

**INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL DO GENE
ANAPC13 NA PROGRESSÃO DO CARCINOMA
DE MAMA**

DAIANA KAROL KOSHIMAE MARIN

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro

Co-Orientadora: Dra. Adriana Miti Nakahata

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Marin, Daiana Karol Koshimae

Investigação funcional do gene ANAPC13 na progressão do carcinoma de mama / Daiana Karol Koshimae Marin – São Paulo; 2015. 102p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Dirce Maria Carraro

Descritores: 1. NEOPLASIAS DA MAMA. 2. CARCINOMA DUCTAL DE MAMA. 3. CICLOSSOMO- COMPLEXO PROMOTOR DE ANÁFASE. 4. PROGRESSÃO DA DOENÇA.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Mieko, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões e sempre esteve do meu lado em todos os momentos da minha vida. À minha avó, Fukiko (*in memoriam*) e à Alice, que desde sempre me deram todo suporte em todos os sentidos para que eu pudesse realizar meus objetivos e me motivaram a seguir em frente; à prima Sayuri, por todo apoio. Ao Andrew, por todo amor, compreensão, apoio e incentivo que têm me dado durante esta trajetória.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Dirce Maria Carraro pela oportunidade de desenvolvermos este trabalho, pelas críticas construtivas e por ter me proporcionado um grande crescimento profissional e pessoal.

À co-orientadora e amiga Adriana Miti Nakahata pelas conversas, pelas críticas, pela ajuda diretamente na bancada e pelas discussões, que foram muito produtivas.

A todos os colegas do laboratório do grupo de Genômica e Biologia Molecular:
Dra. Adriana Nakahata, Ana Paula Suenaga, Ana Miguez, Dra. Bruna Barros, Dra. Claudia de Paula, Dra. Elisa Napolitano, Eloisa Olivieiri, Fernanda Gabriela, Isabella Tanus, Kivvi Mello, Louise Mota, Mabel Gigliola, Rafael Brianese, Raquel Stabellini, Dr. Rodrigo Ramalho, Dra. Vanina Elias.

Aos antigos membros do grupo que contribuíram com este trabalho: Carolina Abuázar, Andrea Yagui, Giovana Torrezan, Tatiana, Roberto, Meire e Márcia Figueiredo.

Aos colaboradores deste projeto: Dra. Cynthia Osorio e Dr. Erico Tosoni

Ao apoio financeiro da FAPESP

Aos técnicos do AC Camargo Cancer Center: Danilo Santos, Felipe Moreira, Hildegardo Bezerra, Oraci e Carlinhos.

Aos amigos do CIPE (Centro Internacional de Pesquisa e Ensino):
Andrew Thomas, Vanessa Dantas, Patrícia Santos, Bianca Troncarelli e Sheila Garcia.

Aos colaboradores da Pós-Graduação, principalmente à Ana Kuninari, Luciana,
Vanusa e Reinaldo.

À Suely da biblioteca

A oportunidade de desenvolver o trabalho no Centro Internacional de Pesquisa
do A.C. Camargo Cancer Center

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização
deste trabalho.

RESUMO

Marin DKK. **Investigação funcional do gene *ANAPC13* na progressão do carcinoma de mama**. São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O câncer de mama é o segundo tipo de tumor maligno mais incidente entre as mulheres e é responsável por uma alta taxa de mortalidade no mundo. De acordo com os tipos histológicos, o carcinoma ductal de mama é o tipo mais frequente e pode manifestar-se na forma *in situ* (DCIS) e/ou invasivo (IDC). O DCIS pode evoluir para o IDC, portanto, algumas lesões *in situ* podem coexistir com células malignas invasivas, sendo neste caso, classificadas como carcinoma ductal invasivo com presença do componente *in situ* (DCIS-IDC). Um estudo anterior do nosso grupo identificou genes que apresentaram-se diferencialmente expressos entre as células capturadas de duas lesões pré-malignas, do DCIS puro e do componente *in situ* que coexistem com a lesão invasiva (DCIS-IDC), com o intuito de descobrir genes potencialmente envolvidos nos estágios iniciais da progressão do DCIS. Entre os genes que apresentaram-se diferencialmente expressos, o gene *ANAPC13* foi um dos genes candidatos selecionados como gene envolvido na progressão do carcinoma ductal de mama por apresentar expressão gradativamente diminuída ao longo do curso da progressão do câncer. Nesse trabalho, a função de *ANAPC13* foi investigada em ensaios *in vitro* através de transfecção permanente para indução de alta e baixa expressão de *ANAPC13* nas linhagens de adenocarcinoma de mama MCF-7 e MDA-MB-231, que apresentam diferenças no potencial invasivo. A diminuição da expressão de *ANAPC13* levou a um aumento da aquisição de um fenótipo mais invasivo nas células MDA-MB-231, assim como, o aumento na expressão de *ANAPC13* levou a uma maior adesão nestas células. Para a linhagem MCF-7, o aumento da expressão de *ANAPC13* levou a maior proliferação celular. Em adição, foram realizados estudos dos

perfis de expressão para identificar genes cuja expressão foi comodulada pelos diferentes níveis de *ANAPC13* nas duas linhagens celulares. Na linhagem MCF-7, entre os grupos de genes coregulados, foi observado enriquecimento principalmente de processos relacionados ao ciclo celular, enquanto que, para a linhagem MDA-MB-231 os genes coregulados estão principalmente relacionados ao desenvolvimento embrionário e ao movimento celular, corroborando com os resultados obtidos *in vitro*. Assim, o trabalho confirma o envolvimento de *ANAPC13* na progressão do carcinoma ductal *in situ* de mama e abre novas possibilidades de estudo dos novos genes relacionados a este processo.

SUMMARY

Marin DKK. **[Functional investigation of *ANAPC13* gene in the progression of carcinoma of the breast]**. São Paulo, 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Breast cancer is the second most frequent cancer in women and is responsible for high mortality rates worldwide. According to histological subtypes, ductal carcinoma of the breast is the most frequent and can manifest as *in situ* (DCIS) and/or invasive (IDC). DCIS lesions might progress to IDC; therefore, some *in situ* lesions can coexist with invasive malignant cells, and these lesions classified as IDC with coexisting DCIS (DCIS-IDC). A previous study conducted by our group identified differentially expressed genes between pure DCIS and *in situ* component of IDC (DCIS-IDC) using cells collected by laser capture microdissection, and helped identify genes possibly involved with the early stages of DCIS progression. Among these differentially expressed genes, *ANAPC13* correlated with the progression of ductal carcinoma of the breast, by presenting a gradual decrease in expression through the course of cancer progression. Accordingly, the *ANAPC13* protein function was investigated using *in vitro* assays that mimic tumorigenesis and tumor progression by using MCF-7 and MDA-MB-231 adenocarcinoma cell lines that present differences in their invasive and proliferative potential. We observed that decreased expression of *ANAPC13* increased invasiveness for MDA-MB-231 cell line and that increased *ANAPC13* expression in the MCF-7 cell line led to higher cell proliferation and increased cell adhesion. We conclude that *ANAPC13* may play a key role in both cell proliferation and cell invasion, depending on the cellular context. In addition, studies conducted to see comodulated genes by *ANAPC13* in MCF-7 cell line are genes related to cell cycle. MDA-MB-231 cell line correlated to genes mainly related to the embryonic development and cell movement, corroborating with the *in vitro* results and opening up new possibilities for studies of new pathways related to this gene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estimativa de novos casos para o biênio de 2014-2015.....	1
Figura 2	Estrutura anatômica da mama feminina normal.....	3
Figura 3	Função do APC/C durante a mitose.....	10
Figura 4	Modelo da estrutura tridimensional do Complexo Promotor de Anáfase (APC/C) humano.....	11
Figura 5	Organização estrutural do complexo promotor de anáfase (APC/C).....	12
Figura 6	Expressão de ANAPC13 avaliada em 6 linhagens celulares de mama.....	16
Figura 7	Construções dos plasmídeos para ensaios funcionais.....	18
Figura 8	Figura ilustrativa de uma placa utilizada para ensaios de proliferação em tempo real (E-Plate 16).....	28
Figura 9	Figura ilustrativa de uma placa utilizada para ensaios de migração em tempo real (CIM-Plate 16).....	32
Figura 10	Representação ilustrativa do Ensaio de Invasão em câmara de Boyden.....	33
Figura 11	PCR das colônias isoladas contendo os plasmídeos com a construção 'senso'.....	41

Figura 12	Sequência de ANAPC13 da construção 'senso' no plasmídeo pcDNA3.1/myc-HisA sequenciado pelo método de Sanger.....	42
Figura 13	Teste de concentração ótima de Lipofectamine LTX® na linhagem MCF-7.....	44
Figura 14	Teste de concentração ótima de Lipofectamine LTX® na linhagem MDA-MB-231.....	45
Figura 15	Expressão de mRNA e proteína de ANAPC13 através de RT-qPCR e Western Blot nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231.....	47
Figura 16	Efeito de diferentes níveis de expressão de ANAPC13 na viabilidade das células da linhagem MCF-7 avaliada através do ensaio de MTT.....	49
Figura 17	Avaliação da expressão de ANAPC13 na proliferação das células MCF-7 através do equipamento XCelligence (Roche®).....	50
Figura 18	Efeito da superexpressão e do silenciamento da proteína ANAPC13 no consumo de glicose.....	52
Figura 19	Efeito de diferentes níveis de expressão da proteína ANAPC13 na adesão celular na linhagem MCF-7.....	53
Figura 20	A alta e a baixa expressão de ANAPC13 não exercem efeito na capacidade de migração celular em MCF-7.....	54
Figura 21	Fases do ciclo celular avaliada na linhagem MCF-7.....	55

Figura 22	Localização celular da proteína ANAPC13 na linhagem MCF-7.....	57
Figura 23	Crescimento tumoral <i>in vivo</i> das diferentes condições de expressão de ANAPC13 na linhagem MCF-7.....	59
Figura 24	Efeito de diferentes níveis de expressão de ANAPC13 na viabilidade das células MDA-MB-231.....	61
Figura 25	Efeito de diferentes níveis de expressão de ANAPC13 na proliferação celular na linhagem MDA-MB-231.....	62
Figura 26	Consumo de glicose por células da linhagem MDA-MB-231 com diferentes níveis de expressão de ANAPC13.....	63
Figura 27	Efeito de diferentes níveis de expressão da proteína ANAPC13 na adesão celular na linhagem MDA-MB-231.....	64
Figura 28	A alta e a baixa expressão de ANAPC13 e o efeito na capacidade de migração celular em MDA-MB-231.....	65
Figura 29	Efeito de diferentes níveis de expressão de ANAPC13 na migração com adição de quimioatraente.....	66
Figura 30	Efeito de diferentes níveis de expressão de ANAPC13 no potencial de invasão celular.....	67
Figura 31	Expressão de marcadores envolvidos na Transição Epitélio-Mesênquima (EMT) através de RT-qPCR (mRNA) e Western Blot (proteínas).....	69

Figura 32	Localização celular da proteína ANAPC13 na linhagem MDA-MB-231.....	70
Figura 33	Crescimento tumoral <i>in vivo</i> das diferentes condições de expressão de ANAPC13 na linhagem MDA-MB-231.....	72
Figura 34	Perfis de expressão identificados pelo programa STEM gerados para células da linhagem MDA-MB-231 antes do estímulo à migração.....	74
Figura 35	Análise de redes e vias realizada através dos perfis de genes diretamente ou inversamente relacionados a ANAPC13.....	76
Figura 36	Perfis de expressão identificados pelo programa STEM gerados para células da linhagem MCF-7.....	79
Figura 37	Análise de redes e vias realizada através dos perfis de genes diretamente ou inversamente relacionados a ANAPC13.....	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas PCRs de colônia.....	20
Quadro 2	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na RT-qPCR e tamanho dos amplificados.....	24
Quadro 3	Denominação das condições utilizadas para MCF-7 e MDA-MB-231.....	45
Quadro 4	Formação de tumor nos animais do grupo MCF-7 avaliadas pelo método de coloração de H&E.....	60
Quadro 5	Formação de tumor nos animais do grupo MCF-7 avaliadas pelo método de coloração de H&E.....	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
APC/C	Complexo Promotor de Anáfase/ Ciclossomo (do Inglês <i>Anaphase-promoting complex/Cyclosome</i>)
BGH	Bovine Growth Hormone
cDNA	DNA complementar a fita de RNA
CMV	Citomegalovírus
DC	Carcinoma Ductal (do Inglês <i>Ductal Carcinoma</i>)
DCIS	Carcinoma Ductal <i>in situ</i> (do Inglês <i>Ductal Carcinoma in situ</i>)
DCIS-IDC	Do Inglês <i>Ductal Carcinoma in situ with coexisting Invasive Ductal Carcinoma</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxiribonucleico (do Inglês <i>Desoxiribonucleic acid</i>)
DNase	Enzima que cliva o DNA
DTT	Ditiotritol (do Inglês <i>Dithiothreitol</i>)
EDTA	Do Inglês <i>Ethylene Diamintetraacetic Acid</i>
TEM	Transição Epitélio-Mesênquima
ER	Receptor de Estrógeno (do Inglês <i>Estrogen Receptor</i>)
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
STEM	<i>Short Time-Series Expression Miner</i>
GAPDH	Gene que codifica a proteína Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFP	Proteína fluorescente verde (do Inglês <i>Green fluorescent protein</i>)
GO	<i>Gene Ontology</i>
HER2	Receptor do fator de crescimento epidermal tipo 2 (do Inglês <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>)
HER2+	Termo usado para designar células ou tumores que possuem superexpressão de receptor HER2
IDC	Carcinoma Ductal Invasivo (do Inglês <i>Invasive Ductal Carcinoma</i>)

INCA	Instituto Nacional do Câncer
LC	Carcinoma Lobular (do Inglês <i>Lobular Carinoma</i>)
M	Molar
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MTT	Brometo de 3-[4,5dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio
ng	Nanogramas
ng/μL	Nanogramas por microlitro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	Pares de bases nucleotídicas
PBS	Tampão fosfato salina (do Inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em cadeia de polimerase (do Inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PR	Receptor de progesterona (do Inglês <i>Progesterone Receptor</i>)
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RIN	Número de Integridade de RNA (do Inglês <i>RNA Integrity Number</i>)
RIPA	Tampão de Ensaio de Radio Imuno Precipitação (do Inglês <i>Radio Immuno Precipitation Assay buffer</i>)
RNA	Ácido ribonucléico (do Inglês <i>Ribonucleic acid</i>)
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro (do Inglês <i>Messenger Ribonucleic acid</i>)
RT	Reação da transcrição reversa (do Inglês <i>reverse transcription</i>)
SMC	Sítio Múltiplo de Clonagem
SWM1	do Inglês <i>Spore Wall Maturation</i>
U	Unidade
μg	Microgramas
μg/μL	Microgramas por microlitro
μg/mL	Microgramas por mililitro
WT	Selvagem - do Inglês <i>Wild Type</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Carcinoma de Mama	1
1.1.1	Epidemiologia e fatores de risco.....	1
1.1.2	Tipos histológicos do carcinoma mamário	2
1.1.3	Classificação molecular e imunofenotípica de tumores mamários	4
1.2	Progressão do Carcinoma Ductal de Mama	6
1.3	Complexo Promotor de Anáfase (APC/C).....	8
1.3.1	Subunidade 13 do Completo Promotor de Anáfase (ANAPC13).....	11
1.4	Modelo de Linhagens Celulares	13
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral.....	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	Linhagens Celulares	15
3.2	Preparação de DNA Plasmidial	17
3.2.1	Transformação bacteriana	17
3.2.2	PCT das colônias selecionadas.....	19
3.2.3	Sequenciamento dos plasmídeos.....	20
3.3	Transfecção em Linhagens Celulares	21
3.4	Extração de DNA.....	22
3.5	Síntese de cDNA	23
3.6	PCR quantitativo (RT-qPCR)	23
3.7	Western Blot	25
3.8	Viabilidade Celular (MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2-YL)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)	26
3.9	Ensaio de Consumo de Glicose	27
3.10	Ensaio <i>In Vitro</i>	28

3.10.1	Ensaio de proliferação em tempo real	28
3.10.2	Ensaio de adesão	29
3.10.3	Ensaio de migração (cicatrização de ferida).....	30
3.10.4	Ensaio de migração em tempo real	31
3.10.5	Ensaio de invasão em câmara de Boyden	32
3.11	Ensaio de Ciclo Celular	34
3.12	Imunofluorescência	34
3.13	Microarranjos de cDNA.....	35
3.14	Ensaio Subcutâneo <i>In Vivo</i>	38
4	RESULTADOS	40
4.1	Preparação Plasmidial.....	40
4.2	Superexpressão e Silenciamento de <i>ANAPC13</i>	42
4.3	Validação da Transfecção Das Linhagens MCF-7 e MDA-MB-231	46
4.4	Ensaio <i>In Vitro</i> com a Linhagem MCF-7	48
4.4.1	Ensaio de viabilidade celular (MTT)	48
4.4.2	Ensaio de proliferação celular em tempo real.....	49
4.4.3	Ensaio de consumo de glicose	51
4.4.4	Ensaio de adesão	52
4.4.5	Ensaio de migração (cicatrização de feridas).....	53
4.4.6	Ensaio de ciclo celular	55
4.5	Imunofluorescência da Linhagem MCF-7	56
4.6	Ensaio Subcutâneos <i>In Vivo</i> da Linhagem MCF-7	58
4.7	Ensaio <i>In Vitro</i> com a Linhagem MDA-MB-231	59
4.7.1	Ensaio de viabilidade celular (MTT)	60
4.7.2	Ensaio de proliferação celular em tempo real.....	61
4.7.3	Ensaio de consumo de glicose	62
4.7.4	Ensaio de adesão celular	63
4.7.5	Ensaio de migração (cicatrização de feridas).....	64
4.7.6	Ensaio de migração em tempo real	66
4.7.7	Ensaio de invasão celular.....	67
4.8	Avaliação de Marcadores da Transição Epitélio-Mesênquima	68

4.9	Imunofluorescência da Linhagem MDA-MB-231	70
4.10	Ensaio Subcutâneo <i>In Vivo</i> da Linhagem MDA-MB-231	71
4.11	Análise dos Genes Comodulados com os Diferentes Níveis de <i>ANAPC13</i> nos dois Modelos de Linhagens MCF-7 E MDA-MB-231	73
4.11.1	Genes comodulados com os níveis de <i>ANAPC13</i> na linhagem MDA- B-231 (ER-, PR-, HER2 basal)	73
4.11.2	Genes comodulados com os níveis de <i>ANAPC13</i> na linhagem MCF-7 (ER+, PR+, HER2-)	78
5	DISCUSSÃO	83
6	CONCLUSÕES	93
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do CEUA

Anexo 2 Genes do perfil 7 da linhagem MDA-MB-231

Anexo 3 Genes do perfil 8 da linhagem MDA-MB-231

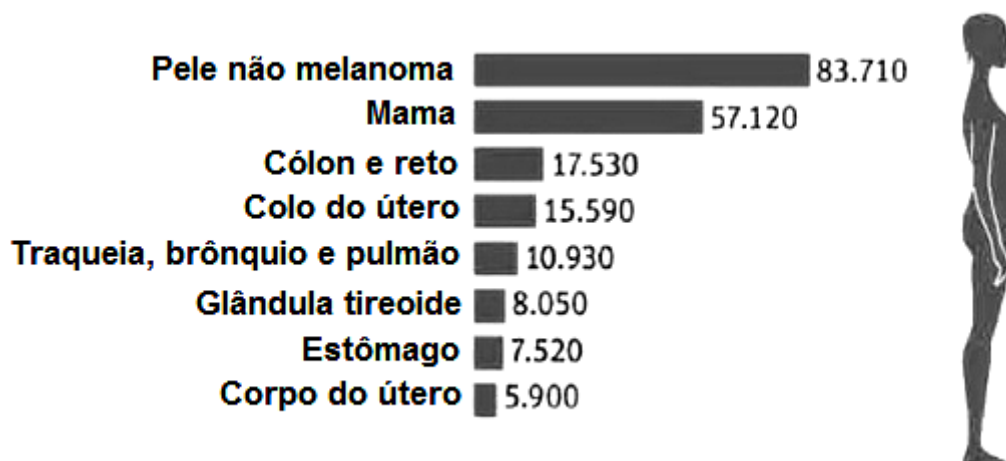
Anexo 4 Genes dos perfis 0, 3 e 4 da linhagem MCF-7

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA DE MAMA

1.1.1 Epidemiologia e fatores de risco

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais incidente entre as mulheres, com exceção dos casos de câncer de pele não melanoma. No ano de 2012 foram diagnosticados 1.7 milhões de casos no mundo (IARC 2014), e no Brasil, foram estimados 57.120 novos casos para o ano de 2015, como observado na Figura 1 (Ministério da Saúde 2014).



