

ANA CAROLINA MARCHIORI

**Efeitos do 17 β -estradiol e da laminina na regulação
da expressão dos genes *DDEF2* e *PHLDA1* em
linhagens de células derivadas de adenocarcinomas
de mama MCF-7 e MDA-MB-231**

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

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai

São Paulo
2007

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Francisco e Elaine.

Os responsáveis por tudo que sou

e por tudo que realizo.

Obrigada por toda compreensão, paciência,

carinho e por tudo que me

proporcionaram em todos estes anos.

Amo vocês, demais!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai pela oportunidade que me deu e por sua orientação.

À minha vó Ada por todo amor, apoio e paciência. Minha querida vó, minha amiga em todos os momentos.

Aos meus padrinhos Cida e Ângelo por todo incentivo e amor pela ciência que eles têm e me ensinaram a ter.

Ao Di, meu namorado, meu amor, por acreditar em mim e acima de tudo por me fazer acreditar em mim.

Ao Netto, meu irmão, por ter tornado meus dias aqui em São Paulo mais alegres e por cozinhar tão bem.

À Monica, minha amiga-irmã por ser tão presente em minha vida, me apoiar e confiar em mim.

À Luciane, minha prima, apaixonada pela pesquisa científica, que me incentivou durante todo o mestrado.

À D. Antônia, a mais figura do laboratório. Que recebe todos com um lindo sorriso, trabalha com alegria no coração e tem o abraço mais gostoso e carinhoso.

À Débora, uma amiga-anjo, por tudo que fez por mim, pela parceria, pelos experimentos e correções. Sem ela não teria chegado aqui.

A Paula, Sibeli, Simone e Yuri, amigas mais que queridas que fizeram cada momento no laboratório valer à pena e que se tornaram indispensáveis na minha vida.

A todas as meninas do laboratório, as que ainda estão lá e as que já seguiram outro caminho, Carol, Cláudia, Diana, Karina, Mariana, Michelle, Michely, Miliam e também aos únicos XY do laboratório, Emerson e Rene. Sem vocês o laboratório não seria o mesmo.

A minhas amigas, Fernanda, Laura, Lilian, Lívia, Marina e Roucheli que participam de muitos momentos em minha vida e sempre me incentivam com palavras positivas.

Aos meus primos Bruno, Gabriel e João Vitor. Crianças maravilhosas e mais que especiais. Não saberia viver sem este trio.

À Hati, por sempre me acolher em sua sala e por todas as conversas descontraídas.

Agradeço à Aldeia da Mata e a todos deste lugar sagrado, que me ensinou a me ver e a olhar todas as pessoas com amor. Sem esta ajuda espiritual eu não estaria aqui.

A todos os amigos e familiares que me incentivaram na realização deste trabalho.

Aos professores da Disciplina de Oncologia, que com seu conhecimento e exemplo científico contribuíram para a minha formação acadêmica.

Às secretárias da pós graduação em Oncologia, Elizângela e Rosilene, pela amizade e ajuda.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Há sonhos que se realizam e para que eles aconteçam é necessário que pessoas estejam em nossos caminhos. Onde através de uma palavra, de um abraço, de um carinho nos dizem que vale à pena continuar. Agradeço por ter conhecido todas as pessoas que conheci durante estes anos de mestrado. Foi muito mais que um estágio científico, foi um estágio de vida. Aprendi, amadureci, cresci muito. Valeu à pena passar por tudo que passei. Obrigada a todos, por tudo que acrescentaram em minha vida.

SUMÁRIO

Lista de siglas e símbolos

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Câncer de mama.....	01
1.2 Estrógenos e seus receptores.....	03
1.3 Elementos responsivos ao estrógeno.....	08
1.4 Antiestrógenos.....	10
1.5 Matriz extracelular e suas vias de sinalização.....	13
1.6 DDEF2 e PHLDA1.....	18
2 OBJETIVOS.....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Análise da região promotora.....	23
3.2 Cultura celular.....	24
3.2.1 Tratamento do soro com carvão dextrana.....	26
3.3 Extração de RNA.....	27
3.4 Tratamento do RNA com DNase.....	29
3.5 Síntese do cDNA.....	29
3.6 PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase).....	29

3.7 Obtenção dos oligonucleotídeos.....	30
3.8 PCR em tempo real.....	30
3.9 Análise estatística.....	32
4 RESULTADOS.....	33
4.1 Análise da região promotora dos genes PHLDA1 e DDEF2.....	33
4.2 Avaliação do nível de expressão dos transcritos PHLDA1 e DDEF2 em diferentes linhagens celulares.....	37
4.3 Efeito do 17 β -estradiol na expressão dos genes PHLDA1 e DDEF2.....	39
4.4 Efeito da laminina na expressão dos genes PHLDA1 e DDEF2.....	44
5 DISCUSSÃO.....	52
5.1 Análise das regiões promotoras dos genes DDEF2 e PHLDA1.....	52
5.2 Avaliação do nível de expressão dos transcritos PHLDA1 e DDEF2 em diferentes linhagens celulares.....	54
5.3 Efeito do 17 β -estradiol na expressão dos genes DDEF2 e PHLDA1.....	56
5.4 Efeito da laminina na expressão dos genes DDEF2 e PHLDA1.....	58
CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

LISTA DE SIGLAS

ADAMTS1	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1
AF-1	Transativação independente do hormônio
AF-2	Transativação dependente do hormônio
AP-1	activator protein-1
Arf	ADP-ribosylation factor
ATF	Fator de ativação da transcrição
BRCA1 (2)	Breast Cancer 1 (2)
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
cDNA	DNA complementar
CT	Cycle Threshold
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DDEF1	Development and Differentiation Enhancing Factor 1
DDEF2	Development and Differentiation Enhancing Factor 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleosídeos trifosfato
E2	Estradiol
ECM	Matriz extracelular
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ERE	Elemento responsivo ao estrógeno
ER α (β)	Receptor de estrógeno alpha (beta)

FAK	Quinase de adesão focal
Fos	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
FoxA1	Forkhead box A1
GAP	Proteínas ativadoras de GTPase
GAPDH	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
GRAF	GTPase regulator associated with FAK
hsp90	Proteína de choque térmico 90
IGF	Fator de crescimento tipo insulina 1
IGF-IR	Receptor do fator de crescimento tipo insulina 1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LBD	Domínio de ligação ao ligante
LN	Laminina
MMPs	Matriz metaloproteinases
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NR	Receptor nuclear
p130CAS	(BCAR1) breast cancer anti-estrogen resistance 1
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PH	Domínio homólogo à pleckstrin
PHLDA1	Pleckstrin Homology-Like Domain, family A, member 1
PI3-K	Phosphoinositide-3-kinase
Pyk2	Proline-rich tyrosin kinase 2
RNA	Ácido ribonucleico

SERMs	Moduladores seletivos do receptor de estrógeno
SHC	Src homology 2 domain-containing
SH3	Domínio homólogo à Src3
SN	Soro normal
SP-1	Specificity protein 1
SRC	v-src sarcoma viral oncogene homolog
ST	Soro tratado
TAM	Tamoxifeno
T	Timina
U	Uracila
UNG	Enzima Amp-Erase Uracil-N-Glycosylase

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramas
h	Hora
kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
pb	Pares de base
rpm	Rotações por minuto
U	Unidade
μg	Micrograma
μm	Micrometros
μM	Micromolar
μl	Microlitro
°C	Graus Celsius

LISTA DE FIGURAS

Figura 01-	Representação esquemática dos domínios funcionais do receptor de estrógeno.....	05
Figura 02-	Ilustração esquemática dos mecanismos de ativação da transcrição pelo receptor de estrógeno.....	08
Figura 03-	Seqüência do elemento responsivo ao estrógeno.....	09
Figura 04-	Mecanismos de regulação da transcrição pelo estradiol, tamoxifeno e fulvestrant.....	13
Figura 05-	Complexo de sinalização nas adesões focais.....	18
Figura 06-	Estrutura primária da proteína DDEF2.....	19
Figura 07-	Resultado representativo da análise das seqüências da região promotora do gene PHLDA1.....	35
Figura 08-	Resultado representativo da análise das seqüências da região promotora do gene DDEF2.....	36
Figura 09-	Expressão relativa do gene PHLDA1 em diferentes linhagens celulares.....	38
Figura 10-	Expressão relativa do gene DDEF2 em diferentes linhagens celulares.....	38
Figura 11-	Expressão relativa dos genes PHLDA1 e DDEF2 nas células MCF-7 submetidas ao tratamento com E2.....	40
Figura 12-	Expressão relativa dos genes PHLDA1 e DDEF2 nas células MCF-7 submetidas a diferentes tratamentos hormonais.....	41
Figura 13-	Expressão relativa do gene PHLDA1 nas células MCF-7 submetidas a tratamentos com 17 β -estradiol e ICI182.780.....	43
Figura 14-	Expressão relativa do gene DDEF2 nas células MCF-7 submetidas a tratamentos com 17 β -estradiol e ICI182.780.....	44
Figura 15-	Expressão relativa do gene PHLDA1 nas células MDA-MB-231 aderidas ou não aderidas à monocamada de laminina.....	45

Figura 16-	Expressão relativa do gene DDEF2 nas células MDA-MB-231 aderidas ou não aderidas à monocamada de laminina.....	46
Figura 17-	Expressão relativa do gene PHLDA1 nas células S30 aderidas ou não aderidas à monocamada de laminina.....	47
Figura 18-	Expressão relativa do gene DDEF2 nas células S30 aderidas ou não aderidas à monocamada de laminina.....	48
Figura 19-	Expressão relativa do gene PHLDA1 nas células S30 aderidas ou não aderidas à monocamada de laminina e submetidas a tratamentos com 17 β -estradiol e ICI182.780.....	50
Figura 20-	Expressão relativa do gene DDEF2 nas células S30 aderidas ou não aderidas à monocamada de laminina e submetidas a tratamentos com 17 β -estradiol e ICI182.780.....	51

RESUMO

O câncer de mama é a doença maligna mais comum e a principal causa de morte entre as mulheres. Sua complexa etiologia envolve múltiplos fatores de risco, a maioria deles relacionada aos níveis cumulativos de exposição da mama aos estrógenos. A maioria de suas ações é mediada pela ligação a seus receptores ER α e ER β que são fatores de transcrição. Outro fator que exerce um controle extraordinário no comportamento celular, regulando a transcrição gênica e influenciando diversos processos biológicos, e que, quando alterado, é associado ao processo de tumorigênese da mama é a matriz extracelular. A laminina, um dos principais componentes da matriz extracelular, interage com as células através das integrinas e está relacionada ao fenótipo maligno, atuando na adesão, migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Nosso grupo identificou diversos genes diferencialmente expressos em células de câncer de mama ER+ na presença ou ausência de uma monocamada de laminina utilizando a técnica DDRT-PCR. Dois dos genes identificados, *DDEF2* e *PHLDA1*, estão associados à adesão; *DDEF2* envolvido na sinalização das integrinas e *PHLDA1* relacionado com apoptose por perda de adesão. Nosso objetivo foi investigar os efeitos do 17 β -estradiol e da laminina na regulação da expressão dos genes *DDEF2* e *PHLDA1* nas linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 e posteriormente S30, utilizando a técnica RT-PCR em tempo real. O gene *PHLDA1* foi induzido pelo E2 via ER

nas células MCF-7 e pela laminina nas células S30, e o gene DDEF2 foi reprimido pelo E2 e induzido pela laminina nas células S30.

Descritores: neoplasias mamárias, expressão gênica, estrogênios, laminina, reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa.

ABSTRACT

The breast cancer is the most common malignant disease and the leading cause of death among women. Its complex etiology involves multiple risk factors, most of them related to the levels of cumulative breast exposure to estrogen. Most of its actions is mediated by binding to its receptor ER α and ER β that are transcription factors. Another factor that has a tremendous control in cell behavior, regulating the gene transcription and influencing various biological processes, which when altered, is attached to the process of tumorigênese of the breast is the extracellular matrix (ECM). The laminin, one of the main components of the ECM, interacts with the cells through integrins and is related to the malignant phenotype, acting in adhesion, migration, proliferation, differentiation and cell survival. Our group identified several genes diferencialy expressed in breast cancer cells ER + in the presence or absence of a laminin monolayer using the technique DDRT-PCR. Two of the genes identified, *DDEF2* and *PHLDA1*, are associated with adhesion; *DDEF2* is involved in the integrins signaling and *PHLDA1* is related with apoptosis by loss of adhesion. Our goal was to investigate the effects of 17 β -estradiol and laminin in regulating the expression of the genes *DDEF2* and *PHLDA1* in MCF-7, MDA-MB-231 and later S30 cell lines, using the real time RT-PCR technique. The gene *PHLDA1* was induced by E2 via ER in MCF-7 cells and the laminin in S30 cells, and the gene *DDEF2* was suppressed by E2 and induced by laminin in S30 cells.

Descriptors: breast neoplasias, gene expression, estrogens, laminin, reverse transcryptase polymerase chain reaction.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de mama

O câncer de mama é a neoplasia de maior ocorrência entre as mulheres no mundo (Dumitrescu e Cotarla, 2005) e a segunda neoplasia de maior incidência entre as mulheres no Brasil. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou 48.930 novos casos de câncer de mama em 2006. Para o Estado de São Paulo a taxa estimada foi de 75,45 novos casos a cada cem mil mulheres.

A etiologia do câncer de mama é complexa e envolve fatores endógenos e exógenos que se constituem de fatores de risco para a doença (McPherson, Steel e Dixon; 2000). O principal fator de risco para o câncer de mama é a história familiar, mulheres com uma ou mais parentes de primeiro grau com a doença diagnosticada, apresentam maior risco de desenvolverem câncer de mama (McPherson, Steel e Dixon; 2000). Estudos epidemiológicos mostraram que 12% das mulheres com câncer de mama possuem um membro da família afetado e 1% das mulheres com câncer de mama possui mais de uma parente com esta neoplasia (Dumitrescu e Cotarla, 2005). Os genes *BRCA1* e *BRCA2* (Breast Cancer 1 e 2) localizados no braço longo dos cromossomos 17 e 13, respectivamente, encontram-se mutados nos tumores de mama hereditários e mutações

nestes genes são responsáveis por quase 90% do câncer de mama familiar (McPherson, Steel e Dixon, 2000; De Jong *et al*, 2002).

A maioria dos fatores de risco, incluindo idade da menarca e da menopausa, idade da primeira gravidez, quantidade de gravidez, uso de contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal, está associada aos níveis cumulativos de exposição da mama ao estrógeno (E2). A menarca precoce e a menopausa tardia estão associadas ao aumento dos ciclos ovulatórios e, conseqüentemente, maior exposição da mama ao E2 endógeno. A gravidez em idade jovem, antes dos 20 anos, tem efeito protetor já que o desenvolvimento completo da glândula mamária a deixa menos susceptível aos carcinógenos; no entanto, a nuliparidade e a gravidez após os 35 anos contribuem com o aumento do risco desta neoplasia. A utilização de hormônios exógenos nos contraceptivos orais e na terapia de reposição hormonal aumenta o risco durante o tempo em que são administrados, porém, após a suspensão do uso, o risco diminui (Martin e Weber, 2000; Dumitrescu e Cotarla, 2005).

Alguns outros fatores que estão associados ao câncer de mama são idade, estilo de vida (dieta, obesidade na pós-menopausa, consumo de álcool, atividade física), condição sócio-econômica e história de doenças mamárias benignas. A incidência do câncer de mama é baixa antes dos 25 anos e aumenta após os 45 anos, o que evidencia o envolvimento de hormônios reprodutivos em sua etiologia. O regime normal de alimentação humana contém componentes que podem gerar radicais livres de oxigênio, que podem causar danos no DNA. A dieta rica em gordura está, embora não

significativamente, associada ao aumento do risco; por outro lado, a ingestão de frutas, vegetais e Omega-3 diminuem este risco (Dumitrescu e Cotarla, 2005). O álcool causa alterações no sistema imune, deficiência nutricional e alterações no ciclo celular que podem levar à hiperproliferação. Seu primeiro metabólito, o acetaldeído, é comprovadamente um carcinógeno e promotor tumoral (Poschl e Seitz, 2004). A obesidade na pós-menopausa está associada com o aumento do risco, pois aumenta o nível de estrógeno endógeno que é produzido no tecido adiposo (Carmichael, 2006). A atividade física está associada à diminuição do risco de câncer de mama pelo fato de alterar os ciclos ovulatórios (Dumitrescu e Cotarla, 2005).

1.2. Estrógenos e seus receptores

Os estrógenos (estradiol, estrona e estriol) são hormônios esteróides e exercem papéis importantes no desenvolvimento e manutenção de diversos tecidos normais. O estrógeno predominante e mais potente em humanos é o 17 β -estradiol, mas também são encontrados pequenos níveis de estrona e estriol (Björnström e Sjöberg, 2005). Eles atuam como reguladores do crescimento, diferenciação e função em diversos tecidos alvos, incluindo a glândula mamária (Clemons e Goss, 2001; Hall, Couse e Korach, 2001) e são essenciais para a proliferação e diferenciação do epitélio mamário (Russo e Russo, 1998). Estes hormônios também estão associados ao desenvolvimento e progressão de tumores em tecidos alvo da

ação dos estrógenos, como é o caso dos tumores de mama e ovário (Russo e Russo, 1998; Henderson e Feigelson, 2000).

A maioria das ações dos estrógenos é mediada pela ligação a seus receptores (ER α e ER β), membros da superfamília de receptores nucleares (NRs) que inclui receptores para glicocorticóides, andrógenos, mineralocorticóides, progestinas, hormônios tireoidianos, retinóides e vitamina D (Ribeiro, Kushner e Baxter, 1995). ER α e ER β são fatores de transcrição induzidos por seus ligantes (Nilsson *et al.*, 2001; Sommer e Fuqua, 2001) e exibem a organização de domínios característicos dos NRs com um domínio N-terminal de transativação bem variável, um domínio de ligação ao DNA bem conservado e um domínio C-terminal de ligação ao ligante (Pike, Brzozowski e Hubbard, 2000).

Os receptores de estrógeno apresentam seis domínios funcionais designados de *A* a *F* (Figura 1). O domínio *A/B* ou amino terminal tem função de transativação independente do hormônio (AF-1); esta região também está envolvida na interação com proteínas. O domínio *C* contém o domínio de ligação ao DNA (DBD), com dois dedos de zinco responsáveis pela ligação específica do receptor ao elemento responsivo ao estrógeno (ERE). Este domínio também participa da dimerização dos receptores nos EREs. O domínio *D* está envolvido na ligação de proteínas co-regulatórias. O domínio *E/F* ou carboxi-terminal contém o domínio de ligação ao ligante (LBD), tem a função de transativação dependente do hormônio (AF-2), media a dimerização dos receptores e a translocação nuclear e, possui sítios de ligação a proteínas co-regulatórias e uma região de ligação à proteína de

choque térmico 90 (hsp90) (Nilsson *et al.*, 2001; Sommer e Fuqua, 2001; Hart, 2002).

