos valores da variação da expressão (log2 ou gene *fold*) de 57 genes, incluindo o FAM3B, nos tumores em estágio 1 do câncer de mama em relação a amostra controle do mesmo indivíduo (n=19). A lista de correlações relevantes usando os limiares calculados pelo teste de Pearson (r >0.20 ou r > -0,20 para correlações positivas ou negativas, respectivamente) são mostrados na parte inferior da figura. Valores de p < 0,05 estão grifados em negrito.

No estágio 2 observamos que FAM3B se correlaciona positivamente com TMPRSS2, gene que codifica protease localizada na mesma região cromossômica de FAM3B e co-reguladas em câncer de próstata (74) e o gene DST, um marcador de prognóstico negativo em câncer de mama recentemente identificado (75). Adicionalmente, MDM2, um gene co-regulado com FAM3B em câncer de cólon (54) e FAM3D (membro da mesma família FAM3) um fator inibitório de tumores de cólon (76) também apresentam correlação significativa com FAM3B. Por outro lado, FAM3B se correlaciona negativamente com vários marcadores bem caracterizados de metástase e da EMT como VIM (Vimentina), SNAI1 (Snail), MMP-9, VEGFA, TGFB1 e ZEB2 (Figura 12).

Finalmente, no estágio 3, observamos uma correlação positiva significativa e muito relevante entre FAM3B e dois genes muito importantes para a progressão do câncer de mama: MX1, um gene preditor de mau prognóstico (77) e PALB2, um gene preditor de risco aumentado da doença (78). Da mesma forma que TMPRSS2, MX1 também está localizado na mesma região cromossômica de FAM3B. Paradoxalmente, o gene DNAJA4 correlacionado negativamente no estágio 1 se correlaciona positivamente com FAM3B no estágio 3. Neste estágio, FAM3B se correlaciona negativamente com o gene PGR (receptor de progesterona) e o gene antiapoptótico BCL2, ambos associados ao bom prognóstico de tumores de mama que respondem a hormônios (79) (Figura 13).

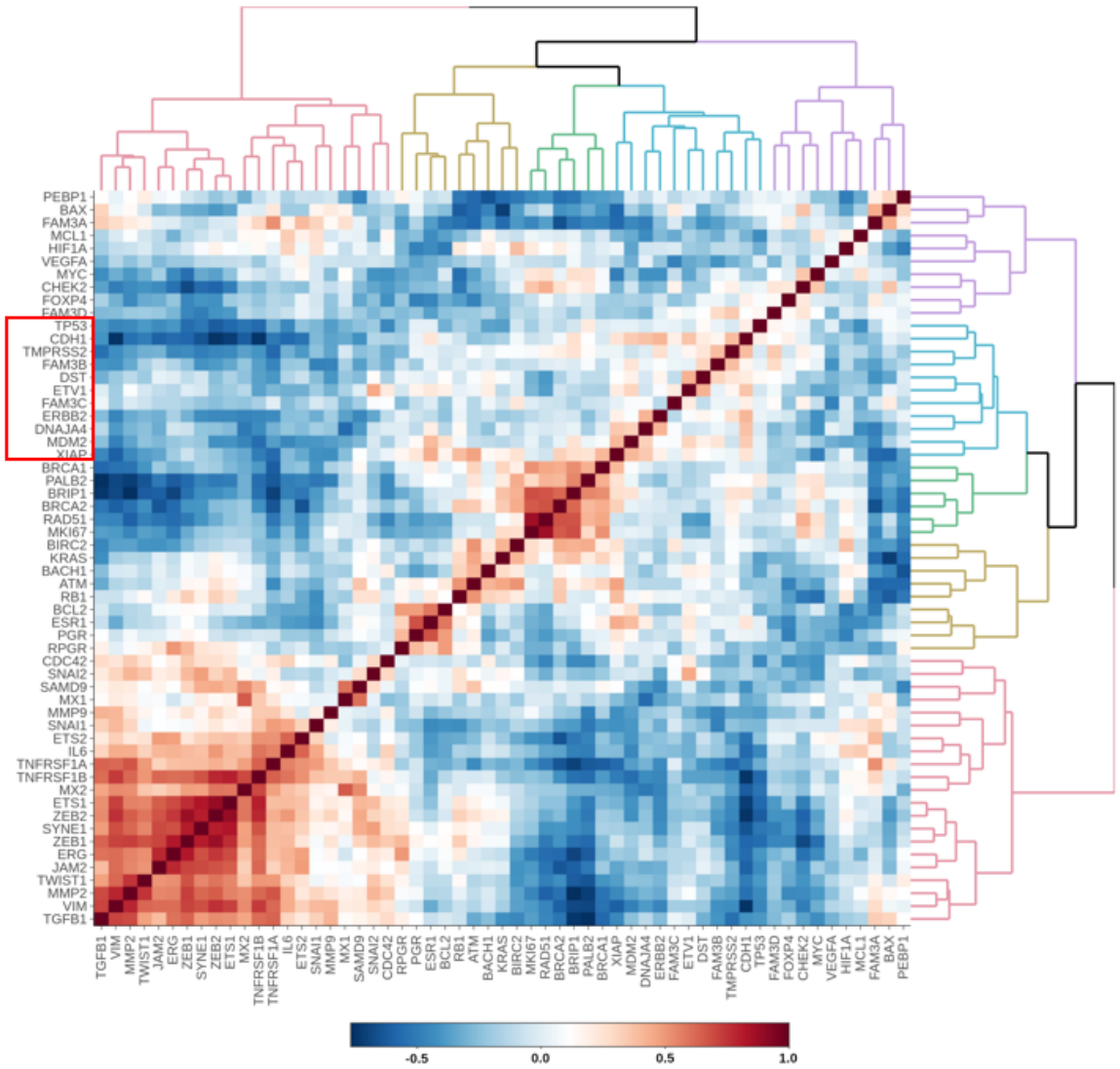
Considerando os subtipos do câncer de mama, no subtipo luminal A a expressão de FAM3B se correlaciona positivamente com os genes TMPRSS2 e FAM3D, coincidindo com o perfil de correlação da expressão gênica observado no estágio 2. Os genes MX1 e PALB2 também estão correlacionados positivamente com FAM3B, de maneira similar ao observado no estágio 3. No subtipo luminal A os genes PGR, BCL2 e TGFB1 se correlacionam negativamente com FAM3B, sugerindo um perfil de expressão parecido ao estágio 3 (Figura 14).

No subtipo luminal B observamos novamente a correlação positiva de FAM3B com TMPRSS2 e FAM3D, de maneira similar ao estágio 1 e ao subtipo luminal A. Já a correlação negativa inclui um outro membro da família Bcl-2, o gene MCL1, que está associado ao prognóstico ruim em tumores de mama hormônio-responsivos e triplo negativos (80, 81). Também foi observada uma correlação significativa com MMP-9, que é um conhecido marcador de mau prognóstico em câncer de mama, comumente aumentado em estágios avançados e subtipos Her2+ e triplo negativo (82) (Figura 15).

Curiosamente, FAM3B não apresentou correlação positiva com nenhum gene em tumores Her2+, entretanto, observou-se correlação negativa com SNAI1 (Slug), IL6 e TGFB,

genes importantes para a EMT (Figura 16). Por outro lado, nos tumores Her2- observamos de novo a correlação significativa com TMPRSS2 e FAM3D, como já descritas para os subtipos luminal A e B, composta por tumores hormônio-responsivos. A correlação negativa de FAM3B foi significativa com o genes ETS1, que funciona como supressor de tumorigênese em câncer de mama (83) e SYNE1, responsável por facilitar os efeitos da quimioterapia em câncer de estômago (84). No entanto, FAM3B também apresentou correlação negativa com VIM (vimentina) e ZEB1, dois conhecidos mediadores da EMT em câncer de mama (Figura 17).

Finalmente, em tumores triplo negativos (TNBC) observamos a correlação positiva com 3 genes, já observadas em outros estágios e subtipos: MDM2, DST e BCL2. A correlação negativa foi evidenciada com MX1, que teve correlação positiva no estágio 3, e ETS1, TNFRSB1, VIM e RAD51, este último um bem caracterizado marcador de TNBC (85) (Figura 18).



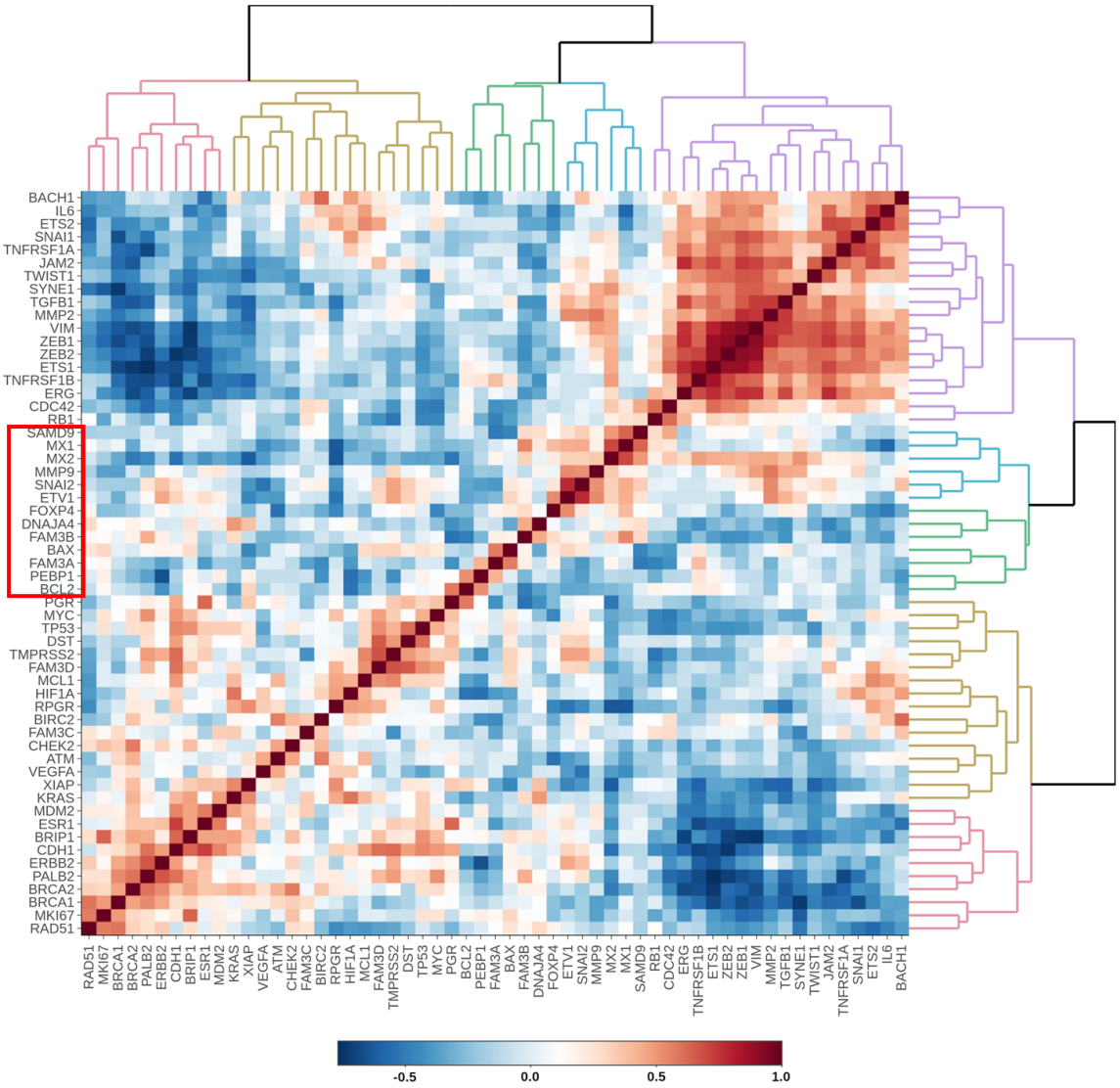
Positivamente

Gene ID	r	*p-value*
TMPRSS2	0.4375	**0.0007**
DST	0.3692	**0.0047**
FAM3D	0.3472	**0.0082**
MDM2	0.3031	0.0219
CDH1	0.2328	0.0814
CHEK2	0.2011	0.1336

Negativamente

Gene ID	r	*p-value*
SNAI1	-0,3538	**0.0069**
MMP9	-0,3517	**0.0073**
VIM	-0,3033	**0.0218**
VEGFA	-0,2932	0.0268
TGFB1	-0,2888	0.0293
ZEB2	-0,2710	0.0415

Figura 12. Mapa de calor da correlação da expressão gênica do FAM3B em pacientes no estágio 2 do câncer de mama. Os mapas de calor e os dendrogramas foram elaborados a partir da correlação dos valores da variação da expressão (log2 ou gene *fold*) de 57 genes, incluindo o FAM3B, nos tumores em estágio 2 do câncer de mama em relação a amostra controle do mesmo indivíduo (n=64). A lista de correlações relevantes usando os limiares calculados pelo teste de Pearson (r >0.20 ou r > -0,20 para correlações positivas ou negativas, respectivamente) são mostrados na parte inferior da figura. Valores de p < 0,05 estão grifados em negrito.



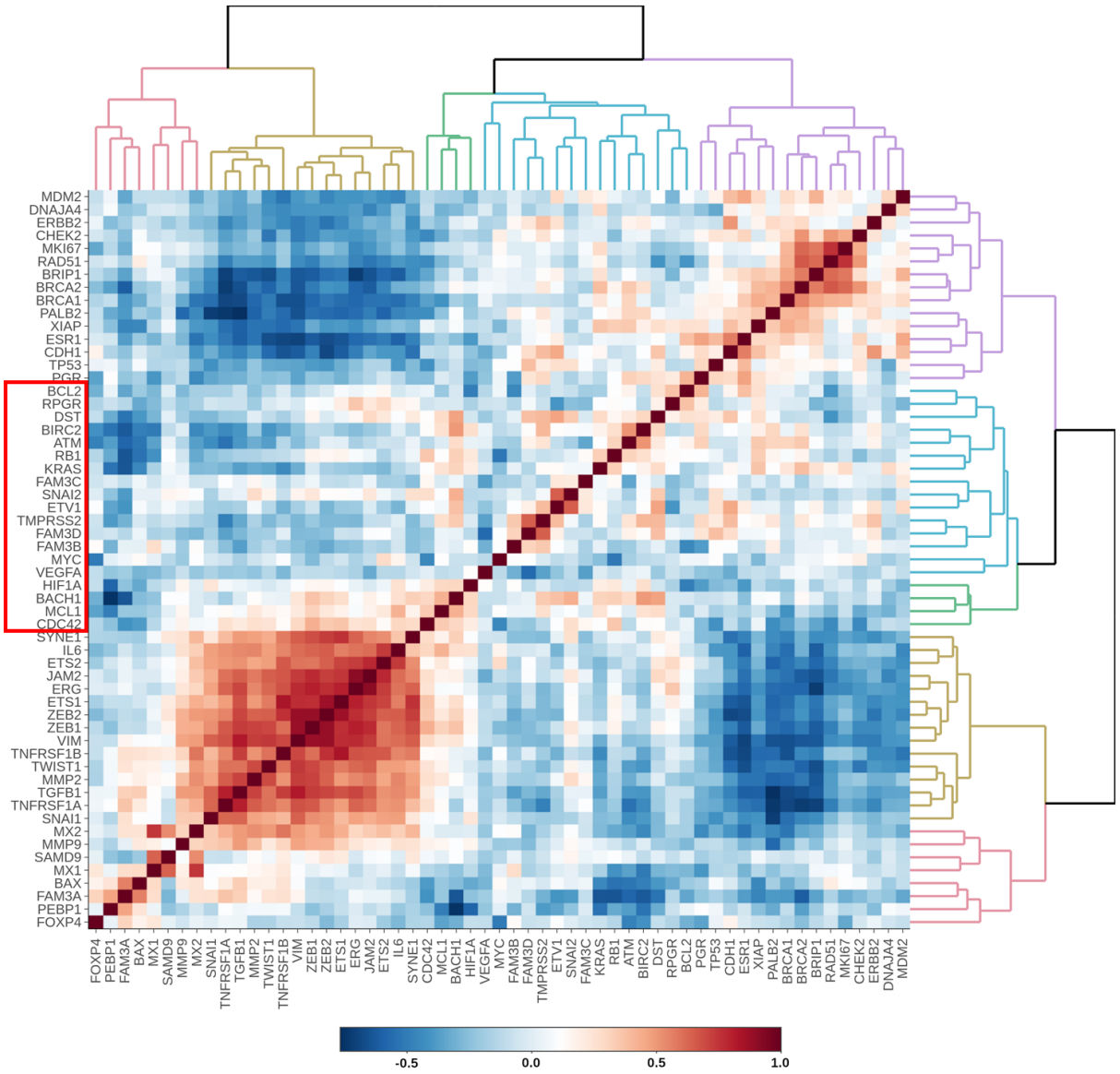
Positivamente

Gene ID	*r*	*p-value*
MX1	0.5532	**0.0093**
DNAJA4	0.4591	**0.0363**
PALB2	0.4511	**0.0401**
MX2	0.3321	0.1413
KRAS	0.3050	0.1789
SAMD9	0.3034	0.1812
FOXP4	0.2968	0.1914

Negativamente

Gene ID	*r*	*p-value*
PGR	-0.5050	**0.0196**
BCL2	-0.4662	**0.0332**
ZEB2	-0.3993	0.0729
TNFRSF1A	-0.3979	0.0741
ZEB1	-0.3918	0.0790
TGFB1	-0.3799	0.0894
ERG	-0.3710	0.0978
IL6	-0.3604	0.1085
JAM2	-0.3535	0.1159
ETS1	-0.3480	0.1221
VIM	-0.3388	0.1330
ETS2	-0.3142	0.1654
MMP2	-0.2678	0.2405
VEGFA	-0.2648	0.2461
ATM	-0.2639	0.2477
PEBP1	-0.2613	0.2525
CDC42	-0.2312	0.3134
TNFRSF1B	-0.2280	0.3201
CHEK2	-0.2215	0.3345

Figura 13. Mapa de calor da correlação da expressão gênica do FAM3B em pacientes no estágio 3 do câncer de mama. Os mapas de calor e os dendrogramas foram elaborados a partir da correlação dos valores da variação da expressão (log2 ou gene *fold*) de 57 genes, incluindo o FAM3B, nos tumores em estágio 3 do câncer de mama em relação a amostra controle do mesmo indivíduo (n=25). A lista de correlações relevantes usando os limiares calculados pelo teste de Pearson (r >0.20 ou r > -0,20 para correlações positivas ou negativas, respectivamente) são mostrados na parte inferior da figura. Valores de p < 0,05 estão grifados em negrito.