Fonte: Modificado de Ministério da Saúde (2014)

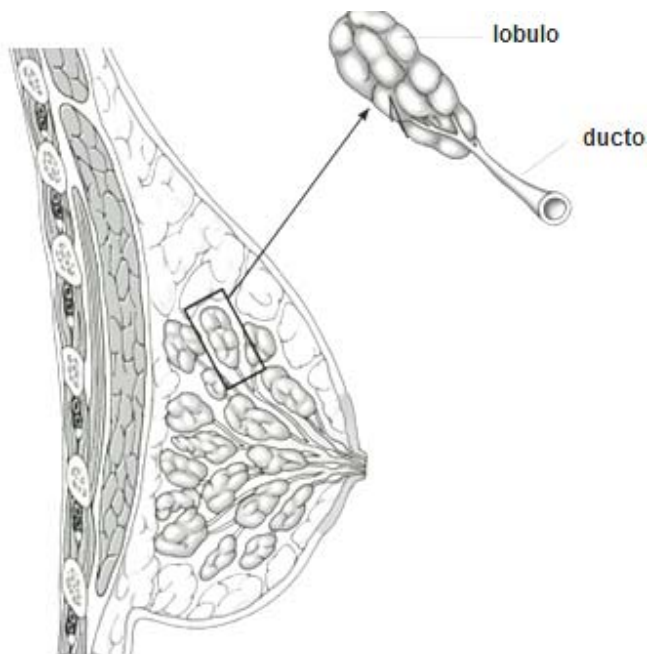
Figura 1 - Estimativa de novos casos para o biênio de 2014-2015. O tipo de tumor mais incidente entre as mulheres, exceto os de pele não melanoma, é o câncer de mama, com incidência estimada de 57.120 novos casos para 2014-2015.

As taxas de mortalidade por câncer de mama são elevadas, sendo a maior causa de mortes relacionadas a câncer em mulheres a nível global (ELLIS et al. 2003). No Brasil, foram contabilizadas 13.345 mortes por câncer de mama, sendo 120 de homens e 13.225 de mulheres (Ministério da Saúde 2014).

Os fatores externos ambientais, genéticos e estilo de vida podem modular os riscos de desenvolver câncer de mama. Existem diversos fatores de risco relacionado, sendo que os principais são idade; sexo; exposição a hormônios; fatores de risco genéticos e história familiar de câncer de mama (American Cancer Society-ACS 2015).

1.1.2 Tipos histológicos do carcinoma mamário

A mama feminina normal adulta representa uma estrutura arborescente e ramificada, sendo composta por elementos epiteliais e estromais. O componente epitelial da mama é organizado em lóbulos e ductos, como demonstrado na Figura 2. O estroma é composto por quantidade variável de tecido adiposo e tecido conectivo fibroso, que compreende a maior parte do volume da mama no estado não lactente (SCHNITT 1995).



Fonte: Modificado de ACS (2015).

Figura 2 - Estrutura anatômica da mama feminina normal. Na figura estão evidenciados um lóbulo e um ducto.

Cerca de 20 tipos de câncer de mama já foram identificados (OMS), dentre estes, os tipos mais comuns entre as mulheres são o carcinoma lobular (LC) e o carcinoma ductal (DC), sendo que este último corresponde a 80% de todos os tumores de mama (BOMBONATI e SGROI 2011). As diferenças entre LC e DC envolvem características histológicas, biológicas e clínicas. Os carcinomas do tipo lobular são predominantemente positivos para os receptores hormonais (ER e PR) e normalmente são mais homogêneos do que os carcinomas ductais. As lesões invasivas do tipo lobular possuem menor índice proliferativo e menor grau patológico quando comparadas aos IDC (RAGUNATH et al. 2012).

O carcinoma de mama pode manifestar-se na forma *in situ* (DCIS ou LCIS) ou invasiva (IDC ou ILC). O carcinoma *in situ* é uma lesão que

compreende células em divisão anormal, porém delimitada aos ductos ou lóbulos mamários, sem extravasamento para o estroma; enquanto que o carcinoma ductal ou lobular invasivo é caracterizado por células com características mesenquimais, que apresentam uma profunda heterogeneidade genética, morfológica e clínica (BOMBONATI e SGROI 2011; ESPINA e LIOTTA 2011).

1.1.3 Classificação molecular e imunofenotípica de tumores mamários invasivos

O carcinoma de mama invasivo, principalmente do tipo ductal, é uma doença heterogênea causada por alterações moleculares que podem ocorrer em diversos tipos celulares (PEROU et al. 2000; SORLIE et al. 2001; WEIGELT e REIS FILHO 2009). A heterogeneidade pode dar origem a manifestações clínicas e morfológicas diferentes e consequentemente, resultar em diferença nas respostas terapêuticas. Os avanços no estudo da biologia molecular da progressão do câncer de mama tem promovido a descoberta de novos marcadores e de novos alvos terapêuticos, assim como uma melhor estratificação dos pacientes baseado em critérios moleculares, com intuito de contribuir na melhoria da sobrevida e redução da morbidade e a mortalidade destas pacientes (BOMBONATI e SGROI 2011).

Atualmente, o carcinoma ductal invasivo pode ser classificado principalmente de acordo com os critérios estabelecidos para imunohistoquímica/fluorescência (IHQ/*FISH*) e estratificado com base na

presença de receptores hormonais (ER e PR) e HER2 (TOSS e CRISTOFANILLI 2015).

Em adição ao trabalho de PEROU et al. (2000), que identificou quatro subtipos do câncer de mama, a taxonomia molecular proposta por SORLIE et al. em 2001, identificou cinco subtipos da doença a partir de dados obtidos de microarranjos de cDNA, sendo eles: luminal A, luminal B, basal, HER2 (superexpressão) e *normal-like*.

Estes subtipos moleculares apresentam cursos clínicos diferentes, assim como diferentes respostas a tratamentos (SORLIE et al. 2001; BERTUCCI et al. 2005), portanto, a divisão é importante para que os diferentes subtipos recebam um tratamento mais específico de acordo com a expressão molecular do tumor.

O Consenso Internacional de Especialistas de Saint Gallen, a partir da classificação molecular, propôs uma classificação baseada em marcadores de imunohistoquímica comumente usados na rotina (receptores de estrógeno, progesterona, HER2, Ki-67) acrescida da análise genômica de amplificação do gene HER2. Dessa forma, os tumores de mama tem sido categorizados com base na classificação imunofenotípica em luminal A/B, hiperexpressão de HER2 e triplo-negativo (GOLDHRIRSH et al. 2013). Os subtipos luminal A e luminal B representam tumores de grau intermediário, caracterizados pela expressão de genes que são normalmente expressos por células ductais normais. O subtipo luminal A apresenta alta expressão de genes relacionados aos receptores de estrógeno e progesterona, assim como baixa expressão de genes associados a proliferação, além de baixa

expressão de HER2; enquanto que o subtipo luminal B apresenta baixa expressão de genes relacionados a ER, superexpressão de HER2 e alta expressão de genes relacionados a proliferação celular. O subtipo HER2 normalmente representa tumores de alto grau e é principalmente caracterizado pela superexpressão de HER2 e baixa expressão de ER e PR. O subtipo basal engloba tumores de alto grau com expressão de citoqueratinas, estes tumores normalmente apresentam necrose e infiltrado linfocitário. Além disso, os tumores do subtipo basal são caracterizados pela baixa expressão de ER, PR e HER 2 (PEROU et al. 2000; BOMBONATI e SGROI 2011).

O carcinoma ductal *in situ* (DCIS) pode ser classificado através dos mesmos subtipos moleculares do carcinoma invasivo por análise de expressão gênica. Entretanto, a classificação de Saint Gallen não é aplicável ao DCIS. Atualmente, não há uma classificação molecular clinicamente estabelecida para o DCIS que auxilie na predição do prognóstico (ZHOU et al. 2013).

1.2 PROGRESSÃO DO CARCINOMA DUCTAL DE MAMA

O carcinoma ductal *in situ* é considerado como uma proliferação pré-maligna de células epiteliais neoplásicas, e a progressão do carcinoma ductal de mama é caracterizada pelo extravasamento de células que adquirem um fenótipo invasivo e invadem o tecido adjacente. As alterações genéticas que promovem a aquisição do fenótipo invasivo em células

intraductais (DCIS) ainda não são totalmente conhecidas e tem sido alvo de estudo de diversos grupos (SCHUETZ et al. 2006; CASTELLANA et al. 2012; KNUDSEN et al. 2012; LIAO et al. 2012), incluindo o nosso (CASTRO et al. 2008; SENS-ABUÁZAR et al. 2012).

Em 1973, foi proposto por WELLINGS e JENSEN que DCIS é um precursor de IDC. Esta teoria é atualmente suportada baseada em observações a nível molecular que demonstraram que muitas lesões IDC possuem semelhanças genéticas com DCIS. Além disso, na maioria dos casos, no momento do diagnóstico de IDC, são encontrados DCIS adjacentes (COWELL et al. 2013).

O nosso grupo, através de técnicas de microarranjos de cDNA e de microdissecção à laser (LCM), realizou uma comparação entre grupos de células capturadas de lesões mamárias que mimetizam a progressão do carcinoma ductal (células normais, células de DCIS puro, células capturadas do componente *in situ* que coexistem com IDC (DCIS-IDC) e células de IDC) com o objetivo de identificar em qual momento da progressão as células exibem maior alteração em nível de expressão gênica que as tornam aptas a invadir os tecidos adjacentes. Como resultado, foi observado que as células intraductais puras e as células do componente *in situ* que coexistem com lesões invasivas (DCIS-IDC) apresentaram diferenças moleculares significantes, contradizendo a semelhança morfológica entre estes dois grupos de células. Este resultado sugere que as alterações moleculares, importantes para a aquisição da capacidade de invasão, ocorrem nas células

epiteliais de lesões pré-invasivas, antes de alterações morfológicas (CASTRO et al. 2008).

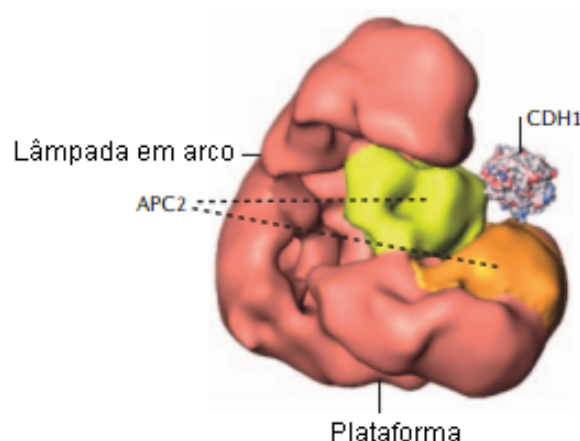
Em um segundo momento, o grupo, explorando diferenças moleculares entre populações de células presentes em lesões pré-invasivas (DCIS puro) e no componente *in situ* de DCIS-IDC, caracterizou alguns dos genes que apresentaram alterações significativas no nível de expressão gênica, tanto em nível de mRNA quanto de proteína, destacando o potencial destes genes estarem envolvidos com a progressão do tumor (CASTRO et al. 2008; SENS-ABUÁZAR et al. 2012). O gene *ANAPC13* (subunidade 13 do Complexo Promotor de Anáfase (APC/C)), um dos genes avaliados, codifica uma proteína com mesmo nome, e apresentou potencial como biomarcador de predição de progressão de DCIS puro e de prognóstico para lesão invasiva (IDC). Além disso, a diminuição de expressão de *ANAPC13* também foi associada com maior instabilidade genômica em amostras de IDC e com pior sobrevida global e sobrevida livre de doença (SENS-ABUÁZAR et al. 2012).

1.3 COMPLEXO PROMOTOR DE ANÁFASE (APC/C)

O Complexo Promotor de Anáfase ou Ciclossomo (APC/C) é composto por 14 subunidades e possui um tamanho de 1.5 MDa. Este complexo é encontrado no núcleo de células interfásicas e posteriormente passa para o citoplasma onde se associa com partes dos fusos mitóticos (PETERS 2006; JIANG et al. 2012).

Para que ocorra a segregação dos cromossomos, inicialmente deve haver a separação das cromátides-irmãs. Na metáfase, o APC/C inicia este processo por ubiquitilação da SECURINA, uma pequena proteína que funciona como co-chaperona e como inibidor da protease SEPARASE. Uma vez ativada, a SEPARASE cliva a SCC1, subunidade da COESINA, um complexo que mantém as cromátides-irmãs unidas, permitindo a separação das cromátides-irmãs. A desregulação do APC/C pode estar associada à tumorigênese por aumentar a proliferação celular ou por causar instabilidade genética (PETERS 2006, BARFORD 2011; JIANG et al. 2012; SIVAKUMAR e GORBSKY 2015).

O APC/C apresenta-se na forma inativa na ausência dos co-ativadores, que podem ser a proteína CDC20 ou a CDH1, dependendo do momento do ciclo celular. As proteínas co-ativadoras promovem ubiquitilação aumentando a interação do APC/C com as enzimas E2 (CHANG et al. 2014), e apresentam atividade em diferentes momentos. A proteína CDC20 liga-se ao APC/C fosforilado no início da mitose e conduz à degradação dos substratos da prometáfase e metáfase, enquanto que, durante a anáfase e a fase G1, a proteína CDC20 é substituída por CDH1, como demonstrado na Figura 3 (SIVAKUMAR e GORBSKY 2015).



Fonte: Adaptado de PETERS (2006)

Figura 4 - Modelo da estrutura tridimensional do Complexo Promotor de Anáfase (APC/C) humano. Em vermelho está representado o subcomplexo denominado 'plataforma' na parte inferior, e na parte superior esquerda está representado o subcomplexo denominado 'lâmpada em arco'. A subunidade APC2 (representada em amarelo, no centro) está localizada no núcleo catalítico do complexo. A proteína CDH1 está representada como um dos co-ativadores do APC/C.

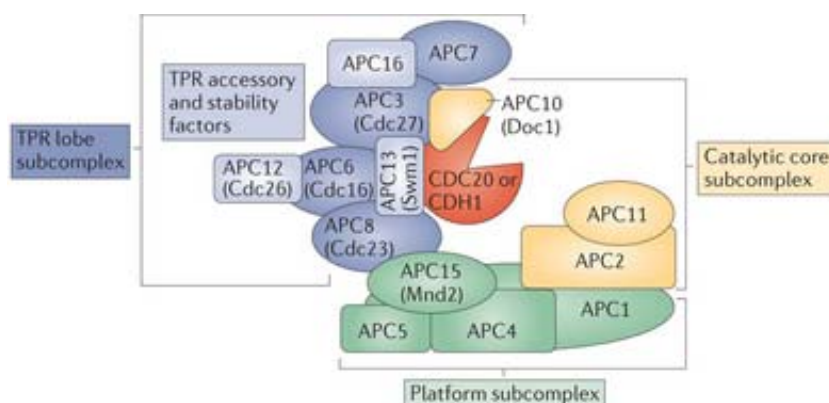
O subcomplexo plataforma é composto pelas proteínas APC1, APC4, APC5 e APC15. O núcleo catalítico é composto pelas subunidades APC2, APC11 e APC10 e o subcomplexo lobo TPR engloba as proteínas APC8, APC6, APC3 e APC7. As proteínas acessórias são importantes para a estabilização do APC/C, entre elas está o ANAPC13 que interage com APC3, APC6 e APC8.

1.3.1 Subunidade 13 do Complexo Promotor de Anáfase (ANAPC13)

O *ANAPC13* foi identificado inicialmente no Complexo Promotor de Anáfase (APC/C) de leveduras, sendo denominado *APC13*, produto do gene *SWM1* (UFANO et al. 1999). Esta proteína foi conservada evolutivamente

como parte do APC/C, sendo necessária para atividade e a integridade da ubiquitina ligase (SCHWICKART et al. 2004).

Como citado anteriormente, a proteína ANAPC13 é uma subunidade do APC/C e possui importância na estabilidade e na organização da estrutura do Ciclossomo, estabilizando as proteínas APC3, APC6 e APC8 (Figura 5), que são subunidades do APC/C localizadas especificamente no domínio do subcomplexo 'lâmpada em arco', também chamado de *Tetratricopeptide Repeat* (TPR), a qual serve de suporte estrutural para o recrutamento dinâmico de substratos do APC/C (PASSMORE et al. 2003; SCHWICKART et al. 2004; THORNTON et al. 2006; BARFORD 2011; CHANG et al. 2014; YAMAGUCHI et al. 2015).



Fonte: Adaptado de SIVAKUMAR e GORBSKY (2015)

Figura 5 - Organização estrutural do Complexo Promotor de Anáfase (APC/C). Em azul estão representadas as proteínas da 'lâmpada em arco' ou TPR; em verde estão representadas as subunidades pertencentes ao subcomplexo denominado 'plataforma'; em amarelo estão as proteínas do núcleo catalítico. Em laranja estão representadas as proteínas co-ativadoras do APC/C: CDC20 ou CDH1. ANAPC13 (APC13/SWM1) está localizada no centro do APC/C como proteína acessória importante para a estabilidade das subunidades APC3, APC6 e APC8. APC é o gene ortólogo de ANAPC13.

O papel de ANAPC13 ainda não é bem compreendido e há pouca informação na literatura, entretanto, o nosso grupo de pesquisa, em um estudo anterior observou uma diminuição da expressão de ANAPC13 ao longo da progressão do carcinoma ductal de mama usando amostras representativas dos grupos de DCIS puro, componente *in situ* de DCIS-IDC e amostras de IDC. Além disso, a diminuição da expressão de ANAPC13 foi associada a maior instabilidade genômica em amostras de IDC. Outro achado importante deste estudo foi que pacientes cujo tumor apresentou marcação positiva para ANAPC13 apresentaram maior sobrevida global e sobrevida livre de doença (SENS-ABUÁZAR et al. 2012). Estes resultados ressaltam a importância de investigar o papel funcional da proteína ANAPC13 na tumorigênese *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar em modelos celulares, o impacto do aumento e da diminuição no nível de expressão de *ANAPC13* nos processos envolvidos na progressão do carcinoma ductal em mama.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar a influência da superexpressão e do silenciamento de *ANAPC13* em ensaios funcionais que mimetizam o processo de proliferação, ciclo celular, viabilidade, migração, invasão e localização nas linhagens de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 e MDA-MB-231.
- 2 Avaliar a expressão de genes comodulados por *ANAPC13* nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. Avaliar o papel do *ANAPC13* no crescimento tumoral *in vivo*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

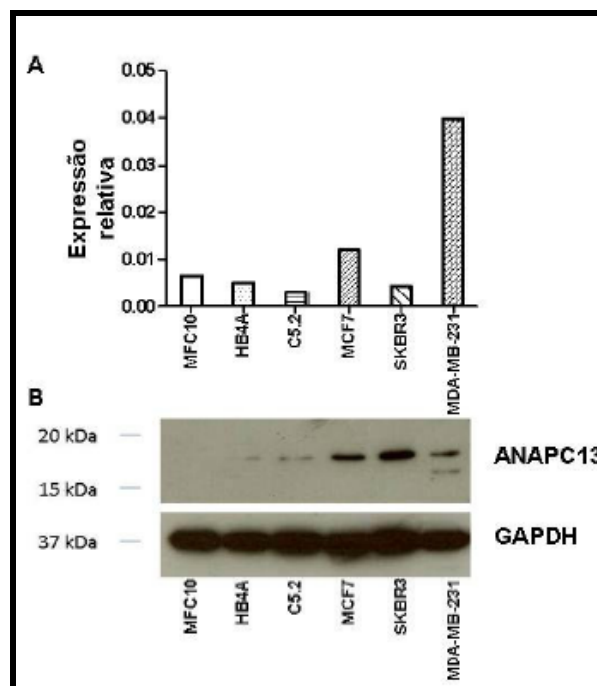
3.1 LINHAGENS CELULARES

Modelos de linhagens celulares são amplamente utilizados na pesquisa do câncer por possuir a vantagem de ser de fácil manuseio, permitir a realização de diversos ensaios, e por serem representativas de vários tipos tumorais (CHARAFE-JAUFFRET et al. 2009).

Em um trabalho anterior do grupo, foi realizada uma avaliação da expressão de *ANAPC13* a nível transcricional e proteico através de RT-qPCR e Western Blot, respectivamente. Foram testadas seis linhagens celulares de mama com diferentes características: MCF-10 (normal não tumorigênica), HB4a (normal não tumorigênica), C5.2 (célula não tumorigênica derivada da linhagem HB4a transfectada para superexpressão de HER2), MCF-7 (tumoral, luminal B), SKBR-3 (tumoral, superexpressão de HER2) e MDA-MB-231 (tumoral, basal). Como resultado, foi observado que a linhagem MDA-MB-231 apresenta maior expressão relativa de *ANAPC13* a nível transcricional, seguida pela linhagem MCF-7 (Figura 6) (SENS-ABUÁZAR 2012).

As linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 são adenocarcinomas de mama derivadas de efusão pleural (ATCC). A linhagem MCF-7 apresenta o perfil molecular do subtipo luminal B (ER+, PR+, HER2-) e a linhagem MDA-MB-231 pertence ao subtipo basal (ER-, PR-, HER2 normal), ambas com alto

índice proliferativo avaliado através de Ki-67 (CHEKHUN et al. 2013). Estas linhagens possuem alta eficiência de transfecção, são frequentemente utilizadas em estudos funcionais de câncer de mama *in vivo* (LACROIX e LECLERCQ 2004).