Os receptores de estrógeno têm estruturas similares, com alto grau de conservação no domínio de ligação ao DNA (Hall e McDonnell, 1999), e ligam-se aos mesmos elementos responsivos no DNA (Kuiper, *et al.*, 1997). ER α e ER β diferem principalmente no domínio amino-terminal, o domínio de ligação ao ligante, refletindo afinidades diferentes aos ligantes fisiológicos (Gruber *et al.*, 2004) e sugerindo que os receptores devem regular genes diferentes (Fuqua *et al.*, 2003). A expressão dos dois tipos de ER é variada nos diferentes tecidos (Hall, Couse e Korach, 2001); ER α e ER β podem transmitir sinais hormonais diferentes dependendo do ligante e do elemento responsivo ao hormônio (Paech *et al.*, 1997).

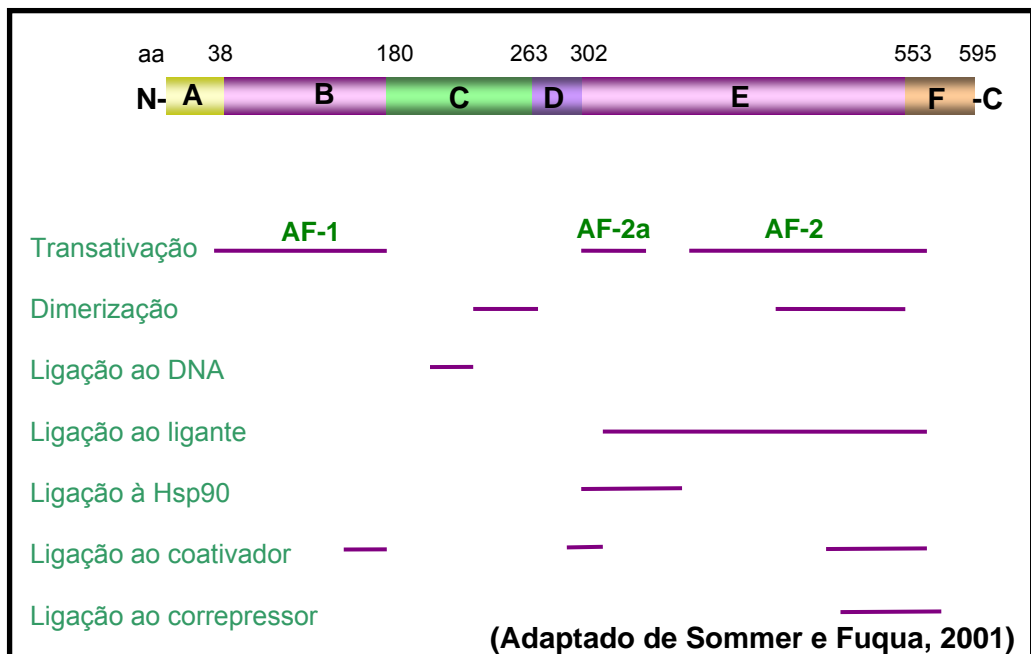


Figura 1. Representação esquemática dos domínios funcionais do receptor de estrógeno. O ER possui seis domínios funcionais denominados de A-F. A/B – domínio de transativação independente do hormônio. C – domínio de ligação ao DNA. D – domínio de ligação a proteínas co-regulatórias. E/F – domínio de ligação ao ligante e de transativação dependente do hormônio.

O ER pode regular a transcrição gênica por quatro mecanismos distintos (Figura 2); *a) Clássico ou Dependente do Ligante*: a ligação do E2 ao ER leva a alterações conformacionais, associação com proteínas co-regulatórias que promovem sua dimerização (ER α / α , ER β / β ou ER α / β) e a ligação específica aos EREs localizados nas regiões promotoras de genes alvo, levando a ativação da transcrição; *b) Independente do Ligante*: na ausência do estrógeno, o ER pode ser ativado por sinais extracelulares como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento tipo insulina 1 (IGF-I), que ativam vias de sinalização que então fosforilam os resíduos serina e tirosina dos domínios AF-1 e AF-2 dos receptores regulando sua dimerização e associação com proteínas co-regulatórias e ligação ao ERE, o que leva à ativação da transcrição do gene alvo; *c) Independente da ligação ao ERE*: a ativação do ER pelo E2 pode levar a regulação da expressão gênica sem a ligação direta ao DNA. O complexo E2-ER liga-se a fatores de transcrição através de interações proteína-proteína, e então ligar-se aos elementos responsivos destes fatores de transcrição no DNA (Hall, Couse e Korach, 2001). Cerca de um terço de genes ativados pelo ER não contém as seqüências dos EREs (O'Lone *et al.*, 2004). Muitos genes são regulados pela interação E2-ER com as proteínas Fos e Jun nos sítios de ligação AP-1 (Björntröm e Sjöberg, 2005). Genes com regiões ricas em GC são regulados de maneira similar, através da ligação do complexo E2-ER ao fator de transcrição SP-1 (Porter *et al.*, 1997). O fator nuclear κ B (NF- κ B) também regula a expressão de genes que não possuem EREs (De Bosscher, Berghe e Haegeman, 2006); *d) Não*

Genômica: as ações não-genômicas são ações muito rápidas para serem causadas através da síntese de RNA e proteína e estão associadas à ativação de várias cascatas de proteínas quinase (Losel e Wehling, 2003). O estrógeno liga-se a uma sub-população de ERs localizados na membrana plasmática (Pappas, Gametchu e Watson, 1995) e este complexo E2-ER de membrana pode interagir com várias moléculas de constituição e moléculas de sinalização, como a caveolina-1, proteínas G, as quinases Src e ras, a subunidade regulatória PI3-quinase (PI3-K) e Shc (Björntröm e Sjöberg, 2005; Manavathi e Kumar, 2006), resultando na ativação de diversas vias de sinalização intracelular. A ativação das vias de transdução de sinais pode conectar as ações não-genômicas às ações genômicas do ER através das cascatas de proteínas quinase que ativam a transcrição pela fosforilação dos resíduos serina e tirosina nos domínios AF-1 e AF-2 dos receptores de estrógeno (Björntröm e Sjöberg, 2005).

Um dos genes regulados pelo estrógeno mais estudado é o receptor de progesterona (PR), o qual medeia os efeitos da progesterona no desenvolvimento da glândula mamária e no câncer de mama. O PR também pertence à família de receptores nucleares e atua como fator de transcrição. Existem duas isoformas do receptor de progesterona, PR-A e PR-B, e como os ERs, os PRs têm domínios de ligação ao DNA (DBD) e ao ligante (LBD) e regiões de transativação (AFs; Cui *et al.*, 2005).

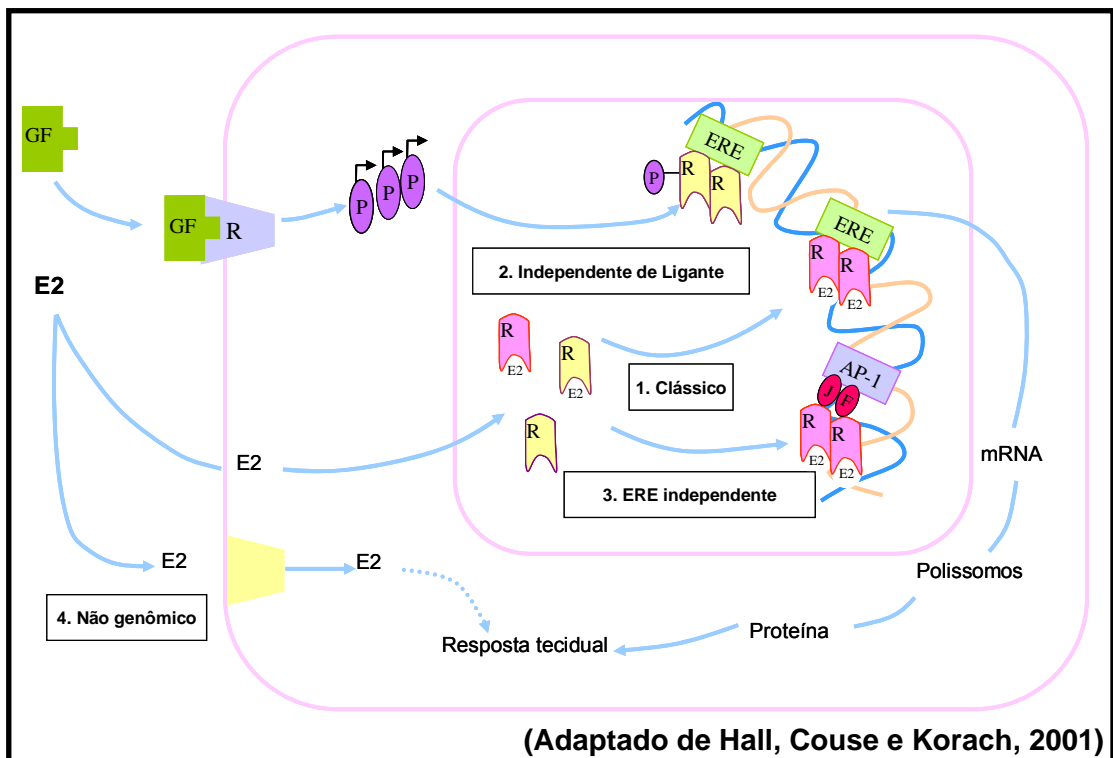


Figura 2. Ilustração esquemática dos mecanismos de ativação da transcrição pelo receptor de estrógeno. Os efeitos do estradiol são mediados por, pelo menos, quatro mecanismos. 1. Clássico – os complexos E2-ER ligam-se diretamente nos EREs nos promotores de genes alvo. 2. Independente do ligante – fatores de crescimento ativam cascatas proteínas-quinases levando à fosforilação e ativação dos ERs. 3. ERE independente – os complexos E2-ER ligam-se ao DNA através de interações proteína-proteína com outros fatores de transcrição. 4. Não genômico – os complexos E2-ER de membrana ativam cascatas proteínas-quinases.

1.3. Elementos responsivos ao estrógeno

ER α e ER β interagem de maneira similar com o ERE (Gruber *et al.*, 2004) e, ligam-se com maior afinidade à seqüência da palíndrome perfeita, ou ERE consenso, 5'-GGTCAnnnTGACC-3' (Figura 3) primeiramente identificada por Walker e colaboradores em 1984. A seqüência do ERE está disposta na região promotora, de maneira heterogênea e independente da orientação e da distância (Klinge, 2001). A maioria das regiões promotoras de genes alvos da ação do estrógeno não contém a seqüência da

palíndrome perfeita do ERE e sim palíndromes imperfeitas (com mutações), meias palíndromes, repetições diretas de meias palíndromes (Klein *et al.*, 1986) ou ainda outros sítios de ligação ao ER. Apenas três palíndromes perfeitas foram identificados em regiões promotoras de genes regulados por estrógeno e, muitas palíndromes imperfeitas com uma ou duas mutações já foram caracterizadas nos genes responsivos ao E2 (Bourdeau *et al.*, 2004).

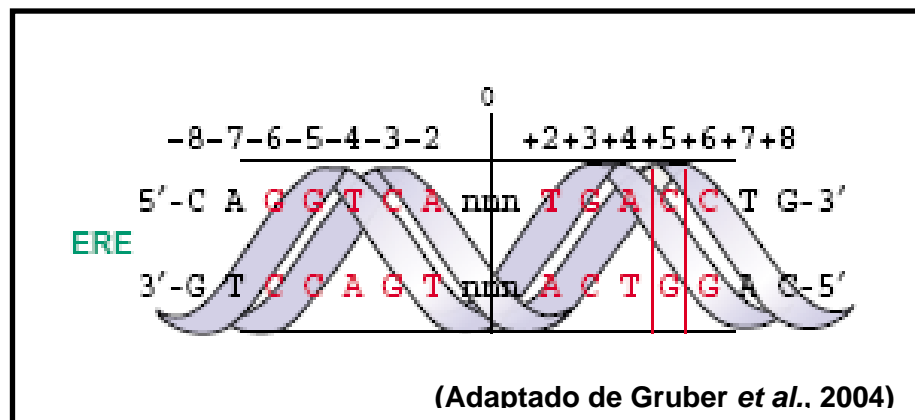


Figura 3. Seqüência do elemento responsivo ao estrógeno. O ERE consenso foi derivado de várias seqüências altamente responsivas ao estrógeno.

A ligação às regiões promotoras proximais, ou seja, as que estão até 2Kb do sítio de início da transcrição (TSS) ou do primeiro ATG transcrito, faz parte do conceito clássico da regulação da transcrição (Carroll e Brown, 2006). Carroll e colaboradores (2006) mostraram que estas regiões proximais não reúnem a maioria dos sítios alvos do receptor de estrógeno, mesmo estando, a maquinaria de transcrição basal localizada nas regiões promotoras proximais. Estudos já mostraram que para muitos genes regulados pelos estrógenos os sítios de ligação ao ER estão localizados a mais de 100kb do sítio de início de transcrição e para outros genes estes

sítios estão localizados na região promotora proximal (Carrol *et al.*, 2005; Carrol *et al.*, 2006; Kininis *et al.*, 2007).

As regiões promotoras também compreendem outros fatores de transcrição que cooperam com a transcrição mediada pelo ER como AP-1, SP-1, NF- κ B, C/EBP e Octâmeros (Sabbah *et al.*, 1999; Kushner *et al.*, 2000; Cicatielo *et al.*, 2004). Existe ainda outro fator que coopera com a transcrição mediada pelo ER, o FoxA1, um fator precursor que media a ligação do ER à cromatina e é essencial para interações e subsequente expressão de genes alvo da ação do estrogênio (Carroll *et al.*, 2005). A regulação negativa de FoxA1 inibe a habilidade do ER de associar-se com seus sítios de ligação (Carroll *et al.*, 2005).

1.4. Antiestrógenos

A presença do receptor de estrogênio no câncer de mama pode ser indicativa da estrogênio-dependência e representa uma característica da doença que pode ser manipulada para controlar e impedir o crescimento do tumor. A funcionalidade do receptor de estrogênio é determinada pela expressão do receptor de progesterona. Portanto a presença do PR também está associada à resposta a terapia hormonal e a um bom prognóstico (Bardou *et al.*, 2003). A existência dos ERs e PRs é usada como indicador prognóstico nos tumores de mama. Aproximadamente metade dos tumores primários são ERs-positivos e PRs-positivos (Gelbfish *et al.*, 1988) e cerca

de dois terços destes tumores respondem favoravelmente à terapia hormonal (Woodward, Lu e Haslam, 2000).

Os antiestrógenos, que antagonizam as ações dos estrógenos, são usados na terapia endócrina. Os antiestrógenos podem ser divididos em duas classes: os antiestrógenos esteroidais, que atuam como antiestrógenos puros e, os antiestrógenos não-esteroidais, os SERMs (Moduladores Seletivos do Receptor de Estrógeno). As duas classes de antiestrógenos mediam seus efeitos através do ER e possuem modos de ação bem diferentes.

Os SERMs agem como agonistas em determinados tecidos (osso, fígado e sistema cardiovascular), antagonistas em outros tecidos (mama e cérebro) e como agonista e antagonista no útero (Lewis e Jordan, 2005). O tamoxifeno (Nolvadex[®]) é o SERM mais conhecido e utilizado no tratamento contra o câncer de mama a mais de 25 anos. O tamoxifeno liga-se ao sítio de ligação ao hormônio do ER de maneira competitiva ao E2. Assim, inicia uma série de eventos incluindo a dissociação das proteínas de choque térmico, a dimerização do receptor de estrógeno e a ligação do receptor aos genes regulados pelo E2, como ocorre na ligação do estrógeno ao ER (Howell, Johnston e Howell, 2004). A diferença é que o tamoxifeno bloqueia o sítio de transativação 2 (AF-2) do ER, impossibilitando a transcrição que é ativada pelo hormônio. Mas ainda permite a ativação do AF-1 e a ligação com proteínas co-regulatórias (Dowsett, Nicholson e Pietras, 2005) levando a uma inativação incompleta da transcrição.

O ICI 182.780 (fulvestrant) é um antiestrógeno puro, não apresenta efeitos agonistas em nenhum tecido e, liga-se ao ER com 100 vezes mais afinidade que o tamoxifeno. Ao ligar-se ao receptor de estrógeno, o fulvestrant induz uma conformação diferente da conformação gerada pela ligação ao tamoxifeno ou pela ligação ao E2 (Figura 4; Dowsett, Nicholson e Pietras, 2005 ou Howell, 2006), bloqueia dimerização do ER, acelera sua degradação e impede sua ligação aos genes responsivos ao E2, diminuindo o nível celular do ER e inibindo sua sinalização (Howell, 2006 *a*). Os sítios de transativação AF-1 e AF-2 do ER são bloqueados, eliminando qualquer possibilidade de transativação, mesmo com o complexo fulvestrant–ER ligando-se ao DNA (Howell, 2006 *b*).

O tamoxifeno pode ser usado em todos os estágios do câncer de mama ER-positivo como terapia adjuvante por cinco anos (Ariazi *et al.*, 2006). No entanto, uma grande parcela das pacientes tratadas com TAM apresenta recidiva (Gustafsson e Warner, 2000), estando o sucesso da hormônio-terapia limitado pelo desenvolvimento da resistência ao antiestrógeno. Conseqüentemente, novas terapias têm sido usadas antes ou após o tratamento com TAM criar resistência, incluindo o inibidor de aromatase anastrozol, para inibir a síntese de 17β -estradiol, e o antiestrógeno puro fulvestrant, para ligar-se ao ER e degradá-lo (Osipo *et al.*, 2003).