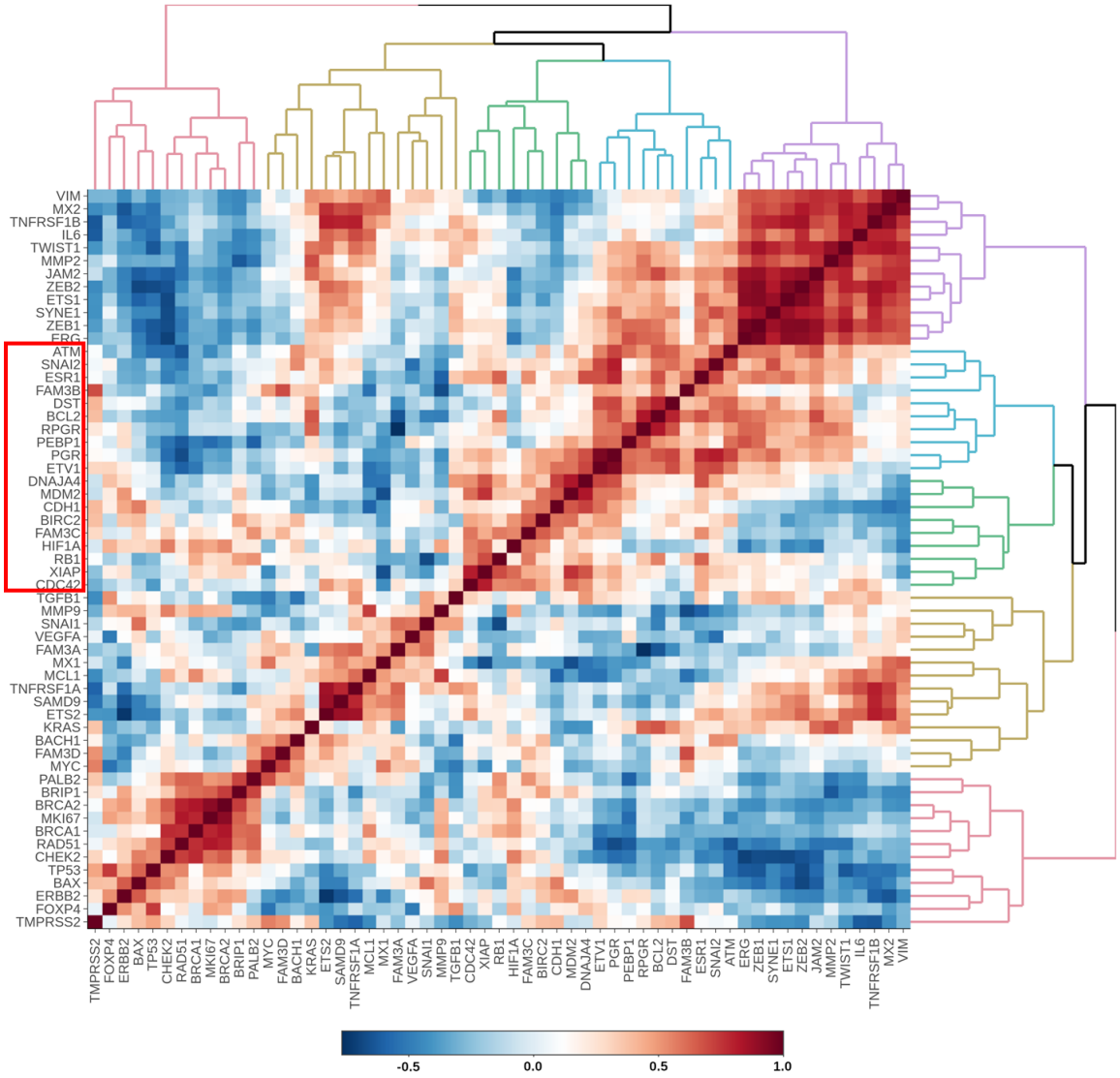
Positivamente

Gene ID	r	*p-value*
TMPRSS2	0.3871	**0.0027**
FAM3D	0.3509	**0.0069**
MX1	0.3183	**0.0149**
PALB2	0.2422	0.0670
ERBB2	0.2004	0.1315

Negativamente

Gene ID	r	*p-value*
BCL2	-0.37381	**0.00385**
PGR	-0.30411	**0.02029**
TGFB1	-0.29357	**0.02531**
ZEB2	-0.25688	0.05159
VEGFA	-0.23749	0.07264
PEBP1	-0.22941	0.08322
ZEB1	-0.22248	0.09323

Figura 14. Mapa de calor da correlação da expressão gênica do FAM3B em pacientes com o subtipo luminal A do câncer de mama. Os mapas de calor e os dendrogramas foram elaborados a partir da correlação dos valores da variação da expressão (log2 ou gene *fold*) de 57 genes, incluindo o FAM3B, nos tumores do subtipo luminal A do câncer de mama em relação a amostra controle do mesmo indivíduo (n=58). A lista de correlações relevantes usando os limiares calculados pelo teste de Pearson (r >0.20 ou r > -0,20 para correlações positivas ou negativas, respectivamente) são mostrados na parte inferior da figura. Valores de p < 0,05 estão grifados em negrito.



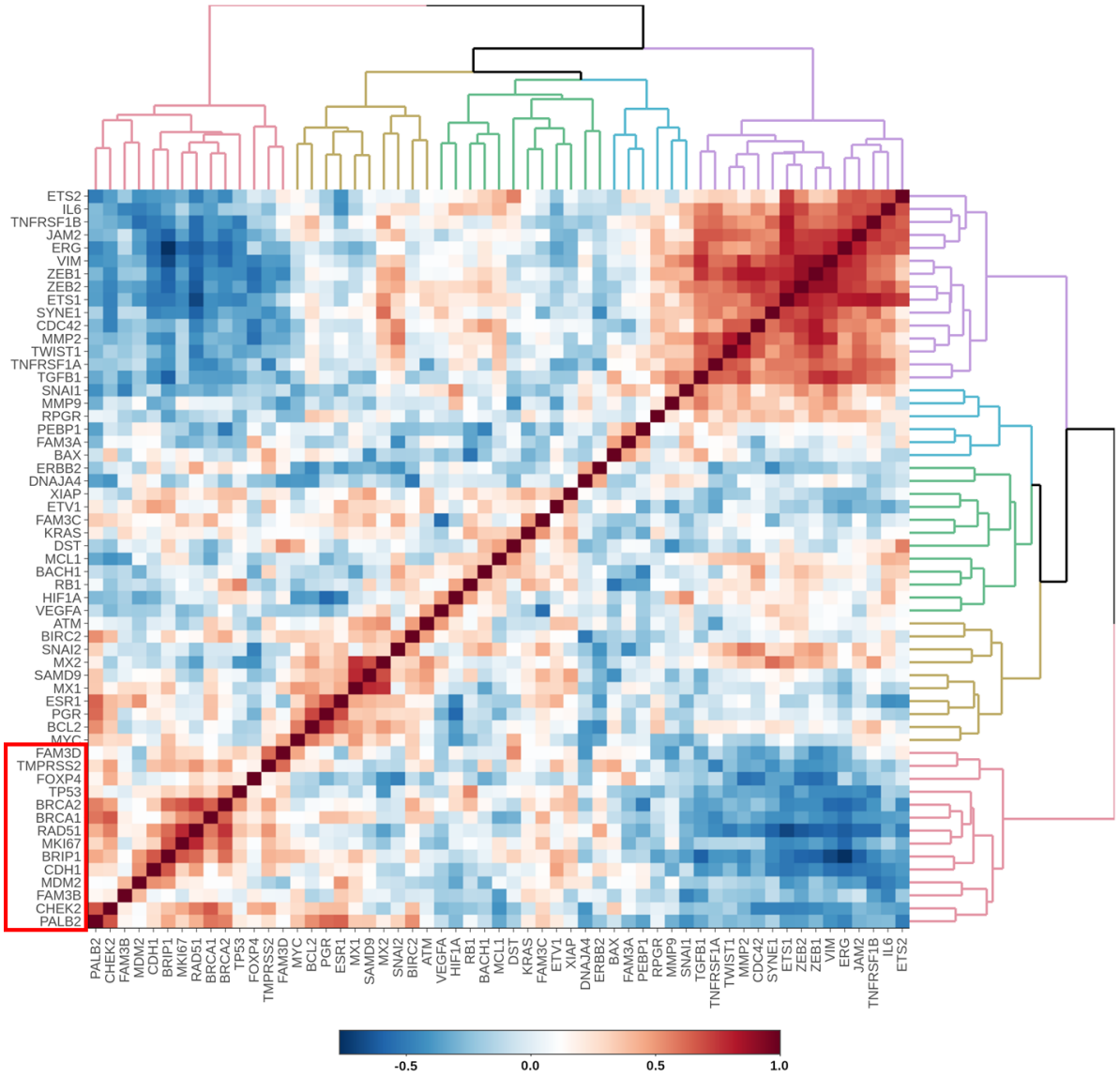
Positivamente

Gene ID	r	*p-value*
FAM3D	0.6707	**0.0338**
TMPRSS2	0.6703	**0.0339**
ESR1	0.5511	0.0987
BCL2	0.5468	0.1019
MYC	0.4632	0.1776
ETV1	0.4388	0.2046
SNAI2	0.4346	0.2095
ATM	0.4231	0.2231
PGR	0.4179	0.2294
JAM2	0.3519	0.3186
DST	0.3125	0.3794
RB1	0.3067	0.3887
KRAS	0.3053	0.3910
PEBP1	0.2941	0.4095
BACH1	0.2848	0.4251
RPGR	0.2335	0.5161
CDH1	0.2175	0.5462

Negativamente

Gene ID	r	*p-value*
MMP9	-0.7952	**0.0060**
MCL1	-0.6532	**0.0406**
MKI67	-0.5337	0.1121
SNAI1	-0.4545	0.1869
BRCA1	-0.4390	0.2044
RAD51	-0.4163	0.2314
TGFB1	-0.4017	0.2499
BAX	-0.3634	0.3020
BRCA2	-0.3633	0.3022
TNFRSF1A	-0.3318	0.3490
ERBB2	-0.3303	0.3512
CHEK2	-0.3202	0.3671
FAM3A	-0.2923	0.4125
HIF1A	-0.2732	0.4450
IL6	-0.2561	0.4751
FOXP4	-0.2124	0.5557

Figura 15. Mapa de calor da correlação da expressão gênica do FAM3B em pacientes com o subtipo luminal B de câncer de mama. Os mapas de calor e os dendrogramas foram elaborados a partir da correlação dos valores da variação da expressão (log2 ou gene *fold*) de 57 genes, incluindo o FAM3B, nos tumores do subtipo luminal B do câncer de mama em relação a amostra controle do mesmo indivíduo (n=11). A lista de correlações relevantes usando os limiares calculados pelo teste de Pearson (r >0.20 ou r > -0,20 para correlações positivas ou negativas, respectivamente) são mostrados na parte inferior da figura. Valores de p < 0,05 estão grifados em negrito.



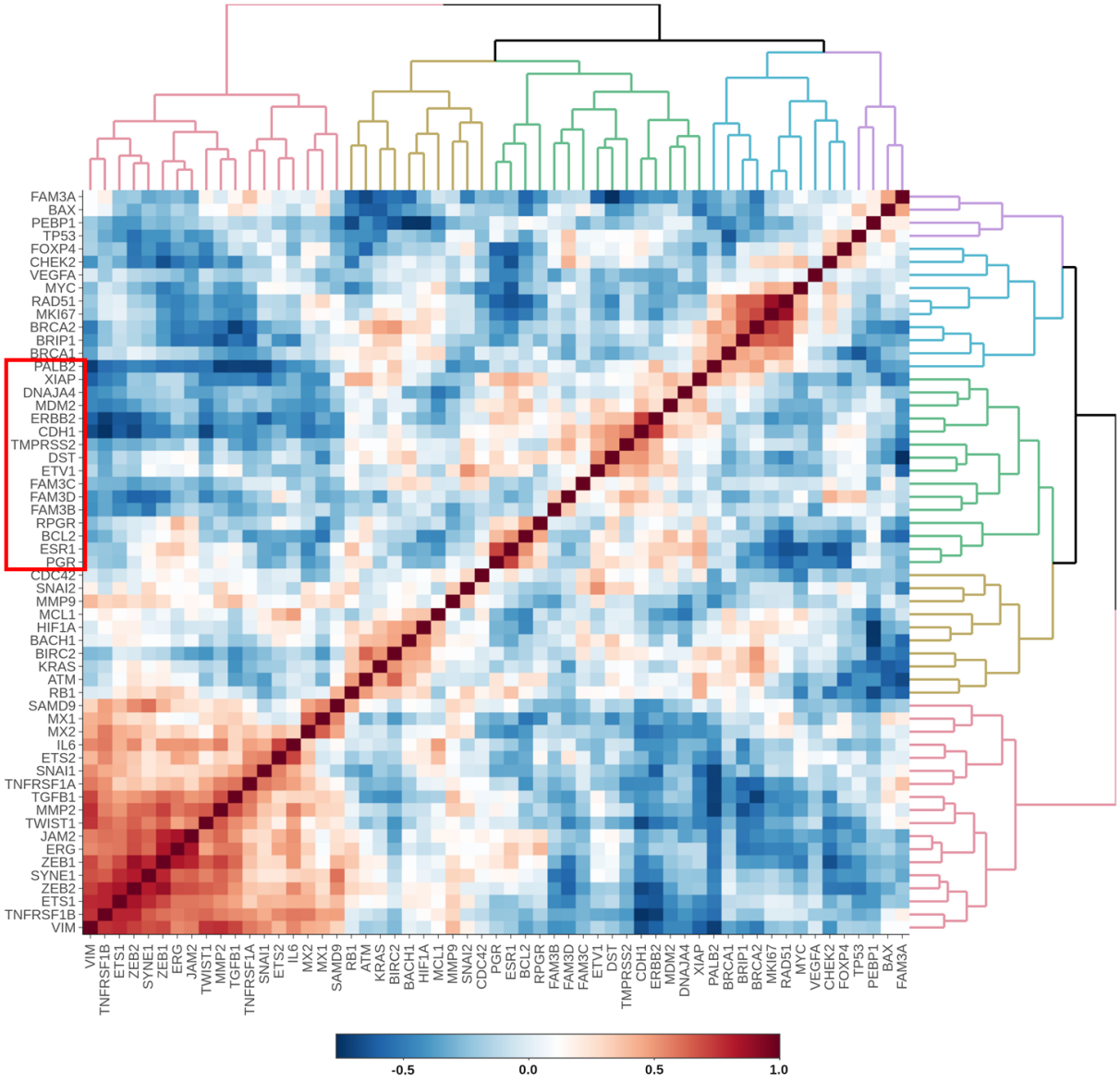
Positivamente

Gene ID	r	*p-value*
MDM2	0.3847	0.0771
ESR1	0.3236	0.1418
MYC	0.2752	0.2152
KRAS	0.2715	0.2217
MX1	0.2605	0.2417
FAM3C	0.2017	0.3681

Negativamente

Gene ID	r	*p-value*
SNAI1	-0.5148	**0.0142**
IL6	-0.5061	**0.0162**
TGFB1	-0.4252	0.0485
MCL1	-0.4104	0.0578
TNFRSF1B	-0.3964	0.0678
ZEB2	-0.3710	0.0891
VIM	-0.2979	0.1782
CDC42	-0.2863	0.1964
ETS1	-0.2672	0.2294
MMP2	-0.2583	0.2458
ZEB1	-0.2476	0.2666
TWIST1	-0.2419	0.2781
ETS2	-0.2359	0.2905
VEGFA	-0.2155372	0.3353795
XIAP	-0.2071903	0.3548741
HIF1A	-0.2048284	0.3605075

Figura 16. Mapa de calor da correlação da expressão gênica do FAM3B em pacientes com o subtipo Her2+ de câncer de mama. Os mapas de calor e os dendrogramas foram elaborados a partir da correlação dos valores da variação da expressão (log2 ou gene *fold*) de 57 genes, incluindo o FAM3B, nos tumores do subtipo Her2+ do câncer de mama em relação a amostra controle do mesmo indivíduo (n=23). A lista de correlações relevantes usando os limiares calculados pelo teste de Pearson (r >0.20 ou r > -0,20 para correlações positivas ou negativas, respectivamente) são mostrados na parte inferior da figura. Valores de p < 0,05 estão grifados em negrito.