Fonte: SENS-ABUÁZAR (2012)

Figura 6 - Expressão de ANAPC13 avaliada em 6 linhagens celulares de mama. A: Expressão relativa de mRNA de ANAPC13 avaliada por RT-qPCR. B: Expressão proteica de ANAPC13 avaliada por Western Blot. Foi avaliado o nível de expressão de mRNA e de proteínas nas linhagens MCF10, HB4a, C5.2, MCF-7, SKBR-3 e MDA-MB-231.

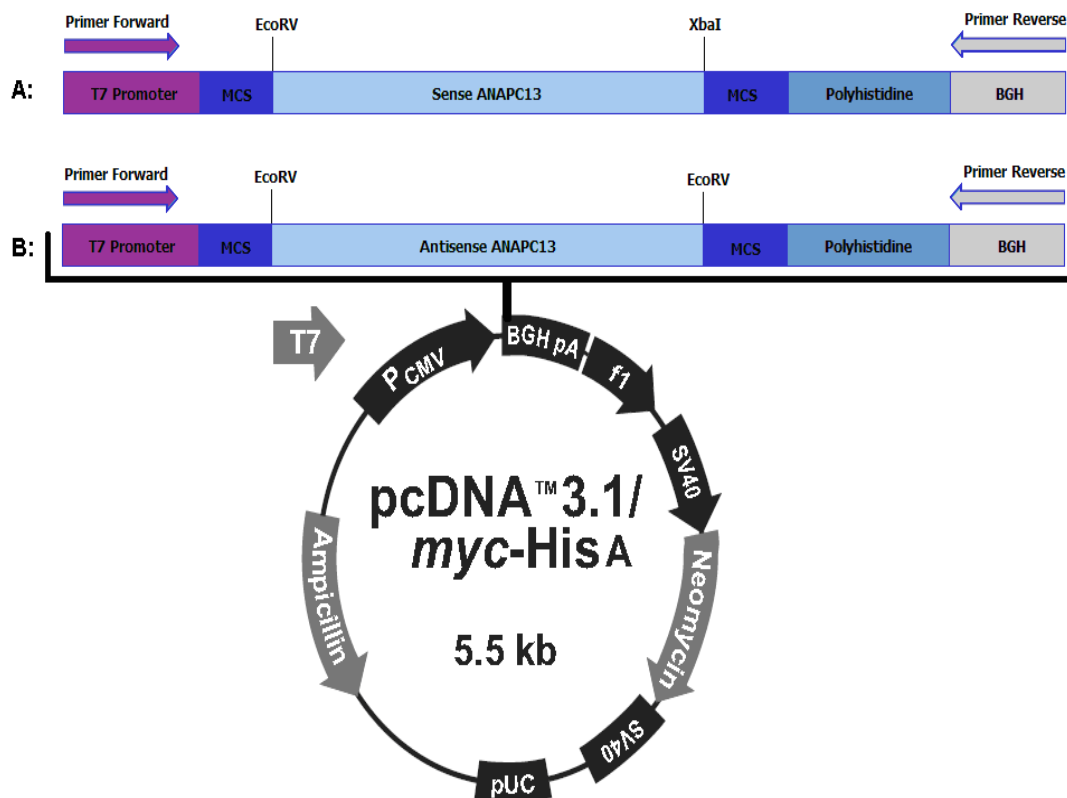
Assim, as amostras utilizadas neste trabalho foram as linhagens celulares de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 (HTB-26) (ER-, PR-, HER2 normal (*basal-like*)) e MCF-7 (HTB-22) (ER+, PR+, HER2- (luminal B)), ambas epiteliais e derivadas de sítios metastáticos, foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD).

As culturas foram mantidas conforme instruções do fornecedor (ATCC). A linhagem MCF-7 foi cultivada em meio de cultura DMEM acrescido de 0,01 mg/mL de insulina humana recombinante e 10% de soro fetal bovino (SFB). Para a linhagem MDA-MB-231 foi utilizado o meio de cultura DMEM-F12 com adição de 10% de soro fetal bovino. Em ambos meios de cultura foi acrescentado 1% de solução antibiótica penicilina/estreptomicina (Invitrogen®). As células foram mantidas em estufa umidificada com 5% de CO₂ e mantidas a 37°C.

3.2 PREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

3.2.1 Transformação bacteriana

Em um trabalho anterior do grupo, foi realizada a construção de sequências 'senso' e 'anti-senso' do gene *ANAPC13* utilizando o plasmídeo pcDNA™3.1/*myc*-HisA (Invitrogen®) (Figura 7) (SENS-ABUÁZAR 2012).



Fonte: Modificado de Invitrogen® (2010)

Figura 7 - Construções dos plasmídeos para ensaios funcionais. A: Sequência 'senso' do gene ANAPC13 na parte superior da figura. B: Construção com a sequência 'anti-senso' do gene ANAPC13. Estão representados respectivamente: sítio promotor T7 presente no plasmídeo pcDNA3.1/myc-HisA (em roxo); MCS (Multiple Cloning Site - Sítio Múltiplo de Clonagem) em azul; sequências 'senso' e 'anti-senso' do gene ANAPC13 em azul claro; cauda de polihistidina em turquesa; e em seguida o sítio BGH em cinza. Em cada construção estão indicadas as enzimas de restrição utilizadas. Para inserir a sequência 'senso' de ANAPC13 no vetor foram utilizadas as enzimas EcoRV e XbaI e para inserir a sequência 'anti-senso' foi utilizada apenas a EcoRV para ambas as extremidades.

Considerando a quantidade de plasmídeos da construção 'anti-senso' suficiente para realizar as transfecções celulares, foi realizada a transformação bacteriana apenas para obtenção de plasmídeos com a construção 'senso' para as posteriores transfecções.

A transformação de bactérias *E. coli DH10B* eletrocompetentes foi realizada através de eletroporação, sendo utilizado 10 ng/ μ L (20 ng no total) de DNA plasmidial previamente purificado e sequenciado da construção 'senso'. Imediatamente após a eletroporação, foram adicionados 1000 μ L de meio de cultura Luria-Bertani (LB) (Tryptona 1%, NaCl 1%, extrato de levedura 0,5%) à alíquota de bactérias transformadas, que em seguida foram incubadas durante 1 hora a 37°C a 80 rotações por minuto (rpm) em agitador orbital.

Em placas de meio LB sólido (meio de cultura LB com ágar 2%) contendo 50 μ g/mL de Ampicilina, foram semeados 150 μ L da transformação bacteriana. As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante aproximadamente 16 horas até o aparecimento de colônias. As colônias que cresceram isoladas após o período de incubação foram parcialmente removidas da placa e inoculadas em placas de 96 poços contendo 100 μ L de meio LB líquido.

3.2.2 PCR das colônias selecionadas

As bactérias de colônias isoladas que cresceram em meio líquido após a transformação bacteriana descrita no item 3.2.1 foram utilizadas como DNA molde para a Reação em Cadeira da Polimerase (PCR – do

Inglês *Polymerase Chain Reaction*) de colônia para confirmação da presença do inserto.

A PCR das colônias foi realizada utilizando-se 1 µL do DNA molde, 0,1 µL da enzima *Taq Polymerase* (Invitrogen®), 2 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 200 nM de oligonucleotídeos iniciadores T7 (*Forward*) e *Bovine Growth Hormone* (BGH) (*Reverse*) (Quadro 1). A reação foi iniciada a 94°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e um passo de extensão final de 7 minutos a 72°C.

Os produtos da PCR de colônia foram aplicados em gel de agarose 1% corado com *Syber Safe DNA gel stain* (Invitrogen®). A partir do resultado da PCR, foram escolhidos clones de bactérias que apresentaram bandas únicas e de tamanho esperado (aproximadamente 435 pares de bases (pb)) para a construção 'senso'. Estes clones foram submetidos à extração plasmidial seguindo o protocolo do kit *Midiprep* (QIAGEN®), e em seguida foram sequenciados.

Quadro 1 - Sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas PCRs de colônia

T7 (<i>Forward</i> 5'-3')	TAATACGACTCACTATAGGG
BGH (<i>Reverse</i> 3'-5')	CTCGACTGTGCCTTCTA

3.2.3 Sequenciamento dos plasmídeos

Os plasmídeos selecionados após o resultado da PCR de colônia foram sequenciados através do método de Sanger (eletroforese capilar). A

reação foi realizada utilizando-se a enzima *BigDye® Terminator v3.1* (Applied Biosystems®) e 200 nM dos oligonucleotídeos iniciadores T7 (*Forward*) e BGH (*Reverse*) (Quadro 1), em um volume total de 10 µL. A reação foi realizada inicialmente a 95°C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de amplificação de 95°C por 18 segundos e 60°C por 4 minutos. Todos os fragmentos foram sequenciados nos sentidos *forward* e *reverse* no equipamento *ABI3130XL Genetic Analyzer* (Life Technologies®).

As sequências obtidas foram analisadas com o programa *CLC Genomics Workbench* (CLCBio®) e alinhadas utilizando-se como referência a RefSeq NM_015391.3 (variante 1 do gene *ANAPC13*).

3.3 TRANSFEÇÃO EM LINHAGENS CELULARES

As linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 foram transfectadas de forma a se obter três diferentes condições: *ANAPC13-UP* (alta expressão), *ANAPC13-DOWN* (baixa expressão) e *MOCK* (pcDNA3.1/*myc*-HisA). As células selvagens de ambas as linhagens foram utilizadas como controle nos ensaios.

Em placas de 6 poços foram adicionadas 2×10^5 células/poço e as células foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂ de modo a atingirem aproximadamente 80% de confluência no momento da transfecção. Em seguida, 2,5 µg de DNA plasmideal/poço foram diluídos em OptiMEM (Invitrogen®) e transfectados nas células tumorais por meio de agente lipofílico (Lipofectamine LTX®, Invitrogen) seguindo o protocolo determinado

pelo fabricante. Após 24 horas da transfecção, o meio foi renovado com presença de 500 µg/mL de Geneticina (G418) para seleção das células transfectadas uma vez que o plasmídeo pcDNA3.1/*myc*-HisA possui o gene de resistência a este antibiótico (*Neomycin*) conforme ilustrado na Figura 7. A seleção das células foi realizada durante um período mínimo de 15 dias, período no qual as células selvagens apresentaram 100% de inviabilidade celular após tratamento com G418. As células selecionadas foram mantidas em cultura na presença deste antibiótico seletivo para a realização dos experimentos.

3.4 EXTRAÇÃO DE RNA

As células transfectadas de ambas as linhagens foram removidas das garrafas de cultivo com confluência de aproximadamente 80%, lavadas com PBS 1x e centrifugadas. O material decantado resultante da centrifugação foi submetido à extração de RNA.

A extração de RNA foi realizada utilizando o *RNeasy Mini kit* (QIAGEN®) seguindo as instruções do fabricante. Em seguida as amostras de RNA foram tratadas com DNase (Promega®) e analisadas no *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies®) e no *Nanodrop* (Thermo Scientific®), sendo considerados de boa qualidade os RNAs que apresentaram Número de Integridade do RNA (RIN - do Inglês *RNA Integrity Number*) entre 9 e 10, e a relação 260/280 de aproximadamente 2.0 de pureza.

3.5 SÍNTESE DE cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total de cada condição, utilizando-se 0,5 µg de oligonucleotídeo Oligo dT. Para a transcrição reversa foi utilizada a enzima *Superscript III* (Invitrogen®), seguindo as recomendações do fabricante.

3.6 PCR QUANTITATIVO (RT-qPCR)

A PCR em tempo real (RT-qPCR) foi realizada utilizando-se o cDNA sintetizado a partir do RNA total das células ANAPC13-UP e MOCK das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. A reação de RT-qPCR foi realizada em volume final de 20 µL, contendo 10 µL de *SYBR Green PCR Master Mix* (Life Technologies®), 200 nM dos oligonucleotídeos iniciadores e 50 ng de cDNA.

As condições da PCR foram: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final da amplificação a temperatura aumenta gradualmente de 60°C a 95°C por 20 minutos para realizar a curva de dissociação. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para os genes *ANAPC13*, *CDH1* e *VIM* e os tamanhos esperados para cada amplificado estão representados no Quadro 2, assim como os genes normalizadores utilizados: *GAPDH*, *HPRT* e *ACTB*. Os normalizadores foram analisados no programa *GeNorm*. Os experimentos foram realizados em triplicata e os gráficos foram gerados através do programa *Graphpad Prism* versão 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA,

EUA) a partir dos dados obtidos com o programa 7500 v2.0.5 utilizando o aparelho *Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies®).

Cada amplificação foi checada para a ausência de produtos de PCR não específicos pela análise da Curva de *Melting*. A expressão do gene foi avaliada usando o método de C_T comparativo. Para a determinação dos valores de expressão relativa, foram feitos os seguintes cálculos:

$$\Delta C_T = C_{T \text{ gene alvo (ANAPC13)}} - C_{T \text{ gene normalizador (GAPDH)}}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ amostra (ANAPC13-UP)}} - \Delta C_{T \text{ controle (Mock)}}$$

$$\text{Expressão relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Aos controles (MOCK) foi designado o valor de 1 para o cálculo de expressão relativa das amostras. Assim, a expressão relativa da amostra foi obtida a partir da comparação dos níveis de expressão de cada um deles com o controle. Os valores foram ‘logados’ na base 2 (log2). Foram realizadas triplicatas por amostra. O desvio máximo considerado permitido entre as replicatas foi de 0,5 C_T .

Quadro 2 - Sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na RT-qPCR e tamanho dos amplificadores

Gene	Oligonucleotídeo iniciador <i>forward 5'-3'</i>	Oligonucleotídeo iniciador <i>reverse 3'-5'</i>	Tamanho do amplificado
ANAPC13	GATTGATGATGCTTGCG	GTAAGGCTAAGTCTGTCC	146 pb
CDH1	CTTGAGCCAGCTGCACAG	GTGGGGTCAGTATCAGCC	165 pb
VIM	CTCCCTCTGGTTGATAC	CAAGGTCATCGTGATGC	106 pb
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGA	GGGTCATTGATGGCAAC	102 pb
HPRT	CCCACGAAGTGTTGGATATAAGC	GGGCATATCCTACAACAACTTGTC	74 pb
ACTB	GCACCCAGCACAATGAAG	CTTGCTGATCCACATCTGC	117 pb

3.7 WESTERN BLOT

Para a extração de proteínas totais das linhagens celulares, as células foram removidas das placas de cultura e lavadas com PBS 1x. As células decantadas por centrifugação foram diluídas em tampão RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, NP40 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1% e contendo um coquetel de inibidores de fosfatases (1:100, Sigma-Aldrich, Gillingham, UK) e coquetel de inibidores de proteases (1:100, Sigma-Aldrich, Gillingham, UK)). A lise da membrana celular foi realizada através de choque térmico, alternando a temperatura de -80°C para 37°C por dez vezes promovendo a liberação de proteínas totais das células. A concentração proteica foi determinada através do protocolo baseado nas instruções do fabricante do kit *Qubit* (Life Technologies®). Em seguida, 50 µg de proteínas foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 62 mM pH 8.8, contendo SDS 0,2% e β-mercaptoetanol) e reduzidas por 5 minutos a 99°C.

As proteínas foram separadas em gel de acrilamida 16% (SDS-PAGE) em tampão de corrida (Tris 25 mM, Glicina 190 mM e SDS 0,1%, pH 8.3) por aproximadamente duas horas. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de Nitrocelulose (poro 0.2 µm) (Amersham Biosciences®) em tampão de transferência (metanol 20%, Tris base 25 mM e Glicina 192 mM) durante noventa minutos. A membrana foi corada com *Ponceau S* para confirmação da transferência das proteínas, e em seguida lavada com ácido acético. O bloqueio foi realizado com leite em pó desnatado diluído em TBS-Tween 1x por 1 hora a temperatura ambiente sob

agitação, e lavada após esse período com TBS-Tween 1x. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-ANAPC13 (policlonal produzido em coelho, 1:500, Life Span Biosciences®), anti-E-CADERINA (monoclonal, produzido em coelho, 1:1000, Cell Signaling®), anti-VIMENTINA (monoclonal, produzido em coelho, 1:1000, Cell Signaling®) e anti-GAPDH (monoclonal, produzido em camundongo, 1:2000, Cell Signaling®). Após a incubação com os anticorpos, a membrana foi lavada com TBS-Tween e incubada com os anticorpos secundários específicos conjugados com peroxidase: anti-IgG de camundongo (produzido em ovelhas, 1:2000, Amersham Biosciences®); ou anti-IgG de coelho (produzido em cavalos, 1:2000, Cell Signaling®). Após as lavagens com TBS-Tween, as proteínas foram detectadas com o reagente quimioluminescente *Luminata Forte Western HRP Substrate* (Millipore®). As imagens foram capturadas no equipamento *UVITEC Alliance 4.7* (UVItec, Cambridge, UK).

3.8 VIABILIDADE CELULAR (MTT – (3-(4,5-DIMETHYLTHIAZOL-2-YL)-2,5-DIPHENYLTETRAZOLIUM BROMIDE)

Em placas de 96 poços foram adicionadas 5×10^3 células/poço diluídas em meio contendo SFB. A viabilidade celular foi avaliada durante um período de 120 horas, sendo que as leituras foram realizadas em 5 tempos diferentes (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h). Após cada período de incubação, o MTT foi adicionado em todos os poços (10 μ L/poço (5 mg/mL)) e as células foram incubadas por 2 horas a 37°C a 5 % de CO₂. Após este

período, o meio foi removido e foi adicionado 100 µL/poço de isopropanol. A leitura foi realizada a 570 nm no espectrofotômetro *SpectraMax*. Os ensaios foram realizados duas vezes, sendo cada uma em quadruplicata. O teste estatístico realizado foi ANOVA, seguido do Tukey, comparando todas as condições com todas as condições e considerando as comparações entre as condições ANAPC13-UP e ANAPC13-DOWN com os controles WT e MOCK.

3.9 ENSAIO DE CONSUMO DE GLICOSE

Em placas de 96 poços, foram adicionadas 2×10^4 células/poço/100 µL e incubadas a 37°C com 5% de CO₂ até que atingissem 100% de confluência. Ao atingir esta confluência, o meio de cultura foi renovado e a leitura dos níveis de glicose no meio de cultura foram realizadas em 5 momentos diferentes: 4 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas e 48 horas. A mensuração foi realizada a partir de 5 µL meio de cultura de cada uma das condições em tiras com capilaridade para quantificação de glicose (Accu-Chek®, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) e estimulam uma reação enzimática que é lida no aparelho *Accu-Chek Active*® (Roche). O ensaio foi realizado duas vezes, sendo cada um deles em duplicata experimental. As análises foram realizadas no *GraphPad Prism* versão 6. O teste estatístico realizado foi ANOVA, seguido do teste de Tukey, comparando todas as condições com todas as condições e considerando as comparações entre

as condições ANAPC13-*UP* e ANAPC13-*DOWN* com os controles WT e MOCK.

3.10 ENSAIOS *IN VITRO*

3.10.1 Ensaio de Proliferação em tempo real

Para a realização do ensaio de proliferação celular em tempo real, foi utilizado o protocolo *RTCA DP Instrument Short Guide I: Cell Titration* disponibilizado pelo fabricante do equipamento *XCelligence* (Roche®). O princípio é baseado na detecção de impedância a partir da aderência das células na *E-Plate 16* (Roche®) (Figura 8), a qual possui microeletrodos na parte inferior da placa, e a proliferação celular é registrada graficamente no programa *RTCA* em tempo real.



Fonte: ACEA Bioscience, Inc (2015)

Figura 8 - Figura ilustrativa de uma placa utilizada para ensaios de proliferação em tempo real (E-Plate 16).

Na placa *E-Plate 16* (Roche®) foram adicionadas 3×10^3 células/poço para a MCF-7 e 5×10^3 células/poço para a linhagem MDA-MB-231, de acordo com a padronização realizada previamente. As mensurações foram configuradas para que fossem realizadas a cada 30 minutos durante aproximadamente 140 horas. O ensaio foi realizado em quadruplicata experimental. As análises foram realizadas no *GraphPad Prism* versão 6. O teste estatístico realizado foi *Oneway ANOVA*, comparando todas as condições com todas as condições e considerando as comparações entre as condições ANAPC13-UP e ANAPC13-DOWN com os controles WT e MOCK.