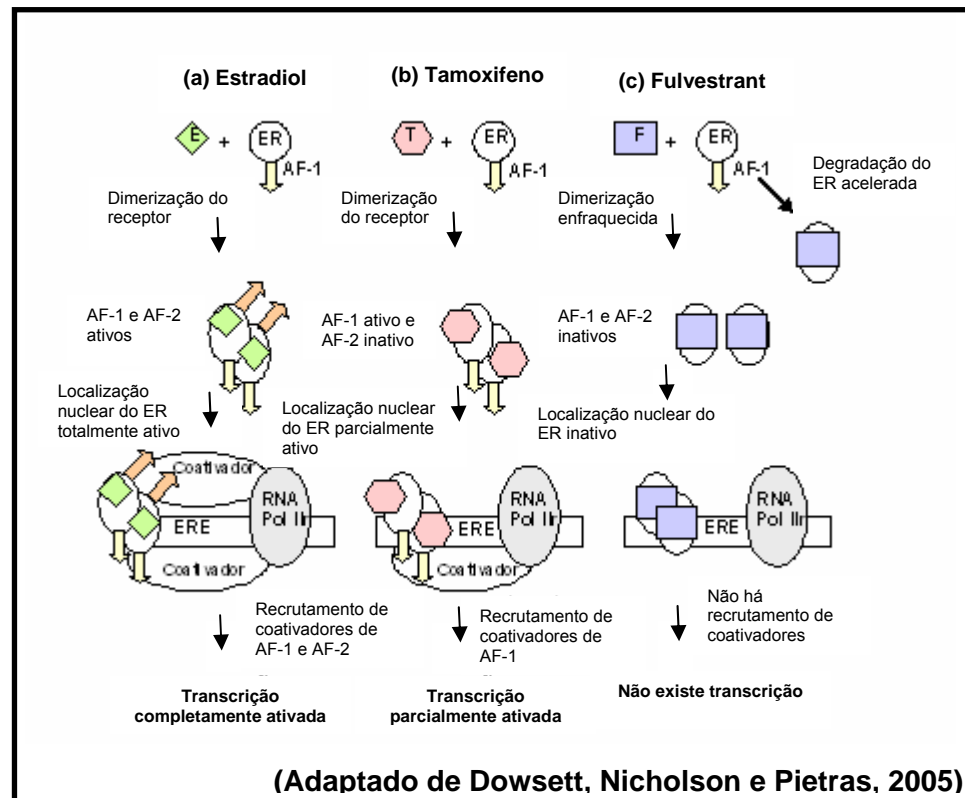


Figura 4. Mecanismos de regulação da transcrição pelo estradiol, tamoxifeno e fulvestrant. O estradiol liga-se ao ER levando a dimerização, mudanças conformacionais e ligação aos EREs. O tamoxifeno compete com o estrógeno para ligar-se ao ER. O fulvestrant liga, bloqueia e degrada o ER, levando a completa inibição da sinalização do estrógeno.

1.5. Matriz extracelular e suas vias de sinalização

A matriz extracelular (ECM) é uma complexa rede de polissacarídeos, glicoproteínas e proteínas, secretados pelas células, que serve como elemento de suporte e fluxo de informações aos diferentes constituintes dos tecidos, influenciando seu desenvolvimento e fisiologia (Bosman e Stamenkoric, 2003). A ECM exerce um controle extraordinário no comportamento da célula, regulando a transcrição gênica e influenciando a proliferação, diferenciação, migração e apoptose (Boudreau e Jones, 1999;

Guo e Giancotti, 2004). A composição da ECM varia de acordo com o tipo de célula/tecido que está a seu redor e não é estática, está em constante renovação. O remodelamento da matriz exige quebra das proteínas existentes pelas metaloproteinases (MMPs) e síntese de novas proteínas (Guo e Giancotti, 2004).

Existem duas formas de ECM: a *membrana basal*, uma camada condensada de matriz localizada adjacente às células epiteliais, adipócitos, músculos e outras células; e a *matriz intersticial*. A característica básica destas duas formas é a estrutura, um esqueleto formado por colágeno no qual glicoproteínas, como as lamininas e as tenascinas, se aderem e interagem com as células presentes na matriz ou adjacentes a ela (Bosman e Stamenkoric, 2003).

As lamininas são as principais glicoproteínas encontradas na membrana basal. As lamininas são grandes moléculas (400 a 900kDa) heterotriméricas formada por cadeias α , β e γ . Até hoje, já foram isoladas 5 cadeias α , 4 cadeias β e 3 cadeias γ que formam 15 diferentes isoformas de laminina (Miner e Yurchenco, 2004) com localização tecido-específica e/ou desenvolvimento específica. Elas possuem estruturas características em comuns que se assemelham a uma cruz, com três braços curtos e um longo, sendo três regiões amino-terminais e uma região carboxi-terminal (Tungall *et al.*, 2000). A região carboxi-terminal, localizada na cadeia α , apresenta uma estrutura globular, chamada de domínio G, responsável pela ligação apropriada a todas as glicoproteínas e outras proteínas. Este domínio

também é importante para a polimerização das lamininas e para a ligação à heparina (Morgan e Inestrosa, 2001).

As lamininas participam de diversas funções celulares, diferenciação, sobrevivência, promoção de adesão, migração, proliferação, atividades de proteases e expressão de genes específicos. Também se ligam a proteínas da ECM formando uma rede organizada e conectando diferentes tecidos (Tungall *et al.*, 2000; Aumailley *et al.*, 2003; Egbring e Kleinman, 2003).

As interações das lamininas com os tumores são diferentes das interações com os tecidos normais. Em geral, a composição das lamininas nos tumores e nos tecidos normais é similar, mas a expressão de seus receptores está muito alterada no câncer (Egbring e Kleinman, 2003). As lamininas promovem a disseminação dos tumores por diferentes mecanismos e facilitam a adesão, migração, angiogênese e sobrevivência das células (Mercurio *et al.*, 2001; Engbring e Kleinman, 2003). A laminina pode contribuir com a metástase também por diferentes mecanismos incluindo a indução de proliferação das células tumorais (Givant-Horwitz, Davidson e Reich, 2005). Células aderidas à laminina-111 mostraram aumento da atividade proliferativa e redução da apoptose comparadas às células não aderidas à laminina-111 (Kim *et al.*, 1999). A laminina-332 parece estar envolvida na adesão, migração, metástase e malignidade das células epiteliais (Miyazaki, 2006). Em presença da prolactina, a laminina é capaz de regular a expressão da β -caseína (Streuli *et al.*, 1995). A laminina pode reduzir a responsividade ao estrógeno em células de câncer de mama

ER-positivas MCF-7 e T47D, diminuindo a eficiência do E2 em ativar a transcrição gênica mediada pelo ERE (Woodward, Lu e Haslam, 2000).

As lamininas interagem com as células através de sindecanos, α -dístroglicanos, receptores 67-kDa (Givant-Horwitz, Davidson e Reich, 2005) e, principalmente, através das integrinas. Estas são os principais receptores da membrana celular que medeiam adesão entre a célula e a ECM e participam de importantes interações célula-célula. As integrinas são receptores transmembrânicos heterodiméricos compostos de duas subunidades, α e β . Apresentam um grande domínio extracelular, uma região transmembrânica e um pequeno domínio intracelular, na maioria dos casos (Hynes, 2002). Já foram identificadas 24 integrinas que possuem especificidade de ligação ao ligante e propriedades específicas para cada tipo de célula (Schatzmann, Marlow e Streuli, 2003). Por possuírem domínios intra e extracelulares, atuam na transdução de sinais de forma bidirecional: *a) inside out (ou de dentro para fora)*: uma célula ativada pode transmitir sinais de seu citoplasma que modifiquem a afinidade das integrinas pelos seus ligantes; *b) outside in (ou de fora para dentro)*; Mizejewski, 1999; Boudreau e Jones, 1999): a ligação da integrina ao seu ligante desencadeia a transdução de sinais externos para o interior da célula. Como consequência da ligação a proteínas da ECM, as integrinas se agregam e suas porções citoplasmáticas se ligam às proteínas do citoesqueleto, como a α -actina, vinculina, talina, tensina e paxilina que se faz pela formação do complexo de adesão focal (Figura 5). O complexo de adesão focal permite que haja uma conexão entre a ECM e as proteínas do

citoesqueleto (Giancotti e Ruoslahti, 1999). Esta interação entre moléculas da ECM e as integrinas ativa muitos mediadores de sinais intracelulares incluindo, FAK (quinase de adesão focal), src, pequenas GTPases, p130CAS, PI3K e MAPKs, resultando no acúmulo de proteínas e moléculas do citoesqueleto altamente fosforiladas. Consequentemente são ativadas por diversas vias de transdução de sinais que regulam diferentes funções celulares como adesão, migração, proliferação, diferenciação, sobrevivência (Giancotti e Ruoslahti, 1999; Bosman e Stamenkovic, 2003) e expressão gênica (Guo e Giancotti, 2004; Givant-Horwitz, Davidson e Reich, 2005).

Estudos da FAK podem ilustrar a relação entre as proteínas de sinalização reguladas pelas integrinas e as proteínas do citoesqueleto. FAK é uma proteína tirosina quinase considerada uma molécula central na sinalização mediada pelas integrinas. A FAK é capaz de recrutar e se ligar a proteínas do citoesqueleto, como paxilina e talina, e de ativar GTPases Rho (Miranti e Brugge, 2002) regulando importantes processos celulares como a divisão celular, motilidade e sobrevivência – proteção contra apoptose (Hauck, Hsia e Schlaepfer, 2002).

A proteína FAK possui sítios de ligação a muitas proteínas adaptadoras e de sinalização. Sua região carboxi-terminal apresenta seqüências ricas em prolina e um domínio homólogo à Src3 (SH3) que serve como sítio de ligação para a molécula adaptadora p130CAS, para as proteínas de ativação da GTPase Rho GRAF e DDEF1 (Schatzmann, Marlow e Streuli, 2003) e para a proteína GAP DDEF2 (Randazzo et al., 2000).

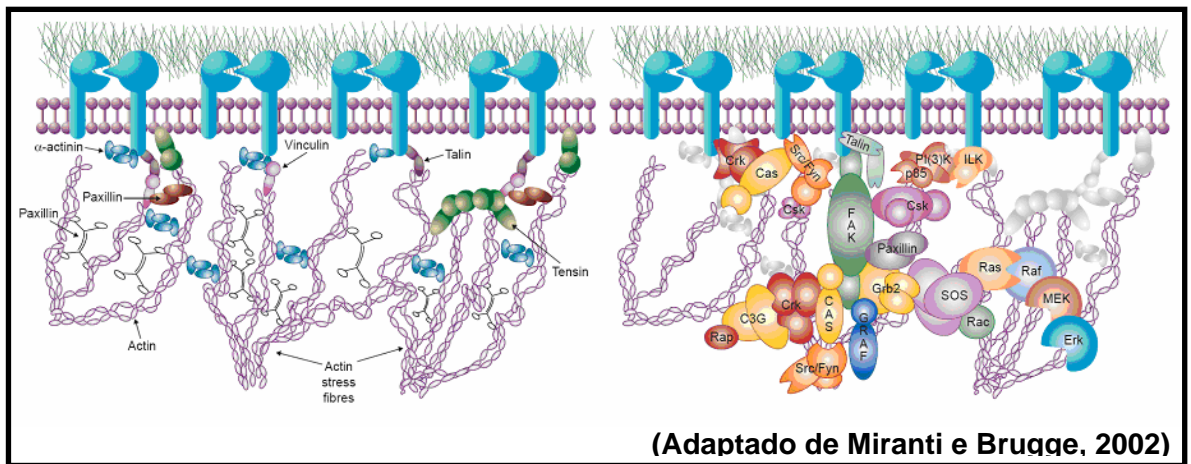


Figura 5. Complexo de sinalização nas adesões focais.

1.6. DDEF2 e PHLDA1

Utilizando a técnica de DDRT-PCR (Diferencial Display Reverse Transcription-PCR) nosso grupo identificou diversos genes diferencialmente expressos em células de câncer de mama ER-positivas na presença ou ausência de uma monocamada de laminina. Alguns dos genes identificados, tais como *DDEF2*, *PHLDA1* e *ADAMTS1* estão associados à adesão e/ou motilidade celular. A expressão do gene *DDEF2* foi inibida em células de câncer de mama ER-positivas aderidas à monocamada de laminina. Ao contrário, a expressão do gene *PHLDA1* aumentou em célula de câncer de mama ER-positivas aderidas à monocamada de laminina (Da Ros, 2003). Além disso, os transcritos do *PHLDA1* foram também identificados como menos expressos em tumores primários de mama em relação ao tecido mamário normal (Nagai *et al.*, 2003).

O gene *DDEF2* (Development and Differentiation Enhancing Factor 2) foi clonado em 1997 e está localizado no cromossomo 2 região p25 (Ishikawa *et al.*, 1997). A estrutura primária de sua proteína (Figura 6) apresenta muitos domínios de interação proteína-proteína, incluindo repetições ankirin, seqüências ricas em prolina e um domínio SH3 (Randazzo e Hirsch, 2004). A proteína possui também um domínio homólogo à pleckstrin (PH) que media suas interações com a membrana, um domínio BAR que percebe ou induz a curvatura da membrana (Nie e Randazzo, 2006) e um dedo de zinco com um domínio Arf GAP (Randazzo e Hirsch, 2004).

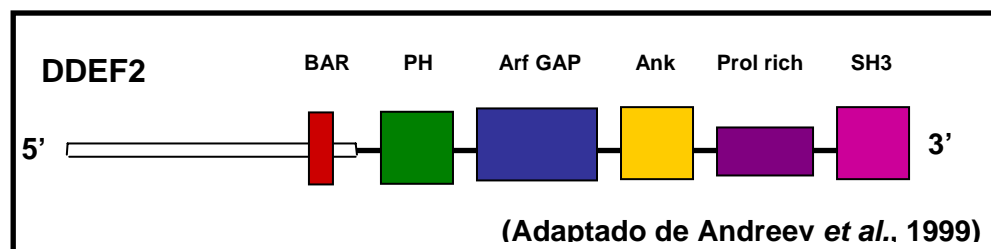


Figura 6. Estrutura primária da proteína DDEF2. Diagrama esquemático representando as seqüências de aminoácidos de DDEF2.

A presença do domínio Arf GAP indica que DDEF2 deve exercer atividade GAP para as proteínas Arfs. A principal função das proteínas Arfs é o remodelamento de membrana, mas também já foi descrito sua participação no remodelamento do citoesqueleto de actina (Uchida *et al.*, 2001). Uchida e colaboradores (2001) mostraram que DDEF2 tem atividade Arf GAP quinase e age como uma GAP para Arf6 durante a fagocitose em macrófagos. Os resultados de Hashimoto e colaboradores (2004) indicam que DDEF2 deve agir como um efetivador de Arf6, ligando-se de maneira

estável a GTP-Arf6 e, como uma proteína adaptadora, acumulando proteínas endocíticas nos sítios de ativação de Arf6 e apenas mediando sua atividade catalítica GAP nas outras Arfs.

DDEF2 liga-se à paxilina atuando como uma molécula adaptadora na sinalização via integrinas (Turner, 2000). Também é proteína de ligação para as proteínas tirosina quinase Pyk2 (Proline-rich tyrosin kinase 2) (Kondo *et al.*, 2000) e FAK (Randazzo *et al.*, 2000), envolvidas na transmissão de sinais extracelulares via MAP-quinases e na regulação de adesão, proliferação, diferenciação e apoptose (Kruljac-Letunic *et al.*, 2003). A interação com estas proteínas se dá através do domínio SH3 (Andreev *et al.*, 1999). O aumento da expressão de DDEF2 levou à perda do recrutamento da paxilina para as placas de adesão focal inibindo a motilidade celular em células COS-7 e U937 (Oshiro *et al.*, 2002).

O gene *PHLDA1* (Pleckstrin Homology-Like Domain, family A, member 1) foi clonado em 1997, está localizado no cromossomo 12 região q15-21.2 e codifica uma proteína colocalizada com a FAK (Kuske e Johnson, 2000). A proteína PHLDA1 contém muitos domínios de interação proteína-proteína na região carboxi-terminal, como repetições prolina-histidinas e repetições prolina-glutaminas, que são encontradas em vários fatores de transcrição e mediam a apoptose em diversas doenças neurodegenerativas, e um domínio PH (Neef *et al.*, 2002; Toyoshima *et al.*, 2004). Hossain e colaboradores (2003) verificaram que *PHLDA1* é induzido por homocisteína e que o aumento de sua expressão causou alterações morfológicas, diminuição da adesão e promoveu anoikis, ou seja, apoptose mediada por

perda de adesão celular, em células endoteliais vasculares humanas. A regulação negativa de *PHLDA1* foi associada com resistência a apoptose, alteração no citoesqueleto de actina e rompimento do complexo de adesão focal, interrompendo o sinal de sobrevivência da ECM antes da morte celular programada (Hossain *et al.*, 2003). A expressão constitutiva de *PHLDA1* foi associada com redução da taxa de crescimento, diminuição da formação de colônias em células de melanoma 293, e a perda de sua expressão contribuiu com resistência a apoptose em melanomas (Neef *et al.*, 2002). A expressão de *PHLDA1* é induzida por IGF-I através da ativação do IGF-IR e da via p38-MAPK em células NWTb3 (Toyoshima *et al.*, 2004). Toyoshima e colaboradores (2004) ainda mostraram que o *PHLDA1* tem papel nos efeitos anti-apoptóticos do IGF-I e, que sua proteína tem efeito anti-apoptótico em células NWTb3. O *PHLDA1* tem sido reportado por inibir síntese de proteínas e possivelmente tem um papel na tradução protéica (Hinz *et al.*, 2001; Oberg *et al.*, 2004). Recentemente, Nagai e colaboradores (2007) confirmaram que a regulação negativa de *PHLDA1* está associada com um fenótipo de câncer de mama mais agressivo e ainda sugeriram que *PHLDA1* poderia ser usado como marcador prognóstico.

2. OBJETIVOS

Investigar os efeitos do 17β -estradiol e da laminina na regulação da expressão dos genes *DDEF2* e *PHLDA1* em linhagens de células derivadas de adenocarcinomas de mama MCF-7 e MDA-MB-231. Mais especificamente, determinar os níveis de expressão dos transcritos dos genes *DDEF2* e *PHLDA1* nas linhagens celulares, MCF-7 e MDA-MB-231, tratadas com 17β -estradiol na presença e ausência de uma monocamada de laminina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Análise da região promotora

A anotação dos genes *PHLDA1* e *DDEF2* foi realizada pelos bancos de dados NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) e UCSC Genome Bioinformatics (genome.ucsc.edu). Estes mesmos sites e o Ensembl (www.ensembl.org/index.html; Hubbard *et al.*, 2007) foram utilizados para obter a região promotora dos genes, seqüências de 2kb acima e 2kb abaixo do sítio de início da transcrição.

Existe um banco de seqüências responsivas ao estrógeno: EREs, sítios AP-1 e SP-1 e outros sítios de ligação ao estrógeno, no laboratório. Este banco foi montado utilizando os bancos de dados Dragon Genome Explorer – ERGBD (Tang, Han e Bajic, 2004) e Transfac 6.0 (www.gene-regulation.com). Com o banco de EREs, foi realizada a busca por seqüências do ERE consenso, seqüências com uma ou duas variações nucleotídicas da palíndrome perfeita, palíndromes perfeitas não-consenso, repetições diretas de meias palíndromes, meias palíndromes dispersas e outros sítios de ligação, tais como, sítios AP-1, sítios SP-1, octâmeros, NF- κ B, ATF e FoxA1 e, os boxes CAAT, TATA que são seqüências iniciadoras da transcrição.

3.2. Cultura celular (Freshney, 1993).

Neste estudo utilizamos as linhagens celulares MCF-7, MDA-MB-231 adquiridas da American Type Culture Collection (Rockville, MD - USA) e o clone S30 (MDA-MB-231 transfectada com o vetor de expressão contendo o receptor de estrógeno selvagem pCMV-ER-neo; Jiang e Jordan, 1992) gentilmente cedido pelos professores Pierry Chambom e Craig Jordan. Estas linhagens de células são derivadas de adenocarcinomas de mama e apresentam perfis diferentes para a expressão do receptor de estrógeno. A linhagem MCF-7 é ER-positiva, expressa o receptor de estrógeno e, a linhagem MDA-MB-231 é ER-negativa, ou seja, não expressa o receptor de estrógeno. Utilizamos também o cDNA da linhagem celular derivada do epitélio normal da mama Hb4a, para analisar o perfil de expressão dos dois genes estudados.