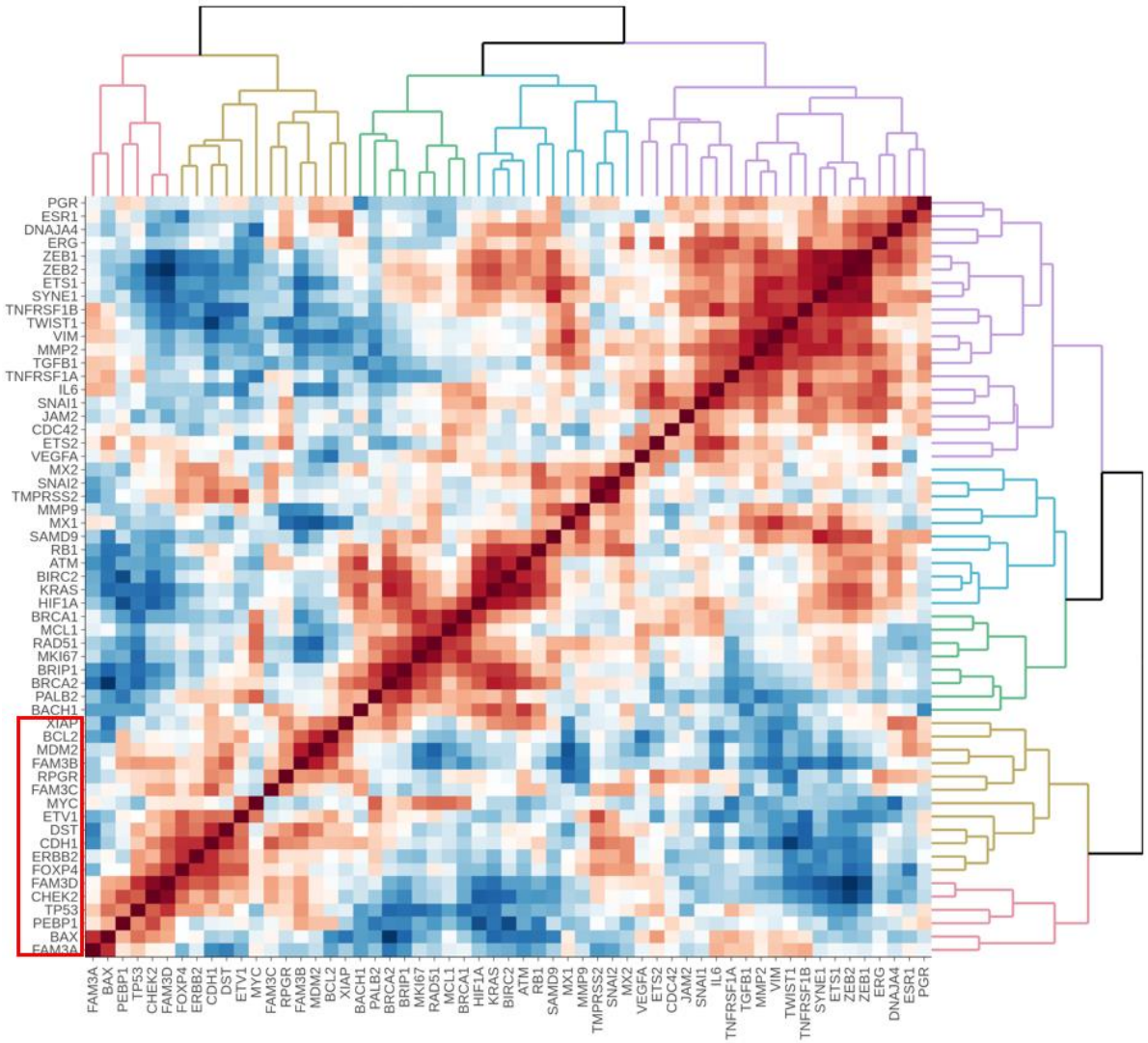
Positivamente

Gene ID	r	*p-value*
FAM3D	0.3949	**0.0050**
TMPRSS2	0.3694	**0.0090**
MDM2	0.2898	0.0434
CDH1	0.2569	0.0748
ERBB2	0.2417	0.0943
DST	0.2164	0.1353

Negativamente

Gene ID	r	*p-value*
SYNE1	-0.4113	**0.0033**
ETS1	-0.3306	**0.0203**
VIM	-0.3099	0.0303
ZEB2	-0.2919	0.0419
VEGFA	-0.2706	0.0600
MMP9	-0.2692	0.0615
TGFB1	-0.2488	0.0847
TNFRSF1B	-0.2328	0.1074
TNFRSF1A	-0.2104	0.1468

Figura 17. Mapa de calor da correlação da expressão gênica do FAM3B em pacientes com o subtipo Her2- de câncer de mama. Os mapas de calor e os dendrogramas foram elaborados a partir da correlação dos valores da variação da expressão (log2 ou gene *fold*) de 57 genes, incluindo o FAM3B, nos tumores do subtipo Her2- do câncer de mama em relação a amostra controle do mesmo indivíduo (n=54). A lista de correlações relevantes usando os limiares calculados pelo teste de Pearson (r >0.20 ou r > -0,20 para correlações positivas ou negativas, respectivamente) são mostrados na parte inferior da figura. Valores de p < 0,05 estão grifados em negrito.



Positivamente

Gene ID	r	*p-value*
MDM2	0.8088	**0.0026**
DST	0.6261	**0.0393**
BCL2	0.6111	0.0458
CDH1	0.4821	0.1332
RPGR	0.4625	0.1520
TP53	0.4593	0.1553
CHEK2	0.4330	0.1834
FAM3D	0.4315	0.1851
PEBP1	0.4124	0.2075
XIAP	0.3271	0.3261
FAM3C	0.2713	0.4196
FOXP4	0.2389	0.4793
ERBB2	0.1998	0.5558

Negativamente

Gene ID	r	*p-value*
MX1	-0.7413	**0.0090**
ETS1	-0.7170	**0.0130**
TNFRSF1B	-0.6846	0.0201
VIM	-0.6558	0.0284
RAD51	-0.6505	0.0302
MKI67	-0.5944	0.0538
IL6	-0.5933	0.0543
MMP2	-0.5874	0.0574
SYNE1	-0.5860	0.0581
SAMD9	-0.5720	0.0660
MMP9	-0.5695	0.0675
ZEB2	-0.5442	0.0835
BRCA1	-0.5395	0.0867
TWIST1	-0.5129	0.1067
TGFB1	-0.4657	0.1488
ZEB1	-0.4460	0.1691
MCL1	-0.4155	0.2037
HIF1A	-0.3577	0.2801
FAM3A	-0.3016	0.3674
MYC	-0.2805	0.4034

Figura 18. Mapa de calor da correlação da expressão gênica do FAM3B em pacientes com o subtipo triplo negativo (TNBC) de câncer de mama. Os mapas de calor e os dendrogramas foram elaborados a partir da correlação dos valores da variação da expressão (log2 ou gene *fold*) de 57 genes, incluindo o FAM3B, nos tumores do subtipo triplo negativo do câncer de mama em relação a amostra controle do mesmo indivíduo (n=11). A lista de correlações relevantes usando os limiares calculados pelo teste de Pearson (r >0.20 ou r > -0,20 para correlações positivas ou negativas, respectivamente) são mostrados na parte inferior da figura. Valores de $p < 0,05$ estão grifados em negrito.

5.2. Expressão do FAM3B em linhagens tumorais da mama

A expressão de FAM3B, ao nível de mRNA, nas diferentes linhagens de mama disponíveis no nosso laboratório, foi analisada por PCR quantitativo (qPCR). Observamos que a linhagem MDA-MB-231 apresentou menor expressão de FAM3B, seguida pelas linhagens HS578T e MCF-7, respectivamente (Figura 19). A partir destes resultados decidimos realizar os ensaios de superexpressão nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7.

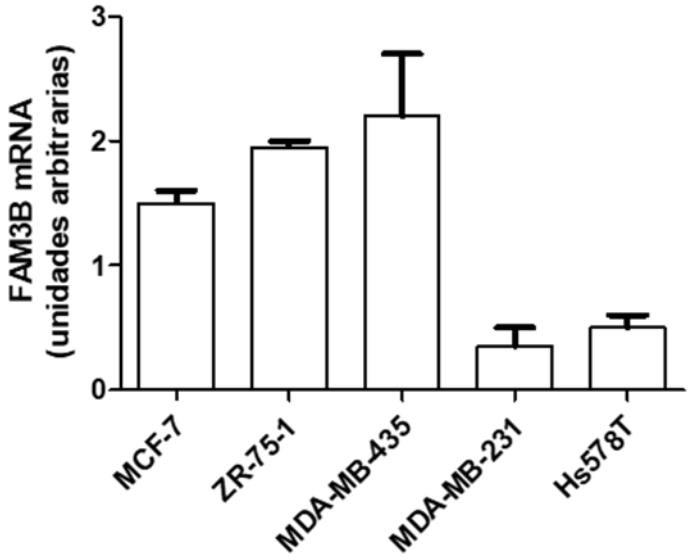


Figura 19. Análise da expressão gênica de FAM3B em diferentes linhagens da mama ao nível de mRNA. Foram coletadas aproximadamente 1 x 10^6 das células MCF-7, ZR-75-1, MDA-MB-435, MDA-MB-231, HS578T. Os resultados são expressos como média ± erro padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes.

5.3. Superexpressão do FAM3B nas células MDA-MB-231 e MCF-7

Após a transfecção e seleção, as células MDA-MB-231 pcDNA (Controle), MDA-MB-231-FAM3B, as células MCF-7 pcDNA e MCF-7-FAM3B não mostraram diferenças morfológicas evidentes quando observadas ao microscópio (Figura 20 B,D). Após a segunda passagem das células MDA-MB-231 transfectadas, foi observado um aumento de ~200 vezes na expressão gênica ao nível de mRNA nas células MDA-MB-231FAM3B, em relação às células controle transfectadas com o vetor vazio (Figura 20C). Nas células MCF-7, foi observado um aumento de ~ 3,5 vezes na expressão gênica ao nível de mRNA nas células transfectadas com FAM3B, em relação às células controle, transfectadas com o vetor vazio (Figura 20 E).

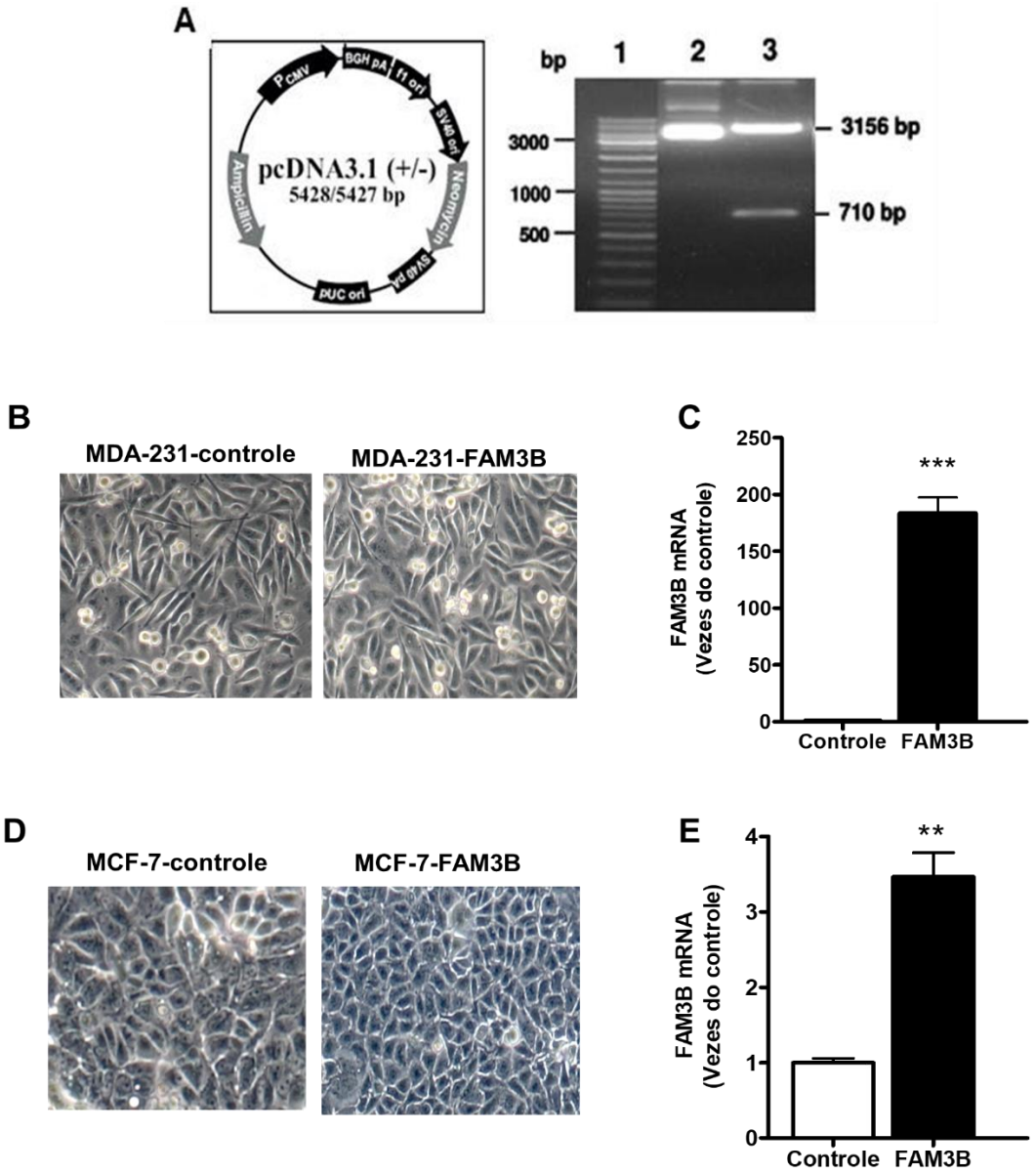


Figura 20. Geração da Linhagem MDA-MB-231-FAM3B e MCF-7-FAM3B. O cDNA completo do FAM3B (710 bp) foi clonado no vetor pcDNA (A). Análise em microscópio de luz visível a 200X de aumento das células MDA-MB-231 pcDNA-controle e pcDNA-FAM3B e células MCF-7-pcDNA e MCF-7 pcDNA-FAM3B, transfectadas com o vetor vazio e com o vetor contendo o cDNA do FAM3B, respectivamente (B-C). A expressão de FAM3B nas duas linhagens foi analisada por qPCR e normalizada pela expressão do gene HPRT (D-E). Os resultados são expressos como média ± erro padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste t *Student*. ** $p < 0,005$ vs. controle. *** $p < 0,001$ vs. controle.

5.4. Migração celular nas células MDA-MB-231-FAM3B e MCF-7-FAM3B

Para mimetizar o processo de migração celular observado *in vivo*, $5x10^5$ células MDA-MB-231-FAM3B e Controle foram plaqueadas em placas de 6 poços. Após a realização de uma lacuna, na monocamada de células confluentes, foi observado uma redução da área aberta de, aproximadamente, 68% nas células MDA-MB-231-FAM3B vs. 37% nas células controle, em 24h; uma redução do espaço de 92% nas células superexpressando o FAM3B vs. 60% no grupo controle, após 48h; um fechamento quase que completo nas células MDA-MB-231-FAM3B, com 99% de redução da lacuna vs. 88% nas células controle, depois de 72h. Foi possível observar, uma redução de cerca de 30% do espaço aberto, mediante a superexpressão do FAM3B, em 24h e 48h, sugerindo uma maior taxa de migração celular mediada pelas ações deste gene (Figura 21).

Da mesma forma, com o objetivo de avaliar a migração celular, $1x10^6$ células MCF-7 FAM3B e controle foram plaqueadas em placas de 6 poços. Após 24h da realização da lacuna na cultura não foram observadas mudanças expressivas em relação ao fechamento. No entanto, após 48h, foi possível observar uma redução da lacuna realizada em torno de 43% nas células com superexpressão do FAM3B vs. 22% nas células controle; após 72h as células MCF-7-FAM3B apresentaram, aproximadamente, 70% de fechamento da lacuna, enquanto as células MCF-7-controle apresentaram apenas uma taxa aproximada de 42% de redução da área aberta. Foi possível observar, uma redução de cerca de 28% do espaço aberto, mediante a superexpressão do FAM3B, em 48h e 72h, sugerindo uma maior taxa de migração celular mediada pelas ações deste gene (Figura 22).