3.10.2 Ensaio de Adesão

Placas de 24 poços foram tratadas com 5 µg/poço de Geltrex® (Gibco®) em 250 µL de PBS. Após 4 horas de incubação a 37°C para que o Geltrex® pudesse ser adsorvido na placa, o excesso foi removido e a placa lavada com PBS 1x. Em seguida, foi adicionado 1% de albumina de soro bovino (do Inglês *Bovine Serum Albumin* (BSA)) e a placa foi incubada por 1 hora a 37°C. Após este período, os poços foram lavados, e foram adicionadas 2×10^5 células/poço e a placa foi incubada a 37°C com 5% de CO₂ por aproximadamente 4 horas para a linhagem MDA-MB-231 e 1 hora e 30 minutos para a linhagem MCF-7. O controle do ensaio foi realizado com a placa tratada apenas com BSA 1%. Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas cuidadosamente com PBS 1x para remover as células que não aderiram; em seguida, as células aderidas foram fixadas com metanol 100% por 15 minutos. Ao final, as células

aderidas foram coradas com solução de 0,2% de Cristal Violeta e 20% de metanol. A eluição foi realizada com SDS 1% e a leitura realizada em placa de 96 poços no *SpectraMax®* a um comprimento de onda de 540 nm. Os dados foram analisados com o programa *GraphPad Prism* versão 6. Os ensaios foram realizados em triplicata experimental.

3.10.3 Ensaio de Migração (cicatrização de feridas)

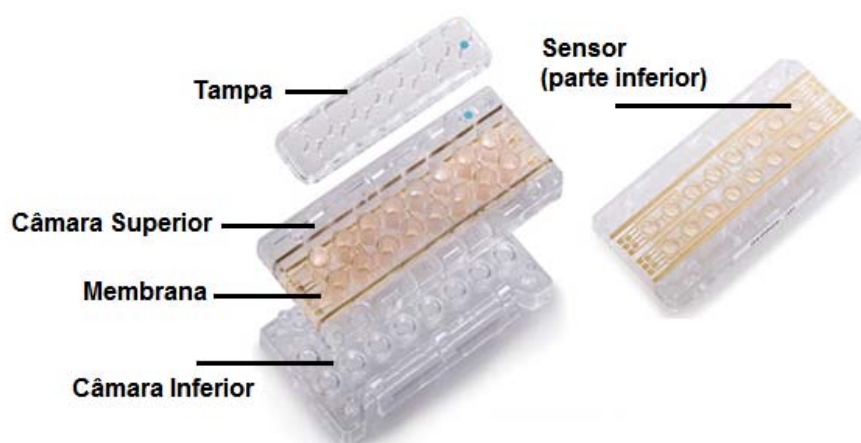
As células foram adicionadas em placas de 6 poços e, ao atingirem a confluência de 100%, com auxílio de uma ponteira de 200 µL foi realizada uma “ferida” entre as células com o intuito de gerar espaço para as células migrarem. Em seguida, foi realizada lavagem com PBS 1x para remover as células que não aderiram e as que soltaram da placa. Em seguida, foi acrescido meio de cultura sem SFB aos poços. As células foram fotografadas em diferentes tempos: zero (imediatamente após o risco), 8, 16, 24 e 32 horas.

As imagens obtidas foram analisadas qualitativamente e a área de migração foi quantificada com auxílio do programa *ImageJ*, em seguida, foi realizada a representação gráfica do ensaio de migração celular com auxílio do programa *GraphPad* versão 6. A área do tempo zero foi considerada como 100% de área possível para migração, e 0% foi considerado quando não havia área possível de ser mensurada devido à quantidade de células presente.

3.10.4 Ensaio de Migração em tempo real

Para a realização do ensaio de migração celular em tempo real, foi seguido o protocolo *RTCA DP Instrument Short Guide II: Cell Migration Assay in CIM-Plate 16 (November 2009)* disponibilizado pelo fabricante do equipamento *XCelligence* (Roche®).

Na *CIM-Plate 16* (Roche®) (Figura 9), foram adicionadas 5×10^3 células/poço. As células foram adicionadas sobre a membrana e na câmara inferior foi adicionado meio de cultura contendo SFB (utilizado como agente quimioatraente). Como controle negativo foi utilizado meio de cultura sem SFB. Esta placa é composta por duas unidades de placas, separadas por uma membrana. As células que atravessam os microporos da membrana aderem no fundo da placa sobre os sensores eletrônicos, levando a um aumento do sinal de impedância, que é identificado e colocado graficamente a cada 30 minutos durante 24 horas no *RTCA Software*. O ensaio foi realizado em quadruplicata experimental. As análises foram realizadas no *GraphPad Prism* versão 6.



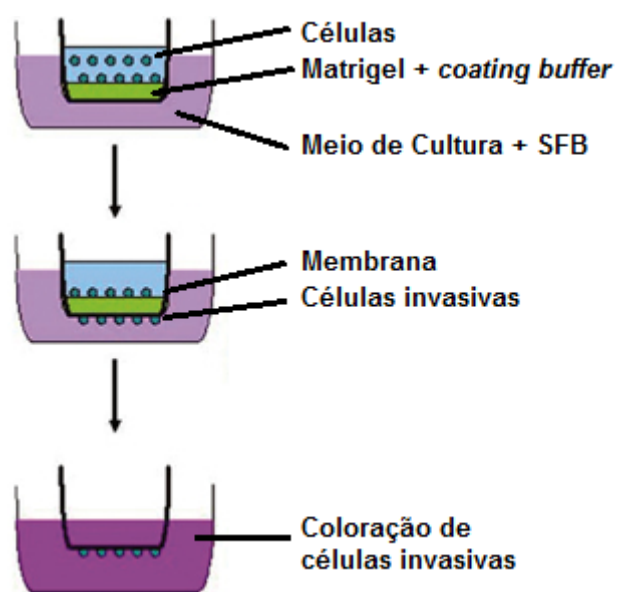
Fonte: ACEA Bioscience, Inc (2015)

Figura 9 - Figura ilustrativa de uma placa utilizada para ensaios de migração em tempo real (CIM-Plate 16).

3.10.5 Ensaio de Invasão em Câmara de Boyden

Placas Transwell (Corning®) foram tratadas com extrato protéico de matriz extracelular (Geltrex, Gibco®) (200 µg/mL) diluído em tampão 0,01 M Tris pH 8.0 contendo 0,7% NaCl, conforme demonstrado esquematicamente na Figura 10. A placa foi mantida a temperatura ambiente durante 16 horas para promover a solidificação do Geltrex®. Em seguida, 2×10^5 células/poço foram adicionadas sobre a membrana do Transwell contendo extrato protéico de matriz extracelular; na câmara inferior foi adicionado meio contendo 10% de SFB utilizado como quimioatraente, enquanto que nos controles negativos foi utilizado meio de cultura sem SFB (controle negativo). Após 24 horas, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 30 minutos; após o período de fixação, as células foram coradas com DAPI (1:500) por 30 minutos. Em seguida, as células que permaneceram na parte superior da membrana do Transwell foram removidas com o auxílio de hastes flexíveis com algodão. As imagens foram adquiridas com o auxílio do

microscópio *Nikon Eclipse TE2000-U*. Foram adquiridas 5 imagens de cada poço para todas as condições, evitando sobreposição das imagens. O ensaio foi realizado em triplicata experimental. Estas imagens foram quantificadas com o programa *ImageJ* e o resultado foi analisado no programa *GraphPad Prism* versão 6.



Fonte: Cell Biolabs, Inc (2015)

Figura 10 - Representação ilustrativa do Ensaio de Invasão em câmara de Boyden. As células são semeadas sobre a membrana tratada com extrato protéico de matriz extracelular. Na câmara inferior é adicionado meio de cultura com adição de SFB, que é utilizado como quimioatraente. As células invasivas que atravessam a membrana são coradas com DAPI (corante de núcleo celular) para serem visualizadas através de microscopia de fluorescência.

3.11 ENSAIO DE CICLO CELULAR

Em placas de Petri para cultura celular (100x15 mm) foram adicionadas 10^5 células/placa em meio de cultura sem SFB. Após 24 horas, o meio foi removido e substituído por meio de cultura contendo SFB. A contagem do tempo de incubação iniciou-se a partir deste momento, sendo determinado os seguintes tempos de incubação: 24 horas, 72 horas, 120 horas e 168 horas. Ao final de cada tempo de incubação as células foram removidas das placas, lavadas com PBS 1x, centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm, o PBS removido e as células resuspensas em 500 μ L de PBS 1x gelado, seguido de adição de 1000 μ L de etanol gelado sob agitação constante. Para avaliação das células em fase S, a marcação foi realizada com Iodeto de Propídio (PI - *Propidium Iodine*) (50 μ g/mL) em todas as amostras e posteriormente passadas por citômetro de fluxo (FACS Calibur, Becton-Dickinson (BD), San Diego, CA). O ensaio foi realizado em duplicata experimental. Os resultados foram analisados no programa *FlowJo*.

3.12 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Lamínulas de 15 mm de diâmetro foram tratadas com o polímero Poly-L-lisina (1:1000), incubadas a temperatura ambiente por 40 minutos, lavadas e em seguida foram adicionadas 10^4 células/poço. Após 24 horas, com as células já aderidas às lamínulas, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS 1x e fixadas em 4% de paraformaldeído pH

7.4. Para redução do *background*, foi adicionado Glicina 0.1 M às lamínulas e em seguida, as células foram permeabilizadas com 0,5% Triton X100. Durante 30 minutos, as células foram bloqueadas com BSA 1%, e em seguida, foram incubadas com o anticorpo primário (ANAPC13 (1:500) – policlonal produzido em coelho, Life Span Biosciences®) durante 16 horas a 4°C. Após este período, as lamínulas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário IgG de coelho (1:1000) (produzido em cabra, IRDye Odyssey) por 1 hora. O núcleo das células foi corado com 4'6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI). As imagens foram capturadas com o microscópio Olympus BX61 (Olympus, Japan) e as imagens foram processadas com auxílio da médica Dra. Mariana Petaccia do Departamento de Anatomia Patológica do AC Camargo Cancer Center.

3.13 MICROARRANJOS DE cDNA

Neste estudo, a técnica de microarranjos de cDNA foi realizada para as amostras da linhagem MDA-MB-231. As amostras da linhagem MCF-7 foram escaneadas em um trabalho anterior do grupo, entretanto foram reanalisadas seguindo os mesmos parâmetros utilizados para a linhagem MDA-MB-231. As amostras da linhagem MDA-MB-231 utilizadas compreendem todas as condições de expressão de ANAPC13 utilizadas neste estudo (alta, moderada e baixa expressão).

Para a análise comparativa dos perfis de expressão gênica entre diferentes níveis de expressão de ANAPC13 foi utilizada a plataforma de

cDNA *microarray SurePrint G3 Human Gene Expression G4851A 8X60K* (Agilent®). Esta plataforma contém 60.000 oligos de 60 bases de comprimento, que cobrem todo o transcriptoma humano.

Os cRNAs fluorescentes foram obtidos pela amplificação linear dos RNAs mensageiros presentes em uma alíquota de 200 ng de RNA total com o *Two-color Low Input Quick Amp Labeling Kit* (Agilent®), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Todas as condições foram co-hibridizadas com a referência comum *Universal Human Reference RNA* (Agilent®), de modo a permitir a realização de comparações horizontais.

Os *oligoarrays* foram hibridizados com os alvos fluorescentes durante 17 horas à 65°C em forno de hibridização, utilizando o tampão de hibridização *Hi-RPM* (Agilent®). Após a hibridização, as lâminas foram lavadas para eliminação de alvos não específicos e de sinal de fundo, segundo recomendações do fabricante.

Os *arrays* foram então digitalizados com o emprego do *Scanner Agilent Bundle* (Agilent®). Os dados de intensidade de cada *spot*, digitalizado no *scanner*, foram extraídos e pré-processados utilizando o programa *Agilent Feature Extraction* versão 10.0 (Agilent®). Nesta etapa, foram extraídos os valores de intensidade de cada *spot* e dos controles de qualidade das hibridações. O programa *Genespring Agilent* versão 11.0 (Agilent®) foi utilizado para realização da normalização da intensidade do sinal, removendo as sondas com sinal muito alto ou muito baixo (*threshold* =5), calculando a razão amostra/referência, realizando a transformação logarítmica da razão e normalizando os valores em relação ao percentil 75

da distribuição. Para ambas as linhagens, os genes que apresentaram diferença de expressão entre a amostra selvagem (WT) e a MOCK foram consideradas possíveis artefatos, portanto, foram filtradas da análise.

O perfil de expressão dos genes entre as diferentes condições de ANAPC13 foi avaliado através do programa *Short Time-Series Expression Miner* (STEM). No presente estudo, foram criadas 3 condições em relação a expressão de ANAPC13: alta expressão (ANAPC13-UP), expressão constitutiva (MOCK) ou baixa expressão (ANAPC13-DOWN). Os perfis de expressão gênica são sempre criados considerando a condição inicial como referência, sendo assim, a condição seguinte poderá apresentar manutenção, aumento ou diminuição da expressão em relação a condição inicial, sendo que, neste estudo a amostra ANAPC13-UP foi considerada como condição inicial, com intuito de representar a diminuição da expressão observada durante a progressão do tumor de mama. Desta forma, os perfis de expressão gênica que apresentaram relação direta ou inversa aos diferentes níveis de expressão do gene *ANAPC13* foram considerados comodulados.

Inicialmente este programa cria perfis de expressão aleatórios considerando o número de condições. Após a geração dos perfis de expressão simulados, o programa utiliza os dados de expressão dos microarranjos (dados empíricos) para atribuir cada gene a um determinado perfil simulado, usando o coeficiente de correlação como medida de semelhança. O número de genes do microarranjo atribuído a cada perfil é calculado e em seguida comparado ao número esperado de genes

atribuídos aos perfis ao acaso. O teste de significância para cada perfil é realizado comparando-se o número de genes observado para cada perfil com o número médio de genes esperado obtido através de diversas simulações por permutações randômicas. Para esta análise, dentre os perfis de expressão gênica criados para as 3 condições de expressão de *ANAPC13*, foram considerados apenas os perfis estatisticamente significativos dentre os 10 perfis de cada condição que apresentam padrões de comodulação em relação à expressão do gene *ANAPC13*, podendo ser uma relação direta ou inversa. Por fim, o programa permite inferir a significância biológica dos genes atribuídos aos perfis significativos usando análise de enriquecimento de categorias funcionais do *Gene Ontology* (GO). Apenas as categorias funcionais relacionadas a Processos Biológicos foram consideradas.

Foi realizada uma análise utilizando o *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) para identificar redes de interações relacionadas ao conjunto de genes dos perfis considerados significantes obtidos com a análise do STEM. Foram escolhidas as redes com escore maior ou igual a 25 que apresentaram função biológica relevante com relação ao nosso estudo.

3.14 ENSAIO DE TUMORIGÊNESE *IN VIVO*

Para o ensaio de tumorigênese *in vivo*, foram utilizados camundongos *Balb/c nude* fêmeas, com idade de 4-8 semanas. Foram inoculadas subcutaneamente 10^6 células/100 μ L de solução Geltrex:PBS (1:1) no flanco

esquerdo de cada camundongo, exceto nos controles, nos quais foi injetado apenas Geltrex® diluído em PBS.

Os tumores foram mensurados semanalmente com o auxílio de um paquímetro (INSIZE, 1112 *Series*). Após o período de acompanhamento de crescimento dos tumores, os animais foram sacrificados e os tumores foram removidos e pesados para que fosse possível comparar as diferentes condições, além disso, os tumores removidos tiveram uma parte congelada para a realização de extração de moléculas de RNA e outra parte foi parafinizada para a avaliação em lâminas de H&E e imunohistoquímica. Os tumores do grupo de animais injetados subcutaneamente com as células das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 foram acompanhados por 14 semanas.

O volume dos tumores foi calculado pela fórmula a seguir:

$$\text{Volume} = (\text{diâmetro menor})^2 \times \text{diâmetro maior} / 2$$

Este projeto foi aprovado para a utilização de animais pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da instituição AC Camargo Cancer Center, sob o número de 059/13.

4 RESULTADOS

4.1 PREPARAÇÃO PLASMIDIAL

Os plasmídeos pcDNA3.1/*myc*-HisA com a construção 'senso', para superexpressar *ANAPC13*, foram purificados, a expressão de *ANAPC13* foi confirmada através de PCR de colônia e os plasmídeos foram sequenciados, conforme descrito no item 3.2 de Material e Métodos. A quantidade de plasmídeos da construção 'anti-senso' foi considerada suficiente para realizar as transfecções celulares, portanto, este procedimento foi realizado apenas para os plasmídeos 'senso'.

Entre as colônias bacterianas que cresceram em LB ágar, foram escolhidas 34 colônias que cresceram de forma isolada.

A partir destas, foram escolhidas 4 colônias baseando-se no resultado da PCR de colônia, sendo que a escolha foi aleatória entre as colônias que apresentaram banda única e de tamanho esperado (435 pb). Conforme apresentado na Figura 11, foram escolhidas as colônias nomeadas 2B, 2H, 4H e 5E. O plasmídeo pcDNA3.1/*myc*-HisA foi utilizado como controle negativo sem inserto (banda de 237 pb) e o plasmídeo da construção 'senso', que já havia sido purificado e sequenciado anteriormente, foi utilizado como controle positivo.

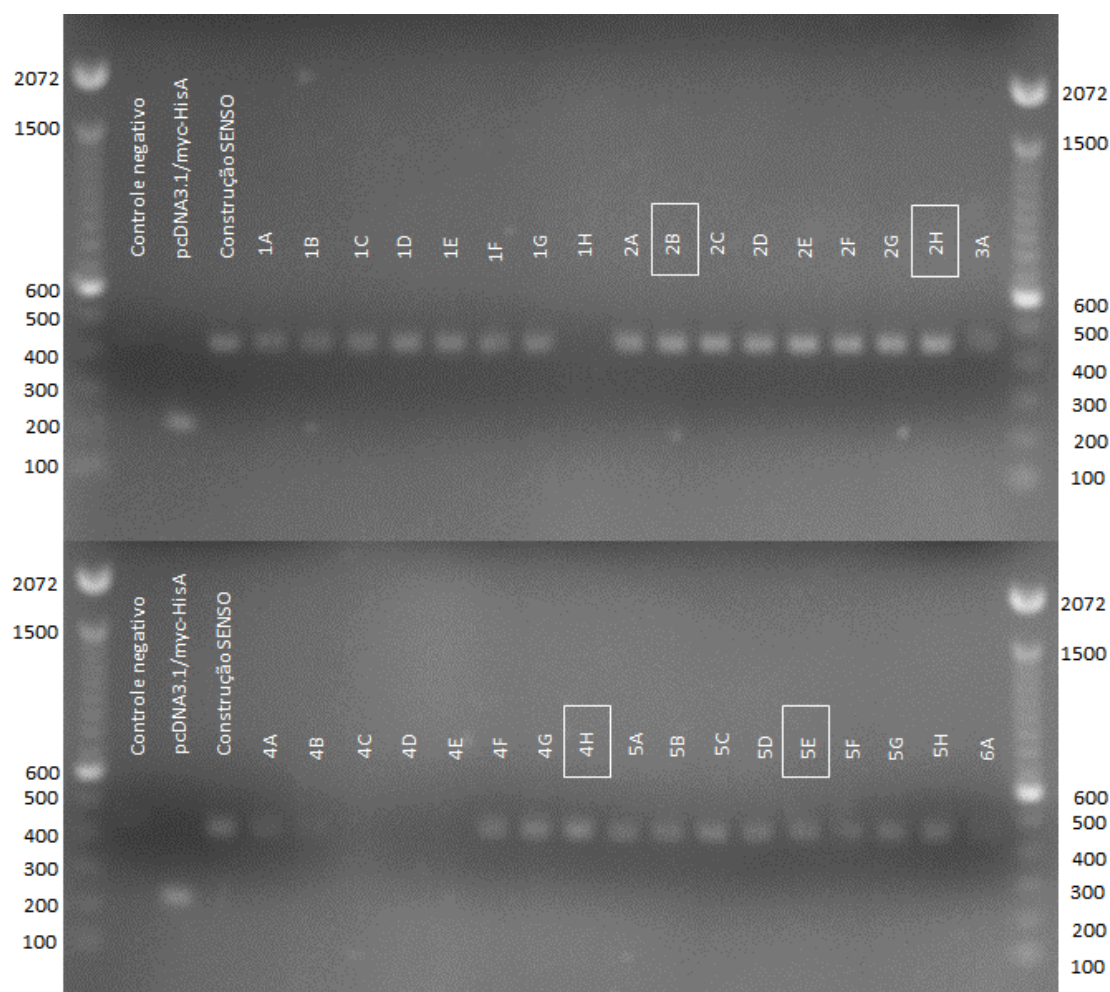


Figura 11 - PCR das colônias isoladas contendo os plasmídeos com a construção 'senso'. As colônias nomeadas 1H, 4C, 4D e 4E não apresentaram bandas, porém, as demais colônias da construção 'senso' apresentaram bandas únicas e de tamanho esperado (aproximadamente 435 pb), e dentre estas, as colônias 2B, 2H, 4H e 5E foram escolhidas aleatoriamente. Controle negativo: controle da reação, sem amostra; pcDNA3.1/myc-HisA: plasmídeo pcDNA3.1/myc-HisA vazio utilizado como controle por não conter inserto; construção SENSO: plasmídeo da construção 'senso' utilizado como controle positivo por ter sido previamente purificado e sequenciado.