As células MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em meio RPMI-1640 (SIGMA Chemical Corporation, St. Louis – EUA) com antibiótico-antimicótico nas concentrações de 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina e 0,25µg/ml de fungizona (Invitrogen Life Technologies, Califórnia – EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen Life Technologies, Califórnia – EUA) e, mantidas em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂.

As células S30 foram cultivadas em meio MEM (SIGMA Chemical Corporation, St. Louis – EUA) com antibiótico-antimicótico nas concentrações de 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina e

0,25µg/ml de fungizona (Invitrogen Life Technologies, Califórnia – EUA), suplementado com 10% de solução complementar: 5% de soro fetal bovino (Invitrogen Life Technologies, Califórnia – EUA), 1X de aminoácidos não-essenciais (SIGMA Chemical Corporation, St. Louis – EUA), 6ng/ml de insulina bovina (SIGMA Chemical Corporation, St. Louis – EUA), 500µg/ml de geneticina (Invitrogen Life Technologies, Califórnia – EUA), e mantidas em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂.

Para a realização dos experimentos, as células MCF-7 e MDA-MB-231 foram mantidas em meio RPMI-1640 modificado, sem o vermelho de fenol (SIGMA Chemical Corporation, St. Louis – EUA), suplementado com 5% de soro fetal bovino (Invitrogen Life Technologies, Califórnia – EUA) ou 5% de soro fetal bovino livre de esteróides por 48 horas antes do início dos tratamentos (o vermelho de fenol é um indicador de pH e possui uma fraca atividade esteroídica). As células S30 foram mantidas em meio MEM modificado, sem o vermelho de fenol (SIGMA Chemical Corporation, St. Louis – EUA) suplementado com 5% da solução complementar ou 5% da solução complementar contendo soro fetal bovino livre de esteróides. O soro fetal bovino livre de esteróides é obtido utilizando-se o tratamento com o carvão ativo (Armelin, 1978). Denominamos o soro fetal bovino de soro normal (SN) e o soro livre de esteróides de soro tratado (ST).

As linhagens celulares, quando tripsinizadas para a realização dos experimentos, utilizando-se a tripsina-EDTA (Invitrogen Life Technologies, Califórnia – EUA), foram transferidas para um tubo cônico de 50ml e incubadas por 1 hora a 37°C. Após este período as células foram

adicionadas às garrafas de cultura de 25cm² com a monocamada de laminina (BD BioCoat) ou sem a monocamada de laminina (Corning). A quantidade de células que foi adicionada em cada garrafa variou de acordo com o tempo em que as mesmas ficariam aderidas às garrafas e com o tipo de célula (de 2x10⁵ a 1x10⁶ células). No início do estudo, as células foram tratadas com 10nM de 17β-estradiol (SIGMA Chemical Corporation, St. Louis – EUA) ou 1μM de tamoxifeno (SIGMA Chemical Corporation, St. Louis – EUA) ou os dois hormônios simultaneamente (10⁻⁷M de 17β-estradiol + 10⁻⁶M de tamoxifeno). Depois, passamos a utilizar 10⁻⁶M de ICI182.780 (TOCRIS Bioscience) como antiestrógeno no lugar do tamoxifeno.

3.2.1. Tratamento do soro com carvão dextrana

Para o tratamento de 100ml de soro, adicionamos 1,25g de carvão dextrana (SIGMA Chemical Corporation, St. Louis – EUA) a 50ml de PBS (NaCl 8,2g/L; KCl 0,2g/L; Na₂PO₄.2H₂O 1,15g/L; KH₂PO₄ 0,2g/L). Essa mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. A seguir, o soro foi misturado ao carvão e mantido sob agitação a 4°C por 1 hora e então centrifugamos a 10.000 rpm por 25 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi filtrado uma vez em papel de filtro 3μm (Imlab, Brasil) e três vezes em membrana de nitrocelulose 0,22μm para esterilização (Millipore Corporation, Massachusetts, EUA).

O controle de eficiência da retirada de esteróides do soro foi realizado pela adição de uma quantidade determinada de estradiol marcado com trício (^3H) (Amersham Biosciences, Nova Jersey – EUA) em uma alíquota do soro que estava sendo tratado. Ao final do tratamento com o carvão, a quantidade de E2 marcado restante no soro foi medida utilizando-se um contador beta (Beckman, EUA).

Uma alíquota do soro normal e uma do soro tratado foram enviadas ao Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (Disciplina de Endocrinologia do HC-FMUSP) para a realização da dosagem do E2 presente nas amostras. A quantificação revelou que a concentração de E2 presente no soro tratado era indetectável.

3.3. Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada pelo método de guanidina-fenol-clorofórmio. A monocamada de células aderida à garrafa de cultura foi lavada três vezes com solução PBS. Após a última lavagem a solução de PBS foi retirada totalmente e foi adicionado 700 μl de solução D gelada (isotiocianato de guanidina 4M, citrato de sódio 25mM pH7,0, sarcosil 0,5% e β -mercaptoetanol 100mM). Após a lise total das células a solução foi transferida para um tubo cônico de 2,0ml e o RNA foi extraído como descrito abaixo (adaptado de Chomczynski e Sacchi, 1987).

Seqüencialmente, adicionou-se 70µl de acetato de sódio 2M, pH 4,0; 700µl de fenol pH 5,0; 175µl de clorofórmio-álcool isoamílico (49:1) sendo que após a adição de cada solução a mistura foi homogeneizada por inversão. A suspensão final foi agitada vigorosamente por 10 segundos e deixada em banho de gelo por 15 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e precipitada com igual volume de isopropanol a -20°C durante a noite. A seguir, centrifugou-se o material a 10.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O precipitado resultante foi dissolvido em 150µl de solução D, transferido para tubos cônicos de 1,5ml e precipitado com um volume de isopropanol a -20°C durante a noite. Após este período, centrifugou-se o material a 10.000 rpm por 20 minutos a 4°C e o precipitado resultante foi lavado com etanol 75% gelado e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o precipitado foi seco em dissecador e dissolvido em água RNase-free.

Durante o desenvolvimento este estudo, o laboratório adquiriu um Kit para extração de RNA e as extrações passaram a ser realizadas pelo ilustra RNAspin Mini kit (GE Helthcare) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

A concentração do RNA extraído foi determinada por leitura espectrofotométrica a 260nm e a qualidade (integridade) do material foi analisada em gel de agarose 1% com formaldeído.

3.4. Tratamento do RNA com DNase

Alíquotas de RNA total foram tratadas com a enzima DNaseI RNase-free 1U/ μ l (Promega) segundo instruções do fabricante. Então a enzima foi inativada e o RNA extraído foi precipitado a -20°C por 14 a 16 horas. Durante o procedimento de extração pelo ilustra RNAspin Mini kit (GE Helthcare) o RNA já é tratado com DNase.

3.5. Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi realizada pelo High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK). Utilizou-se 10 μ g do RNA total e, para cada reação, acrescentou-se 1U/ μ l de RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen Life Technologies, Califórnia – EUA).

3.6. PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase)

Os cDNAs foram submetidos à PCR para verificação de sua qualidade utilizando-se os oligonucleotídeos para os genes β -2-microglobulina e GAPDH (Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase) que são expressos constitutivamente. O volume total de cada reação foi de 25 μ l, utilizando-se 2,5 μ l do cDNA (diluído 1:10), a concentração adequada de cada oligonucleotídeo, 125 μ M de dNTPs (Amersham Biosciences, Nova Jersey – EUA), 125 μ M de tampão e 0,75U de taq DNA polimerase (Invitrogen Life

Technologies, Califórnia – EUA). As amostras foram amplificadas no termociclador (PCR System 9700 – Applied Biosystems) por 35 ciclos (1 minuto de desnaturação a 95°C, 1 minuto de anelamento a 55°C e 1 minuto de extensão a 72°C) e ao final destes ciclos 5 minutos de extensão a 72°C.

3.7. Obtenção dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos para os genes *PHLDA1*, *DDEF2* e *GAPDH* foram desenhados com o auxílio dos programas Primer3 (versão 0.9) e Amplify (versão 1.2) utilizando-se as seqüências depositadas no blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), blat (www.genome.ucsc.edu) e ensembl (www.ensembl.org), para gerar produtos com tamanho entre 100 e 150pb. A geração de produtos específicos foi monitorada para cada jogo de oligonucleotídeos pela visualização em gel de agarose 2%.

3.8. PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real é usada para, simultaneamente, amplificar e quantificar ácidos nucleicos (cDNA ou DNA). A técnica é usada para determinar se uma seqüência específica está ou não presente na amostra. Se estiver presente, é possível determinar o número de cópias existentes permitindo, então, a quantificação absoluta ou relativa da expressão de determinados genes num determinado tempo, ou num tipo específico de célula.

Neste estudo, realizamos a quantificação relativa dos transcritos de interesse utilizando o SYBR Green PCR Master Mix kit (Applied Biosystems, Warrington, UK) e o equipamento GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) seguindo as recomendações do fabricante.

A reação foi preparada com a adição do fluoróforo SYBR Green e após cada ciclo o aparelho mediu os níveis de fluorescência emitida. O SYBR Green somente fluoresce quando se liga numa fita dupla, ou seja, no produto da PCR. A quantidade do produto foi normalizada com um gene expresso constitutivamente. Utilizamos o transcrito do gene. As etapas da amplificação dos cDNAs pela técnica de PCR em Tempo Real utilizando o corante SYBR Green foram as seguintes: incubação a 50°C por 2 minutos para ativação da enzima Amp-Erase Uracil-N-Glycosylase (UNG) a qual remove amplicons indesejados digerindo as seqüências que contêm U (uracila) ao invés de T (timina); um ciclo de 95°C por 10 minutos para a ativação da enzima AmpliTaq Gold e inativação da UNG e 40 ciclos consistindo de 95°C por 15 segundos para desnaturação do DNA e temperatura de anelamento/extensão adequada para cada par de oligonucleotídeos por 1 minuto.

Os dados coletados foram processados pelo “5700 System Software” e ao término do procedimento obteve-se a representação gráfica (*Amplification Plot*) do aumento relativo da fluorescência resultante da ligação do SYBR Green ao cDNA no decorrer dos ciclos de amplificação. A partir do *Amplification Plot*, foi estabelecido o CT (Cycle Threshold), que se refere ao

ciclo de amplificação no qual cada amostra apresenta amplificação exponencial (cerca de 10 vezes o valor do “threshold” que representa a média dos “backgrounds”). Ao final da reação, obteve-se também a curva de dissociação dos oligonucleotídeos para a análise da especificidade do produto amplificado e do padrão de amplificação de cada amostra, garantindo assim, a qualidade da reação e, conseqüentemente, dos resultados.

O nível de expressão gênica foi determinado pela fórmula: $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde ΔCT corresponde à diferença entre a média do CT da amostra amplificada, para o gene alvo e a média do CT da mesma amostra amplificada para o gene controle (*GAPDH*) e $\Delta\Delta CT$ corresponde à diferença entre o ΔCT da amostra de interesse e o ΔCT da amostra que foi utilizada como referência (SN).

Para cada par de oligonucleotídeos utilizados, foi realizada a padronização da reação de RT-PCR e, posteriormente, a padronização da concentração ideal de oligonucleotídeos e do volume adequado de cDNA para a PCR em Tempo Real.

3.9. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste *Student's t*. A significância estatística foi executada em $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

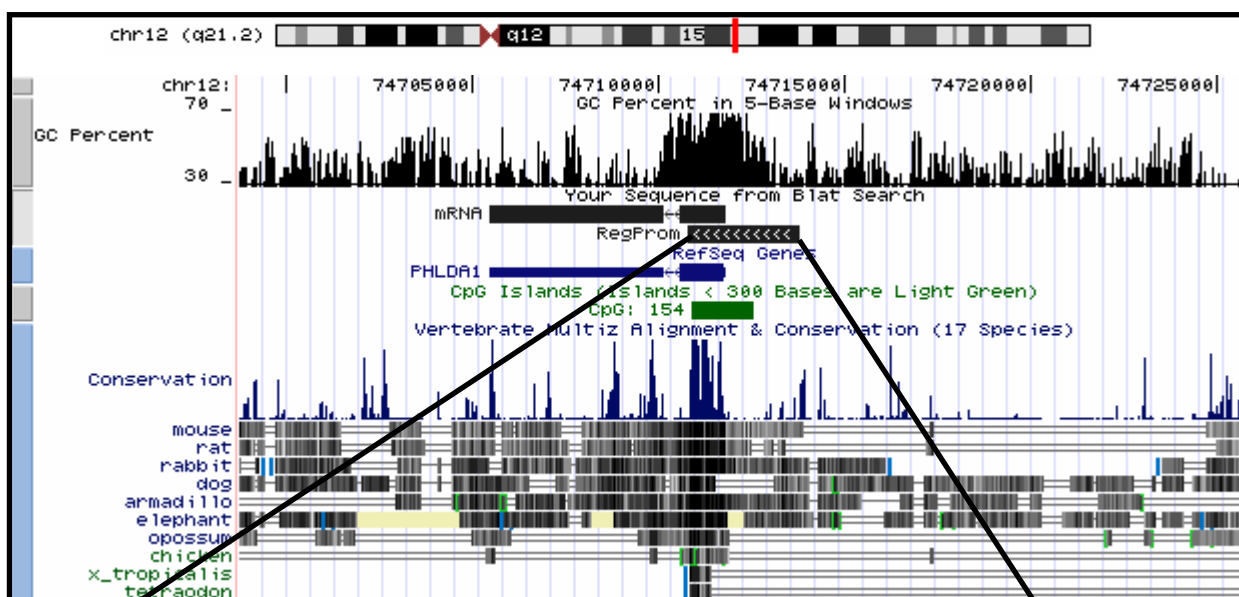
4.1. Análise das regiões promotoras dos genes *PHLDA1* e *DDEF2*.

Para avaliar o potencial dos genes *PHLDA1* e *DDEF2* de serem regulados pelo estradiol, fizemos uma análise de suas regiões promotoras. Realizamos uma busca de seqüências 2kb acima e 2kb abaixo do sítio de início da transcrição, e investigamos quanto à presença dos sítios responsivos ao receptor de estrógeno do nosso banco de EREs e outras seqüências responsivas ao ER. A procura por estas seqüências foi realizada manualmente.

Na análise dos sítios responsivos ao E2 na região promotora do *PHLDA1* (Figura 7) identificamos a presença de uma palíndrome imperfeita com duas mutações separadas por dois nucleotídeos na posição +1522 (**GCTCACTTGTCC**), repetições diretas de meios EREs e meias palíndromes dispersas pela região promotora. Além disso, a análise revelou a presença de um sítio AP-1 na posição +127, três sítios SP-1 nas posições +66, -547 e -1743, e um Box GATA-1 na posição -1227.

A região promotora do *DDEF2* (Figura 8) mostrou a presença de uma palíndrome imperfeita com duas mutações separada por dois nucleotídeos na posição +1491 (**GGTCTACTGTCC**), repetições diretas de meios EREs e meias palíndromes dispersas por toda a região promotora. Identificamos também três sítios AP-1 nas posições +1783, +246 e -896, treze sítios SP-1

nas posições +654, +647, +550, +380, +353, +336, +202, +169, -178, -452, -462, -644 e -783 e uma região para ligação do FoxA1 na posição -1864.

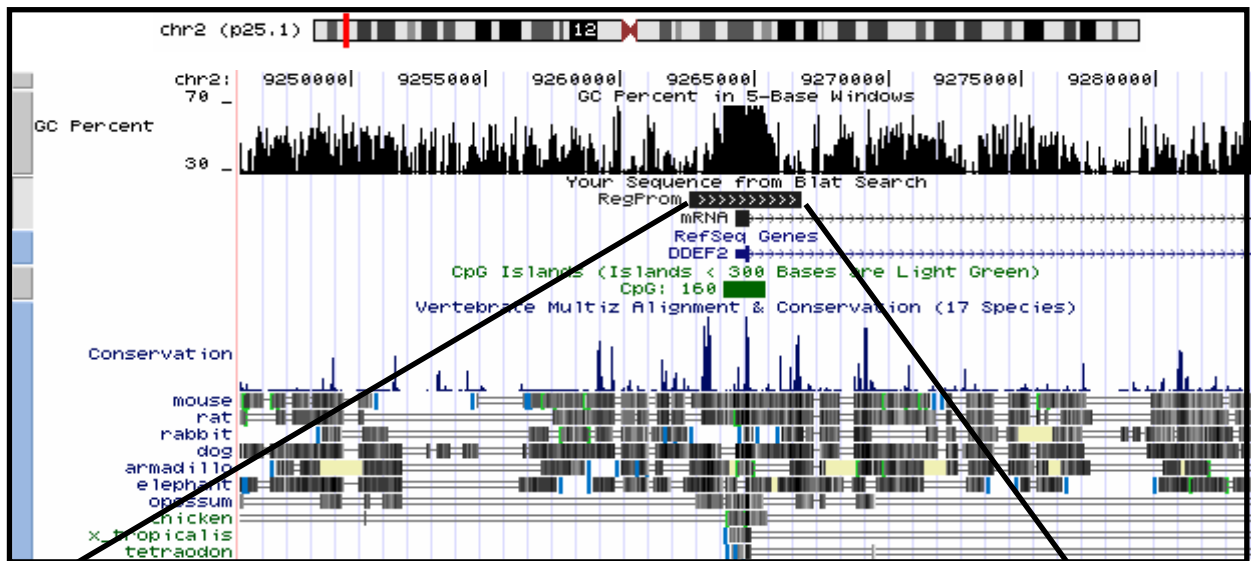


```

+1601 AGATGAGCTG AAGAATGTCA TCCTCTTAAA AGAATGAACA ACTTGGTCATG
+1551 TAGAAATTCT CTGGAATGCT CACTTGTCCT ACAAAGGCAG GGGAGCAGAA
+1501 AACATGTAGT TTTTTTGTTA TTGGTATACA TAATTGTAAG ACTTCGAGAT
+1451 AATTTTACTA GAAGTCCACA TAATTTTAAT AATTGCCTTT TTCCTGAAAA
+1401 GATTGCTAAT AAATTAACAA TGTGAAGGCT AGAAAGCTGG GCAAGCATAA
+1351 TCCGGTGGGA CTCAGGATTG CTGGCTGGAT TGTCCCGTTT GATCAGACAT
+1301 TGTTTCTTAG ATGAATATTC AGGACCGCCCT CGTGTATAAA AGTTGTCCTT
//
+201 CAGCGCCCTG TGAGCGTCGG CAGTAGTCAG GCAGCCAGGG CTCCTTGGGC
+151 GATCGCCCTG GGTAGAGGAG AGGAGTTTCC GGGGCTCGGG TCCGGGTCCGC
+101 CTTCCAGGGG AACGAGCGCG GAAGCAAGTG GGCGGCGAGA GCGGAGCAA
+51 GAGACGCTGG AGGGCGTGGA CGCAGCGGGC TTTGGAAAGG CCCAAGTTA
+/-1 ATGAGGCGTG CGCCGGCTGC CGAGCGCCTC TTGGAGCTGG GCTTTCCCCC
-51 GCGGTGCGGG CGCCAGGAGC CGCCTTTTCC GCTGGGTGTC ACTCGGGGGT
-101 GGGGAAGATG GCCCATTCAA AAGCGCCGCG AGGGGGCCCG GCCAGTGCCC
-151 TTCAGTGAGC GCTCGCAAGA GGACCGGCAGA GGCCCGGCAG TTCGGAGCTC
-201 CGGGACCTTG TGGCGCATCA GGACGCGGCT GTCCCTCTGC CGGGACCCAG
//
-1151 CGCACTCGCA GCCGCACGGG CACCGGCTTC TCCGCAGCAC CTCCAACTCTT
-1201 GCCTGAAAGG GGCAGCTCCC GGGCAAGACA AGGTAAGGTC CCGGCACTCG
-1251 CGCTCCCGAG GAGTGGGTCT CGGGGGTAGT GAGTTGGGAG GAGTAGGAAG
-1301 CTTGTTCACA GGTTCGGCTC CTGTATGGAG AAATCAAAAC TCATACCAAG
-1351 TTTCTGGGGC AATGGAAGAA ACAGAAACAA GCTGGGGCCA GGAGAGCTGG
-1401 GCAGAGAGGG GAGGCTGGGG AGATCCGGGC CAGGCAGGGG GCCTCGCGGA
-1451 CCGCGCCCGC GCCCGCGCCC ATCACGACCG TCCTTGTCCC GTGGTGCGTC