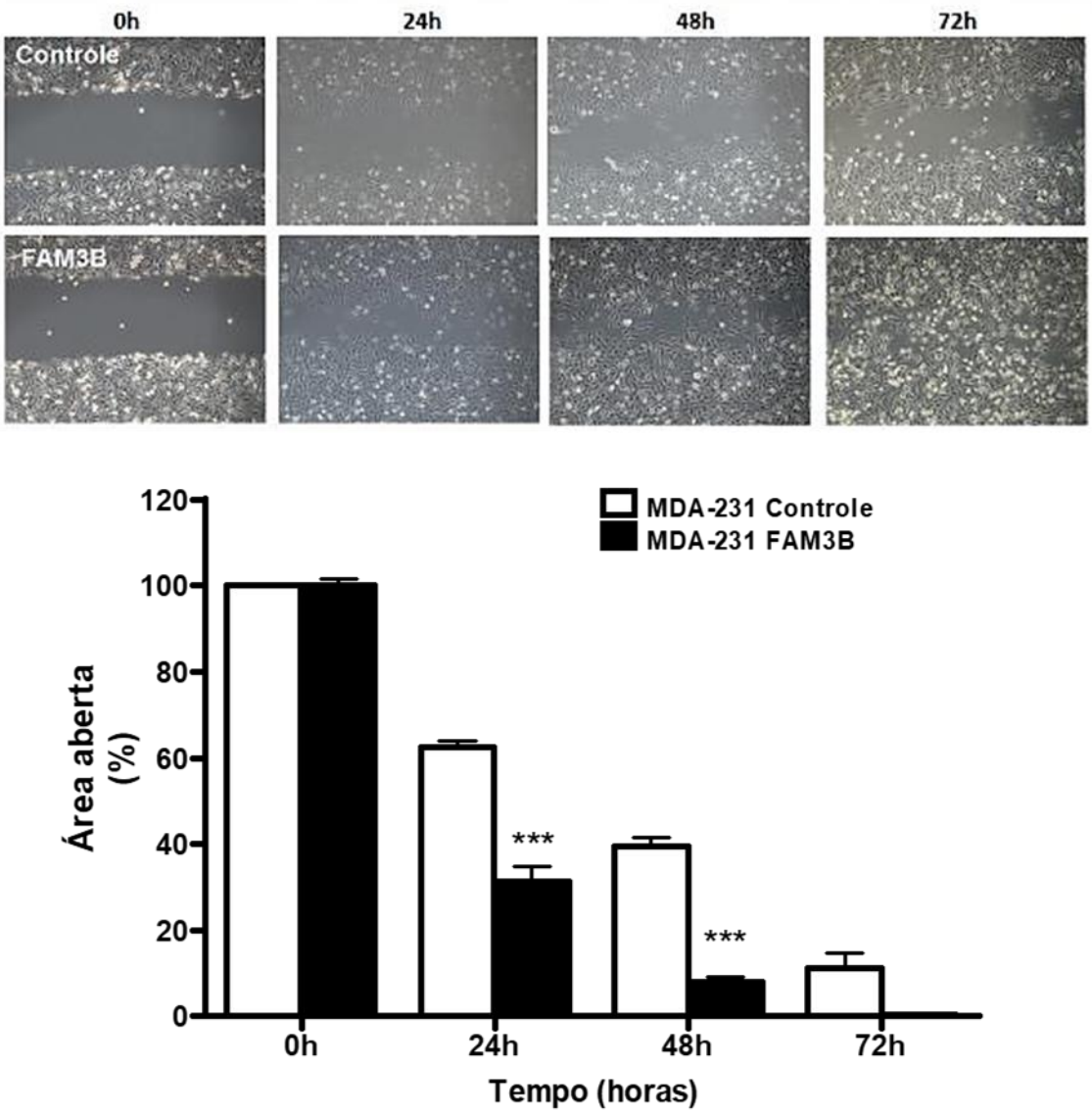


Figura 21. Avaliação da migração celular em células MDA-MB-231-FAM3B. Células MDA-MB-231-FAM3B e MDA-MB-231-controle foram plaqueadas em uma densidade 5 x 10^5 células/poço. Após 24 h foi realizada uma lacuna na camada subconfluentes de células. Como observado, as células com superexpressão do FAM3B migraram mais em direção ao fechamento da lacuna, quando comparadas às células controle nos tempos indicados (0 h, 24 h, 48 h, 72 h). Resultados obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste two-way ANOVA. *** $p < 0,001$.

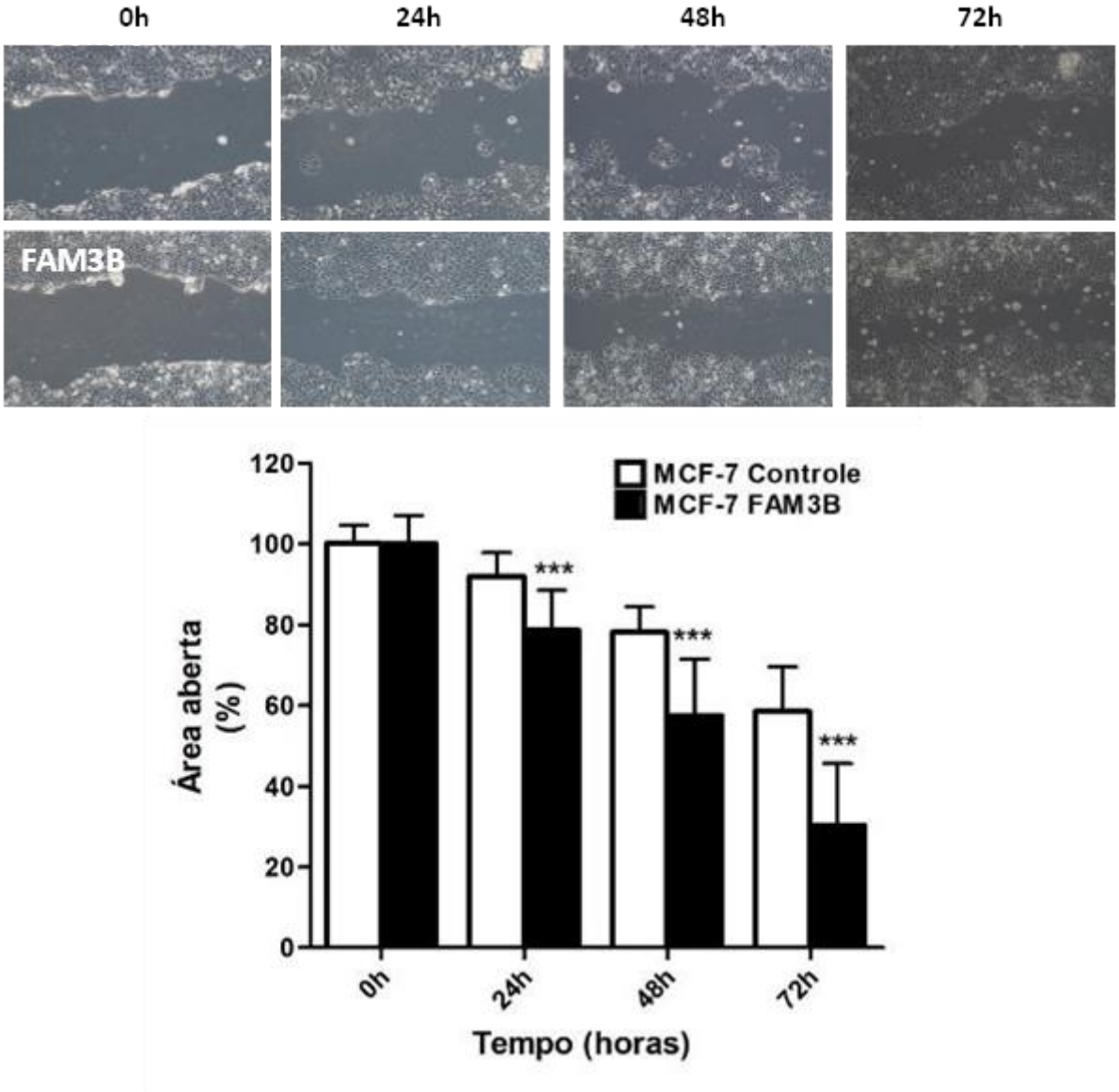


Figura 22. Avaliação da migração celular em células MCF-7. Células MCF-7-FAM3B e MCF-7-controle foram plaqueadas em uma densidade de 1 x 10^6 células/poço. Após 24 h foi realizada uma lacuna na camada subconfluentes de células. Como observado, as células com superexpressão do FAM3B migraram mais em direção ao fechamento da lacuna, quando comparadas às células controle nos tempos indicados (0 h, 24 h, 48 h, 72 h). Resultados obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste two-way ANOVA. *** $p < 0,001$.

5.5. Superexpressão de FAM3B em células MDA-MB-231 de genes relacionados à metástase ao nível de mRNA

A expressão dos genes envolvidos na metástase ao nível de mRNA foi analisada por qPCR em tempo real. Observou-se que a superexpressão de FAM3B em células MDA-MB-231 promove aumento da expressão de Bcl-2, Bcl-xL, MMP-14, TGFBR-2, Slug, Snail, MMP-2, Vimentina e N-caderina (Figura 23).

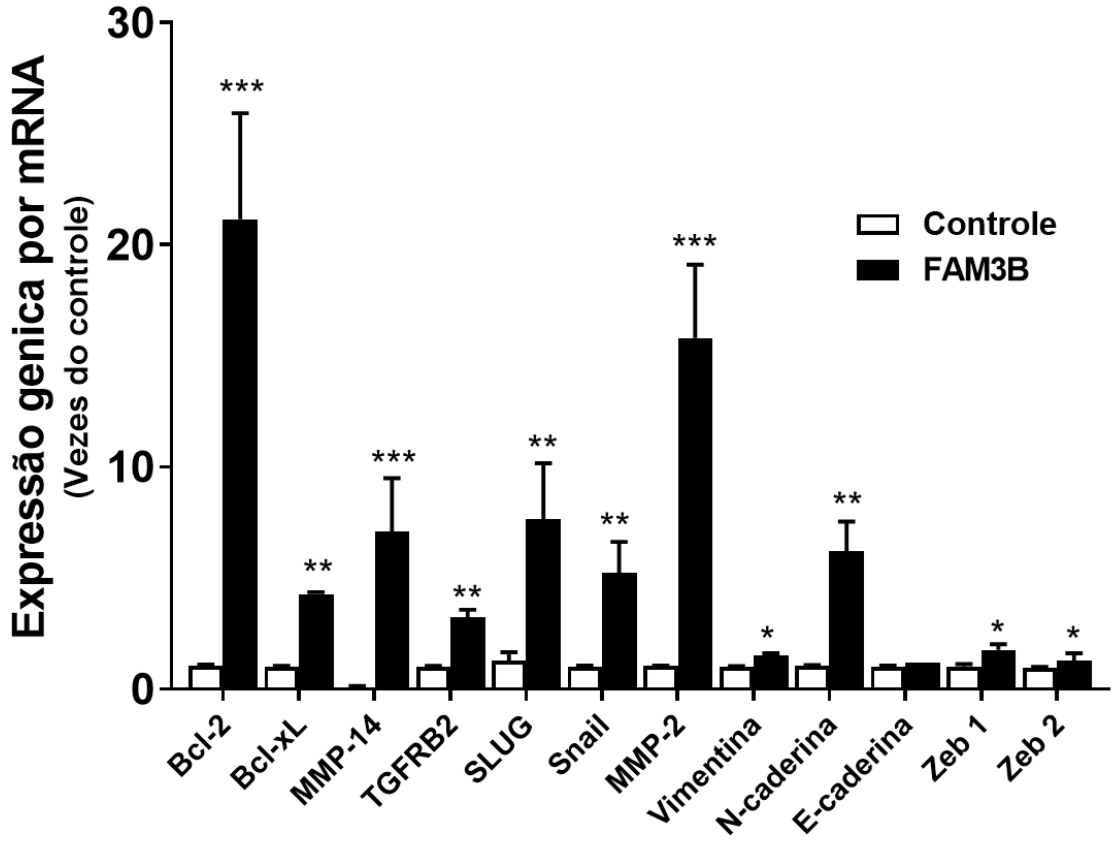


Figura 23. Análise da expressão gênica ao nível de mRNA de genes envolvidos na metástase. Foram coletadas aproximadamente 1 x 10^6 das células MDA-MB-231- FAM3B e controle. A extração de RNA total foi realizada pelo método Trizol® (Invitrogen- Life Technologies, California, USA) e a expressão gênica foi quantificada por qPCR usando o sistema Sybr®Green. Como observado, a superexpressão de FAM3B acompanha aumento na expressão de Bcl-2, Bcl-xL, MMP-14, TGFBR-2, Slug, Snail, MMP-2, Vimentina, N-caderina, Zeb -1 e Zeb-2. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste t *Student.* *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

5.6. Superexpressão de FAM3B em células MCF-7 de genes relacionados à metástase ao nível de mRNA

A expressão dos genes envolvidos na metástase ao nível de mRNA foi analisada por qPCR em tempo real. A superexpressão de FAM3B em células MCF-7 é acompanhada do aumento da expressão de Snail e Slug. Não foi observado aumento significativo na expressão de Bcl-2, Bcl-xL e E-caderina entre os grupos. No entanto, houve uma diminuição da expressão de MMP-2 nas células MCF-7-FAM3B, em relação as células controle ($p < 0,05$). (Figura 24).

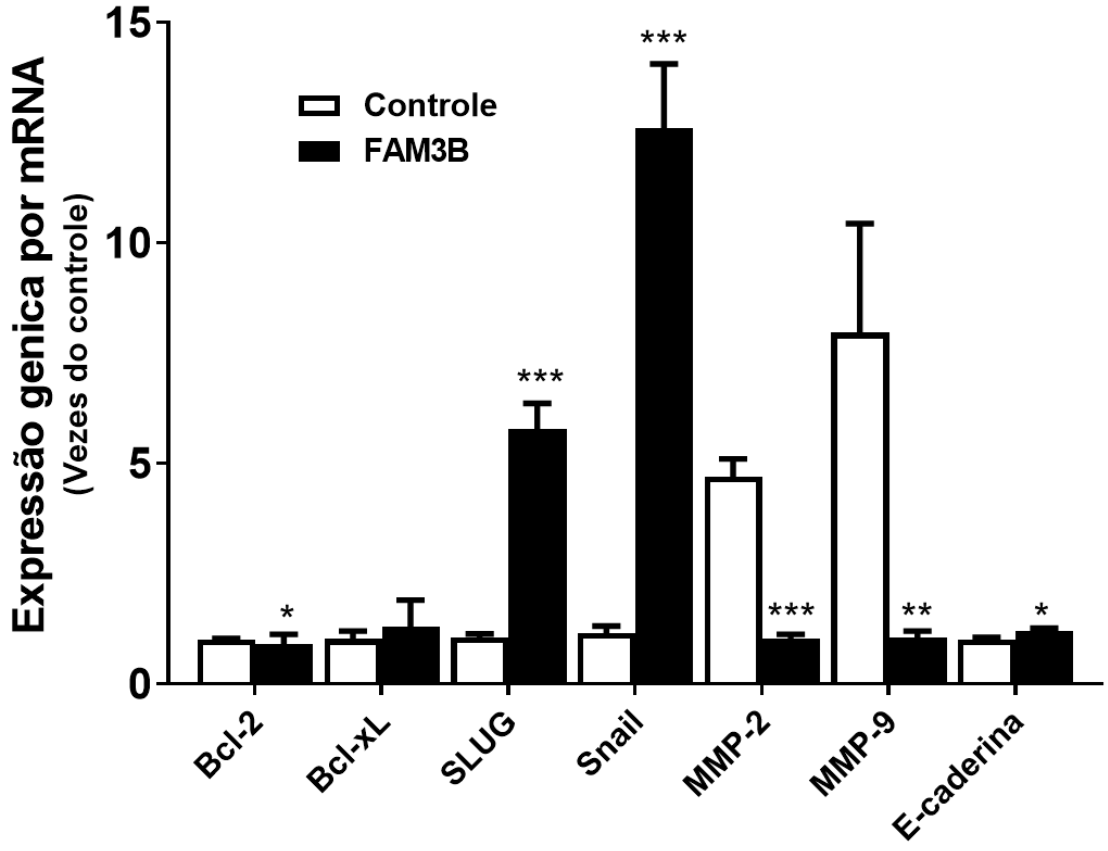


Figura 24. Análise da expressão gênica ao nível de mRNA de genes envolvidos na metástase. Foram coletadas aproximadamente 1 x 10^6 das células MCF-7- FAM3B e controle. A extração de RNA total foi realizada pelo método Trizol® (Invitrogen- Life Technologies, California, USA) e a expressão gênica foi quantificada por qPCR usando o sistema Sybr®Green. Como observado, a superexpressão de FAM3B acompanha aumento na expressão de Snail e Slug. Não foi observado aumento significativo na expressão de Bcl-2, Bcl-xL e E-caderina entre os grupos. Nas células MCF-FAM3B foi encontrada diminuição da expressão de MMP-2 em relação as células controle. Os resultados são expressos como média ± erro padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste *t Student.* * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

5.7. Superexpressão de FAM3B em células MDA-MB-231 de genes relacionados à metástase ao nível de proteína

A quantificação da expressão dos genes envolvidos na metástase Slug, MMP-2 e MMP-9, foi verificada ao nível de proteína através da técnica de Western blot. Os resultados, demonstram um aumento na expressão de Slug (~2x), nos níveis de MMP-2 (~2x) e um aumento na expressão de MMP-9 (~4x), nas células MDA-MB-231 com superexpressão, quando comparadas com o grupo de células controle. (Figura 25).