Os plasmídeos das colônias escolhidas foram purificados (MiniPrep) e sequenciados pelo método de Sanger. Os resultados obtidos a partir do sequenciamento comprovaram a presença do inserto correspondente ao gene *ANAPC13*, conforme apresentado na Figura 12, mostrando o plasmídeo da colônia 2B como exemplo. Além disso, foi confirmado que a

inserção do gene *ANAPC13* está *in frame*. Todos os quatro plasmídeos escolhidos foram sequenciados e apresentaram o mesmo resultado.

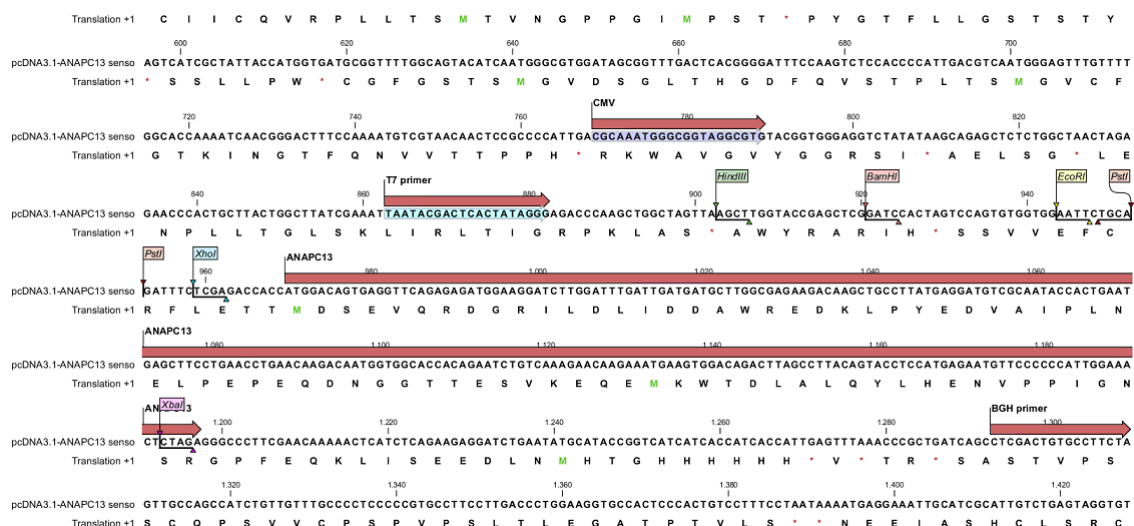


Figura 12 - Sequência de *ANAPC13* da construção 'senso' no plasmídeo pcDNA3.1/*myc*-HisA sequenciado pelo método de Sanger. Estão representados na figura: CMV: Promotor; T7 primer: sequência presente no plasmídeo a qual foi ligado o primer forward; *ANAPC13*: sequência de *ANAPC13* inserida no plasmídeo; BGH: sequência presente no plasmídeo a qual foi ligada o primer reverse. As letras 'M' em verde indicam os locais aonde encontra-se os aminoácidos 'Metionina' (*Start Codon*), portanto, mostrando que *ANAPC13* está *in frame*. Esta figura foi gerada com a análise do resultado utilizando o programa CLC Genomics Workbench®.

4.2 SUPEREXPRESSÃO E SILENCIAMENTO DE *ANAPC13*

Para realizar a transfecção através de lipossomos (*Lipofectamine LTX*®), o volume de *Lipofectamine LTX*® foi padronizado de acordo com as instruções do fabricante, sendo testados os seguintes volumes/poço: 5 µL, 7,5 µL, 10 µL e 12 µL. Nesta padronização foi determinado o volume que apresentou menor toxicidade celular e melhor eficácia na transfecção. Para

a linhagem MCF-7, foi estabelecido o volume de 12 μ L (Figura 13) e para a linhagem MDA-MB-231 foi determinado o volume de 7,5 μ L (Figura 14).

Para estudar o papel de ANAPC13 na progressão do câncer de mama, utilizamos as linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 como modelo para estudos funcionais *in vitro*. Desta forma, os plasmídeos contendo as sequências 'senso' e 'anti-senso' de *ANAPC13* foram transfectados para elevar e diminuir a expressão deste gene, respectivamente. O plasmídeo pcDNA3.1/*myc*-HisA sem inserto foi transfectado nas células de ambas as linhagens e utilizado como controle (MOCK). As células selvagens de ambas as linhagens, neste trabalho, denominadas WT (do Inglês *Wild-Type*), também foram utilizadas como controle. No Quadro 3 estão descritas as denominações das condições utilizadas neste trabalho.

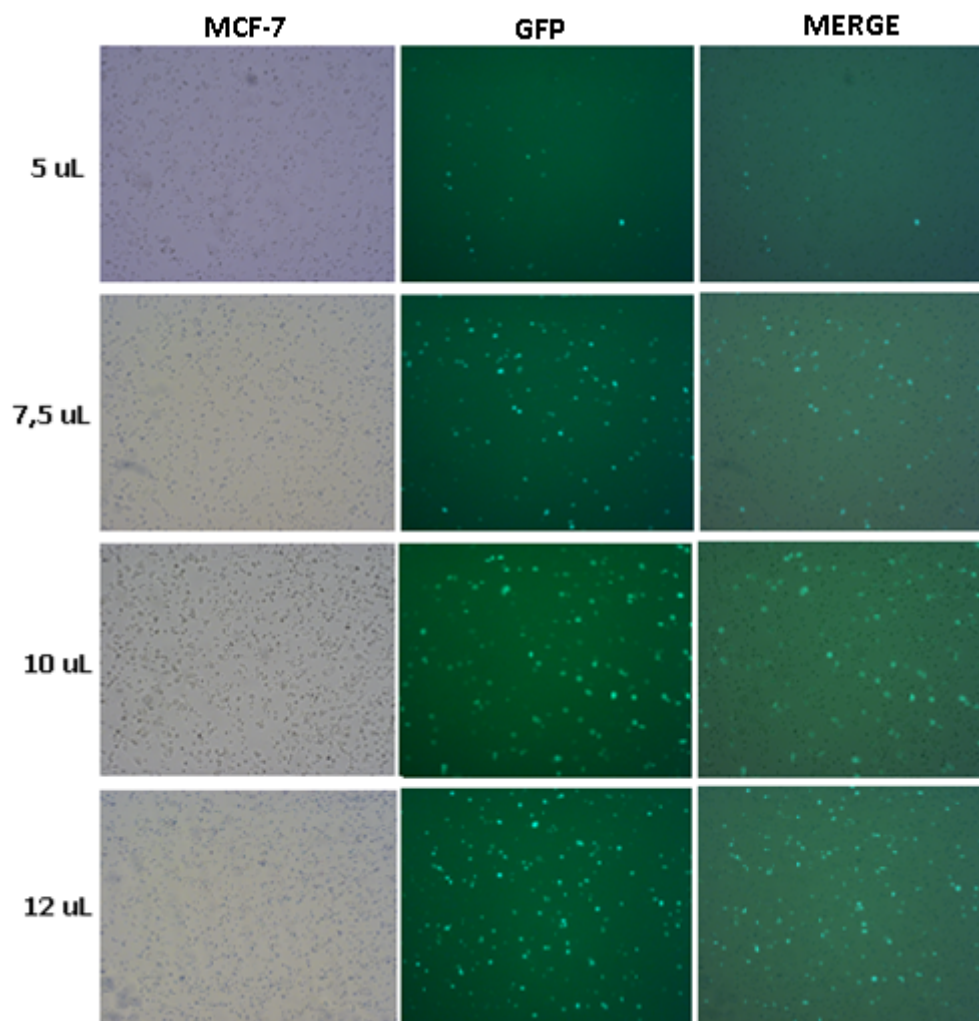


Figura 13 - Teste de concentração ótima de *Lipofectamine LTX®* na linhagem MCF-7. Foram testados quatro volumes diferentes de *Lipofectamine LTX®* na padronização da transfecção: 5 μ L, 7,5 μ L, 10 μ L e 12 μ L. O volume de 12 μ L apresentou melhor eficácia com menor toxicidade celular. A imagem foi adquirida em um aumento de 40x.

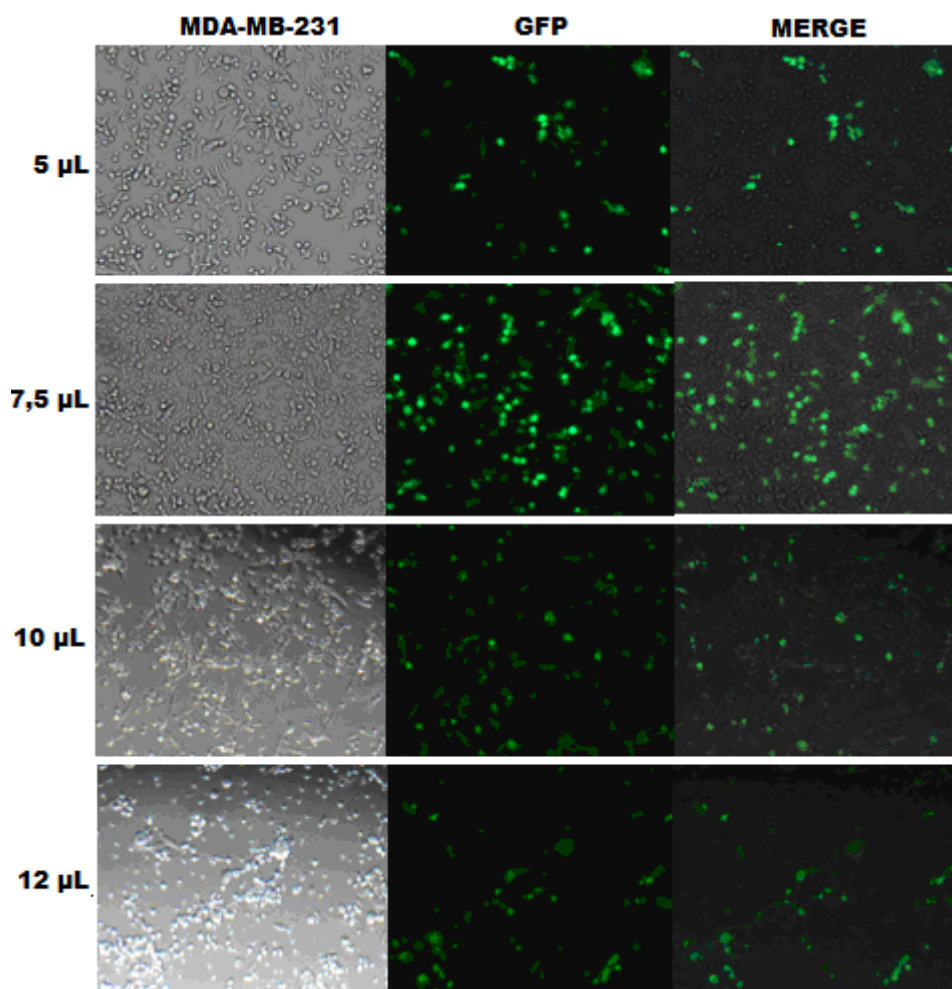


Figura 14 - Teste de concentração de *Lipofectamine LTX®* na linhagem MDA-MB-231. Foram testados quatro volumes diferentes de *Lipofectamine LTX®* na padronização da transfecção: 5 µL, 7,5 µL, 10 µL e 12 µL. O volume de 7,5 µL apresentou melhor eficácia na transfecção com menor toxicidade celular. A imagem foi adquirida em um aumento de 40x.

Quadro 3 – Denominação das condições utilizadas para MCF-7 e MDA-MB-231

Células	Condição	Construção	Denominação
MCF-7 e MDA-MB-231	Controle Selvagem	-	WT
	Controle Plasmídeo Vazio (expressão moderada/basal)	pcDNA3.1/myc-HisA sem inserto	MOCK
	Expressão alta	Senso	ANAPC13-UP
	Expressão baixa	Antisenso	ANAPC13-DOWN

4.3 VALIDAÇÃO DA TRANSFEÇÃO DAS LINHAGENS MCF-7 E MDA-MB-231

Com o propósito de avaliar a eficácia da transfecção das células da condição *ANAPC13-UP*, foi realizada a reação de PCR quantitativo em tempo real. Na linhagem MCF-7 foi observado um aumento de 3,2 vezes da expressão transcricional deste gene nas células com alta expressão de *ANAPC13* (*ANAPC13-UP*) comparadas com as células MOCK (expressão basal), enquanto que para a linhagem MDA-MB-231, houve um aumento de 1,9 vezes da expressão transcricional de *ANAPC13-UP* quando comparado com MOCK, conforme demonstrado na Figura 15a, confirmando que houve um aumento da expressão de *ANAPC13* em ambas as linhagens celulares quando comparadas ao controle.

A expressão proteica de *ANAPC13* foi avaliada através da técnica de Western Blot. Na Figura 15b estão representados os resultados da linhagem MCF-7, que apresentou níveis esperados desta proteína, sendo que as células selvagens (WT) e MOCK apresentaram níveis basais de expressão da proteína *ANAPC13*, as células *ANAPC13-UP* apresentaram expressão elevada desta proteína em relação aos controles (WT e MOCK) e as células *ANAPC13-DOWN* apresentaram diminuição da expressão em relação aos controles e as células *ANAPC13-UP*. Na linhagem MDA-MB-231 o aumento da expressão de *ANAPC13* foi menos pronunciado do que se observou na linhagem MCF-7, em concordância com os resultados da expressão transcricional.

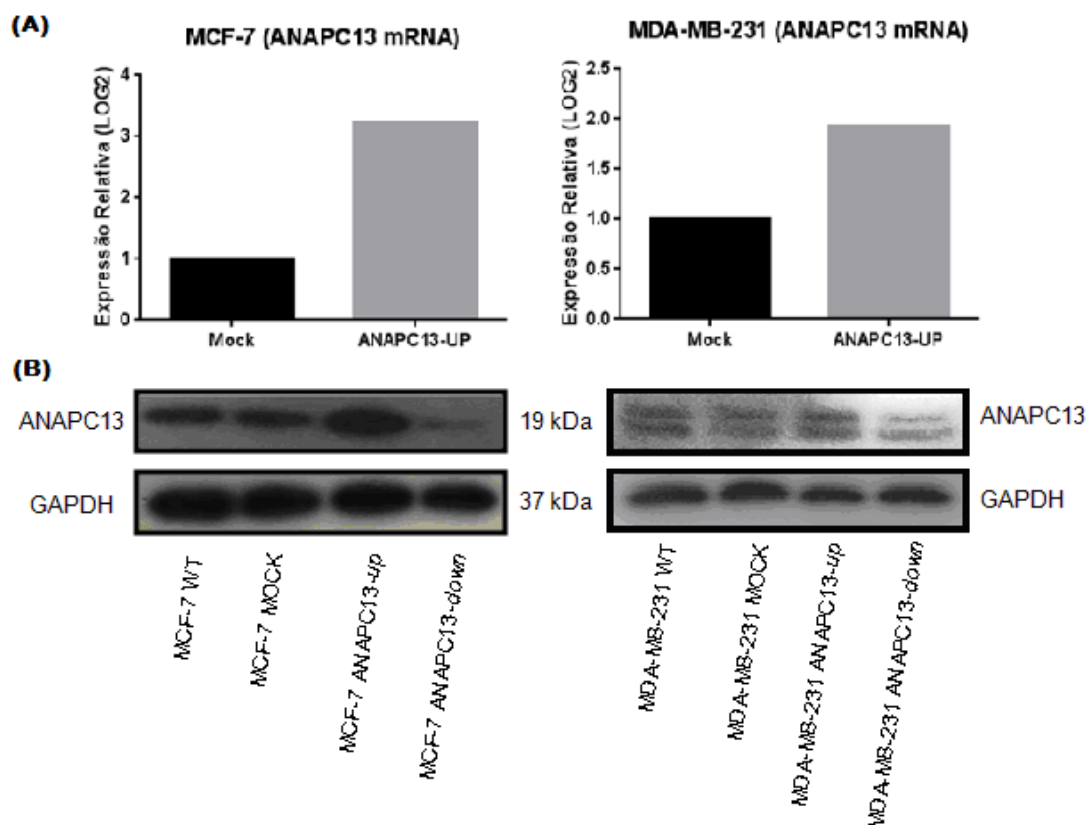


Figura 15 - Expressão de mRNA e proteína de ANAPC13 através de RT-qPCR e Western Blot nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. (A) RT-qPCR para avaliar os níveis de expressão de mRNA de ANAPC13 (ANAPC13-UP e MOCK) das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 transfectadas. (B) Western Blot realizado para avaliar o nível de expressão proteica de ANAPC13 nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. WT: células MCF-7 e MDA-MB-231; MOCK: células transfectadas com o plasmídeo (pcDNA3.1/myc-HisA) sem inserto; ANAPC13-UP: células com alta expressão de ANAPC13; ANAPC13-DOWN: células com baixa expressão de ANAPC13. O gene e a proteína GAPDH foram utilizados como referência constitutiva para ambos os ensaios (RT-qPCR e Western Blot). O tamanho do amplificado de ANAPC13 é de 146 pb e do GAPDH é de 102 pb. O peso molecular da proteína ANAPC13 é de aproximadamente 19 kDa e do GAPDH é de aproximadamente 37 kDa.

4.4 ENSAIOS *IN VITRO* COM A LINHAGEM MCF-7

A linhagem MCF-7 (ER+, PR+, HER2- (luminal B) foi selecionada com base em um estudo anterior do grupo que avaliou a expressão de mRNA e de proteína de ANAPC13 e esta linhagem apresentou alta expressão em ambos os níveis, proteico e transcricional, como demonstrado na Figura 6 do item 1.4 da Introdução. Para avaliar a função de ANAPC13 em processos que mimetizam a progressão do tumor, foram realizados ensaios *in vitro* com as diferentes condições de expressão de ANAPC13: baixa expressão (ANAPC13-DOWN), expressão constitutiva ou basal (MOCK) e alta expressão (ANAPC13-UP).

4.4.1 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT – (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

A viabilidade celular foi avaliada por ensaio colorimétrico baseado na redução de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) por células metabolicamente ativas, avaliado em parte pela ação de enzimas mitocondriais, no qual a quantidade do produto da clivagem (cristais de formazan) é diretamente proporcional ao número de células vivas.

As células com baixa expressão de ANAPC13 (ANAPC13-DOWN) apresentaram menor viabilidade celular na linhagem MCF-7 quando comparada com as demais condições de expressão de ANAPC13 (WT,

MOCK e ANAPC13-*UP*). Esta diferença passou a ser significativa a partir de 96 horas de incubação, conforme apresentado na Figura 16.

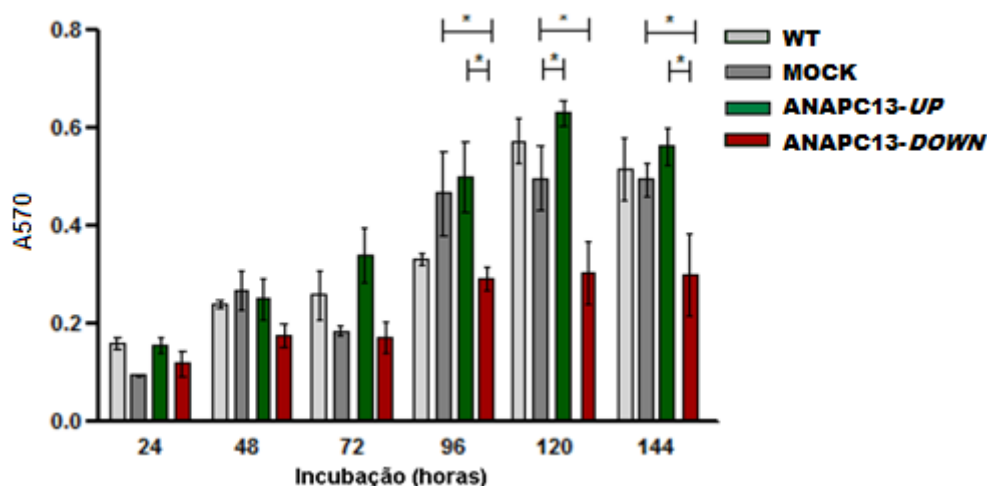


Figura 16 - Efeito de diferentes níveis de expressão de ANAPC13 na viabilidade das células da linhagem MCF-7 avaliada através do ensaio de MTT. WT: células MCF-7 selvagens; MOCK: células MCF-7 transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/myc-HisA sem inserto; ANAPC13-*UP*: células com alta expressão de ANAPC13; ANAPC13-*DOWN*: células com baixa expressão de ANAPC13. O ensaio foi realizado em quadruplicata experimental.

4.4.2 Ensaio de Proliferação Celular

A proliferação celular foi avaliada em relação a diferentes níveis de expressão de ANAPC13 com auxílio do equipamento *XCelligence* (Roche®), que monitora a proliferação celular em tempo real como descrito no item 3.10.1 de Material e Métodos.