```

Figura 7. Resultado representativo da análise das seqüências da região promotora do gene *PHLDA1*. Figura obtida pelo BLAT (genome.ucsc.edu). As regiões em vermelho representam meios EREs, a região em azul representa o sítio AP-1, as regiões em rosa representam os sítios SP-1, a região em verde representa o box TATA e a região em lilás representa o box GATA-1. Os nucleotídeos em negrito representam uma palíndrome imperfeita com duas mutações separada por duas bases. As barras // representam cortes da região promotora.



```

+1551 CCAAGCTGCC ACCTCATATA GCAACTTCTT ACATGGGGGC TTAAAAAGA
+1501 TTGTTTGACT GGTCTACTGT CTTGCAGTGT CAGGAGACGG CTTTGTCTGA
+1451 CATATTGAAT TTCCAGTGTC TCTCACACTT CCTCCTTTTC AGATGCACAA
+1401 AAGGTTTTTG TAAAGTTTCT CTTGGTTTTA CCGCTGGCAG CTACAGAAAC
+1351 CATGCCACAA GTCTGGTGTA GAGTTATAGG GTGTGATTTT ATTTGACTGG
//
+901 GTCCCCTATA TAAATAAGC ACCCATCTCT TCATCTTGTCT CCTAGGCCTG
+851 CGACGATGCA ATGACTGCAC GCAAAGCGCA CATTCACGGT CAGGTCACTT
+801 CTGGCGTCCG GCTGTGGTCC CCGCAGGGTG CCCGCCGGCG GAGCGCATCC
+751 TCCGGCAGGG GCGAGCTCC GACCCCGCT TTCCTCATGG GCCGGCGCGG
+701 CCCGCCGTTT AAGTGGGGAG CCCAGAGGTG CTCCGCGCCG TGGGCGGGGG
+651 GCGGTTGGCG CGCACAAGGC GGACTCCGG CGGGGCGCAC CTCCACACGC
+601 ACCCTCGCGG GCAGCGGGTC GGAGTCGGGG CCTCGGGCCG GCTGGGGGCG
+551 GGGCATGGGC GCGGCGCGCG GGGCCCGGAA CGCCGAGACA ATGCGGCGCG
+501 CGGCGGCCAG GAACGGCTCG GCGGGCCGGG GCGCGCGCCG CCTTCTTCC
+451 TGCGGGATCC GCTTCCCGGC GCGCGGCAG CGGCGAGCGC GCCGATTGGC
+401 GGCCCGGTCC TCCCGCGCC CCGCCCCACG CCCGGCCGGC CGCCGCCC
+351 GGCCCGGACC CGCCCTCTC CGCGGGAGGC GTCGGGGCC GCGGCTGGGT
+301 GGCGGTAGT TCCCGCCGGC TGTGCGCGCC CGCCTCGGG CTGCTCTGA
+251 GAGGACGCGG CGGCAGCGGA CTCGGAGCCC TCGGCGCGCA GGCGGCGGA
+201 CCGGCCGAGC TGCGCGGGGC TCGCGCCGC CCCTGCTCCG CCGCCAGGCC
//
-1701 GAATGATTGC AACCAAAAAG GTAGCTGAAT ATTTCTTAAG CGAAGGAAGC
-1751 ATTGTCATG ATGTCTTTCT TTAGAAAGCT TGATTATGTT GAAAGTTCTG
-1801 TTGCTTTTCC CCACTGCAGT TGTCAGTTA AATATTATTA AACTGGCAG
-1851 ATGTTGAAA GCCAAGCAA CAAGAATTGC TATTAATTA TGCATACCTT
-1901 TCTCTGATTA ATTTTAGTTT ACAGTGTATA ATTCAAAGC CCTTTTTGTA

```

Figura 8. Resultado representativo da análise das seqüências da região promotora do gene *DDEF2*. Figura obtida pelo BLAT (genome.ucsc.edu). As regiões em vermelho representam meios EREs, a região em azul representa o sítio AP-1, as regiões em rosa representam os sítios SP-1, a região em verde representa o box TATA e a região em laranja representa o FoxA1. Os nucleotídeos em negrito representam uma palíndrome imperfeita com duas mutações separada por duas bases. As barras // representam cortes da região promotora.

4.2. Avaliação do nível de expressão dos transcritos *PHLDA1* e *DDEF2* em diferentes linhagens celulares.

Nós examinamos a expressão dos genes *PHLDA1* e *DDEF2* em diferentes linhagens celulares de mama. As linhagens utilizadas foram: MCF-7, derivada de adenocarcinoma de mama, ER+; MDA-MB-231, derivada de adenocarcinoma de mama, ER-; S30, clone da MDA-MB-231 transfectada com o receptor de estrógeno, ER+; Hb4a, derivada do epitélio normal da mama.

Todas as linhagens celulares foram mantidas em SN por 48 horas, e após este período foi realizada a extração de RNA e síntese do cDNA conforme descrito em materiais e métodos. Os resultados desta análise são referentes a um experimento e representam as expressões relativas, obtidas pela técnica de RT-PCR em tempo real dos transcritos *PHLDA1* e *DDEF2* nas diferentes linhagens celulares de câncer de mama comparadas a uma linhagem da mama normal.

A figura 9 mostra o gráfico representativo da expressão relativa do *PHLDA1*. A linhagem celular MDA-MB-231, que possui um fenótipo mais invasivo, apresentou expressão até quatro vezes maior do transcrito *PHLDA1* quando comparada à MCF-7 e cinco vezes maior quando comparada à S30. A linhagem Hb4a expressou o *PHLDA1* 34 vezes menos quando comparada à MCF-7 e 138 vezes menos quando foi comparada à MDA-MB-231.

A análise do gráfico representativo da expressão relativa do *DDEF2* (figura 10) mostrou que a linhagem MDA-MB-231 expressou 1,2 vezes mais o

transcrito que a MCF-7 e 2,0 vezes mais que a S30. A linhagem MCF-7 expressou 3,9 vezes mais o transcrito que a derivada da mama normal Hb4a.

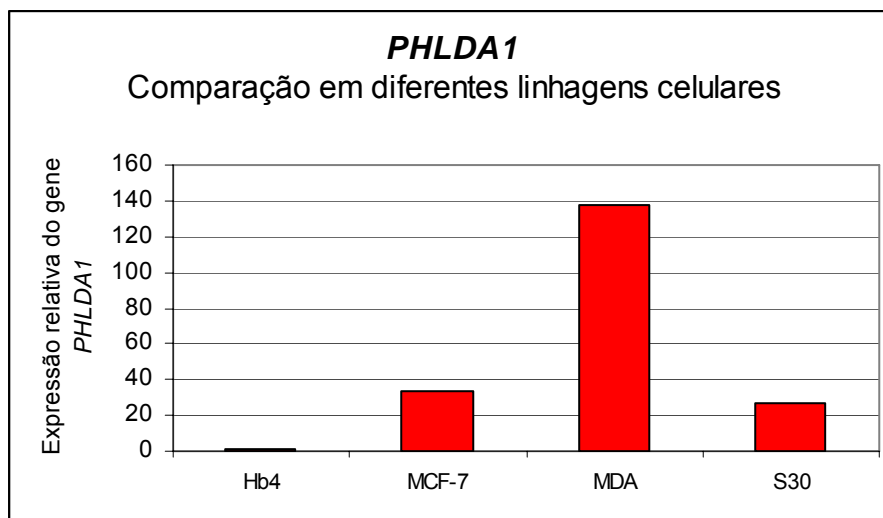


Figura 9. Expressão relativa do gene *PHLDA1* em diferentes linhagens celulares. As células Hb4a, C5.2, SKBR3, MCF-7 e MDA-MB-231 foram mantidas em SN e a célula S30 foi mantida em ST. As barras a expressão relativa do gene *PHLDA1* em diferentes linhagens de câncer de mama comparadas a uma linhagem da mama normal (Hb4a).

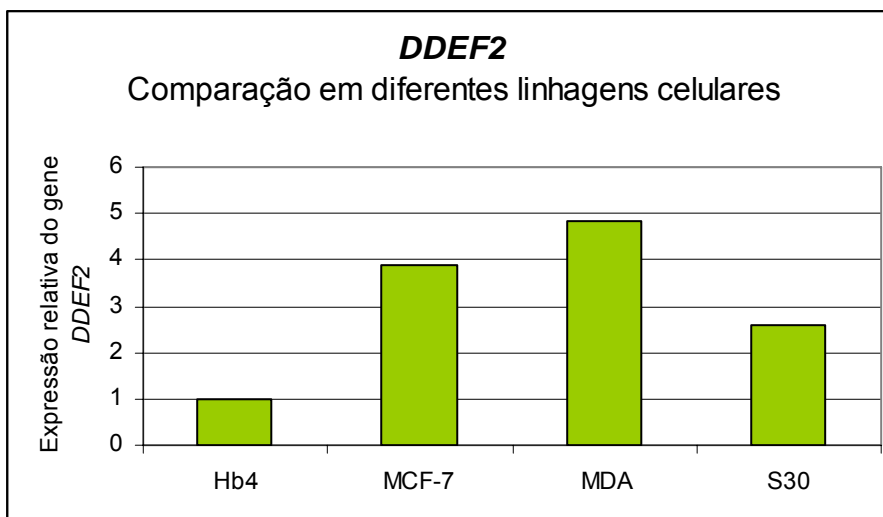


Figura 10. Expressão relativa do gene *DDEF2* em diferentes linhagens celulares. As células Hb4a, C5.2, SKBR3, MCF-7 e MDA-MB-231 foram mantidas em SN e a célula S30 foi mantida em ST. As barras representam a expressão relativa do gene *DDEF2* em diferentes linhagens de câncer de mama comparadas a uma linhagem da mama normal (Hb4a).

4.3. Efeito do 17 β -estradiol na expressão dos genes *PHLDA1* e *DDEF2*.

Para avaliar qual o melhor tempo de tratamento e concentração de estradiol para cada transcrito estudado, fizemos uma curva de tempo de tratamento e concentração de E2 em MCF-7, e analisamos os níveis de expressão através da técnica RT-PCR em tempo real. As concentrações de E2 utilizadas foram de 10^{-10} M a 10^{-8} M e os tempos de tratamento foram de 2, 6 e 24 horas. Neste experimento comparamos a expressão relativa dos transcritos *PHLDA1* e *DDEF2* nas células tratadas com diferentes concentrações de E2 por diferentes tempos com as células mantidas em SN (Figura 11). O melhor tempo de tratamento com E2 para o *PHLDA1* foi por 6 horas, independente da concentração de estradiol utilizada. Para o *DDEF2*, apesar da alteração entre os tempos de tratamento ter sido muito pequena, escolhemos o tempo de 6 horas para a realização dos experimentos. As concentrações de E2, 10^{-10} , 10^{-9} e 10^{-8} M também apresentaram o mesmo efeito sobre a expressão do *DDEF2*, portanto, optamos por usar a concentração de E2 mais utilizada na literatura, 10^{-8} M, em nossos experimentos.

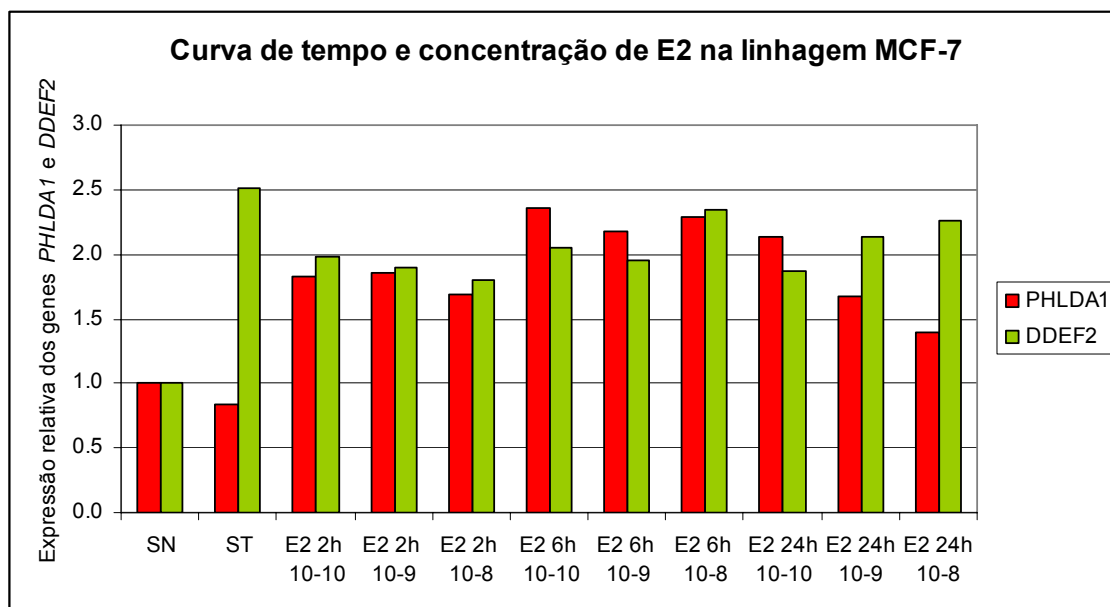


Figura 11. Expressão relativa dos genes *PHLDA1* e *DDEF2* nas células MCF-7 submetidas ao tratamento com E2. SN, células mantidas em soro normal; ST, células mantidas em soro tratado; E2, células mantidas em ST e tratadas com 17β -estradiol. As barras representam a expressão relativa dos genes *PHLDA1* e *DDEF2* tratados com E2 em relação às células mantidas em SN em um experimento.

Para avaliar se o efeito do E2 na expressão dos genes *PHLDA1* e *DDEF2*, era via receptor de estrógeno, realizamos um experimento utilizando os tratamentos de 17β -estradiol (10^{-8} M) por 6 horas, tamoxifeno (10^{-6} M) por 24 horas e E2 e tamoxifeno simultaneamente (10^{-7} M e 10^{-6} M, respectivamente) por 24 horas, na linhagem celular MCF-7. A figura 12 mostra o gráfico representativo das expressões relativas dos transcritos *PHLDA1* e *DDEF2* nas células tratadas com E2 e/ou TAM, comparadas às células mantidas em SN. O tratamento com E2 por 6 horas causou um aumento de 4,4 vezes na expressão do *PHLDA1* em relação às células mantidas em ST. O tratamento com TAM e E2+TAM também promoveu aumento da expressão deste gene de 4,1 e 3,6 vezes, respectivamente, em relação ao ST. A expressão do *DDEF2* sofreu um aumento de 1,4 vezes nas células mantidas em ST em relação às células mantidas em SN. Os

tratamentos com E2, TAM e E2+TAM causaram aumento na expressão do transcrito de 1,4, 1,2 e 1,3 vezes, respectivamente, em relação ao ST.

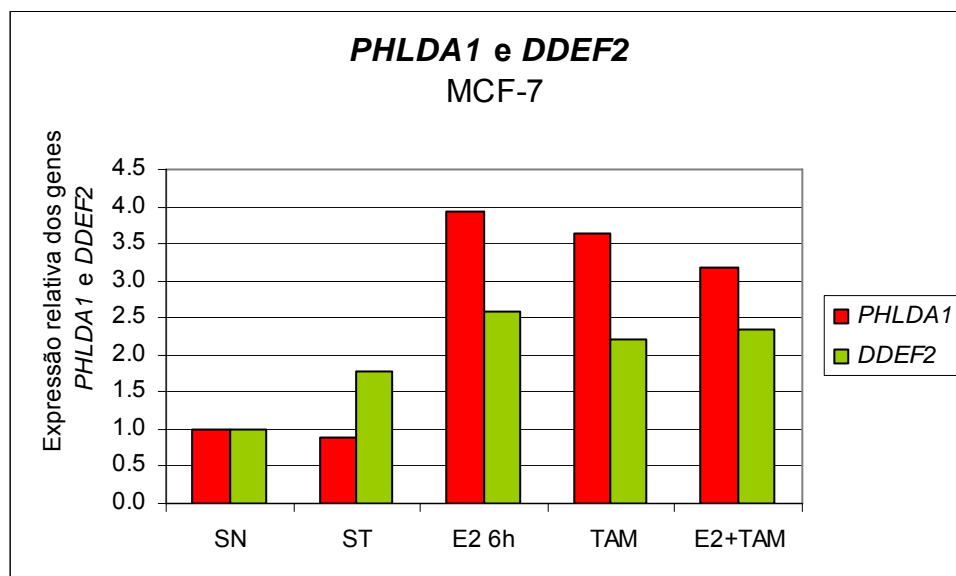


Figura 12. Expressão relativa dos genes *PHLDA1* e *DDEF2* nas células MCF-7 submetidas a diferentes tratamentos hormonais. SN, células mantidas em soro normal; ST, células mantidas em soro tratado; E2, células mantidas em ST e tratadas com 17β -estradiol; TAM, células mantidas em ST e tratadas com tamoxifeno. As barras representam a expressão relativa dos genes *PHLDA1* e *DDEF2* nos diversos tratamentos em relação às células mantidas em SN em um experimento.

Como os tratamentos com TAM não confirmaram se a regulação dos genes em estudo estava sendo através do ER, passamos a utilizar o antiestrógeno puro ICI182.780. Neste experimento, realizado em triplicata, tratamos as células MCF-7 com E2 (10^{-8} M) por 2, 6 e 24 horas, com ICI (10^{-6} M) por 2, 6 e 24 horas e tratamos com ICI (10^{-6} M) e após 1 hora adicionamos E2 (10^{-8} M), também por 2, 6 e 24 horas.