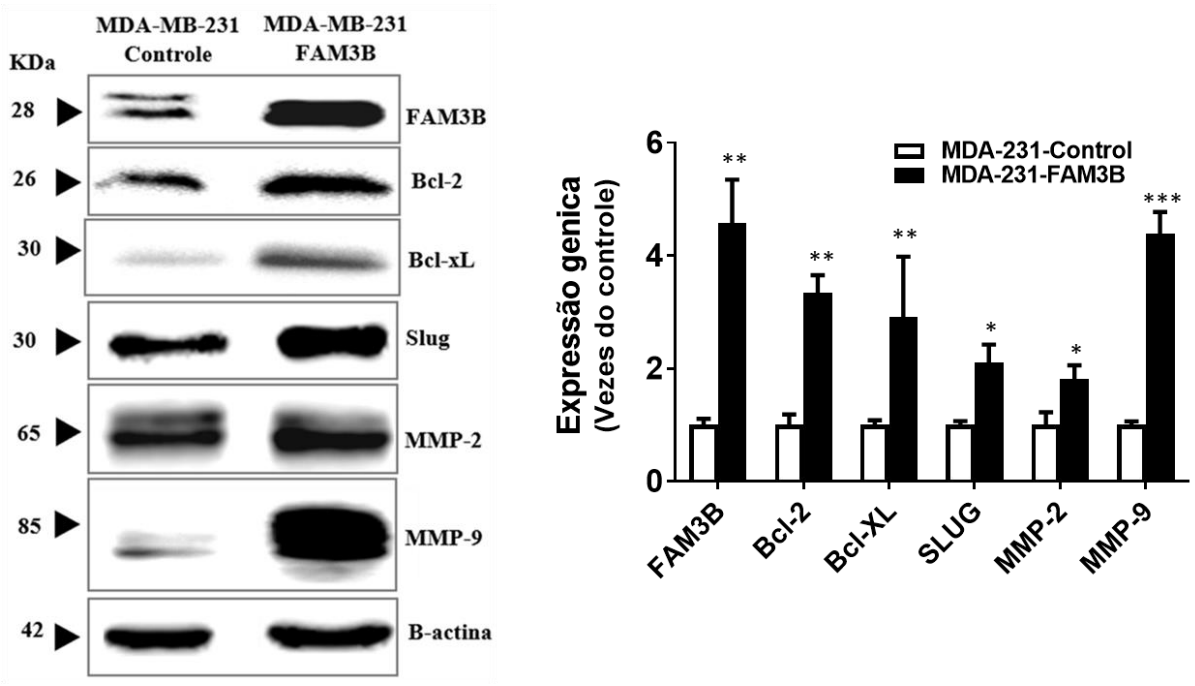


Figura 25. Análise da expressão gênica de genes envolvidos na metástase ao nível de proteína. As proteínas totais das células MDA-MB- 231-FAM3B e controle foram extraídas por lise com detergentes não-desnaturantes e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS. Em seguida, foram transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueadas com leite e incubadas com os anticorpos primários para Slug, MMP-2, MMP9 e β-actina. A revelação foi feita usando a enzima estreptavidina-peroxidase pelo método quimioluminiscente. A normalização da expressão de Slug, MMP-2 e MMP-9 foi realizada, em todos os casos, considerando a expressão das proteínas β-actina. Como observado, houve um aumento na expressão de Bcl-2, Bcl-xL,Slug, MMP-2 e MMP-9 ao nível de proteína nas células com superexpressão de FAM3B, em relação ao grupo controle. Os resultados são expressos como média ± erro padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; ***$p<0,0001$.

5.8. Superexpressão de FAM3B em células MCF-7 promove fragmentação de E-caderina

A quantificação da expressão dos genes envolvidos na metástase Slug e E-caderina foi verificado ao nível de proteína através da técnica de Western blot. Foram observados 2 fragmentos de E-caderina nas células MCF-7 com superexpressão de FAM3B. O fragmento-2 entre 38-50 kDa e o fragmento-1 de 38 kDa sugerem possível clivagem da E-caderina, possivelmente mediada pelas ações do aumento da expressão de FAM3B. Não foi possível observar diferenças significativas na expressão da proteína Slug em ambos os grupos (Figura 26).

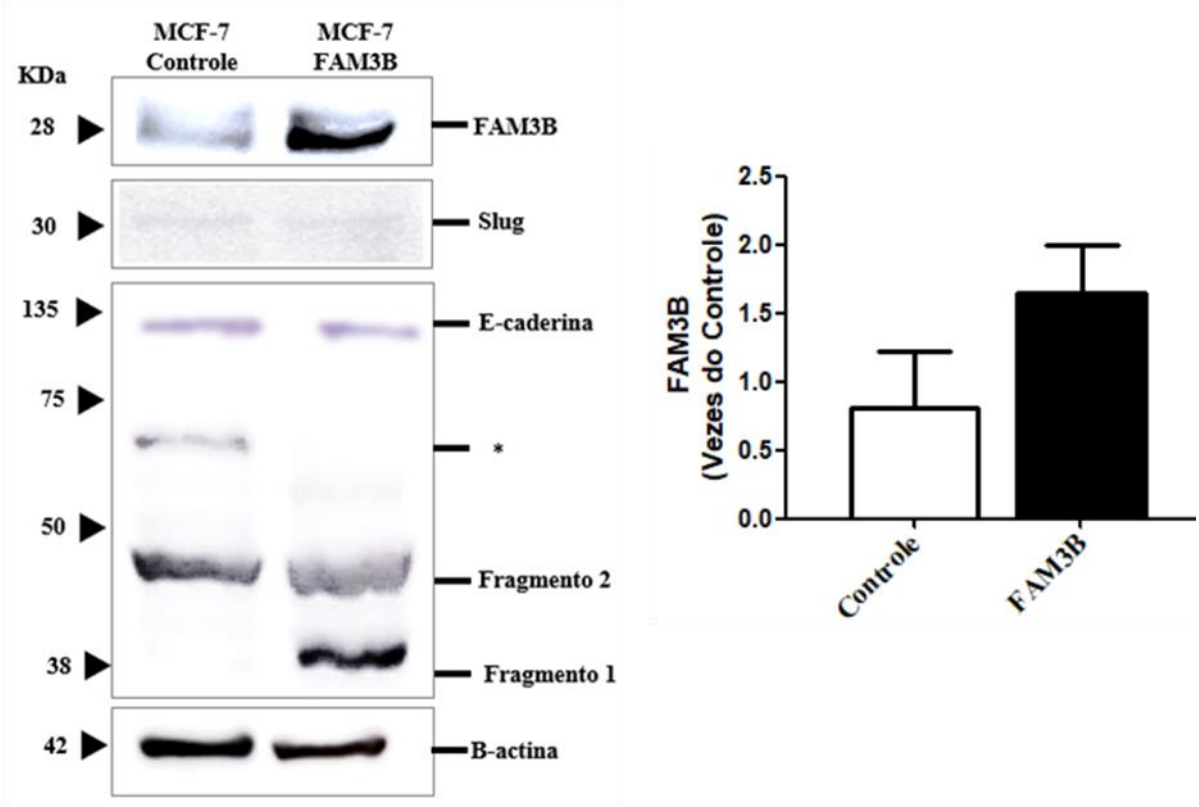


Figura 26. Análise da expressão gênica de genes envolvidos na metástase ao nível de proteína. As proteínas totais das células MCF-7-FAM3B e Controle foram extraídas por lise com detergentes não-desnaturantes e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS. Em seguida, foram transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueadas com leite e incubadas com os anticorpos primários para FAM3B, Slug, E-caderina e β-actina. A revelação foi feita usando a enzima estreptavidina-peroxidase pelo método quimioluminiscente. A normalização da expressão de FAM3B, Slug e E-caderina foi realizada, em todos os casos, considerando a expressão das proteínas β-actina. Como observado, houve uma possível clivagem da proteína E-caderina nas células com superexpressão de FAM3B. Não foram observadas diferenças na expressão da proteína Slug em ambos os grupos. Os resultados são expressos como média ± erro padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student.

6. DISCUSSÃO

A hipótese de que o FAM3B teria um papel importante no desenvolvimento de tumores tem se confirmado a partir de muitos estudos que demonstraram as funções do FAM3B na proteção contra apoptose, nos processos de migração e metástase em células de carcinoma de cólon, células tumorais escamosas de esôfago, câncer gástrico e, finalmente, dados do nosso grupo que revelaram os efeitos protetores do FAM3B contra a morte celular programada em células tumorais da próstata (DU145) e da mama (MDA-MB-231) (53-55, 57, 59).

Nossos dados da superexpressão do FAM3B, demonstraram o efeito anti-apoptótico desta proteína nas células de tumor de próstata da linhagem DU145, com ativação das vias que envolvem os genes Bcl-2 e Bcl-xL, bem como a inativação parcial das caspases 3 e 9. A principal consequência deste efeito *in vivo* é o crescimento tumoral em animais xenotransplantados (57).

Da mesma forma, demonstramos o envolvimento do FAM3B na proteção à morte celular em células tumorais da mama MDA-MB-231. Após tratamento com diferentes indutores de morte celular, como TNF-α + cicloheximida, estaurosporina e peróxido de hidrogênio observamos aumento da viabilidade celular e menor número de núcleos subdiploides (menor taxa de fragmentação nuclear) nas células com superexpressão de FAM3B. Foi demonstrado que a expressão de FAM3B foi capaz de conferir proteção à morte celular via aumento de Bcl-2 e Bcl-xL, assim como diminuição da expressão de Bax e atividade de caspase 3. Em nossos estudos *in vivo* também foram observados indícios sobre possíveis efeitos da FAM3B no aumento da invasão e migração celular (59). Estes achados, justificaram a elaboração da hipótese que FAM3B estaria envolvida na progressão tumoral também pela indução de mecanismos associados a metástase, como a EMT.

A análise de padrões de expressão *in sílico* em pacientes com câncer de mama (BRCA) nas bases de dados públicas, principalmente a TGCA, usando ferramentas de bioinformática, nos permitiu verificar que não existe um aumento/diminuição significativa entre as mais de 1000 amostras de pacientes provenientes de vários estudos, com exceção do estágio menos avançado e em tumores triplo negativos (Fig. 9). Contudo, essas diferenças se perdem quando analisamos amostras pareadas, em que o controle do tumor do paciente é o seu próprio tecido não-tumoral (normal), resultado mais confiável e preciso (Fig. 10). Um dos grandes problemas para as duas formas de análise é a pouca quantidade de amostras em estágios mais avançados, inclusive, os tumores triplo-negativo ou *basal-like*, os quais pressupomos uma maior diferença

da expressão de FAM3B com base em estudos de expressão gênica realizados preliminarmente no nosso laboratório (dados não mostrados).

Nos estudos de correlação (Fig. 11-18) observamos diferentes padrões de expressão e correlação de FAM3B com outros genes associados a câncer de mama e EMT, dependendo do estágio da doença. Mostrou-se evidente uma relação oposta de FAM3B e alguns genes como DNAJA4 e BCL2, dependendo do estágio. Dessa forma, ambos os genes se correlacionam positivamente com FAM3B em estágios mais avançados e em tumores triplo-negativos, o que corrobora nossos resultados com células MDA-MB-231-FAM3B, que apresentam aumento de Bcl-2 (59). Considerando todos os estágios e subtipos, existe uma consistência da correlação positiva de FAM3B com TMPRSS2, FAM3D, MDM2, DST e PALB2, sendo estes 3 últimos genes associados ao prognóstico negativo do câncer de mama. Além disso, é evidente uma correlação negativa consistente com VIM (vimentina), MMP-2, MMP-9 e SNAI1 (Snail), marcadores clássicos da EMT.

Em síntese, apesar dos resultados não serem conclusivos podemos apontar que as análises de expressão usando ferramentas de bioinformática sugerem que exista uma regulação diferente de FAM3B, dependendo do estágio e do subtipo tumoral sendo associado, aparentemente, a padrões antitumorais nos primeiros estágios da doença e subtipos menos agressivos (hormônio-responsivos) e a padrões mais metastáticos nos estágios mais avançados e subtipos mais agressivos (triplo negativo/*basal-like*) nos quais, infelizmente, existe uma baixa representatividade nas amostras disponíveis no TGCA. Desta forma, consideramos conveniente responder esta questão usando modelos celulares.

A análise de expressão gênica de FAM3B nas diferentes linhagens de câncer de mama disponíveis no nosso laboratório (Fig. 19) nos permitiu escolher as linhagens com menos expressão de FAM3B. Assim, nos dedicamos a estudar os mecanismos celulares e moleculares ativados por FAM3B, em células das linhagens tumorais da mama MDA-MB-231 (triplo negativo) e MCF-7 (hormônio-responsiva ou luminal *plus* Her2+) utilizando o modelo de superexpressão *in vitro.* A partir da transfecção do FAM3B com vetor comercial pcDNA, obtivemos células MDA-MB-231-FAM3B e MDA-MB-231-controle e MCF-7-FAM3B e MCF-7-controle, com a superexpressão confirmada através de qPCR e Western blot (Figura 20). Foi obtido um elevado aumento na expressão de FAM3B na linhagem MDA-MB-231 e discreto na linhagem MCF-7, o que representa uma limitação na comparação da expressão desta citocina em ambas as linhagens.

Com estas células, inicialmente, foram realizados ensaios celulares para mensuração do comportamento migratório. No ensaio de migração (fechamento de feridas ou *Wound healing assay)*, foi observado que as células MDA-MB-231-FAM3B, apresentaram um aumento expressivo da taxa de fechamento da ferida com, aproximadamente, 30% de diminuição da área aberta, em 24 h (Fig. 21). Na ausência de soro, as células preencheram quase totalmente (em alguns poços a ferida foi completamente fechada) o espaço que se assemelha com uma "ferida", além de morfologicamente terem adquirido algumas diferenças visíveis. É possível que estas células tenham tido um incremento na sua capacidade migratória, a partir da contratilidade do seu citoesqueleto, com consequente adoção da aparência fusiforme observada. Há também a possibilidade, de que assim como em muitos tumores, as células com a superexpressão do FAM3B tenham aumento das suas taxas de migração celular em um modelo de filopódios ricos em actina e pobres na sua interação com o substrato, em um tipo migratório também conhecido como migração mesenquimal (71).

Da mesma forma, foi observado o aumento do potencial migratório nas células MCF-7 com superexpressão do FAM3B, as quais após 72h apresentaram, aproximadamente, 70% de fechamento da lacuna, enquanto as células MCF-7-controle apresentaram apenas uma taxa aproximada de 42% de redução da área aberta. Foi possível observar, uma redução de cerca de 28% do espaço aberto, mediante a superexpressão do FAM3B em 48h, sugerindo uma maior taxa de migração celular mediada por FAM3B (Fig. 22)

Os dados de migração com ambas as linhagens corroboram o que havia sido observado previamente *in vitro e in vivo*, quando notamos nas imagens obtidas no tomógrafo (*IVIS Spectrum)* células MDA-231-FAM3B marcadas com luciferase, possivelmente, migrando e se espalhando mais dentro dos camundongos, sugerindo incremento na capacidade migratória estimulada pelo FAM3B (Fig. 7) (59).

A fim de investigar os possíveis mecanismos nos efeitos celulares relatados, foi avaliada a expressão de genes já estabelecidos como um dos principais envolvidos em processos de EMT. No entanto, além da investigação das vias de sinalização relacionadas, buscou-se também analisar quais seriam os efeitos do FAM3B em células tumorais com características moleculares diferentes, uma vez que sabidamente as células MCF-7 são positivas para RP, RE e HER2 e as células MDA-MB-231, consideradas provenientes de um tumor mais agressivo, não expressam nenhum destes marcadores (66, 67).