Conforme apresentado na Figura 17, as células da linhagem MCF-7 com alta expressão de ANAPC13 (ANAPC13-*UP*) proliferaram mais do que as demais condições; esta diferença pode ser observada principalmente após 68 horas de incubação. As células com baixa expressão de ANAPC13

(ANAPC13-*DOWN*) apresentaram baixos níveis de proliferação do início ao final do experimento. As células controle, ou seja, as células que expressam níveis basais de ANAPC13 (WT e MOCK) apresentaram perfil de proliferação semelhante entre si e comparativamente intermediária entre as células com menor e maior expressão do gene *ANAPC13*.

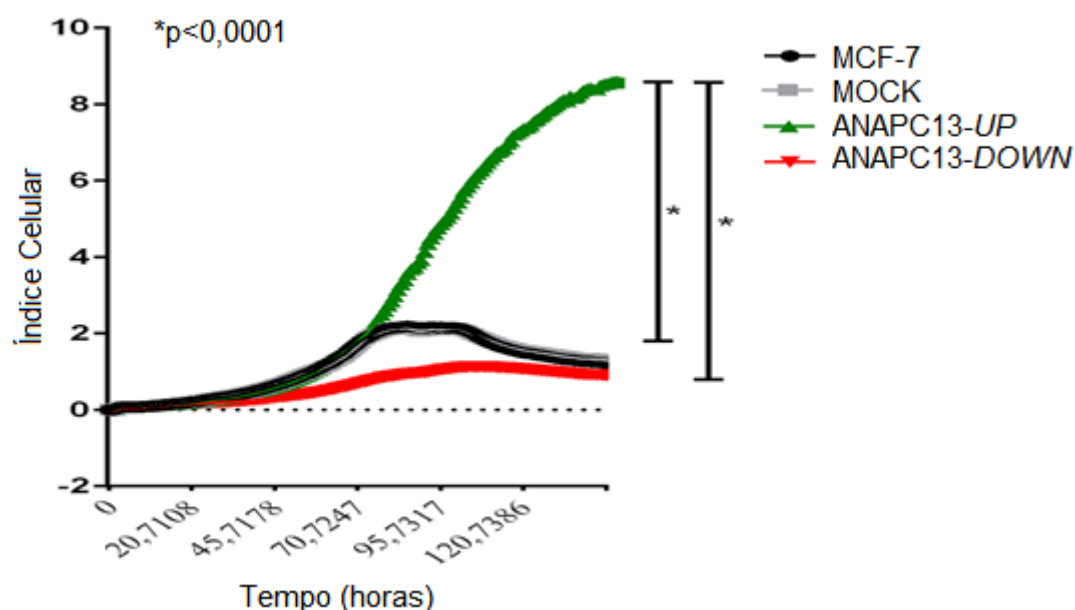


Figura 17 - Avaliação da expressão de ANAPC13 na proliferação das células MCF-7 através do equipamento *XCelligence* (Roche®). As células foram adicionadas à *E-Plate* 16 (Roche®) e avaliadas em tempo real durante aproximadamente 130 horas. WT: células MCF-7 selvagens (preto); MOCK: células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/myc-HisA sem inserto (turquesa); ANAPC13-UP: células com alta expressão de ANAPC13 (verde); ANAPC13-DOWN: células com baixa expressão de ANAPC13 (vermelho); DMEM: controle sem células, apenas meio de cultura (roxo). As células com alta expressão de ANAPC13 (ANAPC13-UP) apresentaram maiores níveis proliferativos comparando com as demais condições. O ensaio foi realizado em quadruplicata experimental.

4.4.3 Ensaio de Consumo de Glicose

O consumo de glicose está diretamente relacionado ao gasto energético de glicose pelas células. Uma vez que ocorre um aumento da proliferação celular há um maior consumo de glicose para manter a demanda de energia exigida.

O ensaio de consumo de glicose foi realizado para avaliar se as células com diferentes níveis de expressão de ANAPC13 apresentam diferença no consumo de glicose contida no meio de cultura celular. Foi observado que as células com baixa expressão da proteína ANAPC13 (ANAPC13-*DOWN*) apresentaram menor consumo de glicose do meio de cultura quando comparada com os controles (WT e MOCK), assim como quando comparada às células com a alta expressão da proteína ANAPC13 (ANAPC13-*UP*), conforme apresentado na Figura 18.

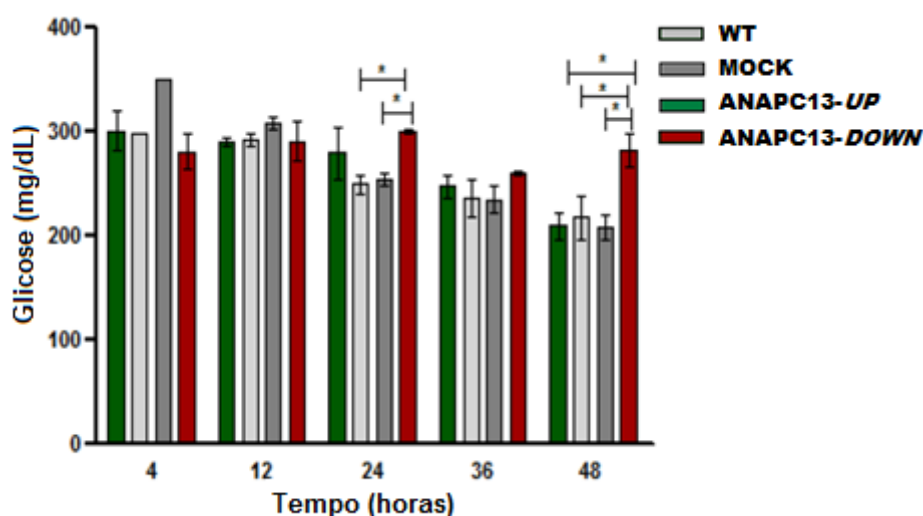


Figura 18 - Efeito da superexpressão e do silenciamento da proteína ANAPC13 no consumo de glicose. O ensaio teve duração de 48 horas e nos tempos de 4, 12, 24, 36 e 48 horas a glicose contida no meio de cultura foi quantificada. WT: células MCF-7 selvagens; MOCK: células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/myc-HisA vazio; ANAPC13-UP: células com alta expressão de ANAPC13; ANAPC13-DOWN: células com baixa expressão de ANAPC13. O ensaio foi realizado em duplicata experimental.

4.4.4 Ensaio de Adesão

A capacidade de adesão à matriz extracelular (MEC) foi avaliada nas diferentes condições de expressão de ANAPC13 na linhagem não invasiva MCF-7 em ensaio de mimetiza este processo através da mensuração de células que aderiram ao extrato de proteínas de matriz extracelular.

Como demonstrado na Figura 19, não foi observada diferença significativa na adesão celular quando foram comparadas todas as condições de expressão de ANAPC13 entre si.

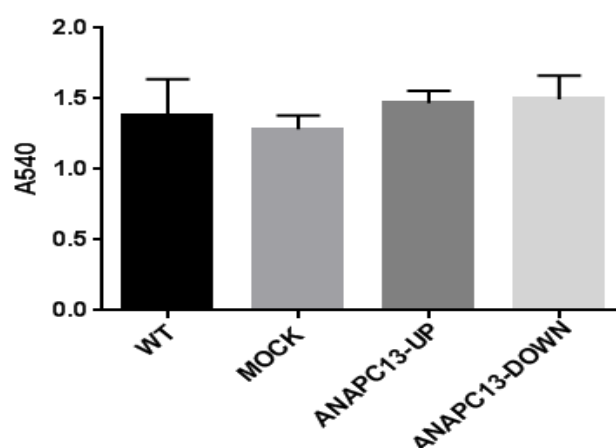


Figura 19 - Efeito de diferentes níveis de expressão da proteína ANAPC13 na adesão celular na linhagem MCF-7. WT: células MCF-7 selvagens; MOCK: células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/myc-HisA vazio; ANAPC13-UP: células com alta expressão de ANAPC13; ANAPC13-DOWN: células com baixa expressão de ANAPC13. No eixo X estão representadas as diferentes condições de expressão de ANAPC13. No eixo Y estão representados os valores de absorbância lidos em 540 nm de comprimento de onda. Não houve significância estatística. O ensaio foi realizado em triplicata experimental.

4.4.5 Ensaio de Migração (cicatrização de feridas)

A migração celular, ou seja, o movimento de células de uma área para outra, geralmente em resposta a sinais químicos, mostra relação com um papel importante na capacidade metastática das células. O ensaio bidimensional de migração por cicatrização de feridas foi realizado com a linhagem MCF-7 para avaliar se possíveis alterações nos níveis de expressão de ANAPC13 poderiam influenciar na capacidade de migração celular. Entretanto, esta linhagem celular apresenta baixa habilidade migratória nas condições experimentais utilizadas. Neste ensaio foi observado que, independente dos níveis de ANAPC13, não houve diferença na migração celular durante um período de 32 horas, conforme demonstrado nas Figuras 20a e 20b.

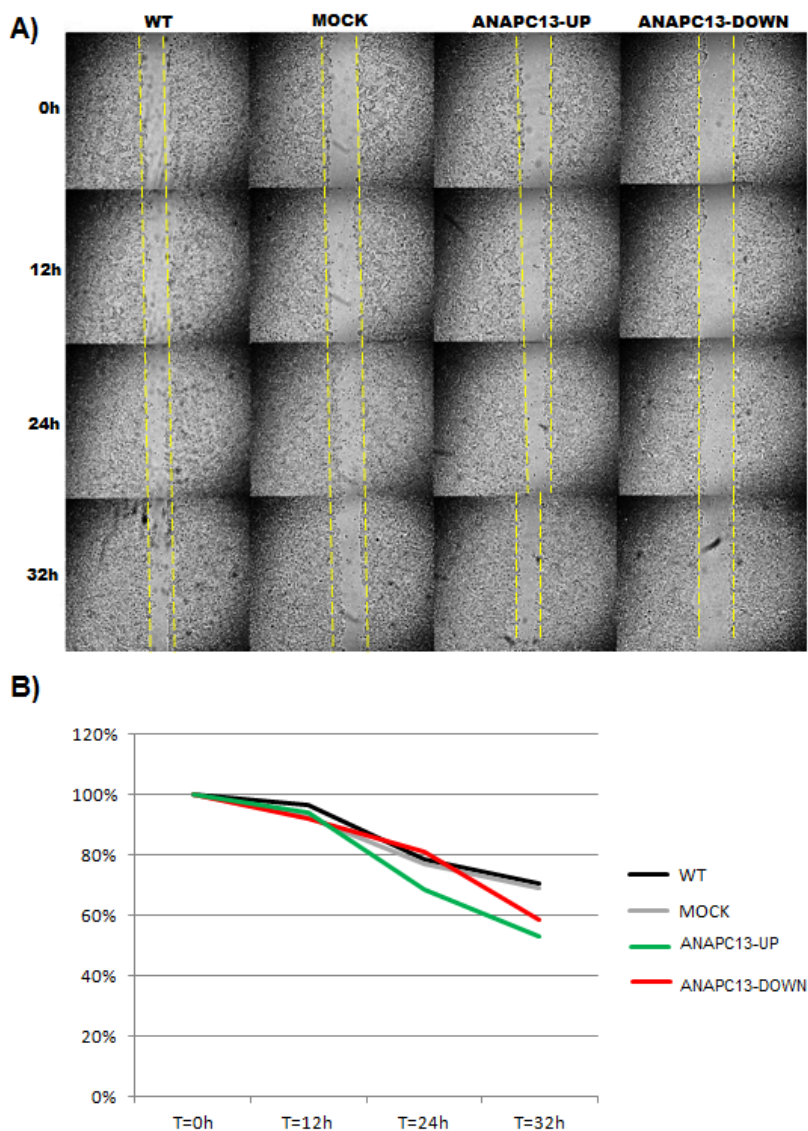


Figura 20 - A alta e a baixa expressão de ANAPC13 não exercem efeito na capacidade de migração celular em MCF-7. WT: células MCF-7 selvagens; MOCK: células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/myc-HisA vazio; ANAPC13-UP: células com alta expressão de ANAPC13; ANAPC13-DOWN: células com baixa expressão de ANAPC13. O ensaio foi realizado durante 32 horas e as imagens foram adquiridas em quatro momentos diferentes. Não houve diferença de migração celular entre as condições. A) Imagens adquiridas em cada um dos tempos (T=0h, 12h, 24h e 32h) para cada condição da linhagem MCF-7. B) Demonstração gráfica da migração celular. As imagens foram analisadas com o programa *ImageJ* e o gráfico foi realizado com auxílio do programa *GraphPad Prism*. A porcentagem representa o fechamento da ferida em cada tempo.

4.4.6 Ensaio de Ciclo Celular

A avaliação do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo através de marcação de DNA com Iodeto de Propídio que permite distinguir a distribuição das células entre as principais fases do ciclo celular (G1 x S x G2/M). Não foi observada diferença entre as diferentes condições de expressão de ANAPC13, como observado na Figura 21, entretanto para todas as condições, a maioria das células apresentou-se em fase G0/G1.

MCF-7 WT				
Fases	24h	72h	120h	168h
G0/G1	62,09%	71,28%	64,33%	74,53%
S	22,03%	16,41%	13,69%	12,13%
G2/M	12,36%	10,92%	20,79%	12,57%
MCF-7 MOCK				
G0/G1	60,15%	57,9%	63,17%	68,04%
S	18,74%	14,23%	13,72%	12,72%
G2/M	19,66%	26,41%	21,73%	17,77%
MCF-7 ANAPC13-UP				
G0/G1	50,56%	57,3%	63,46%	69,12%
S	21,2%	14,72%	15,96%	13,65%
G2/M	25,66%	26,69%	18,92%	16,01%
MCF-7 ANAPC13-DOWN				
G0/G1	61,59%	59,62%	63,53%	75,18%
S	17,47%	15,66%	15,43%	9,82%
G2/M	19,32%	23,31%	19,95%	13,69%

Figura 21 – Porcentagem da distribuição das fases do ciclo celular na linhagem MCF-7. As células foram sincronizadas antes da realização do ensaio em todos os tempos avaliados. A maioria das células de todas as condições encontra-se em G0/G1. Não houve diferença significativa entre as condições. As porcentagens representadas são as médias da duplicata experimental. O ensaio foi realizado em duplicata experimental.

4.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA DA LINHAGEM MCF-7

A técnica de imunofluorescência permite a avaliação de proteínas específicas possibilitando visualizar a distribuição e abundância de proteínas nas células. Portanto, esta técnica foi utilizada para identificar a localização celular de ANAPC13 nas células MCF-7 com as diferentes condições de expressão desta proteína.

Conforme demonstrado na Figura 22, a proteína ANAPC13 é encontrada tanto no núcleo quanto no citoplasma, contudo, a expressão nuclear de ANAPC13 é mais evidenciada nesta linhagem celular quando comparada a expressão citoplasmática.

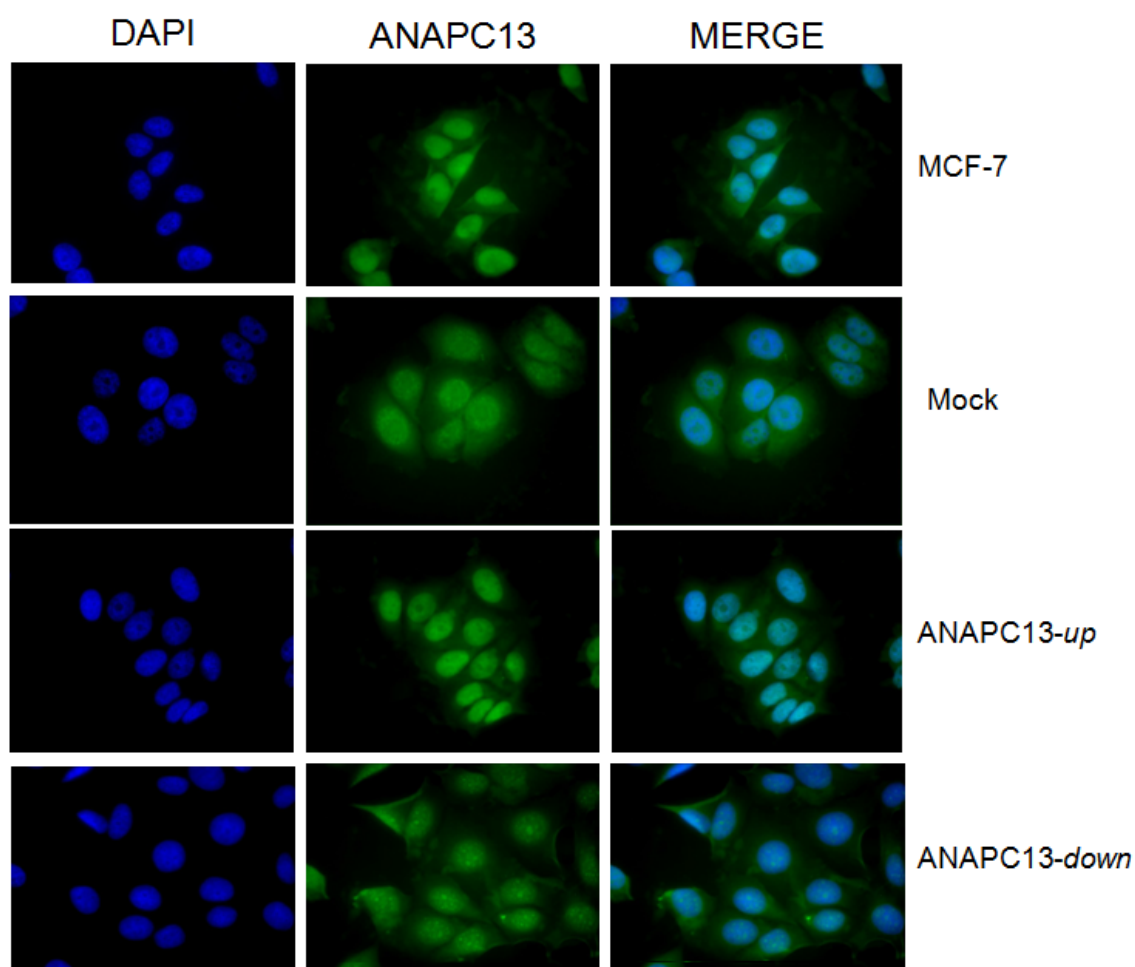


Figura 22 - Localização celular da proteína ANAPC13 na linhagem MCF-7.

MCF-7: células MCF-7 selvagens; MOCK: células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/myc-HisA vazio; ANAPC13-UP: células com alta expressão de ANAPC13; ANAPC13-DOWN: células com baixa expressão de ANAPC13. O DAPI foi utilizado para corar o núcleo. O anticorpo secundário marcado com GFP foi utilizado para marcar a proteína ANAPC13. As imagens do núcleo das células e com a marcação de ANAPC13 foram sobrepostas (MERGE). Imagens adquiridas em aumento de 100x.

4.6 ENSAIOS DE TUMORIGÊNESE *IN VIVO* DA LINHAGEM MCF-7

Após avaliação da função da proteína ANAPC13 em ensaios *in vitro*, a função desta proteína foi avaliada em relação ao crescimento tumoral em camundongos *Balb/C nudes* nas diferentes condições de expressão de ANAPC13 na linhagem celular MCF-7.

O crescimento tumoral das diferentes condições de expressão foi avaliado durante 14 semanas. Durante as primeiras semanas ocorreu um aumento do volume tumoral seguido por um decréscimo no crescimento tumoral, o que provavelmente se deve ao período de absorção do extrato de proteínas da matriz extracelular (Geltrex®) nos animais. A partir da oitava semana, o crescimento tumoral foi bastante variável para todas as condições, conforme observado na Figura 23.

Tumorigênese *in vivo* - MCF-7

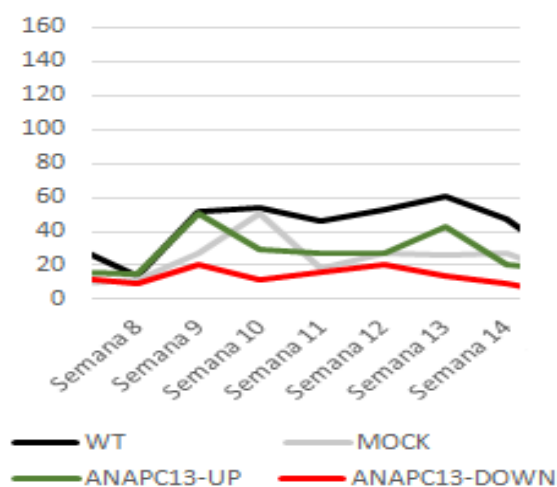


Figura 23 - Crescimento tumoral *in vivo* das diferentes condições de expressão de ANAPC13 na linhagem MCF-7. Camundongos Balb/C nude injetados subcutaneamente com as células WT (MCF-7), MOCK (plasmídeo vazio), ANAPC13-UP (células com alta expressão de ANAPC13), ANAPC13-DOWN (células com baixa expressão de ANAPC13). Foram utilizados 3 animais em cada grupo. O crescimento tumoral foi acompanhado durante 14 semanas.