A análise da expressão do *PHLDA1* após os tratamentos referidos acima, está representada na figura 13. Os resultados mostraram um aumento significativo de 2,9 ($\pm 0,9$) vezes ($p=0,05$) na expressão do *PHLDA1* nas

células MCF-7 tratadas com E2 por 6 horas em relação às células mantidas em ST. Os tratamentos com ICI não só impediram o aumento da expressão do *PHLDA1*, mas também diminuíram a expressão do mesmo quando comparados às células mantidas em SN e ST nos três tempos. Este efeito de diminuição da expressão não foi revertido quando adicionamos E2 às células com ICI. O antiestrógeno bloqueou a sinalização via receptor de estrógeno comprovando que a expressão do *PHLDA1* é regulada pelo E2 via ER.

O gráfico da figura 14 representa o efeito dos tratamentos na regulação da expressão do *DDEF2*. Os diferentes tratamentos com E2, ICI e ICI+E2 não apresentaram diferenças significativas entre si. A expressão do *DDEF2* aumentou significativamente 1,3 ($\pm 0,1$) vezes ($p=0,01$) nas células mantidas em ST quando comparadas às células mantidas em SN.

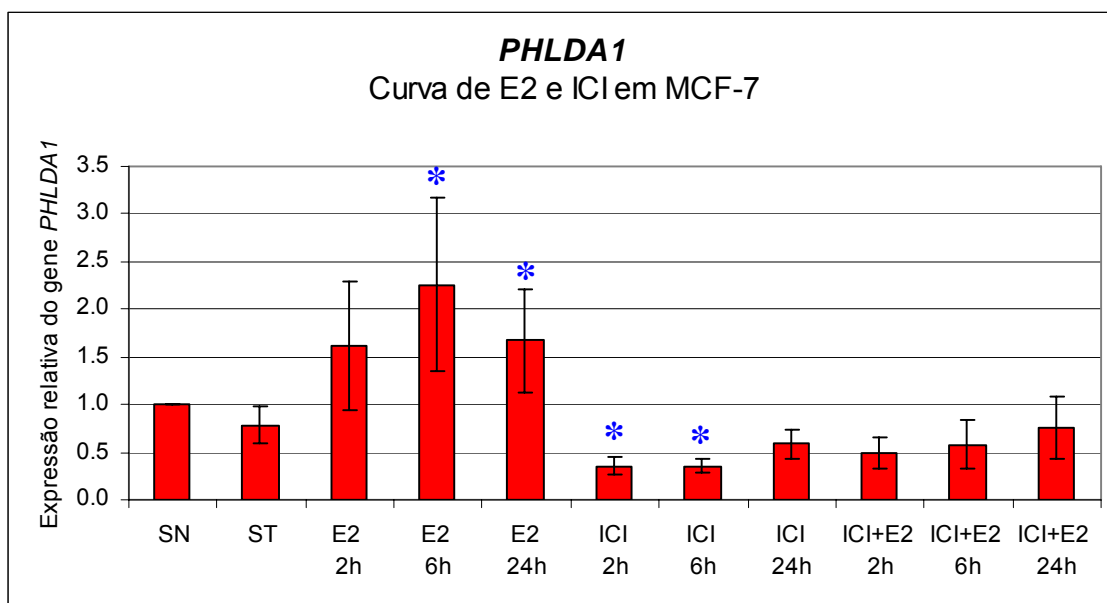


Figura 13. Expressão relativa do gene *PHLDA1* nas células MCF-7 submetidas a tratamentos com 17 β -estradiol e ICI182.780. SN, células mantidas em soro normal; ST, células mantidas em soro tratado; E2, células mantidas em ST e tratadas com 17 β -estradiol; ICI, células mantidas em ST e tratadas com ICI 182.780. As barras representam a expressão relativa e o desvio padrão do gene *PHLDA1* nos diversos tratamentos em relação às células mantidas em SN (média de três experimentos). *, Teste *Student's t*, valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

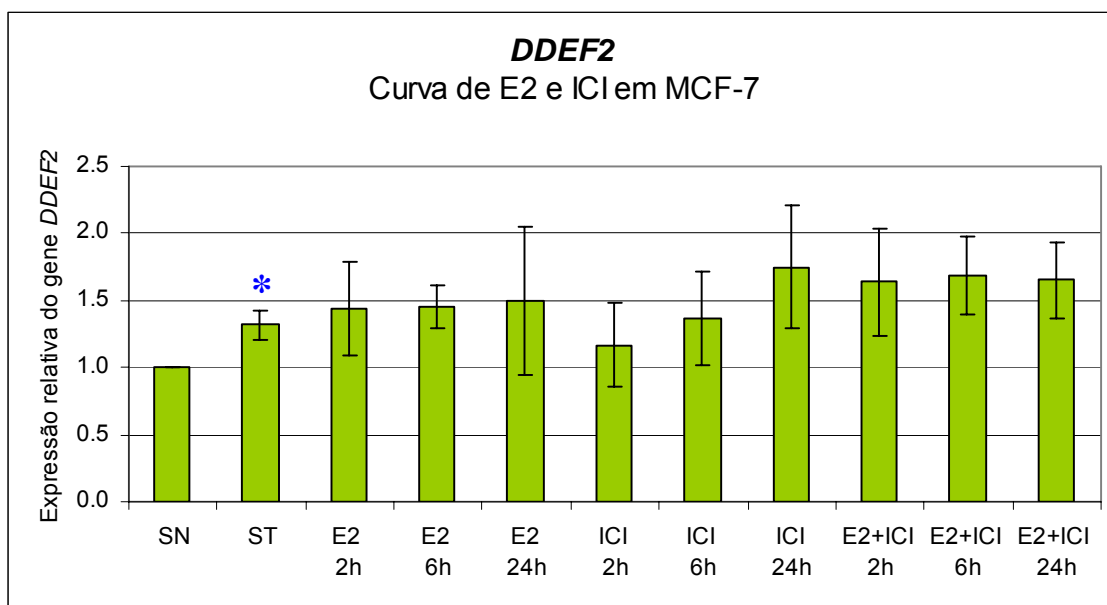


Figura 14. Expressão relativa do gene *DDEF2* nas células MCF-7 submetidas a tratamentos com 17 β -estradiol e ICI182.780. SN, células mantidas em soro normal; ST, células mantidas em soro tratado; E2, células mantidas em ST e tratadas com 17 β -estradiol; ICI, células mantidas em ST e tratadas com ICI 182.780. As barras representam a expressão relativa e o desvio padrão do gene *DDEF2* nos diversos tratamentos em relação às células mantidas em SN (média de três experimentos). *, Teste *Student's t*, valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.4. Efeito da laminina na expressão dos genes *PHLDA1* e *DDEF2*.

Realizamos um ensaio com a linhagem celular MDA-MB-231. As células, quando tripsinizadas, foram adicionadas às garrafas com e sem a laminina e após 48 horas realizamos a extração do RNA. O objetivo deste experimento foi avaliar se a laminina tinha algum efeito na expressão dos genes *PHLDA1* e *DDEF2*. As figuras 15 e 16 mostram os gráficos representativos da expressão destes dois genes após 48 horas de adesão à laminina comparadas às células aderidas no plástico e mantidas em SN. A manutenção das células em ST sem laminina, SN com laminina e ST com laminina não promoveu alterações significativas na expressão dos dois genes quando comparadas

com as células mantidas em SN sem laminina. Esta análise mostrou que a laminina não interfere na expressão dos genes em estudo nas células MDA-MB-231.

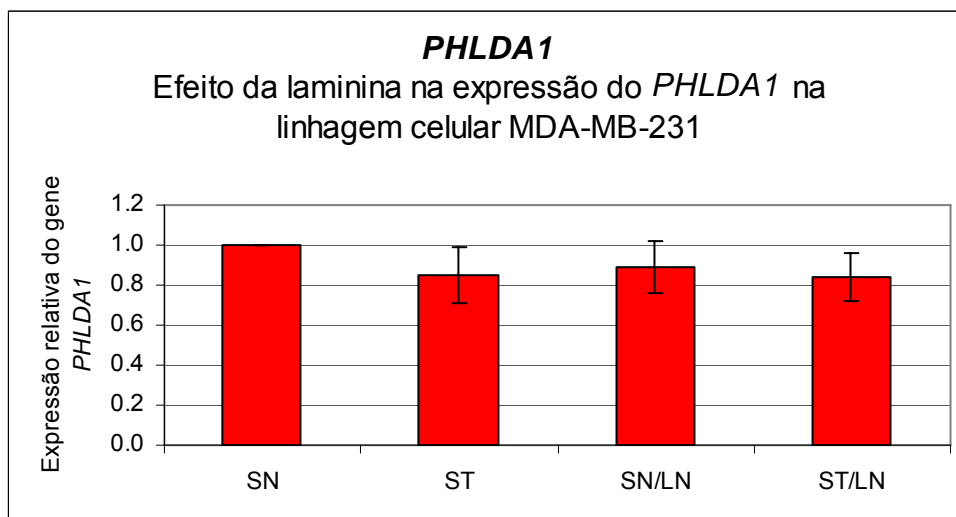


Figura 15. Expressão relativa do gene *PHLDA1* nas células MDA-MB-231 aderidas ou não aderidas à laminina. SN, células mantidas em soro normal; ST, células mantidas em soro tratado; LN, células aderidas à laminina. As barras representam a expressão relativa e o desvio padrão do gene *PHLDA1* nas células aderidas ou não à laminina em relação às células mantidas em SN (média de três experimentos).

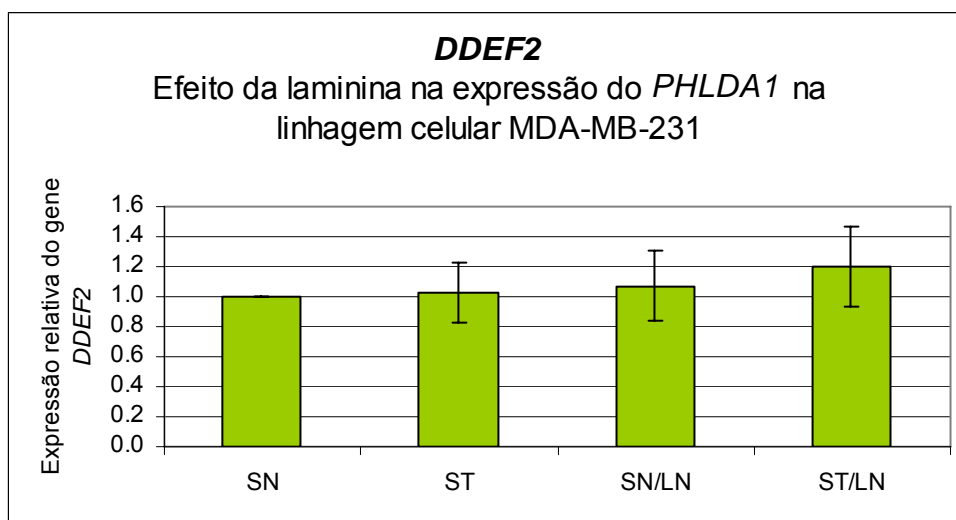


Figura 16. Expressão relativa do gene *DDEF2* nas células MDA-MB-231 aderidas ou não aderidas à laminina. SN, células mantidas em soro normal; ST, células mantidas em soro tratado; LN, células aderidas à laminina. As barras representam a expressão relativa e o desvio padrão do gene *DDEF2* nas células aderidas ou não à laminina em relação às células mantidas em SN (média de três experimentos).

A avaliação do efeito da laminina na expressão dos genes estudados não pôde ser realizada na linhagem celular MCF-7, porque estas células demoram muito para aderir nas garrafas com a laminina. Portanto, optamos por usar a linhagem celular S30 como modelo para analisar o efeito do ER e da laminina, já que a S30 é uma linhagem ER-positiva.

Realizamos um experimento, em triplicata, onde deixamos as células aderidas à laminina ou aderidas ao plástico por 24, 48 e 72 horas. A expressão do *PHLDA1* teve um aumento significativo de 1,7 ($\pm 0,3$) vezes ($p=0,03$) nas células mantidas em ST ou em SN aderidas à laminina por 48 horas comparadas às células mantidas em ST aderidas ao plástico pelo mesmo tempo (Figura 17). A figura 18 mostra o gráfico representativo do efeito da laminina na expressão do *DDEF2*. Nas células mantidas em ST e aderidas à laminina por 48 horas observamos um aumento, não significativo,

da expressão do *DDEF2* de 1,2 ($\pm 0,3$) vezes quando comparadas às células nas mesmas condições aderidas ao plástico.

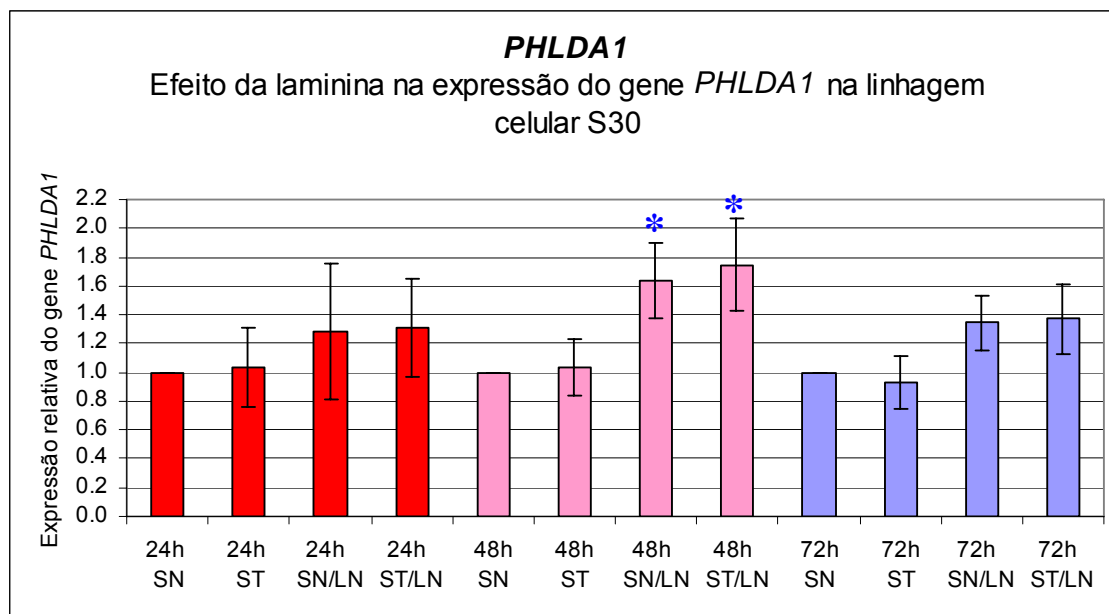


Figura 17. Expressão relativa do gene *PHLDA1* nas células S30 aderidas ou não aderidas à laminina. SN, células mantidas em soro normal; ST, células mantidas em soro tratado; LN, células aderidas à laminina. As barras representam a expressão relativa e o desvio padrão do gene *PHLDA1* nas células aderidas ou não à laminina em relação às células mantidas em SN de cada tempo (média de três experimentos). *, Teste *Student's t*, valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

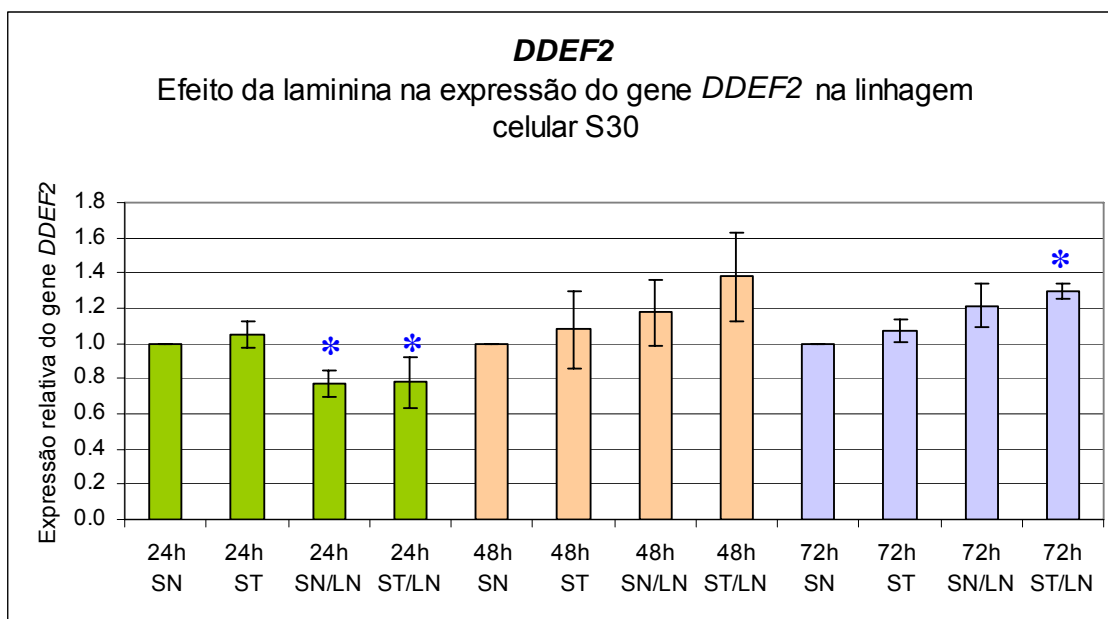


Figura 18. Expressão relativa do gene *DDEF2* nas células S30 aderidas ou não aderidas à laminina. SN, células mantidas em soro normal; ST, células mantidas em soro tratado; LN, células aderidas à laminina. As barras representam a expressão relativa e o desvio padrão do gene *DDEF2* nas células aderidas ou não à laminina em relação às células mantidas em SN de cada tempo (média de três experimentos). *, Teste *Student's t*, valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

As células S30 aderidas ou não à laminina por 48 horas foram submetidas a tratamentos com 17β -estradiol e ICI182.780. Tratamos as células com E2 (10^{-8} M) por 6 horas, com ICI (10^{-6} M) por 6 horas e com ICI (10^{-6} M) e após 1 hora adicionamos E2 (10^{-8} M) por 6 horas.