Em um primeiro momento, observamos que células MDA-MB-231 com a superexpressão de FAM3B, apresentaram um aumento na expressão de membros da família Snail, SNAIL1 (Snail) e SNAIL2 (Slug) (Fig. 23). Ambos são fatores de transcrição com expressão aumentada

em tumores com pouca diferenciação e conhecidos repressores transcricionais de moléculas de adesão celular expresso por células epiteliais como a E-caderina, cuja expressão estava discretamente menor em células com aumento do FAM3B. Por outro lado, este aumento de expressão de Slug em células MDA-MB-231-FAM3B foi confirmado ao nível de proteína (Fig. 25). No entanto, a expressão de Snail não pôde ser confirmada ao nível de proteína, possivelmente, em decorrência da perda de especificidade do nosso anticorpo (dados não mostrados). Slug é considerado um marcador de prognóstico ruim, contribuindo para diminuição da expressão de moléculas de adesão celular como a E-caderina e JAM, por consequência, propiciando metástases para linfonodos circundantes (54). Além disso, um dos principais resultados de células que passam por EMT é a expressão de fatores, como o Slug (8, 12). Estes dados relacionam-se com os dados obtidos com células tumorais de adenocarcinoma de cólon, em que foi reportado que a expressão de FAM3B é acompanhada do aumento da expressão de Slug e Snail (54).

Nossos dados de expressão gênica mostraram que as células MCF-7-FAM3B apresentam um aumento de expressão de Snail e Slug ao nível de mRNA em relação ao grupo controle, reforçando a hipótese de que FAM3B também está associada a expressão de marcadores de EMT em linhagens mais diferenciadas e menos agressivas (Fig. 24). Contudo, diferente do que foi observado em MDA-231, não foram confirmadas as diferenças na expressão de Snail (pelos motivos já explicitados) nem da proteína Slug, provavelmente, devido aos níveis de expressão algumas vezes indetectáveis por western blot na linhagem MCF-7 (Fig. 26) (86).

Por outro lado, observamos em células MDA-MB-231 com superexpressão de FAM3B um aumento na expressão das metaloproteinases MMP-2 e MMP-14 (Fig. 23). A expressão de MMP-2 foi confirmada ao nível de proteína (Fig. 25). As metaloproteinases são enzimas envolvidas na degradação e remodelação da MEC, que colaboram com a migração de células tumorais e invasão na metástase. Contudo, tem sido descrito na literatura de que além das ações diretas exercidas pelas MMPs na MEC, que existe uma regulação própria entre elas e muitos fatores de transcrição envolvidos na EMT. Nesta regulação, por exemplo, quanto maior a expressão de MMP-9 maior a expressão de Snail. Neste sentido, tanto é possível que o FAM3B aumente a expressão de Slug e Snail através de moléculas intermediárias encontradas no citoplasma das células tumorais e que este aumento estimularia a transcrição das MMPs, quanto que o FAM3B também promova o aumento das MMPs que vão regular positivamente estes mesmos fatores, responsáveis por coordenar os sinais nucleares envolvidos na metástase (14, 87).

De formas conectadas e/ou independentes o que se espera é que o aumento de Snail, Slug e MMPs reforcem a capacidade migratória das células, já que todos são repressores de E-caderina, marcador de célula epitelial, enquanto que a MMP-2 e -9 têm sido associadas à proteólise de E-caderina (14, 87). No entanto, outros repressores transcricionais de E-caderina, como Twist, Zeb-1/-2 não tiveram diferenças significativas na sua expressão em células MDA-MB-231-FAM3B.

Além disso, de encontro com nossos dados prévios, o Bcl-2 também parece influenciar nos níveis das metaloproteinases, fato demonstrado por outros estudos em células de glioma com aumento de MMP-3, MMP-12 , assim como em linhagens tumorais da mama, em que também foi verificado um aumento significativo em MMP-2 e MMP-9 (88).

Outros envolvidos nas vias da EMT analisados foram os receptores de TGF-β, o TGFRB-1 e -2. Estes receptores têm atividade serina/treonina e tirosina quinase que interagem não apenas com o próprio TGF-β, mas também com muitas outras proteínas. No câncer é considerado que o TGF-β tem um papel duplo dependendo do tumor, visto que em estágios iniciais pode reduzir a proliferação celular e levar as células tumorais à apoptose, o que é oposto ao papel do TGF-β em tumores em estágios mais avançados, em que promove aumento da proliferação, migração e invasividade celular (89-91).

A respeito do TGFBR-1 não foram identificadas diferenças de expressão entre as células MDA-MB-231 FAM3B e controle, mas os dados obtidos na quantificação da expressão ao nível de mRNA, evidenciaram um aumento significativo de TFGBR-2 nas células MDA-MB-231-FAM3B.

TGFBR-2 é uma quinase constitutivamente ativa independente de ligação ao ligante, que se auto fosforila, assim como é fosforilado por diversas quinases celulares e promove fosforilação de TGFBR-1 e outros receptores. Em relação ao câncer de mama algumas evidências apontam para o fato de que o TGFBR-2 aumenta agressividade de tumores em estágios mais avançados, está relacionado à focos de metástase pulmonar e a um prognóstico ruim em tumores de mama (91-94).

Considerando que a sinalização dos receptores de TGF-β, inclui tanto a via canônica na qual há fosforilação das SMADS -2/ -3 quanto a via não canônica com ativação de p38, JNK, Erk, PI3K-Akt, GTPases (RhoA, cdc 42), envolvidas na progressão tumoral é possível que o aumento da expressão que foi observado tenha relação com ação parácrina do FAM3B, que poderia induzir aumento da transcrição de TGFBR2, contribuindo, também via TGFBR2 com a EMT em tumores de mama mais agressivos (13, 90, 91).

Tentando estabelecer uma relação com nossos dados prévios com câncer de mama ainda não publicados, também hipotetizamos que o aumento de expressão dos genes Bcl-2 e Bcl-xL, tanto ao nível de mRNA, quanto ao nível de proteína nas células que superexpressam FAM3B, poderiam estar relacionadas com a expressão de Slug, MMP-2 e MMP-9 aumentando o potencial migratório, além de inibir a morte celular programada. Neste sentido já foi demonstrado que o Bcl-xL pode estar associado à indução de metástase (59, 60, 88).

Alguns trabalhos relataram que em células tumorais da mama do tipo luminal (MCF-7 RE +) e basal (HCC1954 HER2 +) e em células tumorais neuroendócrinas pancreáticas (panNET), assim como em modelos animais, o Bcl-xL nuclear e não citoplasmático ou mitocondrial, parece ser capaz de promover a secreção de TGF-β, fator que induziria inibição da adesão celular com degradação da matriz extracelular, indução de imunossupressão e angiogênese. Foi sugerido, que o Bcl-xL, parece contribuir de forma autócrina e parácrina, com a metástase, levando as células à EMT. Além disso, foi verificado que a superexpressão de Bcl-xL, ou a utilização de mutantes com problemas na oligomerização de *Bax* e *Bak*, não alterava as taxas de apoptose, quando esta era induzida. Os modelos de superexpressão de Bcl-xL revelaram aumento da invasividade de células de glioma e tumorais da mama, promovendo aumento da invasão local do estroma e de metástases nodais, em neoplasias mamárias (95). Em células tumorais de pulmão o aumento Bcl-xL foi associado à EMT, enquanto a diminuição da sua expressão pareceu promover redução das taxas de migração em células de carcinoma colorretal (96, 97).

Parece ser possível que o aumento do potencial migratório, esteja diretamente relacionado com o fato das células MDA-MB-231 estarem passando por EMT, devido ao aumento da expressão de FAM3B, que em termos estruturais é muito semelhante a outro membro da família FAM3, o FAM3C/ILEI, envolvido em processos como este (44, 98).

Ademais, observamos nas células MCF-7-FAM3B um possível fragmentos da E-caderina, o “fragmento 1”, com cerca de 38 KDa que sugere clivagem da proteína em células com superexpressão do FAM3B (Figura 15). A proteína E-caderina pertencente à família das caderinas e depende da sua integridade estrutural para formar dímeros laterais no seu domínio extracelular e se conectar com a actina do citoesqueleto através das cateninas no seu domínio intracelular, para formar as conexões célula-célula que compõe o epitélio. Desta forma, a proteólise da E-caderina está diretamente relacionada à perda das adesões entre as células epiteliais, o que parece ocorrer em alguns processos patológicos em que há aumento na expressão de MMPs e/ou ADAMs, com redução na expressão de inibidores naturais destas proteases (TIMPs) (99).

Contudo, os eventos que levam à fragmentação da E-caderina e sua eventual perda também foram demonstrados na apoptose de células epiteliais, em que foram observados fragmentos de 24 KDa, 29 KDa, 84 KDa e 88 KDa desta proteína. O primeiro fragmento de 24 KDa que surgiu após a indução da apoptose, foi identificado como resultado da atividade proteolítica das caspases -3 e -7. No entanto, foi sugerido que os demais fragmentos de 29-88 KDa tenham sido resultado da ação das MMPs. Foi relatado que durante a apoptose a ação das caspases resultariam na proteólise do domínio intracelular da E-caderina que faz conexão com a actina do citoesqueleto e que a fraca adesão extracelular resultante do processo é por fim corrompida com a ação das MMPs, que parecem finalizar o processo com a fragmentação do domínio extracelular, responsável pelas adesões célula-célula (100).

Em outro contexto, com hepatócitos que sofreram lesão após isquemia e reperfusão, o que leva à morte celular programada, foi descrito a liberação de outro fragmento de E-caderina de 38 kDa, apontado como resultado da degradação de E-caderina por enzimas proteolíticas como ADAM-10 (101).

É possível que o fragmento de 38 kDa de E-caderina observados neste trabalho em células MCF-FAM3B tenham relação com morte celular, o que nós ainda não exploramos nesta linhagem. Entretanto, nossa análise de expressão gênica não demonstrou diferenças na expressão de genes da família Bcl-2, envolvidos na apoptose. São necessárias investigações futuras para esta confirmação e para determinar qual seria o evento envolvido nesta clivagem, que pode ser tanto relacionado ao aumento da apoptose em tumores menos agressivos, neste modelo representado pelas células MCF-7 - em que a apoptose não foi explorada - quanto início da metástase, em que para migrar as células precisam perder suas conexões e remodelar a MEC.

7. CONCLUSÕES

Em síntese, a partir dos dados obtidos descritos até o momento, é possível concluirmos que:

1) A expressão aumentada de FAM3B interfere nos processos de progressão tumoral de formas diferentes em ambas as linhagens estudadas, compartilhando alguns aspectos em comum associados ao aumento da EMT;

2) Especificamente na linhagem tumoral triplo negativa MDA-231, FAM3B aumenta a progressão tumoral por meio da inibição da apoptose e aumenta a migração celular, o que explicaria, em parte, o aumento da massa tumoral, o incremento da invasão tumoral local e a promoção de metástases a distância observadas *in vivo*. Estes processos pró-metastáticos induzidos pelo FAM3B estariam mediados pelo aumento da expressão de moléculas associadas a EMT (Snail, Slug, N-caderina) com possível ativação da via do TGF-β (TGFBR2) e das metaloproteinases associadas a degradação da matriz extracelular (MMP-2, MMP-9 e MMP-14). O aumento de Bcl-2 e Bcl-X_L sugere que estas moléculas participem dos processos pró-metastáticos – além da inibição de apoptose – provavelmente associadas a sinalização de TGF-β (Figura 27);

3) Na linhagem hormônio-responsiva - e menos agressiva - MCF-7 com expressão aumentada de FAM3B foi observado um aumento discreto da migração celular associado, provavelmente, ao aumento da expressão de Snail e Slug e a clivagem da E-caderina, sem ativação significativa de outros genes associados a EMT. Adicionalmente, não foi verificado aumento de expressão das proteínas anti-apoptoticas da família das Bcl-2;

4) Os dados de expressão gênica de FAM3B analisados nas bases de dados públicas usando ferramentas de bioinformática, embora não conclusivos, permitem sugerir que FAM3B tenha mecanismos de regulação da expressão gênica diferentes dependendo do subtipo tumoral e do estágio da doença, reforçando o caráter pleiotrópico desta citocina no contexto do câncer de mama.

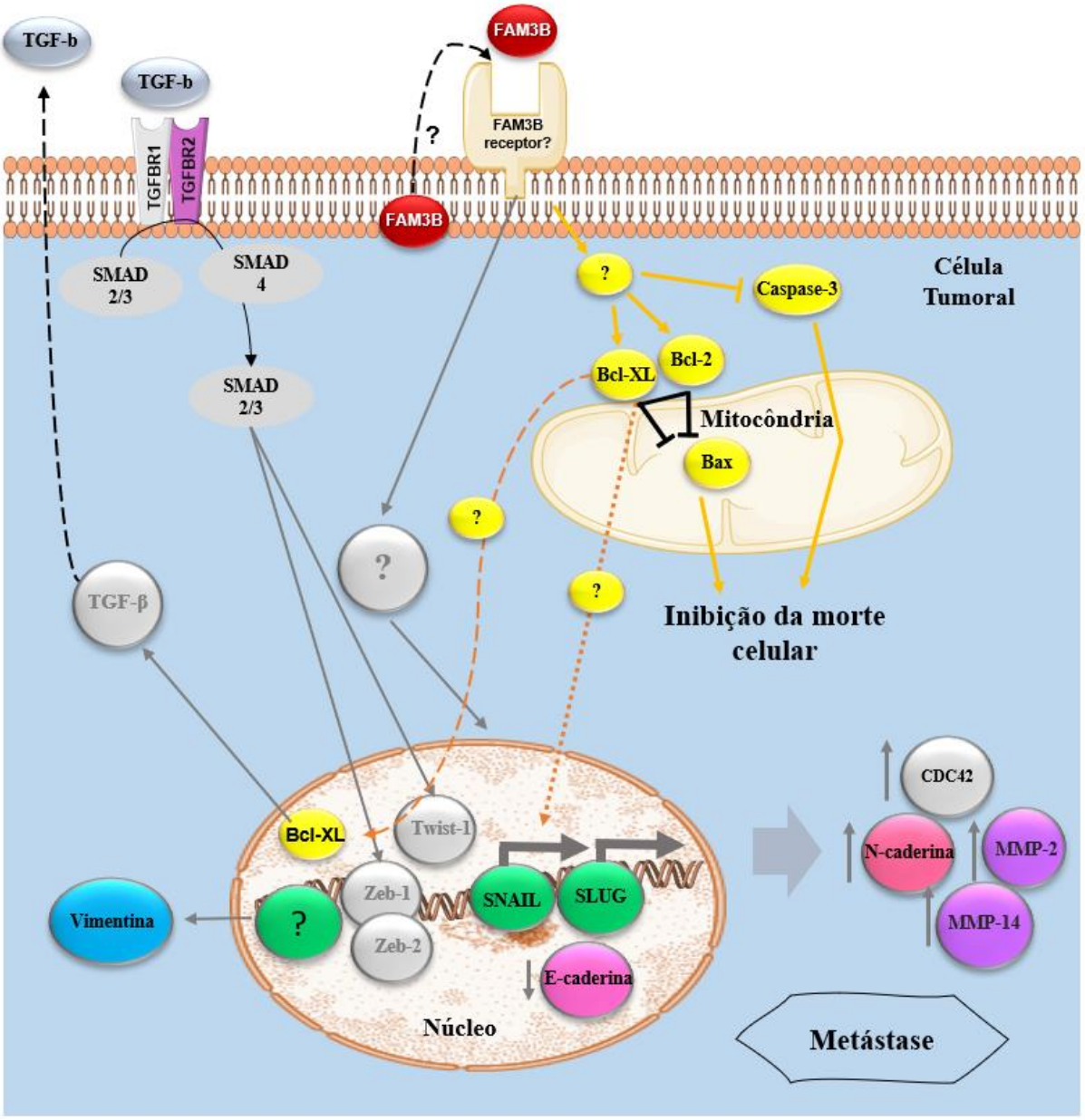


Figura 27. Mecanismos de sinalização do FAM3B observados nas linhagens de câncer de mama. O aumento da expressão de FAM3B em células tumorais da mama foi capaz conferir proteção contra morte celular induzida, em conjunto com o aumento dos níveis das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL, acompanhado da redução da expressão de Bax e inibição de caspase -3. É possível que estas proteínas façam conexões com vias de sinalização da metástase, através da sinalização do TGF-β. É possível que a ação autócrina e/ou parácrina de FAM3B promova a ativação da via do TGF-β, assim como a ativação de fatores de transcrição como Snail, Slug envolvidos na redução da expressão de marcadores epiteliais como E-caderina e aumento da expressão de N-caderina acompanhado pelo aumento da expressão das metaloproteinases MMP-2, MMP-9 e MMP-14 envolvidas na degradação de matriz extracelular, sabidamente envolvidas na progressão metastática do câncer de mama. **Partes da figura foram desenhadas utilizando imagens do *Servier Medical Art. Servier. Medical Art by Servier* é licenciado sob uma licença da Creative Commons Attribution 3.0 unported.**