Após 14 semanas de acompanhamento do crescimento das lesões, estas foram removidas e avaliadas pela patologista Dra. Cynthia Osório. Foi observado que apenas um dos animais da condição ANAPC13-UP apresentou desenvolvimento de tumor. Os animais MOCK3, DOWN2 e DOWN3 não apresentaram tumor e nem desenvolvimento de nenhuma lesão foi observada, contudo, os demais animais apresentaram comprometimento de linfonodo com glândula anexa, conforme apresentado no Quadro 4.

Quadro 4 – Formação de tumor nos animais do grupo MCF-7 avaliadas pelo método de coloração de H&E.

MCF-7-WT	0/3
MCF-7-MOCK	0/3
MCF-7-ANAPC13-UP	1/3
MCF-7-ANAPC13-DOWN	0/3

4.7 ENSAIOS *IN VITRO* COM A LINHAGEM MDA-MB-231

A linhagem MDA-MB-231 (ER-, PR-, HER2 normal (*basal-like*)) foi selecionada com base em um estudo anterior do grupo que avaliou a expressão de mRNA e de proteína de ANAPC13 e esta linhagem apresentou alta expressão de mRNA, conforme apresentado na Figura 6 (item 1.4 da Introdução), que seria ideal para os ensaios de silenciamento deste gene, o qual simularia a diminuição de expressão de ANAPC13 que ocorre durante a progressão do câncer de mama (SENS-ABUÁZAR 2012). Para avaliar a função de ANAPC13 em processos que mimetizam a progressão tumoral, foram realizados ensaios *in vitro* com as diferentes condições de expressão de ANAPC13: baixa expressão de ANAPC13 (ANAPC13-*DOWN*), expressão constitutiva ou basal (MOCK) e alta expressão de ANAPC13 (ANAPC13-*UP*).

4.7.1 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT – (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

Conforme apresentado na Figura 25, a linhagem MDA-MB-231 com diferentes níveis de expressão de ANAPC13 (WT, MOCK, ANAPC13-*UP* e ANAPC13-*DOWN*) foi avaliada quanto a viabilidade celular através do

ensaio colorimétrico MTT durante 168 horas, sendo que as leituras ocorreram em sete momentos diferentes: 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas, 120 horas, 144 horas e 168 horas.

Após 48 horas de incubação, foi observada uma diferença estatística nas comparações realizadas entre as diferentes condições, entretanto, devido a grande variabilidade do experimento essas diferenças estatisticamente significantes não foram consideradas.

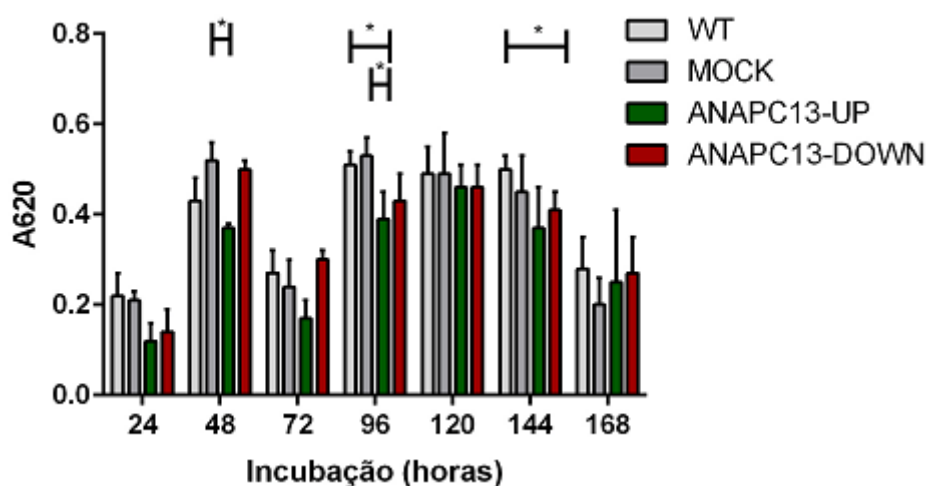


Figura 24 - Efeito de diferentes níveis de expressão de ANAPC13 na viabilidade das células MDA-MB-231. WT: células MDA-MB-231; MOCK: células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/*myc*-HisA vazio; ANAPC13-UP: células com alta expressão de ANAPC13; ANAPC13-DOWN: células com baixa expressão de ANAPC13. O ensaio foi realizado durante 96 horas. As mensurações foram realizadas em 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas em comprimento de onda de 260 nm. No eixo X estão representados os tempos de incubação e as barras representam as médias das absorbâncias lidas em cada tempo, com desvio padrão. No eixo Y está representada a escala de absorbância. O ensaio foi realizado em quadruplicata experimental.

4.7.2 Ensaio de Proliferação Celular

A avaliação da proliferação celular foi realizada para verificar o papel de ANAPC13 na linhagem MDA-MB-231. Conforme apresentado na Figura 26, durante as 136 horas de incubação, não houve diferença na proliferação de MDA-MB-231 entre as condições com diferentes níveis de expressão de ANAPC13.

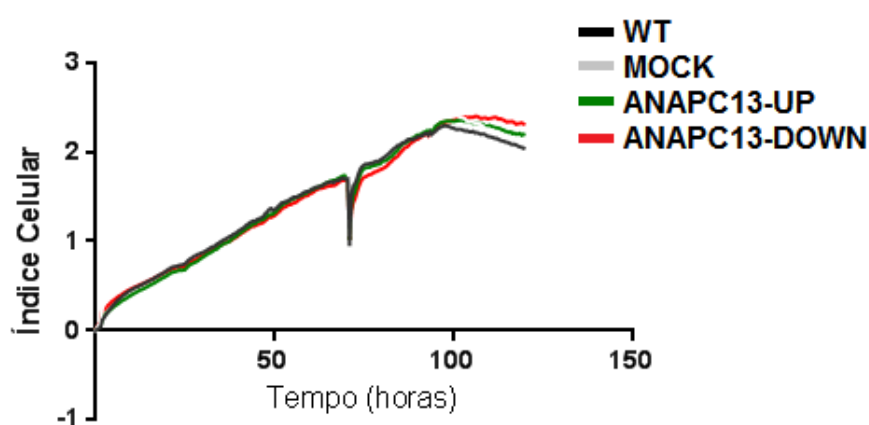


Figura 25 - Efeito de diferentes níveis de expressão de ANAPC13 na proliferação celular na linhagem MDA-MB-231. WT (linha preta): células MDA-MB-231; MOCK (linha cinza): células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/myc-His-A vazio; ANAPC13-UP (linha verde): células com alta expressão de ANAPC13; ANAPC13-DOWN (linha vermelha): células com baixa expressão de ANAPC13. No gráfico estão representadas as médias de cada condição. O ensaio foi realizado em quadruplicata experimental.

4.7.3 Ensaio de Consumo de Glicose

O ensaio de consumo de glicose foi realizado na linhagem MDA-MB-231 para avaliar se as células com diferentes níveis de expressão de ANAPC13 apresentam diferença no consumo de glicose. Não foi observada diferença estatística entre as condições analisadas, conforme apresentado na Figura 27.

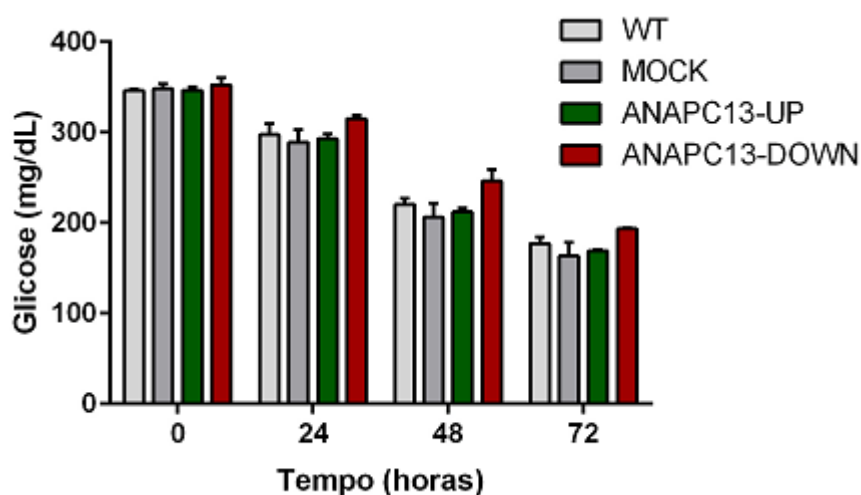


Figura 26 - Consumo de glicose pelas células da linhagem MDA-MB-231 com diferentes níveis de expressão de ANAPC13. MDA-MB-231 WT: células MDA-MB-231; MDA-MB-231 MOCK: células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/*myc*-HisA vazio; MDA-MB-231 ANAPC13-UP: células com alta expressão de ANAPC13; MDA-MB-231 ANAPC13-DOWN: células com baixa expressão de ANAPC13. O ensaio foi realizado em duplicata experimental.

4.7.4 Ensaio de Adesão Celular

Na linhagem invasiva MDA-MB-231, foi observado que as células com alta expressão da proteína ANAPC13 (ANAPC13-UP) apresentaram maior capacidade de adesão das células às proteínas de matriz extracelular aproximadamente 3 vezes maior quando comparada as demais condições (WT, MOCK e ANAPC13-DOWN), como demonstrado no gráfico da Figura 28.

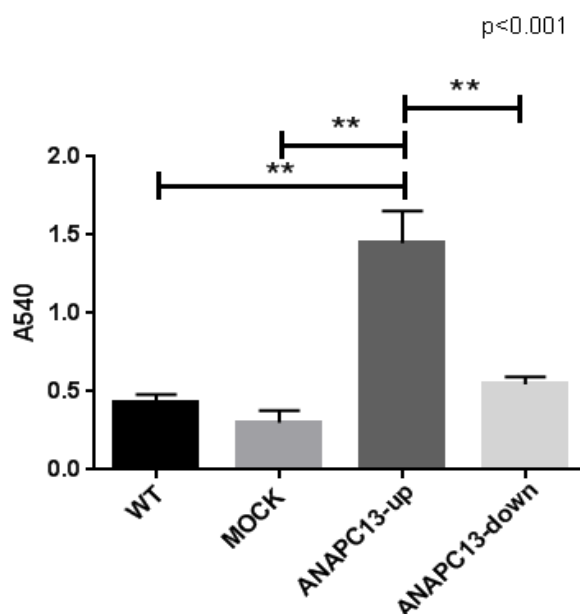


Figura 27 - Efeito de diferentes níveis de expressão da proteína ANAPC13 na adesão celular na linhagem MDA-MB-231. WT: células MDA-MB-231; MOCK: células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/*myc*-HisA sem inserto; ANAPC13-*UP*: células com alta expressão de ANAPC13; ANAPC13-*DOWN*: células com baixa expressão de ANAPC13. No eixo X estão representadas as diferentes condições de expressão de ANAPC13. No eixo Y estão representados os valores de absorbância lidos em 540 nm de comprimento de onda. ** $p < 0,001$. O ensaio foi realizado em triplicata experimental.

4.7.5 Ensaio de Migração Celular (cicatrização de feridas)

As células da linhagem MDA-MB-231 com baixa expressão de ANAPC13 (ANAPC13-*DOWN*), apresentaram maior potencial de migração quando comparada às células com alta expressão de ANAPC13 (ANAPC13-*UP*), assim como quando comparada às células controle (WT e MOCK), de forma tempo dependente, ou seja, durante as primeiras 24 horas de incubação não foi possível observar diferença significativa entre as diferentes condições de expressão de ANAPC13, entretanto, após 32 horas de experimento, as células ANAPC13-*DOWN* fecharam a área de migração (Figura 29a e b).

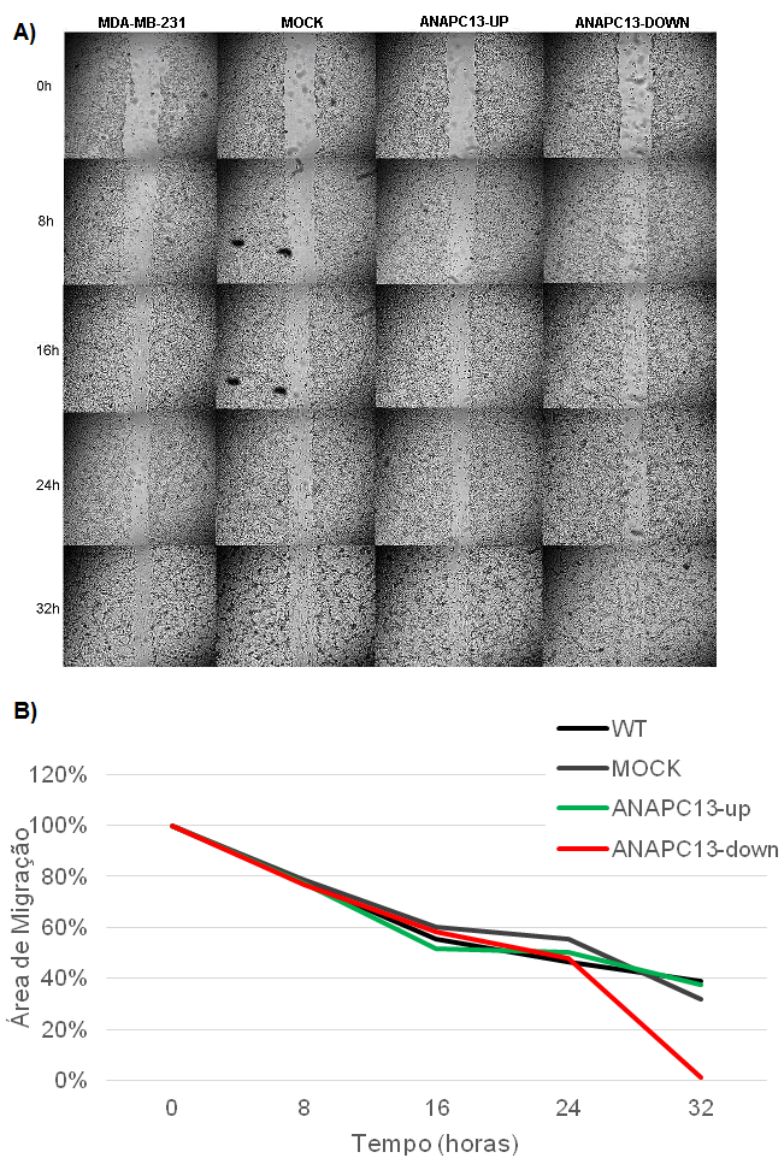


Figura 248 - A baixa expressão de ANAPC13 aumenta a capacidade de migração celular em MDA-MB-231. WT: células MDA-MB-231 selvagens; MOCK: células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/myc-HisA vazio; ANAPC13-UP: células com alta expressão de ANAPC13; ANAPC13-DOWN: células com baixa expressão de ANAPC13. O ensaio foi realizado durante 32 horas e as imagens foram adquiridas em quatro momentos diferentes. A) Imagens adquiridas em cada um dos tempos (T=0h, 12h, 24h e 32h) para cada condição da linhagem MDA-MB-231. B) Demonstração gráfica da migração celular. As imagens foram analisadas com o programa *ImageJ* e o gráfico foi realizado com auxílio do programa *GraphPad Prism*. A área total de migração foi considerada como 100% e 0% representa a área coberta por células com capacidade migratória.

4.7.6 Ensaio de Migração em tempo real

A migração celular foi avaliada em tempo real, sendo um método bastante preciso e sensível, de forma a confirmar o resultado obtido pelo método de ‘cicatrização de feridas’.

Conforme observado no resultado de migração por ‘cicatrização de feridas’, as células ANAPC13-*DOWN* apresentaram maior migração quando comparadas aos controles (WT e Mock) e com as células que possuem alta expressão da proteína ANAPC13 (ANAPC13-*UP*) e esse efeito foi confirmado através do ensaio de migração em tempo real. A migração celular foi avaliada durante 24 horas, e a diferença entre ANAPC13-*DOWN* e as demais condições passou a ser evidenciada a partir de 12 horas de migração, conforme demonstrado na Figura 30.

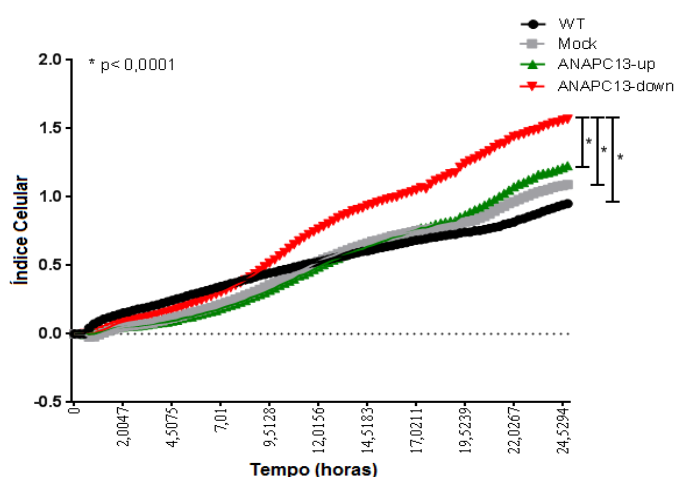


Figura 2529 - Efeito de diferentes níveis de expressão de ANAPC13 na migração por atração de quimioatraente. WT: células MDA-MB-231 selvagens; MOCK: células MDA-MB-231 transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/*myc*-HisA sem inserto; ANAPC13-*UP*: células com alta expressão de ANAPC13; ANAPC13-*DOWN*: células com baixa expressão de ANAPC13. No eixo X está representado o tempo em horas. No eixo Y está representado o índice celular de acordo com a migração. * $p < 0,0001$. O ensaio foi realizado em quadruplicata experimental.

4.7.7 Ensaio de Invasão Celular

O ensaio de invasão de matriz extracelular foi realizado para medir a capacidade de células com diferentes níveis de expressão de ANAPC13 de invadir a membrana basal. Neste experimento, foi observado que as células da linhagem MDA-MB-231 com baixa expressão de ANAPC13 (ANAPC13-*DOWN*) apresentaram maior capacidade de invasão quando comparadas com as células com expressão basal de ANAPC13 (WT e *MOCK*), e com as células com a alta expressão de ANAPC13 (ANAPC13-*UP*), conforme apresentado nas imagens da Figura 31.

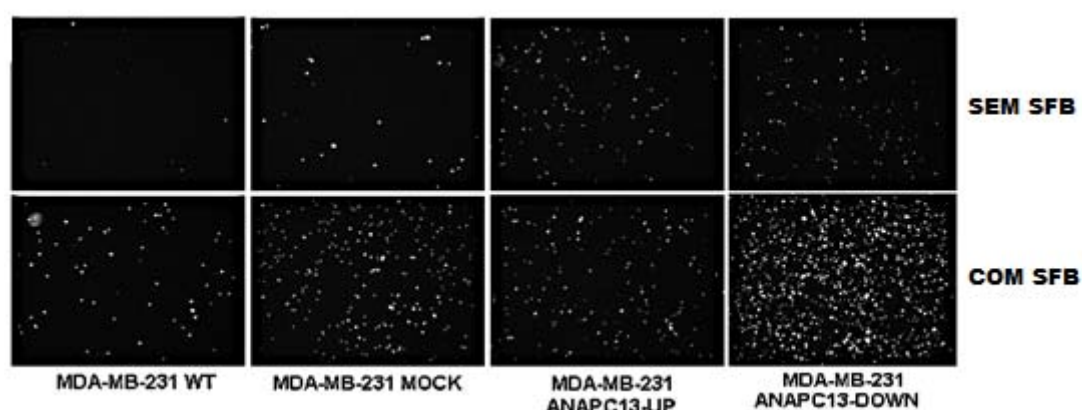


Figura 30 - Efeito de diferentes níveis de expressão de ANAPC13 no potencial de invasão celular. MDA-MB-231 WT: células da linhagem MDA-MB-231 selvagens; MDA-MB-231 *MOCK*: células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/*myc*-HisA sem inserto; MDA-MB-231 ANAPC13-*UP*: células com alta expressão de ANAPC13; MDA-MB-231 ANAPC13-*DOWN*: células com baixa expressão de ANAPC13. As imagens adquiridas após 24h de ensaio. Cada ponto representa uma célula marcada com DAPI que foi capaz de invadir a membrana tratada com proteínas da matriz extracelular. O ensaio foi realizado com SFB utilizado como agente quimioatraente, portanto não foi adicionado SFB no controle.

4.8 AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA

A Transição Epitélio-Mesênquima (EMT) está relacionada ao processo em que as células perdem a adesão célula-célula e adquirem propriedades mesenquimais, como a capacidade de migração e invasão. Desta forma, investigamos se o processo poderia estar relacionado com o aumento de invasão e migração celular observado nas células MDA-MB-231 com baixa expressão de ANAPC13. Assim, o gene *CDH1*, que codifica a proteína E-CADERINA, foi utilizado como marcador epitelial e o gene *VIM*, que codifica a proteína VIMENTINA, foi utilizado como marcador mesenquimal para avaliar a relação da expressão de ANAPC13 na linhagem MDA-MB-231 e os marcadores da TEM.