Os gráficos das figuras 19 e 20 mostram as expressões relativas, obtidas pela técnica de RT-PCR em tempo real, dos genes *PHLDA1* e *DDEF2* nas células S30 submetidas a diferentes tratamentos e aderidas ou não à laminina comparadas às células mantidas em SN aderidas ao plástico. As células que receberam os tratamentos com E2, ICI e ICI+E2 não apresentaram diferenças significativas na expressão do *PHLDA1* quando comparadas às células mantidas em ST (Figura 19). Quando comparamos as células mantidas em

ST aderidas à laminina às células submetidas aos tratamentos aderidas à laminina, observamos uma diminuição, também não significativa, da expressão de 1,3 ($\pm 0,3$) vezes do transcrito deste gene. A expressão do *DDEF2* diminuiu 2,0 ($\pm 0,1$) vezes ($p=0,01$) quando as células foram tratadas com E2 e 1,5 ($\pm 0,1$) vezes quando as células foram tratadas com ICI e ICI+E2 comparadas às células mantidas em ST (Figura 20). As células aderidas à monocamada submetidas ao tratamento com E2 tiveram uma diminuição significativa da expressão de 1,6 ($\pm 0,1$) vezes ($p=0,04$) quando comparadas às células mantidas em ST aderidas à LN. Os tratamentos com ICI e E2+ICI nas células aderidas à laminina comparadas às células em ST aderidas à laminina também diminuíram significativamente a expressão de *DDEF2*.

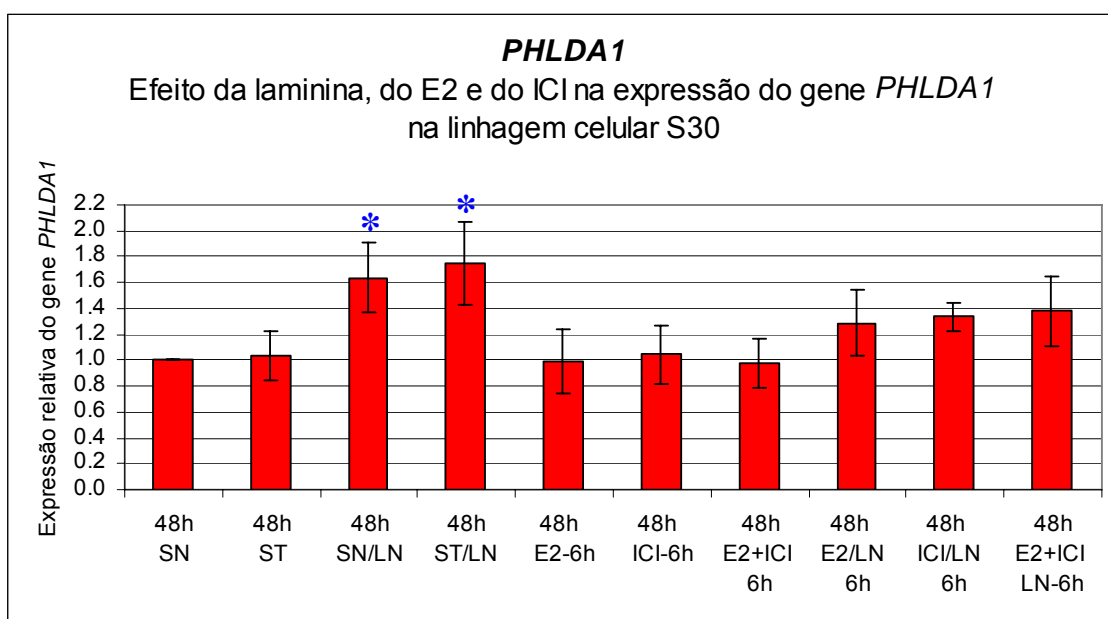


Figura 19. Expressão relativa do gene *PHLDA1* nas células S30 aderidas

ou não aderidas à laminina e submetidas a tratamentos com 17 β -estradiol e ICI182.780. SN, células mantidas em soro normal; ST, células mantidas em soro tratado; E2, células mantidas em ST e tratadas com 17 β -estradiol; ICI, células mantidas em ST e tratadas com ICI182.780; LN, células aderidas à laminina. As barras representam a expressão relativa e o desvio padrão do gene *PHLDA1* nas células aderidas ou não à laminina e submetidas a diferentes tratamentos em relação às células mantidas em SN (média de três experimentos). *, Teste *Student's t*, valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

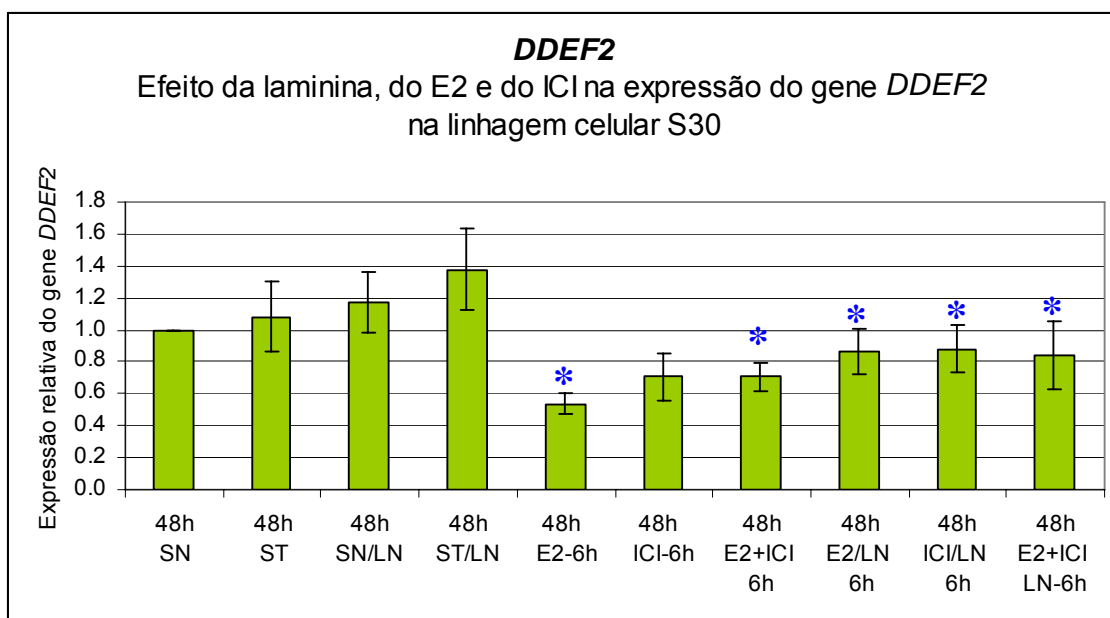


Figura 20. Expressão relativa do gene *DDEF2* nas células S30 aderidas ou não aderidas à laminina e submetidas a tratamentos com 17 β -estradiol e ICI182.780. SN, células mantidas em soro normal; ST, células mantidas em soro tratado; E2, células mantidas em ST e tratadas com 17 β -estradiol; ICI, células mantidas em ST e tratadas com ICI182.780; LN, células aderidas à laminina. As barras representam a expressão relativa e o desvio padrão do gene *DDEF2* nas células aderidas ou não à laminina e submetidas a diferentes tratamentos em relação às células mantidas em SN (média de três experimentos). *, Teste *Student's t*, valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. DISCUSSÃO

Estudo prévio de nosso grupo, utilizando a técnica DDRT-PCR, identificou o gene *PHLDA1* mais expresso, e o gene *DDEF2* menos expresso, nas células de câncer de mama ER-positivas S30 aderidas à laminina comparadas às células aderidas ao plástico (Da Ros, 2003).

No presente estudo investigamos os efeitos do 17 β -estradiol (E2) e da laminina na regulação da expressão dos genes *DDEF2* e *PHLDA1* em células de câncer de mama.

5.1. Análise das regiões promotoras dos genes *DDEF2* e *PHLDA1*.

O receptor de estrógeno pode regular a transcrição por quatro mecanismos distintos. No mecanismo clássico, o complexo hormônio-receptor regula a expressão gênica através de sua ligação aos EREs presentes nas regiões promotoras dos genes alvos das ações dos estrógenos. Os ERs se ligam com maior afinidade à seqüência do ERE consenso (ou palíndrome perfeita), que é formado por duas seqüências de cinco pares de bases separadas por três nucleotídeos, 5'-GGTCAnnnTGACC-3' (Walker *et al.*, 1984; Gruber *et al.*, 2004). No genoma humano, entretanto, a maioria dos genes alvos das ações dos estrógenos não contém a seqüência do ERE consenso, e sim seqüências palindrômicas

que apresentam uma ou mais mutações (Gruber *et al.*, 2004). Todos os EREs com variação em uma única base ainda se ligam ao ER, embora algumas substituições nucleotídicas possam ser mais prejudiciais que outras (Bourdeau *et al.*, 2004). Algumas substituições simétricas de uma base em cada lado da palíndrome podem afetar mais drasticamente a ligação ao ER que a substituição unilateral (Bourdeau *et al.*, 2004). Seqüências de meios EREs associados a sítios SP-1, repetições diretas de meios EREs, e EREs com espaçamento diferente entre as duas seqüências também estão relacionadas às respostas aos estrógenos (Aumais *et al.*, 1996; Anderson e Gorski, 2000; O'Lone *et al.*, 2004).

A análise das regiões promotoras dos genes *PHLDA1* e *DDEF2* revelou diversas seqüências responsivas aos estrógenos como, palíndromes imperfeitas, sítios AP-1, sítios SP-1, FoxA1 e meios EREs, mostrando que estes genes têm potencial para serem regulados pelos estrógenos.

A região promotora proximal do *PHLDA1* possui uma palíndrome imperfeita com duas mutações, uma região para a ligação do sítio AP-1 e três para a ligação do sítio SP-1 e diversos meios EREs dispersos. Na região promotora proximal do gene *DDEF2* encontramos uma palíndrome imperfeita com duas mutações, três sítios AP-1, 13 sítios SP-1, diversos meios EREs e uma região para a ligação do FoxA1. Carrol e colaboradores (2005) mostraram que a ligação do FoxA1 é essencial para as interações do ER com a cromatina e subsequente regulação da expressão do gene alvo.

Muitos genes regulados pelos estrógenos não possuem a seqüência dos EREs e são regulados por mecanismos não clássicos (Klinge, 2001).

Estes genes são regulados através de interações do receptor de estrógeno com outros fatores de transcrição, como AP-1, SP-1 e NF- κ B, que então se ligam em suas seqüências responsivas no DNA localizadas nas regiões promotoras dos genes alvos (Cicatiello *et al.*, 2004). Kinics e colaboradores (2007), através da análise das regiões promotoras de genes regulados por estrógenos, constataram que as regiões onde ocorre a ligação do ER, mas não contém EREs são regiões ricas em AP-1.

5.2. Avaliação do nível de expressão dos transcritos *PHLDA1* e *DDEF2* em diferentes linhagens celulares

Utilizamos diferentes linhagens celulares da mama, normal e tumoral, para avaliar o perfil da expressão dos transcritos *DDEF2* e *PHLDA1*. A linhagem derivada do epitélio luminal normal da mama HB4a foi usada como controle. A MCF-7 é uma linhagem ER-positiva, sensível ao hormônio e de baixa invasividade. A MDA-MB-231 é uma linhagem ER-negativa, insensível ao hormônio, de alta invasividade e com potencial metastático. A S30 é um clone da MDA-MB-231 transfectada com o ER, e foi usada em nosso estudo para substituir a linhagem MCF-7 nos ensaios com laminina. Nossos resultados mostraram que existem diferenças na expressão do *DDEF2* e, principalmente, na expressão do *PHLDA1*, nestas diferentes linhagens da mama. A expressão dos dois transcritos foi maior na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231, comparada à linhagem derivada da mama normal HB4a (Figuras 9 e 10).

A expressão do *PHLDA1* foi 140 vezes maior na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 e 35 vezes maior na linhagem MCF-7 comparada à expressão do gene na linhagem celular derivada da mama normal HB4a. A análise do perfil de expressão do *PHLDA1* em 54 linhagens de células de mama utilizando uma plataforma da Affimetrix contendo cinco sondas para o gene *PHLDA1* mostra que a grande maioria das linhagens de origem luminal, incluindo a MCF-7, apresentam baixos níveis de expressão dos transcritos do *PHLDA1*, enquanto que as linhagens de origem basal como a MDA-MB-231 expressam altos níveis de *PHLDA1* (dados não publicados obtidos em colaboração com o Dr. P. Kenny do laboratório da Dra. Mina J. Bissell).

Neef e colaboradores (2002) analisaram linhagens celulares e tecidos de melanoma e obtiveram uma correlação entre a expressão do *PHLDA1* e a origem das células. As linhagens celulares derivadas de tumores metastáticos expressaram menos mRNA e proteína *PHLDA1* que as derivadas de tumores primários. A expressão do *PHLDA1* também foi menor nos tumores metastáticos comparados aos primários e aos nevi. Neste mesmo estudo foi visto que a expressão constitutiva do *PHLDA1* foi associada com a taxa de redução do crescimento e da formação de colônias e aumento da sensibilidade à apoptose.

Em estudos de nosso grupo também foi encontrado correlação entre a expressão do mRNA e da proteína do *PHLDA1* e a origem celular. O *PHLDA1* foi encontrado menos expresso em tumores primários de mama em relação ao tecido normal da mama, e essa regulação negativa foi associada

com um fenótipo mais agressivo de câncer de mama (Nagai *et al.*, 2003; Nagai *et al.*, 2007). As diferenças na expressão do *PHLDA1* entre a cultura celular e os tumores *in vivo* podem ser atribuídas a diversos fatores. Na cultura celular o oxigênio é ilimitado, o pH é adequado, o meio possui metabólitos, fatores de crescimento, citocinas, pelos quais as células teriam que competir *in vivo* (Vogel *et al.*, 2005).

5.3. Efeito do 17 β -estradiol na expressão dos genes *DDEF2* e *PHLDA1*

Os estrógenos têm papel muito importante no desenvolvimento e proliferação da mama, além de ter ação oncogênica em suas células (Russo *et al.*, 2006). Os antiestrógenos antagonizam as ações dos estrógenos. Assim, pacientes que possuem tumores ER-positivos podem ser tratadas através de diversas terapias anti-estrogênicas (Patel, Sharma e Jordan, 2007). Muitos genes são regulados pelos estrógenos. A investigação de como estes genes são regulados e de suas funções pode ajudar a identificar novos marcadores e beneficiar as pacientes que realizam o tratamento hormonal do câncer de mama.

A expressão de *DDEF2* nas células MCF-7 aumentou significativamente após a manutenção das células em soro tratado, mas não apresentou variação após os tratamentos com E2 e ICI182.780. Outros fatores retirados do soro devem participar de sua regulação negativa. O tratamento do soro com carvão dextrana não é específico apenas para a retirada dos esteróides, outras moléculas pequenas, como os fatores de

crescimento, também são adsorvidas pelo carvão. Quaisquer destas moléculas retiradas do soro podem estar participando de sua regulação. Na linhagem celular S30, a expressão do *DDEF2* diminuiu significativamente após os tratamentos com E2 e também diminuiu após os tratamentos com o antiestrógeno ICI182.780 em relação às células mantidas em ST.

Nós mostramos que o *PHLDA1* é regulado por E2 via ER nas células MCF-7. Sua expressão aumentou com a adição do E2 e foi inibida com o ICI182.780 mesmo após a adição de E2 às células com ICI. Nas células S30, a expressão do *PHLDA1* não apresentou alterações significativas em relação às células mantidas em ST após os tratamentos hormonais.

As diferenças na regulação da expressão dos genes *DDEF2* e *PHLDA1* nas linhagens MCF-7 e S30 (clone da MDA-MB-231 transfectado com o ER) podem ser atribuídas às diferenças existentes entre as linhagens. Assim como os tumores primários, as linhagens celulares são genomicamente heterogêneas, e possuem mais anormalidades genômicas que os tumores primários (Neve *et al.*, 2006). Talvez somente a presença do receptor de estrógeno na MDA-MB-231 (S30) não seja suficiente para que ela responda da mesma forma que a MCF-7. Os diferentes cofatores existentes nestas células ou mesmo a conformação da cromatina podem alterar a resposta aos estímulos hormonais.

A análise da região promotora nos mostrou que o *DDEF2* seria um gene com maior potencial para ser regulado pelos estrógenos. No entanto, o *PHLDA1* foi regulado pelos estrógenos nas células MCF-7 e o *DDEF2* não.

5.4. Efeito da laminina na expressão dos genes *DDEF2* e *PHLDA1*

As lamininas medeiam adesão celular através da interação com receptores na superfície das células e também regulam a diferenciação, sobrevivência, proliferação, atividades de proteases, migração e a expressão de genes específicos (Tungall *et al.*, 2000; Aumailley *et al.*, 2003; Egbring e Kleinman, 2003).

DDEF2 pertence a uma família de proteínas Arf GAP constituída por DDEF1, DDEF2, ACAP1 e ACAP2, e envolvida na regulação do citoesqueleto de actina (Furman *et al.*, 2002). DDEF1 funciona como regulador do remodelamento do citoesqueleto de actina e já foi visto que o aumento de sua expressão reduz a formação das adesões focais (Randazzo *et al.*, 2000). DDEF2 é o membro mais próximo de DDEF1, com a organização de domínios quase idêntica (Furman *et al.*, 2002). DDEF2 liga-se à paxilina (Turner, 2000), às proteínas tirosina quinase Pyk2 (Kondo *et al.*, 2000) e FAK (Randazzo *et al.*, 2000). O aumento de sua expressão levou à perda do recrutamento da paxilina para as placas de adesão focal inibindo a motilidade celular em células fibroblásticas de macaco COS-7 e nas células de leucemia linfóide humana U937 (Oshiro *et al.*, 2002).

A expressão do DDEF2 gene não apresentou alteração entre as células aderidas à laminina e ao plástico, nas células MDA-MB-231. A adesão das células S30 à laminina aumentou a expressão do *DDEF2*. As células S30 são clones das células MDA-MB-231 transfectadas com o receptor de estrógeno, portanto a diferença entre essas linhagens é a

presença do ER. A presença do ER modificou a resposta das células à laminina, sugerindo que o ER tem participação na via de sinalização da laminina.

O aumento da expressão do *PHLDA1* foi associado com o aumento da morte celular programada em células endoteliais vasculares humanas HUVEC e HAEC (Hossain *et al.*, 2003) e em células de melanomas (Neef *et al.*, 2002). O aumento de expressão do *PHLDA1* também causou alterações morfológicas, diminuiu a adesão celular, promoveu rompimento do complexo de adesão focal, e anoikis - morte celular programada mediada pelo descolamento das células (Hossain *et al.*, 2003). Estudos também indicaram que o *PHLDA1* se colocaliza com a FAK (Kuske e Johnson, 2000) sendo possível que o *PHLDA1* também esteja envolvido na via de sinalização da FAK, entretanto estudos adicionais serão necessários para confirmar essa hipótese. Não houve alteração da expressão do *PHLDA1* na linhagem celular MDA-MB-231 entre as células aderidas e as células não aderidas à laminina. A adesão das células S30 à laminina aumentou significativamente a expressão do *PHLDA1*, como mostrado no estudo anterior (Da Ros, 2003). Como ocorreu com a expressão do gene *DDEF2*, a expressão do *PHLDA1* foi positivamente regulada somente na linhagem celular S30, indicando que o ER deve participar da via de sinalização da laminina. Podemos sugerir que a laminina participa da regulação do *PHLDA1* e que esta regulação é dependente do receptor de estrógeno.

6. CONCLUSÕES

Concluimos que o gene *PHLDA1* é induzido pelo E2 via ER nas células MCF-7.