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA) José Alencar Gomes da Silva. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 4 ed. Rio de Janeiro:2018.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209-49.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil.: Rio de Janeiro 2019.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74.
5. Vincent T. DeVita TSL, Steven A. Rosenberg. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology: Tenth Edition: Wolters Kluwer Health Adis (ESP); 2015.
6. Warburg O WF, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. The Journal of General Physiology. 1926:519-30.
7. Ocana MC, Martinez-Poveda B, Quesada AR, Medina MA. Metabolism within the tumor microenvironment and its implication on cancer progression: An ongoing therapeutic target. Med Res Rev. 2019;39(1):70-113.
8. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. Cell. 2017;168(4):670-91.
9. Ganesh K, Massague J. Targeting metastatic cancer. Nat Med. 2021;27(1):34-44.
10. Suhail Y, Cain MP, Vanaja K, Kurywchak PA, Levchenko A, Kalluri R, et al. Systems Biology of Cancer Metastasis. Cell Syst. 2019;9(2):109-27.
11. Marcucci F, Stassi G, De Maria R. Epithelial-mesenchymal transition: a new target in anticancer drug discovery. Nat Rev Drug Discov. 2016;15(5):311-25.
12. Pulkka OP, Nilsson B, Sarlomo-Rikala M, Reichardt P, Eriksson M, Hall KS, et al. SLUG transcription factor: a pro-survival and prognostic factor in gastrointestinal stromal tumour. Br J Cancer. 2017;116(9):1195-202.
13. Yastrebova MA, Khamidullina AI, Tatarskiy VV, Scherbakov AM. Snail-Family Proteins: Role in Carcinogenesis and Prospects for Antitumor Therapy. Acta Naturae. 2021;13(1):76-90.
14. Roy R, Morad G, Jedinak A, Moses MA. Metalloproteinases and their roles in human cancer. Anat Rec (Hoboken). 2020;303(6):1557-72.
15. Evette S. Radisky DCR. Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets. Frontiers in Bioscience. 2015.
16. Bolik J, Krause F, Stevanovic M, Gandrass M, Thomsen I, Schacht SS, et al. Inhibition of ADAM17 impairs endothelial cell necroptosis and blocks metastasis. J Exp Med. 2022;219(1).
17. Cominetti MR, Altei WF, Selistre-de-Araujo HS. Metastasis inhibition in breast cancer by targeting cancer cell extravasation. Breast Cancer (Dove Med Press). 2019;11:165-78.
18. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância – (Conprev). Falando sobre câncer de mama. Rio de Janeiro2002.
19. Gucalp A, Traina TA, Eisner JR, Parker JS, Selitsky SR, Park BH, et al. Male breast cancer: a disease distinct from female breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2019;173(1):37-48.
20. Norum JH, Andersen K, Sorlie T. Lessons learned from the intrinsic subtypes of breast cancer in the quest for precision therapy. Br J Surg. 2014;101(8):925-38.
21. Srivastava V, Huycke TR, Phong KT, Gartner ZJ. Organoid models for mammary gland dynamics and breast cancer. Curr Opin Cell Biol. 2020;66:51-8.
22. Dimri G, Band H, Band V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. Breast Cancer Res. 2005;7(4):171-9.
23. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação. Rio de Janeiro2019.
24. Ana Lucia Amaral Eisenberg SK. Câncer de mama: Marcadores Tumorais. Revista Brasileira de Cancerologia. 2001;4:377-88.

25. George W. Sledge EPM, Gabriel N. Hortobagyi, Harold J. Burstein, Pamela J. Goodwin, Antonio C. Wolff. Past, Present, and Future Challenges in Breast Cancer Treatment. Journal of Clinical Oncology. 2014;32:1979-86.
26. Loibl S, Poortmans P, Morrow M, Denkert C, Curigliano G. Breast cancer. The Lancet. 2021;397(10286):1750-69.
27. Magno Belém Cirqueira MARM, Leonardo Ribeiro Soares, Ruffo Freitas-Júnior. Subtipos moleculares do câncer de mama. FEMINA. 2011;39.
28. Allison KH. Molecular Testing in Breast Cancer. Diagnostic Molecular Pathology2017. p. 257-69.
29. Sining Chen GP. Meta-Analysis of BRCA1 and BRCA2 Penetrance. Journal of Clinical Oncology. 2007.
30. Machado VA. Desenvolvimento de instrumentos epidemiológicos para a pesquisa

do câncer de mama hereditário. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer (INCA); 2010.
31. Zhu Y, Xu G, Patel A, McLaughlin MM, Silverman C, Knecht K, et al. Cloning, expression, and initial characterization of a novel cytokine-like gene family. Genomics. 2002;80(2):144-50.
32. Yang J, Robert CE, Burkhardt BR, Young RA, Wu J, Gao Z, et al. Mechanisms of glucose-induced secretion of pancreatic-derived factor (PANDER or FAM3B) in pancreatic beta-cells. Diabetes. 2005;54(11):3217-28.
33. Cao X, Gao Z, Robert CE, Greene S, Xu G, Xu W, et al. Pancreatic-derived factor (FAM3B), a novel islet cytokine, induces apoptosis of insulin-secreting beta-cells. Diabetes. 2003;52(9):2296-303.
34. Wang O, Cai K, Pang S, Wang T, Qi D, Zhu Q, et al. Mechanisms of glucose-induced expression of pancreatic-derived factor in pancreatic beta-cells. Endocrinology. 2008;149(2):672-80.
35. Burkhardt BR, Yang MC, Robert CE, Greene SR, McFadden KK, Yang J, et al. Tissue-specific and glucose-responsive expression of the pancreatic derived factor (PANDER) promoter. Biochim Biophys Acta. 2005;1730(3):215-25.
36. Wilson CG, Robert-Cooperman CE, Burkhardt BR. PANcreatic-DERived factor: novel hormone PANDERing to glucose regulation. FEBS Lett. 2011;585(14):2137-43.
37. Robert-Cooperman CE, Dougan GC, Moak SL, Athanason MG, Kuehl MN, Bell-Temin H, et al. PANDER transgenic mice display fasting hyperglycemia and hepatic insulin resistance. J Endocrinol. 2014;220(3):219-31.
38. Robert-Cooperman CE, Carnegie JR, Wilson CG, Yang J, Cook JR, Wu J, et al. Targeted disruption of pancreatic-derived factor (PANDER, FAM3B) impairs pancreatic beta-cell function. Diabetes. 2010;59(9):2209-18.
39. Wang C, Guan Y, Yang J. Cytokines in the Progression of Pancreatic beta-Cell Dysfunction. Int J Endocrinol. 2010;2010:515136.
40. MarElia CB, Kuehl MN, Shemwell TA, Alman AC, Burkhardt BR. Circulating PANDER concentration is associated with increased HbA1c and fasting blood glucose in Type 2 diabetic subjects. J Clin Transl Endocrinol. 2018;11:26-30.
41. Wang H, Yu F, Zhang Z, Hou Y, Teng W, Shan Z, et al. Effects of circulating member B of the family with sequence similarity 3 on the risk of developing metabolic syndrome and its components: A 5-year prospective study. J Diabetes Investig. 2018;9(4):782-8.
42. Cao X, Yang C, Lai F, Hong Z, Lin H, Liu J, et al. Elevated circulating level of a cytokine, pancreatic-derived factor, is associated with metabolic syndrome components in a Chinese population. J Diabetes Investig. 2016;7(4):581-6.
43. Jichun Yang ZG, Claudia E. Robert, Brant R. Burkhardt, Helena Gaweska, Amary Wagner, Jianmei Wu, Scott R. Greene, Robert A. Young, and Bryan A. Wolf. Structure-Function Studies of PANDER, an Islet Specific Cytokine Inducing Cell Death of Insulin-Secreting â Cells. Biochemistry. 2015;44:11342-52.
44. Johansson P, Bernstrom J, Gorman T, Oster L, Backstrom S, Schweikart F, et al. FAM3B PANDER and FAM3C ILEI represent a distinct class of signaling molecules with a non-cytokine-like fold. Structure. 2013;21(2):306-13.

45. Gao ZH, Lu C, Wang ZN, Song YX, Zhu JL, Gao P, et al. ILEI: a novel marker for epithelial-mesenchymal transition and poor prognosis in colorectal cancer. Histopathology. 2014;65(4):527-38.
46. Kurzrock R. Cytokine deregulation in cancer. Biomed Pharmacother. 2011.
47. Shi M, Duan G, Nie S, Shen S, Zou X. Elevated FAM3C promotes cell epithelial- mesenchymal transition and cell migration in gastric cancer. Onco Targets Ther. 2018;11:8491-505.
48. Yang W, Feng B, Meng Y, Wang J, Geng B, Cui Q, et al. FAM3C-YY1 axis is essential for TGFbeta-promoted proliferation and migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells via the activation of HSF1. J Cell Mol Med. 2019;23(5):3464-75.
49. Yin S, Chen F, Ye P, Yang G. Overexpression of FAM3C protein as a novel biomarker for epithelial-mesenchymal transition and poor outcome in gastric cancer. Int J Clin Exp Pathol. 2018;11(8):4247-56.
50. Zhu Y, Pu Z, Wang G, Li Y, Wang Y, Li N, et al. FAM3C: an emerging biomarker and potential therapeutic target for cancer. Biomark Med. 2021;15(5):373-84.
51. Zhu YH, Zhang B, Li M, Huang P, Sun J, Fu J, et al. Prognostic significance of FAM3C in esophageal squamous cell carcinoma. Diagn Pathol. 2015;10:192.
52. Wu CC, Xiao Y, Li H, Mao L, Deng WW, Yu GT, et al. Overexpression of FAM3C is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. Pathol Res Pract. 2019;215(4):772-8.
53. Mou H, Li Z, Yao P, Zhuo S, Luan W, Deng B, et al. Knockdown of FAM3B triggers cell apoptosis through p53-dependent pathway. Int J Biochem Cell Biol. 2013;45(3):684-91.
54. Li Z, Mou H, Wang T, Xue J, Deng B, Qian L, et al. A non-secretory form of FAM3B promotes invasion and metastasis of human colon cancer cells by upregulating Slug expression. Cancer Lett. 2013;328(2):278-84.
55. He SL, Wang WP, Yang YS, Li EM, Xu LY, Chen LQ. FAM3B promotes progression of oesophageal carcinoma via regulating the AKT-MDM2-p53 signalling axis and the epithelial-mesenchymal transition. J Cell Mol Med. 2019;23(2):1375-85.
56. Song C, Duan C. Upregulation of FAM3B Promotes Cisplatin Resistance in Gastric Cancer by Inducing Epithelial-Mesenchymal Transition. Med Sci Monit. 2020;26:e921002.
57. Maciel-Silva P, Caldeira I, de Assis Santos I, Carreira ACO, Siqueira FR, Antonioli E, et al. FAM3B/PANDER inhibits cell death and increases prostate tumor growth by modulating the expression of Bcl-2 and Bcl-XL cell survival genes. BMC Cancer. 2018;18(1):90.
58. Shiiba M, Ishige S, Saito Y, Shimizu T, Minakawa Y, Kasamatsu A, et al. Down-regulated expression of family with sequence similarity 3, member B (FAM3B), in oral squamous cell carcinoma. Oral Science International. 2012;9(1):9-16.
59. Caldeira IDS. Papel da nova citocina FAM3B/PANDER na progressão tumoral em câncer de mama [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo (USP); 2016.
60. Um H-D. Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species. Oncotarget. 2015.
61. Barzaman K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalbolandi S, et al. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. Int Immunopharmacol. 2020;84:106535.
62. Deng M, Brägelmann J, Kryukov I, Saraiva-Agostinho N, Perner S. FirebrowseR: an R client to the Broad Institute's Firehose Pipeline. Database (Oxford). 2017;2017.
63. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. 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.
64. Chandrashekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, Patel H, Shovon AR, Athar M, et al. UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. Neoplasia. 2022;25:18-27.
65. Galili T, O'Callaghan A, Sidi J, Sievert C. heatmaply: an R package for creating interactive cluster heatmaps for online publishing. Bioinformatics. 2018;34(9):1600-2.
66. Brinkley BR, Beall PT, Wible LJ, Mace ML, Turner DS, Cailleau RM. Variations in cell form and cytoskeleton in human breast carcinoma cells in vitro. Cancer Res. 1980;40(9):3118-29.

67. Comsa S, Cimpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. Anticancer Res. 2015;35(6):3147-54.
68. Speirs DLHaV. Choosing the right cell line for breast cancer research. Breast Cancer Research. 2011.
69. Rae JM, Creighton CJ, Meck JM, Haddad BR, Johnson MD. MDA-MB-435 cells are derived from M14 melanoma cells--a loss for breast cancer, but a boon for melanoma research. Breast Cancer Res Treat. 2007;104(1):13-9.
70. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic acids research. 2001;29(9):e45.
71. Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschlager M, et al. In vitro cell migration and invasion assays. Mutat Res. 2013;752(1):10-24.
72. Geback T, Schulz MM, Koumoutsakos P, Detmar M. TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. Biotechniques. 2009;46(4):265-74.
73. Pohl S, Pervaiz S, Dharmarajan A, Agostino M. Gene expression analysis of heat-shock proteins and redox regulators reveals combinatorial prognostic markers in carcinomas of the gastrointestinal tract. Redox Biol. 2019;25:101060.
74. Wang Z, Wang Y, Zhang J, Hu Q, Zhi F, Zhang S, et al. Significance of the TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer. Mol Med Rep. 2017;16(4):5450-8.
75. Qiu X, Li X, Yan Y, Cai Y, Liang Q, Peng B, et al. Identification of m6A-Associated Gene DST as a Prognostic and Immune-Associated Biomarker in Breast Cancer Patients. Int J Gen Med. 2022;15:523-34.
76. Liang W, Peng X, Li Q, Wang P, Lv P, Song Q, et al. FAM3D is essential for colon homeostasis and host defense against inflammation associated carcinogenesis. Nat Commun. 2020;11(1):5912.
77. Aljohani AI, Joseph C, Kurozumi S, Mohammed OJ, Miligy IM, Green AR, et al. Myxovirus resistance 1 (MX1) is an independent predictor of poor outcome in invasive breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2020;181(3):541-51.
78. Wu S, Zhou J, Zhang K, Chen H, Luo M, Lu Y, et al. Molecular Mechanisms of PALB2 Function and Its Role in Breast Cancer Management. Front Oncol. 2020;10:301.
79. Lipponen P, Pietiläinen T, Kosma VM, Aaltomaa S, Eskelinen M, Syrjänen K. Apoptosis suppressing protein bcl-2 is expressed in well-differentiated breast carcinomas with favourable prognosis. J Pathol. 1995;177(1):49-55.
80. Campbell KJ, Dhayade S, Ferrari N, Sims AH, Johnson E, Mason SM, et al. MCL-1 is a prognostic indicator and drug target in breast cancer. Cell Death Dis. 2018;9(2):19.
81. Young AI, Law AM, Castillo L, Chong S, Cullen HD, Koehler M, et al. MCL-1 inhibition provides a new way to suppress breast cancer metastasis and increase sensitivity to dasatinib. Breast Cancer Res. 2016;18(1):125.
82. Yousef EM, Tahir MR, St-Pierre Y, Gaboury LA. MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer. BMC Cancer. 2014;14:609.
83. Kim GC, Lee CG, Verma R, Rudra D, Kim T, Kang K, et al. ETS1 Suppresses Tumorigenesis of Human Breast Cancer via Trans-Activation of Canonical Tumor Suppressor Genes. Front Oncol. 2020;10:642.
84. Qu Y, Gao N, Wu T. Expression and clinical significance of SYNE1 and MAGI2 gene promoter methylation in gastric cancer. Medicine (Baltimore). 2021;100(4):e23788.
85. Wiegmans AP, Al-Ejeh F, Chee N, Yap PY, Gorski JJ, Da Silva L, et al. Rad51 supports triple negative breast cancer metastasis. Oncotarget. 2014;5(10):3261-72.
86. Smith BN, Burton LJ, Henderson V, Randle DD, Morton DJ, Smith BA, et al. Snail promotes epithelial mesenchymal transition in breast cancer cells in part via activation of nuclear ERK2. PLoS One. 2014;9(8):e104987.
87. Cowden Dahl KD, Symowicz J, Ning Y, Gutierrez E, Fishman DA, Adley BP, et al. Matrix metalloproteinase 9 is a mediator of epidermal growth factor-dependent e-cadherin loss in ovarian carcinoma cells. Cancer Res. 2008;68(12):4606-13.