O gene *PHLDA1* não é regulado pelo E2 nas células S30.

A laminina induz a expressão do *PHLDA1* nas células S30, e possivelmente esta regulação é dependente do ER.

O gene *DDEF2* não é regulado por E2 nas células MCF-7, mas pode ser reprimido por outros fatores presentes no soro.

Nas células S30, o *DDEF2* é reprimido após os tratamentos com E2 e ICI.

DDEF2 pode ser regulado pela LN, pois apesar de o aumento de sua expressão não ter sido significativo, ocorreu um aumento de expressão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson I, Gorski J. Estrogen receptor alpha interaction with estrogen response element half-sites from the rat prolactin gene. *Biochem*. 2000;39(13):3842-7.
- Andreev J, Simon J-P, Sabatini DD, Kam J, Plowman G, Randazzo PA, Schlesseinger J. Identification of a new Pyk2 target protein with Arf-GAP activity. *Mol Cell Biol*. 1999; 2338-50.
- Ariazi EA, Lewis-Wambi JS, Gill SD, Pyle JR, Ariazi JL, Kim HR, Sharma CG, Cordera F, Shupp HA, LI T, Jordan VC. Emerging principles for the development of resistance to antihormonal therapy: implications for the clinical utility of fulvestrant. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006;102(1-5):128-38.
- Armelin HA. O papel de hormônios e fatores de crescimento no controle da proliferação celular em mamíferos. *Publicação ACIESP*. 1978;10:41-63.
- Aumailley M, El Khal A, Knoss N, TUnngal L. Laminin 5 processing and its integration into the ECM. *Matrix Biol*. 2003;22(1):49-54.
- Aumais JP, Lee HS, Degannes C, Horsford J, White JH. Function of directly repeated half-sites as response elements for steroid hormone receptors. *J Biol Chem*. 1996;271(21):12568-77.
- Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol*. 2003;21:1973-9.
- Björnström L, Sjöberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol*. 2005;14(4):833-42.
- Bosman FT, Stamenkoric I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*. 2003;200:423-8.
- Boudreau N, Jones P. Extracellular matrix and integrin signaling: the shape of things to come. *Biochem J*. 1999;339:481-8.
- Bourdeau V, Deschênes J, Métivier R, Nagai Y, Nguyen D, Bretschneider N, Gannon F, White JH, Mader S. Genome-wide identification of high affinity estrogen response elements in human and mouse. *Mol Endocrinol*. 2004;18(6):1411-27.

- Carmichael AR. Obesity and prognosis of breast cancer. *Obes Rev.* 2006;7(4):333-40.
- Carroll JS, Brow M. Estrogen receptor target gene: an evolving concept. *Mol Endocrinol.* 2006;20(6):1707-14.
- Carroll JS, Liu XS, Brodsky AS, Li W, Meyer CA, Szary AJ, Shao, Eli V, Hestermann JEW, Geistlinger TR, Fox EA, Silver PA, Brown M. Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell.* 2005;122:33–43.
- Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistlinger TR, Eeckhoute J, Brodsky AS, Keeton EK, Fertuck KC, Hall GF, Wang Q, Bekiranov S, Sementchenko V, Fox EA, Silver PA, Gingeras TR, Liu XS, Brown M. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet.* 2006;38(11):1289-97.
- Cicatiello L, Addeo R, Sasso A, Altucci L, Petrizzi VB, Borgo R, Cancemi M, Caporali S, Caristi S, Scafoglio C, Teti D, Bresciani F, Perillo B, Weisz A. Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing transcriptional derepression via c-Jun/c-Fos/estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a distal regulatory element and recruitment of cyclin D1 to its own gene promoter. *Mol Cell Biol.* 2004;24(16):7260-4.
- Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 2001;344:276-85.
- Coutinho-Camillo CM, Salaorni S, Sarkis AS, Nagai MA. Differentially expressed genes in the prostate cancer cell line LNCaP after exposure to androgen and anti-androgen. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006;166(2):130-8.
- Cui X, Schiff R, Arpino G, Osborne CK, Lee AV. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol.* 2005;23(30):7721-35.
- Da Ros N. Análise de expressão diferencial de genes em células de carcinoma de mama ER+/ER-. *Tese de doutorado-USP.* São Paulo, 2003.
- De Bosscher K, Berghe WV, Haegeman G. Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor κ B. *Oncogene.* 2006;25:6868–86.
- De Jong MM, Nolte IM, Meerman GJ, Van Der Graaf WT, Oosterwijk JC, Kleibeuker JH, Schaapveld M, De Vries EG. Genes other than *BRCA1* and *BRCA2* involved in breast cancer susceptibility. *J Med Genet.* 2002;39:225-42.

- Dowsett M, Nicholson RI, Pietras RJ. Biological characteristics of the pure antiestrogen fulvestrant: overcoming endocrine resistance. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;93:S11-8.
- Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk – where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med.* 2005;9:208-21.
- Engbring JA, Kleinman HK. The basement membrane matrix in malignancy. *J Pathol.* 2003;200:465-70.
- Freshney RI. *Culture of animal cells: A manual of basic technique.* New York: John Wiley and Sons Incorporation; 1993.
- Fuqua SAW, Schiff R, Parrà I, Moore JT, Mohsin SK, Osborne CK, Clark GM, Allred DC. Estrogen receptor β protein in human breast cancer: correlation with clinical tumor parameters. *Cancer Res.* 2003;63:2434-9.
- Furman C, Short SM, Subramanian RR, Zetter BR, Roberts TM. DEF-1/ASAP1 is a GTPase-activating protein (GAP) for ARF1 that enhances cell motility through a GAP-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2002;277(10):7962-9.
- Gelbfish GA, Davidson AL, Kopel S, Schreiberman B, Gelbfish JS, Degenshein GA, Herz BL, Cunningham JN. Relationship of estrogen and progesterone receptors to prognosis in breast cancer. *Ann Surg.* 1988;207(1):75-9.
- Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999;285:1028-32.
- Givant-Horwitz V, Davidson B, Reich R. Laminin-induced signaling in tumor cells. *Cancer Lett.* 2005;223:1-10.
- Gruber AJ, Gruber DM, Gruber AML, Wieser F, Huber JC. Anatomy of the estrogen response element. *Trends Endocrinol Metab.* 2004;15(2):73-8.
- Guo W, Giancotti FG. Integrin signaling during tumor progression. *Nature.* 2004;5:816-26.
- Gustafsson JA, Warner M. Estrogen receptor beta in the breast: role in estrogen responsiveness and development of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000;74(5):245-8.
- Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor β -isoform (ER β) of the human estrogen receptor modulates ER α transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinol.* 1999;140(12):5566-78.
- Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted of mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem.* 2001;276:36869-72.

- Hart SM. Modulation of nuclear receptor dependent transcription. *Biol Res.* 2002;35:295-303.
- Hashimoto S, Hashimoto A, Yamada A, Kojima C, Yamamoto H, Tsutsumi T, HIGASHI M, Mizoguchi A, Yagi R, Sabe H. A novel mode of action of an ArfGAP, AMAP2/PAG3/Papa lpha, in Arf6 function. *J Biol Chem.* 2004;279(36):37677-84.
- Hauck CR, Hsia DA, Schlaepfer DD. The focal adhesion kinase--a regulator of cell migration and invasion. *IUBMB Life.* 2002;53(2):115-9.
- Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogen.* 2000;21(3):427-33.
- Hinz T, Flindt S, Marx A, Janssen O, Kabelitz D. Inhibition of protein synthesis by the T cell receptor-inducible human TDAG51 gene product. *Cell Signal.* 2001;13:345-52.
- Hossain GS, Van Thienen JV, Werstuck GH, Zhou J, Sood SK, Dickhout JG, De Koning ABL, Tang D, Wu D, Falk E, Poddar R, Jacobsen DW, Zhang K, Kaufman RJ, Austin RC. TDAG51 is induced by homocysteine, promotes detachment-mediated programmed cell death, and contributes to the development of atherosclerosis in hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem.* 2003;278:30317-27.
- Howell SJ, Johnston SRD, Howell A. The use of selective estrogen receptor modulators and selective estrogen receptor down-regulators in breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2004;18(1):47-66.
- Howell A. Is fulvestrant ("Faslodex") just another selective estrogen receptor modulator? *Int J Gynecol Cancer.* 2006a;16(S2):521-3.
- Howell A. Pure estrogen antagonists for the treatment of advanced breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2006b;13:689-706.
- Hubbard TJP, Aken BL, Beal K, Ballester B, Caccamo M, Chen Y, Clarke L, Coates G, Cunningham F, Cutts T, Down T, Dyer SC, Fitzgerald S, Fernandez-Banet J, Graf S, Haider S, Hammond M, Herrero J, Holland R, Howe K, Howe K, Johnson N, Kahari A, Keefe D, Kokocinski F, Kulesha E, Lawson D, Longden I, Melsopp C, Megy K, Meid P, Overduin B, Parker A, Prlc A, Rice S, Rios D, Schuster M, Sealy I, Severin J, Slater G, Smedley D, Spudich G, Trevanion S, Vilella A, Vogel J, White S, Wood M, Cox T, Curwen V, Durbin R, Fernandez-Suarez XM, Flicek P, Kasprzyk A, Proctor G, Searle S, Smith J, Ureta-Vidal A, Birney E. Nucleic Acids Research. Database issue. *Ensembl.* 2007.

- Hynes RO. Integrins: bi-directional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002;110:637-87.
- Ishikawa K, Nagase T, Nakajima D, Seki N, Ohira M, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H, Nomura N, Ohara O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VIII. 78 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res*. 1997;4(5):307-13.
- Jiang SY, Jordan VC. Growth regulation of estrogen receptor-negative breast cancer cells transfected with complementary DNAs for estrogen receptor. *J Natl Cancer Inst*. 1992;84(8):580-91.
- Kim HO, Lee BL, Kim DK, Kleinman HK. Laminin-1-adherent cells show increased proliferation and decreased apoptosis in vivo. *Anticancer Res*. 1999;19:3067-72.
- Kininis M, Chen BS, Diehl AG, Isaacs GD, Zhang T, Siepel AC, Clark AG, Kraus WL. Genomic analyses of transcription factor binding, histone acetylation, and gene expression reveal mechanistically distinct classes of estrogen-regulated promoters. *Mol Cell Biol*. 2007;27(14):5090-104.
- Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel GU. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell*. 1986;46:1053-61.
- Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:2905-19.
- Kondo A, Hashimoto S, Yano H, Nagayama K, Mazaki Y, Sabe H. A new paxillin-binding protein, PAG3/Papalpha/KIAA0400, bearing an ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein activity, is involved in paxillin recruitment to focal adhesions and cell migration. *Mol Biol Cell*. 2000;11(4):1315-27.
- Kruljac-Letunic A, Moelleken J, Kallin A, Wieland F, Blaukat A. The tyrosine kinase Pyk2 regulates Arf1 activity by phosphorylation and inhibition of the Arf-GTPase-activating protein ASAP1. *J Biol Chem*. 2003;278(32):29560-70.
- Kuhn I, Bartholdi MF, Salamon H, Feldman RI, Roth RA, Johnson PH. Identification of AKT-regulated genes in inducible MERAkt cells. *Physiol Genomics*. 2001;7(2):105-14.
- Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson J-A. Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors α and β . *Endocrinol*. 1997;138:863-70.

- Kushner PJ, Agard D, Feng WJ, Lopez G, Schiau A, Uht R, Webb P, Greene G. Oestrogen receptor function at classical and alternative response elements. *Novartis Found Symp*. 2000;230:20-40.
- Kuske MDA, Johnson JP. Assignment of the human PHLDA1 gene to chromosome 12q15 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet*. 2000; 89(1-2):1.
- Lewis JS, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. *Mutation Res*. 2005; 591(1-2):247-63.
- Li X, Lonard DM, O'Malley BW. A contemporary understanding of progesterone receptor function. *Mech Ageing Dev*. 2004;125(10-11):669-78.
- Losel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(1):46-56.
- Macadam RC, Sarela AI, Farmery SM, Robinson PA, Markham AF, Guillou PJ. Death from early colorectal cancer is predicted by the presence of transcripts of the REG gene family. *Br J Cancer*. 2000;83(2):188-95.
- Manavathi B, Kumar R. Steering Estrogen Signals From the Plasma Membrane to the Nucleus: Two Sides of the Coin. *J Cell Physiol*. 2006;207:594–604.
- Martin AM, Weber BL. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:1126-35.
- McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases: Breast cancer – epidemiology, risk factors and genetics. *Clinical Rev*. 2000;321:624-8.
- Mercurio AM, Bachelder RE, Chung J, O'Connor KL, Rabinovitz I, Shaw LM, Tani T. Integrin laminin receptors and breast carcinoma progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2001;6(3):299-309.
- Miner JH, Yurchenco PD. Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:255-84.
- Miranti CK, Brugge JS. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol*. 2002;4(4):E83-90.
- Miyazaki K. Laminin-5 (laminin-332): Unique biological activity and role in tumor growth and invasion. *Cancer Sci*. 2006;97(2):91-8.
- Mizejewski GJ. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999;222(2):124-38.
- Morgan C, Inestrosa NC. Interactions of laminin with the amyloid beta peptide. Implications for Alzheimer's disease. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34(5):597-601.

- Nagai MA, Ros N, Bessa SA, Neto MM, Miracca EC, Brentani MM. Differentially expressed genes and estrogen receptor status in breast cancer. *Int J Oncol.* 2003;23(5):1425-30.
- Nagai MA, Fregnani JH, Netto MM, Brentani MM, SOARES FA. Down-regulation of PHLDA1 gene expression is associated with breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat.* 2006.
- Neef R, Kuske MA, Pröls E, Johnson JP. Identification of the human PHLDA1/TDAG51 gene: down-regulation in metastatic melanoma contributes to apoptosis resistance and growth regulation. *Cancer Res.* 2002;62:5920-9.
- Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, Devries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell.* 2006;10(6):515-27.
- Nie Z, Randazzo PA. Arf GAPs and membrane traffic. *J Cell Sci.* 2006;119(7):1203-11.
- Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 2001;81:1535-65.
- Oberg H-H, Sipos B, Kaltoff H, Janssen O, Kabelitz D. Regulation of T-cell death-associated gene 51 (TDAG51) expression in human T-cells. *Cell Death Differ.* 2004;11:674-84.
- O'Lone R, Frith MC, Karisson EK, Hansen U. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol.* 2004;18:1859-75.
- Osipo C, Gajdos C, Liu H, Chen B, Jordan VC. Paradoxical action of fulvestrant in estradiol-induced regression of tamoxifen-stimulated breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(21):1597-608.
- Oshiro T, Koyama S, Sugiyama S, Kondo A, Onodera Y, Asahara T, Sabe H, Kikuchi A. Interaction of POB1, a downstream molecule of small G protein Ra1, with PAG2, a paxillin-binding protein, is involved in cell migration. *J Biol Chem.* 2002;277(41):38618-26.
- Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science.* 1997;277(5331):1508-10.

- Pappas TC, Gametchu B, Watson CS. Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J.* 1995;9(5):404-10.
- Patel RR, Sharma CG, Jordan VC. Optimizing the antihormonal treatment and prevention of breast cancer. *Breast Cancer.* 2007;14(2):113-22.
- Pike ACW, Brzozowski AM, Hubbard RE. A structural biologist's view of the oestrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000;74:261-8.
- Porter W, Saville B, Hoivik D, Safe S. Functional Synergy between the Transcription Factor Sp1 and the Estrogen Receptor. *Mol Endocrinol.* 1997;11:1569-80.
- Poschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol.* 2004;39:155-65.
- Randazzo PA, Andrade J, Miura K, Brown MT, Long YQ, Stauffer S, Roller P, Cooper JA. The Arf GTPase -activatin protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(8):4011-6.
- Randazzo PA, Hirsch DS. Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodelling. *Cell Signal.* 2004;16(4):401-13
- Ribeiro RCJ, Kushner PJ, Baxter JD. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu Rev Med.* 1995;46:443-53.
- Russo IH, Russo J. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.*1998;3:49-61.
- Russo J, Fernandez SV, Russo PA, Fernbaugh R, Sheriff FS, Lareef HM, Garber J, Russo IH. 17-Beta-estradiol induces transformation and tumorigenesis in human breast epithelial cells. *FASEB J.* 2006;20(10):1622-34.
- Sabbah M, Courilleau D, Mester J, Redeuilh G. Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: Involvement of a cAMP response-like element. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(20):11217-22.
- Schatzmann F, Marlow R, Streuli CH. Integrin signaling and mammary cell function. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.* 2003; 8 (4): 395-408.
- Sommer S, Fuqua SAW. Estrogen receptor and breast cancer. *Cancer Biol.* 2001;11:339-52.
- Streuli CH, Schmidhauser C, Bailey N, Yurchenco P, Skubitz AP, Roskelley C, Bissell MJ. Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia. *J Cell Biol.* 1995;129(3):591-603.
- Tang S, Han H, Bajic VB. ERGDB: Estrogen Responsive Genes Database. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:D533-6.

- Tryndyak VP, Kovalchuk O, Pogribny IP. Loss of DNA methylation and histone H4 lysine 20 trimethylation in human breast cancer cells is associated with aberrant expression of DNA methyltransferase 1, Suv4-20h2 histone methyltransferase and methyl-binding proteins. *Cancer Biol Ther.* 2006;5(1):65-70.
- Toyoshima Y, Karas M, Yakar S, Dupont J, Lee H, Leroith D. TDAG51 mediates the effects of insulin-like growth factor I (IGF-I) on cell survival. *J Biol Chem.* 2004;279(24):25898-904.
- Tunggal P, Smyth N, Paulsson M, Olt MC. Laminins: structure and genetic regulation. *Microsc Res Tech.* 2000;51:214-27.
- Turner CE. Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol.* 2000;2(12):E231-6.
- Tyulmenkov VV, Klinge CM. A mathematical approach to predict the affinity of estrogen receptors alpha and beta binding to DNA. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;182(1):109-19.
- Uchida BH, Kondo A, Yoshimura Y, Mazaki Y, Sabe H. PAG3/Pap α /KIAA0400, a GTPase-activating protein for ADP-ribosylation factor (ARF), regulates ARF6 in Fc γ receptor-mediated phagocytosis of macrophages. *J Exp Med.* 2001;193(8):955-66.
- Vogel TW, Zhuang Z, Li J, Okamoto H, Furuta M, Lee YS, Zeng W, Oldfield EH, Vortmeyer AO, Weil RJ. Proteins and protein pattern differences between Gglioma cell lines and glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res.* 2005;11(10):3624-32.
- Walker P, Germond JE Brown-Luedi M, Givel F, Wahli W. Sequence homologies in the region preceding initiation site of the liver estrogen-responsive vitellogenin and apo-VLDLII genes. *Nuclei Acids Res.* 1984;12(22):8611-26.
- Woodward TL, Lu H, Haslam SZ. Laminin inhibits estrogen action in human breast cancer cells. *Endocrinol.* 2000;8(141):2814-21.