88. Wolfgang Wicka SW, Siglinde Kerkaub, Johannes Dichgansa, Joërg C. Tonnb, Michael Wellera. BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. FEBS Letters. 1998:419-24.
89. Moses H, Barcellos-Hoff MH. TGF-beta biology in mammary development and breast cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011;3(1):a003277.
90. Ikushima H, Miyazono K. Biology of transforming growth factor-beta signaling. Curr Pharm Biotechnol. 2011;12(12):2099-107.
91. Vander Ark A, Cao J, Li X. TGF-beta receptors: In and beyond TGF-beta signaling. Cell Signal. 2018;52:112-20.
92. Bai F, Wang C, Liu X, Hollern D, Liu S, Fan C, et al. Loss of function of BRCA1 promotes EMT in mammary tumors through activation of TGFbetaR2 signaling pathway. Cell Death Dis. 2022;13(3):195.
93. Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, et al. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. Cell. 2008;133(1):66-77.
94. Buck MB, Fritz P, Dippon J, Zugmaier G, Knabbe C. Prognostic significance of transforming growth factor beta receptor II in estrogen receptor-negative breast cancer patients. Clin Cancer Res. 2004;10(2):491-8.
95. Nuria Rubio LE, Yolanda Fernández, Jerónimo Blanco, Angels Sierra. Metastatic Behavior of Human Breast Carcinomas Overexpressing the Bcl-xL Gene: A Role in Dormancy and Organospecificity. Laboratory Investigation. 2001;81.
96. Choi S, Chen Z, Tang LH, Fang Y, Shin SJ, Panarelli NC, et al. Bcl-xL promotes metastasis independent of its anti-apoptotic activity. Nat Commun. 2016;7:10384.
97. Scherr AL, Gdynia G, Salou M, Radhakrishnan P, Duglova K, Heller A, et al. Bcl-xL is an oncogenic driver in colorectal cancer. Cell Death Dis. 2016;7(8):e2342.
98. Waerner T, Alacakaptan M, Tamir I, Oberauer R, Gal A, Brabletz T, et al. ILEI: a cytokine essential for EMT, tumor formation, and late events in metastasis in epithelial cells. Cancer Cell. 2006;10(3):227-39.
99. Gonzalez-Avila G, Sommer B, Garcia-Hernandez AA, Ramos C. Matrix Metalloproteinases' Role in Tumor Microenvironment. Adv Exp Med Biol. 2020;1245:97-131.
100. Steinhusen U, Weiske J, Badock V, Tauber R, Bommert K, Huber O. Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. J Biol Chem. 2001;276(7):4972-80.
101. Fujii T, Duarte S, Lee E, Ke B, Busuttil RW, Coito AJ. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3 Deficiency Disrupts the Hepatocyte E-Cadherin/beta-Catenin Complex and Induces Cell Death in Liver Ischemia/Reperfusion Injury. Liver Transpl. 2020;26(1):113-26.

ANEXO I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **13** nas fls. **15** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Jose Ernesto Belizário,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Avaliação da Atividade Apoptótica da Nova Citocina PANDER-FAM3B em Linhagens Tumorais de Mama*" do qual participam o(s) aluno(s) **Izabela Daniel Sardinha Caldeira** e o pesquisador **Humberto Miguel Garay Malpartida,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **27.03.2014, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 27 de março de 2014.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

ANEXO II

TABELA. Correlações calculadas entre o FAM3B e 57 genes associados a câncer de mama e EMT de acordo aos estágios da doença

	Estágio I		Estágio II		Estágio III	
Gene	**r**	**p-value**	**r**	**p-value**	**r**	**p-value**
ATM	-0,0918	0,7085	0,0341	0,8012	-0,2639	0,2477
BACH1	-0,0048	0,9844	0,0920	0,4962	-0,0328	0,8878
BAX	0,2195	0,3665	-0,1156	0,3918	0,1962	0,3941
BCL2	0,1217	0,6196	0,0289	0,8309	-0,4662	0,0332
BIRC2	-0,0742	0,7628	0,0131	0,9227	-0,0298	0,8978
BRCA1	-0,0645	0,7932	-0,0082	0,9518	0,0548	0,8134
BRCA2	-0,0015	0,9950	0,0965	0,4753	0,1979	0,3899
BRIP1	-0,0463	0,8507	0,0665	0,6232	0,2245	0,3278
CDC42	-0,2022	0,4064	-0,2024	0,1311	-0,2312	0,3134
CDH1	0,3846	0,1039	0,2328	0,0814	0,0310	0,8939
CHEK2	0,4030	0,0871	0,2011	0,1336	-0,2215	0,3345
DNAJA4	-0,5365	0,0179	0,1252	0,3536	0,4591	0,0363
DST	0,1176	0,6315	0,3692	0,0047	-0,0945	0,6838
ERBB2	0,0869	0,7235	0,1757	0,1911	0,2019	0,3801
ERG	-0,1720	0,4814	-0,0506	0,7085	-0,3710	0,0978
ESR1	0,3301	0,1676	0,1297	0,3363	-0,1408	0,5428
ETS1	-0,1834	0,4524	-0,2273	0,0891	-0,3480	0,1221
ETS2	-0,0536	0,8274	-0,1078	0,4250	-0,3142	0,1654
ETV1	0,3453	0,1476	0,1044	0,4398	0,2039	0,3754
FAM3A	0,0371	0,8801	-0,2522	0,0584	0,2081	0,3653
FAM3C	0,2156	0,3754	0,1232	0,3611	-0,1767	0,4436
FAM3D	0,4504	0,0530	0,3472	0,0082	0,0869	0,7080
FOXP4	-0,0117	0,9621	0,1270	0,3464	0,2968	0,1914
HIF1A	-0,1103	0,6531	-0,0202	0,8817	0,0239	0,9182
IL6	-0,1447	0,5545	-0,1181	0,3814	-0,3604	0,1085
JAM2	-0,0214	0,9306	0,0131	0,9229	-0,3535	0,1159
KRAS	-0,0676	0,7834	-0,0279	0,8365	0,3050	0,1789
MCL1	-0,1598	0,5134	-0,2026	0,1307	0,0368	0,8740
MDM2	0,4293	0,0666	0,3031	0,0219	-0,0618	0,7900
MKI67	0,0705	0,7743	0,0073	0,9570	0,1487	0,5201
MMP2	-0,1969	0,4190	-0,2202	0,0998	-0,2678	0,2405
MMP9	-0,0484	0,8439	-0,3517	0,0073	-0,0831	0,7204
MX1	-0,0776	0,7521	-0,0736	0,5862	0,5532	0,0093
MX2	0,0494	0,8409	-0,1267	0,3478	0,3321	0,1413
MYC	0,3626	0,1270	0,1109	0,4114	0,0974	0,6746

PALB2	0,0050	0,9838	0,1630	0,2258	0,4511	0,0401
PEBP1	-0,0682	0,7816	-0,0379	0,7798	-0,2613	0,2525
PGR	0,2694	0,2646	-0,0912	0,5001	-0,5050	0,0196
RAD51	-0,0625	0,7993	0,0751	0,5789	0,1690	0,4636
RB1	-0,1919	0,4314	0,1014	0,4529	-0,1865	0,4183
RPGR	0,6010	0,0065	0,0266	0,8444	-0,1003	0,6654
SAMD9	-0,1604	0,5119	-0,2545	0,0560	0,3034	0,1812
SNAI1	0,0729	0,7667	-0,3538	0,0069	-0,1740	0,4505
SNAI2	0,2852	0,2367	-0,1198	0,3746	0,1829	0,4275
SYNE1	-0,3886	0,1002	-0,2943	0,0263	0,0244	0,9164
TGFB1	-0,1596	0,5140	-0,2888	0,0293	-0,3799	0,0894
TMPRSS2	0,3311	0,1662	0,4375	0,0007	0,1903	0,4086
TNFRSF1A	-0,0895	0,7157	-0,3448	0,0086	-0,3979	0,0741
TNFRSF1B	-0,3394	0,1552	-0,2565	0,0541	-0,2280	0,3201
TP53	0,4381	0,0606	0,1179	0,3823	0,0346	0,8816
TWIST1	-0,4109	0,0805	-0,0758	0,5754	-0,0275	0,9059
VEGFA	-0,4263	0,0688	-0,2932	0,0268	-0,2648	0,2461
VIM	-0,3046	0,2048	-0,3033	0,0218	-0,3388	0,1330
XIAP	0,2312	0,3410	0,1485	0,2703	-0,0774	0,7387
ZEB1	-0,2753	0,2539	-0,1357	0,3142	-0,3918	0,0790
ZEB2	-0,3510	0,1406	-0,2710	0,0415	-0,3993	0,0729

ANEXO III

TABELA: Correlações calculadas entre o FAM3B e 57 genes associados a câncer de mama e EMT de acordo aos subtipos da doença

	Luminal A		Luminal B		HER2 +		HER2 -		Triplo negativo		Todas as subtipos	
Gene	**r**	**p-value**	**r**	**p-value**	**r**	**p-value**	**r**	**p-value**	**r**	**p-value**	**r**	**p-value**
ATM	-0,1305	0,3289	0,4231	0,2231	-0,0353	0,8760	-0,0818	0,5765	0,0827	0,8090	-0,0018	0,9858
BACH1	0,0568	0,6722	0,2848	0,4251	-0,1466	0,5151	0,0175	0,9050	0,1385	0,6846	0,0393	0,6979
BAX	0,0706	0,5984	-0,3634	0,3020	-0,1808	0,4208	0,1511	0,3000	0,0076	0,9824	-0,0038	0,9702
BCL2	-0,3738	0,0038	0,5468	0,1019	-0,1813	0,4194	-0,0855	0,5594	0,6111	0,0458	-0,0352	0,7277
BIRC2	-0,0179	0,8939	0,1053	0,7721	-0,0542	0,8108	-0,0681	0,6421	-0,1757	0,6054	-0,0039	0,9694
BRCA1	-0,0561	0,6758	-0,4390	0,2044	0,1680	0,1680	-0,1084	0,4586	-0,5395	0,0867	0,0129	0,8985
BRCA2	0,0745	0,5785	-0,3633	0,3022	0,0384	0,8651	0,0122	0,9338	-0,0967	0,7772	0,1043	0,3017
BRIP1	0,0709	0,5554	-0,1103	0,7616	0,0919	0,6842	-0,0065	0,9646	-0,1612	0,6359	0,1080	0,2848
CDC42	-0,1416	0,2889	-0,0726	0,8420	-0,2863	0,1964	-0,0231	0,8749	-0,0667	0,8456	-0,1903	0,0579
CDH1	0,1583	0,2352	0,2175	0,5462	0,0397	0,8607	0,2569	0,0748	0,4821	0,1332	0,2118	0,0344
CHEK2	0,0832	0,5346	-0,3202	0,3671	0,1838	0,4130	0,1420	0,3305	0,4330	0,1834	0,1108	0,2723
DNAJA4	0,0737	0,5825	0,1435	0,6925	0,0376	0,8680	0,1189	0,4160	0,0441	0,8975	0,1461	0,1469
DST	0,0775	0,5629	0,3125	0,3794	0,0330	0,8842	0,2164	0,1353	0,6261	0,0393	0,2235	0,0254
ERBB2	0,2004	0,1315	-0,3303	0,3512	0,0167	0,9413	0,2417	0,0943	0,1998	0,5558	0,1653	0,1003
ERG	-0,1744	0,1905	0,0993	0,7850	-0,1428	0,5262	-0,0913	0,5326	-0,2175	0,5205	-0,1095	0,2782
ESR1	-0,0438	0,7438	0,5511	0,0987	0,3236	0,1418	0,0123	0,9333	0,0210	0,9511	0,1522	0,1306
ETS1	-0,1909	0,1512	0,0910	0,8025	-0,2672	0,2294	-0,3306	0,0203	-0,7170	0,0130	-0,2340	0,0191
ETS2	-0,0983	0,4628	0,0403	0,9120	-0,2359	0,2905	-0,1439	0,3240	-0,0793	0,8166	-0,1473	0,1437
ETV1	0,1606	0,2284	0,4388	0,2046	0,1539	0,4940	0,0935	0,5229	0,1800	0,5963	0,1755	0,0808
FAM3A	0,0764	0,5685	-0,2923	0,4125	0,0441	0,8457	-0,0864	0,5548	-0,3016	,03674	-0,1439	0,1531

FAM3C	-0,1080	0,4196	0,1658	0,6472	0,2017	0,3681	0,0668	0,6484	0,2713	0,4196	0,0364	0,7195
FAM3D	0,3509	0,0069	0,6707	0,0338	0,0387	0,8643	0,3949	0,0050	0,4315	0,1851	0,2634	0,0081
FOXP4	0,1824	0,1705	-0,2124	0,5557	0,1728	0,4419	0,1636	0,2614	0,2389	0,4793	0,1221	0,2263
HIF1A	0,1735	0,1928	-0,2732	0,4450	-0,2048	0,3605	0,0845	0,5636	-0,3577	0,2801	0,0051	0,9601
IL6	0,0071	0,9578	-0,2561	0,4751	-0,5061	0,0162	0,0084	0,9545	-0,5933	0,0543	-0,1842	0,0665
JAM2	-0,0720	0,5914	0,3519	0,3186	-0,0769	0,7336	-0,0276	0,8506	-0,1984	0,5586	-0,0345	0,7334
KRAS	0,0747	0,5776	0,3053	0,3910	0,2715	0,2217	0,0220	0,8808	-0,2325	0,4916	0,0680	0,5014
MCL1	0,0993	0,4584	-0,6532	0,0406	-0,4104	0,0578	-0,0962	,05110	-0,4155	0,2037	-0,1519	0,1313
MDM2	0,0578	0,6664	-0,0145	0,9682	0,3847	0,0771	0,2898	0,0434	0,8088	0,0026	0,2500	0,0121
MKI67	0,0483	0,7187	-0,5337	0,1121	-0,0689	0,7606	-0,0157	0,9148	-0,5944	0,0538	0,0185	0,8550
MMP2	-0,1247	0,3510	0,0711	0,8453	-0,2583	0,2458	-0,1533	0,2929	-0,5874	0,0574	-0,2169	0,0302
MMP9	-0,1327	0,3207	-0,7952	0,0060	-0,0958	0,6714	-0,2692	0,0615	-0,5695	0,0675	-0,2410	0,0157
MX1	0,3183	0,0149	-0,1715	0,6356	0,2605	0,2417	0,0050	0,9728	-0,7413	0,0090	0,0611	0,5457
MX2	0,1774	0,1827	-0,1177	0,7461	0,0225	0,9209	-0,0406	0,7816	-0,2593	0,4414	-0,0266	0,7926
MYC	0,1626	0,2226	0,4632	0,1776	0,2752	0,2152	0,0153	0,9167	-0,2805	0,4034	0,1123	0,2658
PALB2	0,2422	0,0670	0,1470	0,6854	0,1308	0,5618	0,1450	0,3202	-0,0158	0,9632	0,2149	0,0318
PEBP1	-0,2294	0,0832	0,2941	0,4095	-0,1401	0,5340	0,0591	0,6868	0,4124	0,2075	-0,1048	0,2995
PGR	-0,3041	0,0203	0,4179	0,2294	-0,1143	0,6125	-0,0759	0,6042	-0,0534	0,8760	-0,0936	0,3545
RAD51	0,1283	0,3372	-0,4163	0,2314	0,1494	0,5071	0,0700	0,6329	-0,6505	0,0302	0,0377	0,7099
RB1	-0,1567	0,2403	0,3067	0,3887	-0,1395	0,5358	-0,0456	0,7559	-0,2511	0,4564	0,0126	0,9014
RPGR	-0,0822	0,5395	0,2395	0,5161	-0,1832	0,4144	0,0854	0,5595	0,4625	0,1520	0,0856	0,3973
SAMD9	0,0914	0,4949	-0,1662	0,6464	0,0148	0,9480	-0,1800	0,2159	-0,5720	0,0660	-0,0832	0,4104
SNAI1	-0,0424	0,7520	-0,4545	0,1869	-0,5148	0,0142	0,1200	0,4115	-0,2018	0,5518	-0,2138	0,0327
SNAI2	0,0766	0,5676	0,4346	0,2095	-0,1130	0,6166	-0,1078	0,4610	-0,2046	0,5462	0,0471	0,6419
SYNE1	-0,1865	0,1610	-0,0353	0,9229	-0,1315	0,5596	-0,4113	0,0033	-0,5860	0,0581	-0,1898	0,0586
TGFB1	-0,2936	0,0253	-0,4017	0,2499	-0,4252	0,0485	-0,2488	0,0847	-0,4657	0,1488	-0,2856	0,0040
TMPRSS2	0,3871	0,0027	0,6703	0,0339	0,0430	0,8492	0,3694	0,0090	-0,0923	0,7871	0,3252	0,0010
TNFRSF1A	-0,1833	0,1684	-0,3318	0,3490	-0,1846	0,4108	-0,2104	0,1468	-0,1441	0,6724	-0,3037	0,0021
TNFRSF1B	-0,1234	0,3561	-0,2020	0,5758	-0,3964	0,0678	-0,2328	0,1074	-0,6846	0,0201	-0,2704	0,0065

TP53	0,1682	0,2069	-0,0215	0,9529	-0,0286	0,8994	0,1449	0,3207	0,4593	0,1553	0,1396	0,1659
TWIST1	-0,0543	0,6858	-0,1034	0,7763	-0,2419	0,2781	-0,1073	0,4631	-0,5129	0,1067	-0,1264	0,2100
VEGFA	-0,2375	0,0726	-0,1995	0,5805	-0,2155	0,3354	-0,2706	0,0600	-0,2706	0,4208	-0,2892	0,0035
VIM	-0,1833	0,1684	-0,1615	0,6557	-0,2979	0,1782	-0,3099	0,0303	-0,6558	0,0284	-0,3123	0,0016
XIAP	-0,0158	0,9063	-0,0304	0,9335	-0,2072	0,3549	0,0506	0,7298	0,3271	0,3261	0,1276	0,2058
ZEB1	-0,2225	0,0932	0,0845	0,8164	-0,2476	0,2666	-0,1946	0,1802	-0,4460	0,1691	-0,1683	0,0941
ZEB2	-0,2569	0,0516	0,1057	0,7713	-0,3710	0,0891	-0,2919	0,0419	-0,5442	0,0835	-0,2813	0,0046