A Transição Epitélio-Mesênquima foi avaliada através de RT-qPCR, como apresentado na Figura 32, e foi observado que nas amostras com baixa expressão de *ANAPC13* (*ANAPC13-DOWN*) o gene *CDH1* está menos expresso quando comparado às demais condições de expressão do gene *ANAPC13* (*MOCK* e *ANAPC13-UP*). Em relação ao gene *VIM*, as amostras *ANAPC13-DOWN* apresentaram expressão aumentada quando comparada as amostras *MOCK* e *ANAPC13-UP*.

Na Figura 32b, estão apresentadas as expressões proteicas dos marcadores E-CADERINA e VIMENTINA, mostrando que o resultado foi concordante com o observado na expressão de mRNA. As amostras *ANAPC13-DOWN* apresentaram expressão diminuída de E-CADERINA e aumentada de VIMENTINA, enquanto que nas demais amostras (*WT*, *MOCK* e *ANAPC13-UP*) a expressão destes marcadores foi semelhante.

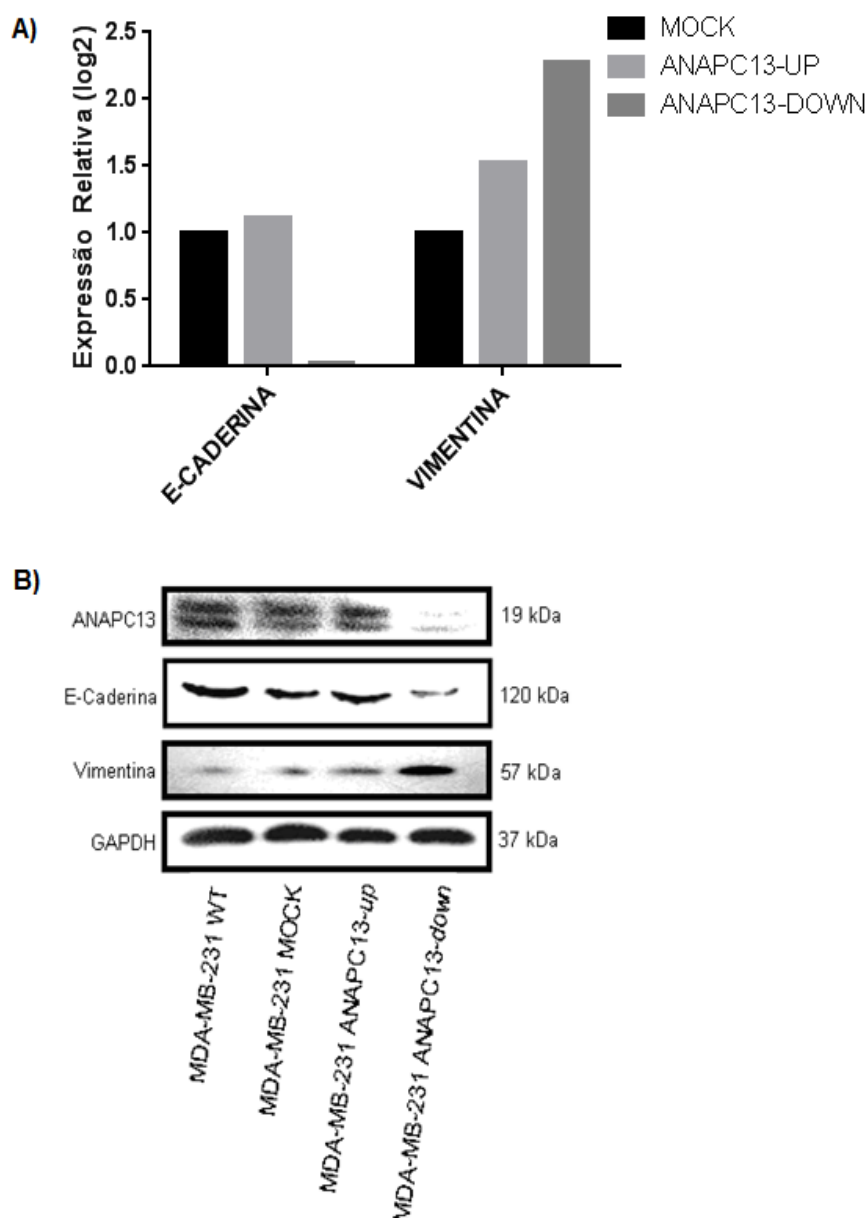


Figura 31 - Expressão de marcadores envolvidos na Transição Epitélio-Mesênquima (EMT) através de RT-qPCR (mRNA) e Western Blot (proteínas). (A) Expressão relativa de *CDH1* e *VIM* nas condições MOCK, ANAPC13-UP e ANAPC13-DOWN avaliada através de RT-qPCR. (B) Expressão proteica de E-CADHERINA e VIMENTINA nas condições MDA-MB-231 WT (células selvagens), MDA-MB-231 MOCK (células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/myc-HisA vazio), MDA-MB-231 ANAPC13-UP (células com alta expressão de ANAPC13) e MDA-MB-231 ANAPC13-DOWN (células com baixa expressão de ANAPC13). Os tamanhos esperados para as proteínas ANAPC13: 19 kDa, E-CADHERINA: 120 kDa, VIMENTINA: 57 kDa e GAPDH: 37 kDa. GAPDH foi utilizada como proteína constitutiva de referência.

4.9 IMUNOFLUORESCÊNCIA DA LINHAGEM MDA-MB-231

A técnica de imunofluorescência foi utilizada para identificar a localização celular de ANAPC13 nas células MDA-MB-231 em diferentes condições de expressão desta proteína.

Conforme demonstrado na Figura 33, a proteína ANAPC13 é encontrada principalmente no citoplasma e a expressão nuclear é mínima, ou praticamente nula na linhagem MDA-MB-231.

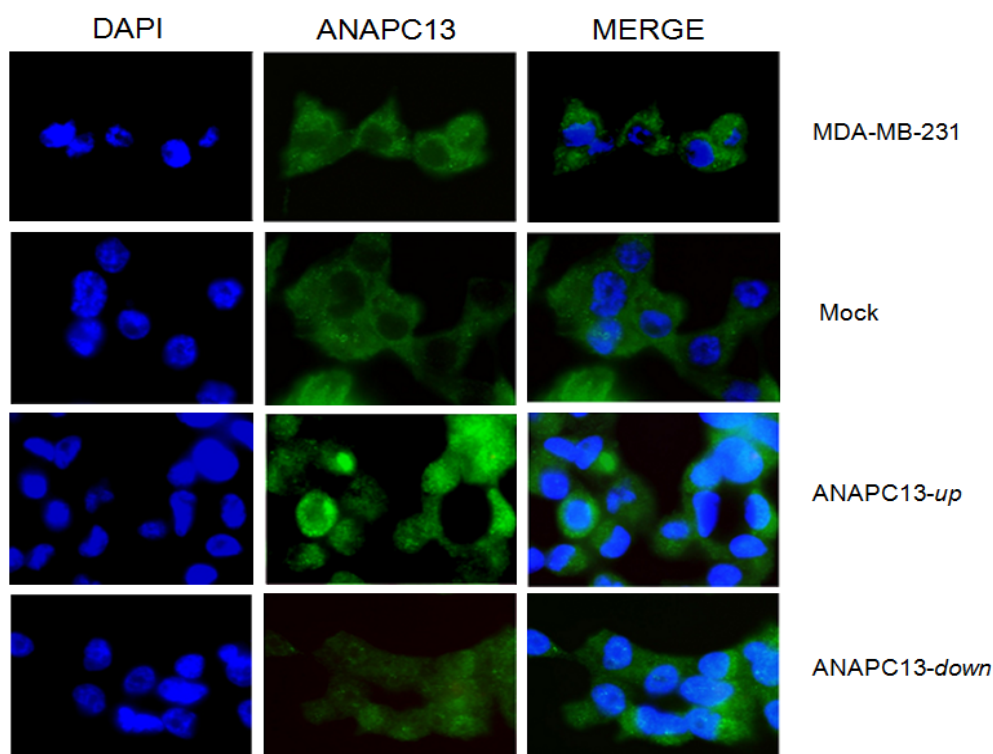


Figura 262 - Localização celular da proteína ANAPC13 na linhagem MDA-MB-231. MDA-MB-231: células selvagens da linhagem MDA-MB-231; MOCK: células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/myc-HisA vazio; ANAPC13-UP: células com alta expressão de ANAPC13; ANAPC13-DOWN: células com baixa expressão de ANAPC13. O DAPI foi utilizado para corar o núcleo. O anticorpo secundário marcado com GFP foi utilizado para marcar a proteína ANAPC13. As imagens do núcleo das células e com a marcação de ANAPC13 foram sobrepostas (MERGE).

4.10 ENSAIOS DE TUMORIGÊNESE *IN VIVO* DA LINHAGEM MDA-MB-231

Após avaliação da função da proteína ANAPC13 em ensaios *in vitro*, a função desta proteína foi avaliada em relação ao crescimento tumoral em camundongos *Balb/C nudes* nas diferentes condições de expressão de ANAPC13.

O crescimento tumoral das diferentes condições de expressão de ANAPC13 da linhagem celular MDA-MB-231 foi avaliado durante 14 semanas, conforme descrito em 3.14 de Material e Métodos. Conforme observado na Figura 34, a partir da sétima semana foi observado um crescimento inicial dos tumores, entretanto, o crescimento foi bastante variável para todas as condições e não houve diferença significativa no volume tumoral entre as condições analisadas.

Após o crescimento dos tumores, que foi acompanhado durante 14 semanas, os tumores foram removidos e avaliados pela patologista Dra. Cynthia Osório. Foi observado que 5 dos 12 animais do grupo da linhagem MDA-MB-231 apresentaram desenvolvimento de tumor, conforme demonstrado no Quadro 5. Os animais MOCK2, UP2 e DOWN2 não apresentaram tumor e nem desenvolvimento de nenhuma lesão observada. Os animais WT1, WT3, UP1, UP3 e DOWN1 apresentaram comprometimento linfonodal.

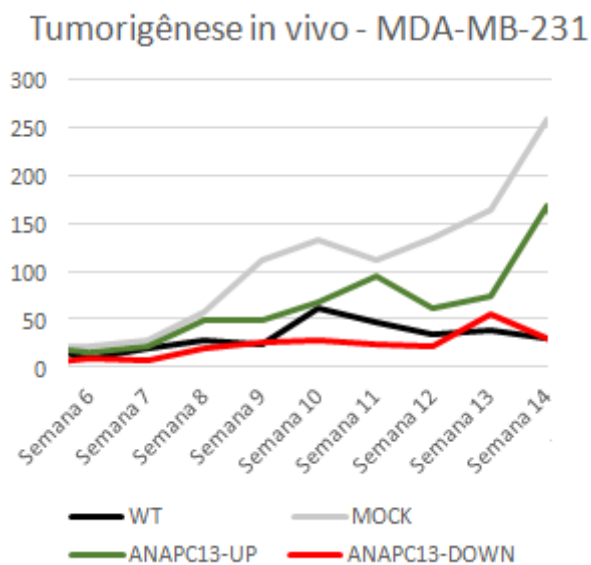


Figura 273 - Crescimento tumoral *in vivo* das diferentes condições de expressão de ANAPC13 na linhagem MDA-MB-231. Camundongos Balb/C nude injetados subcutaneamente com as células WT (MDA-MB-231), MOCK (plasmídeo vazio), ANAPC13-UP (células com alta expressão de ANAPC13), ANAPC13-DOWN (células com baixa expressão de ANAPC13). Foram utilizados 3 animais em cada grupo. O crescimento tumoral foi acompanhado durante 14 semanas.

Quadro 5 - Lesões desenvolvidas nos animais do grupo MDA-MB-231 avaliadas pelo método de coloração de H&E.

MDA-MB-231-WT	0/3
MDA-MB-231-MOCK	2/3
MDA-MB-231-UP	2/3
MDA-MB-231-DOWN	1/3

4.11 ANÁLISE DOS GENES COMODULADOS COM OS DIFERENTES NÍVEIS DE *ANAPC13* NOS DOIS MODELOS DE LINHAGENS MCF-7 E MDA-MB-231

4.11.1 Genes comodulados com os níveis de *ANAPC13* na linhagem MDA-MB-231 (ER-, PR-, HER2 normal (*basal-like*))

Para identificar genes comodulados por *ANAPC13*, foi realizada a técnica de microarranjos de cDNA a partir do RNA total das células da linhagem MDA-MB-231 com diferentes níveis de expressão de *ANAPC13* (alta, moderada e baixa expressão), e em seguida foi realizada uma análise no programa *STEM* para identificar perfis de genes relacionados diretamente ou inversamente à expressão de *ANAPC13* considerando os três pontos seriados como alta (*ANAPC13-UP*), moderada (*MOCK*) e baixa (*ANAPC13-DOWN*) expressão de *ANAPC13*. Para esta análise foram considerados somente 10 perfis de expressão simulados representativos de genes que diminuem ou aumentam na expressão da avaliação seriada.

Com a utilização do programa *STEM*, para as amostras da linhagem MDA-MB-231 foi possível identificar os perfis '7' e '8', que apresentaram correlação com os níveis de expressão de *ANAPC13*, englobando 90 e 83 genes, respectivamente, conforme demonstrado na Figura 36. O perfil 7 apresenta genes diretamente relacionados a *ANAPC13*, e o perfil 8 apresenta genes inversamente relacionados (a lista completa de genes encontra-se nos Anexos 2 e 3, respectivamente).

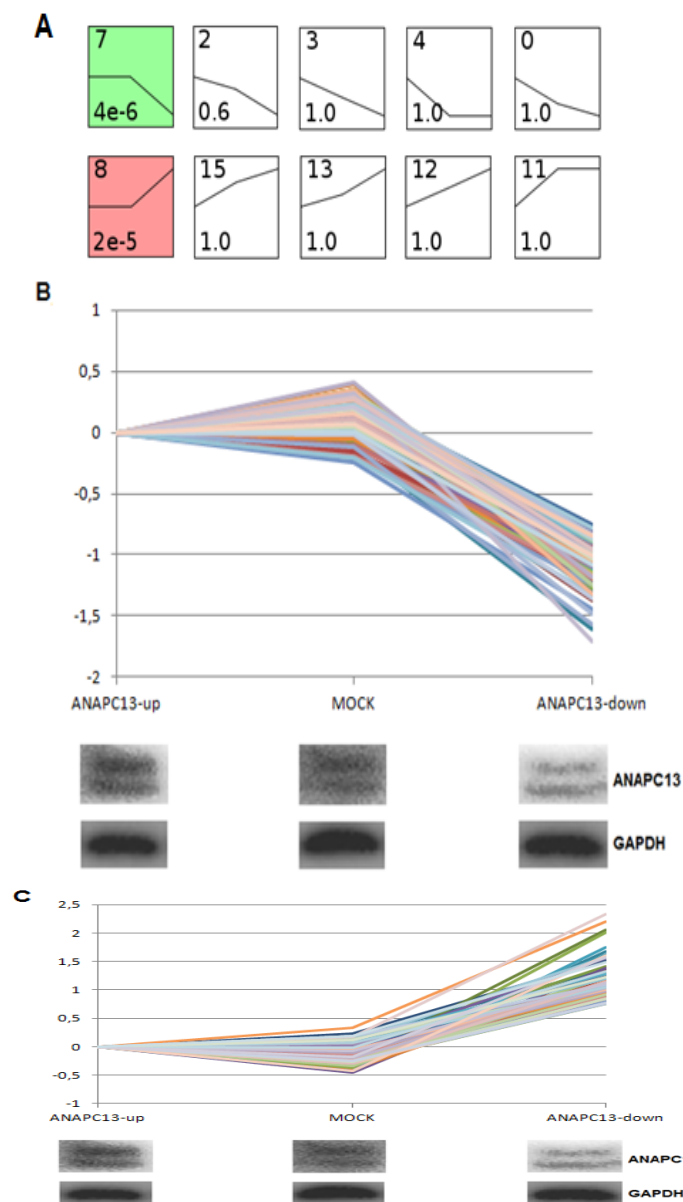


Figura 284 - Perfis de expressão identificados pelo programa STEM gerados para células da linhagem MDA-MB-231 antes do estímulo à migração. A) Estão representados 10 perfis identificados que apresentaram correlação com ANAPC13. Os perfis 7 e 8 foram escolhidos por apresentar correlação com ANAPC13 e significância estatística. B) Perfil 7, mostrando a representação gráfica dos 90 genes que apresentaram estar comodulados por ANAPC13. Valor de $p=4.10^{-6}$ C) Perfil 8, mostrando a representação gráfica dos 83 genes que apresentaram estar comodulados por ANAPC13. Valor de $p=2.10^{-5}$. Da esquerda para a direita está representada a expressão decrescente de ANAPC13 (ANAPC13-UP; MOCK e ANAPC13-DOWN) com a expressão proteica avaliada por Western Blot.

A partir dos perfis '7' e '8' obtidos como significantes na análise do STEM, foi realizada uma análise através do *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) (QIAGEN®) para verificar quais as redes e vias estão relacionadas aos genes que apresentaram relação direta ou inversa com a expressão do gene *ANAPC13*. Na Figura 37a e b estão representadas as principais redes obtidas. A análise funcional de redes e vias dos genes mapeados revelou funções associadas a desenvolvimento embrionário, desenvolvimento celular, movimento celular e câncer.

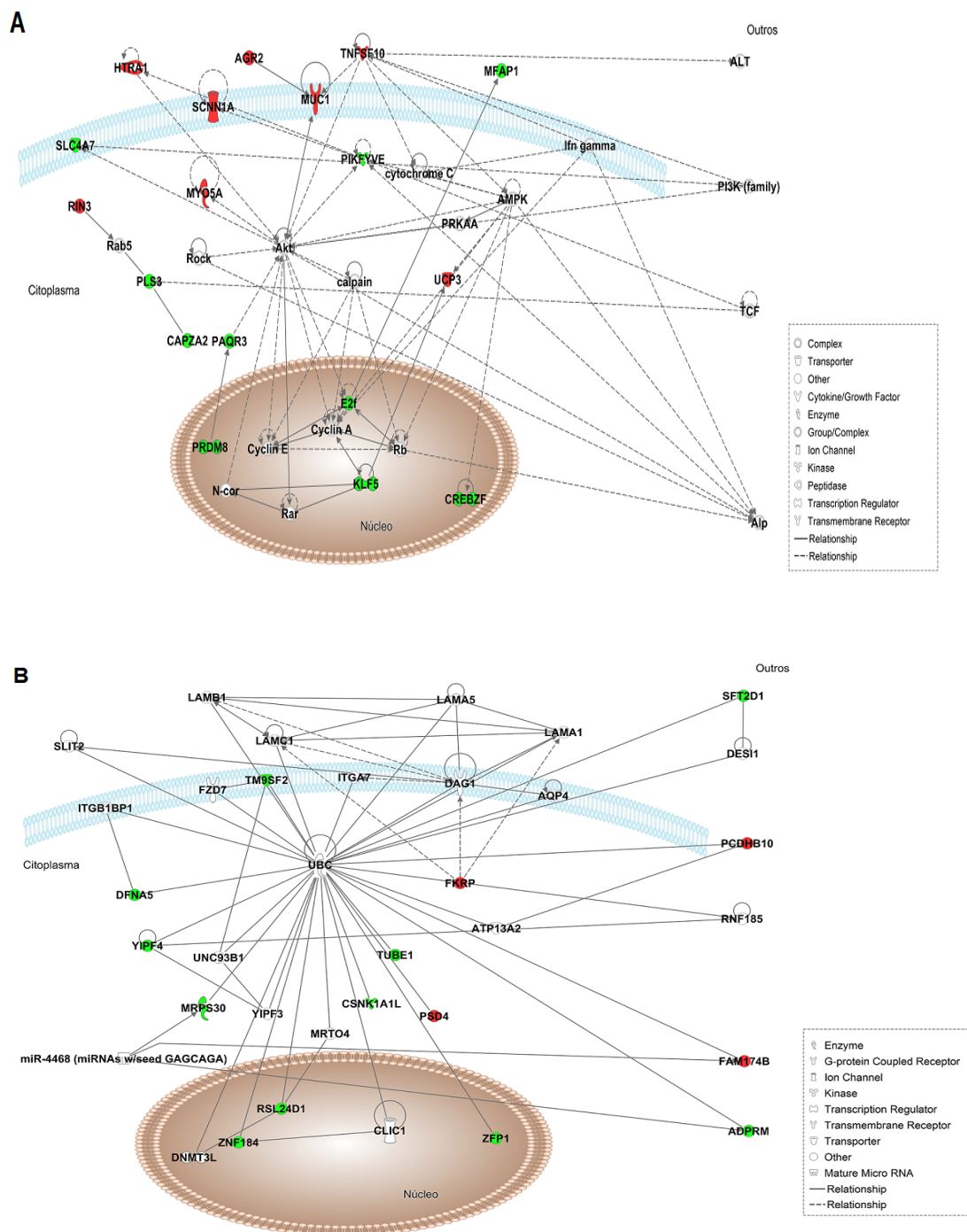


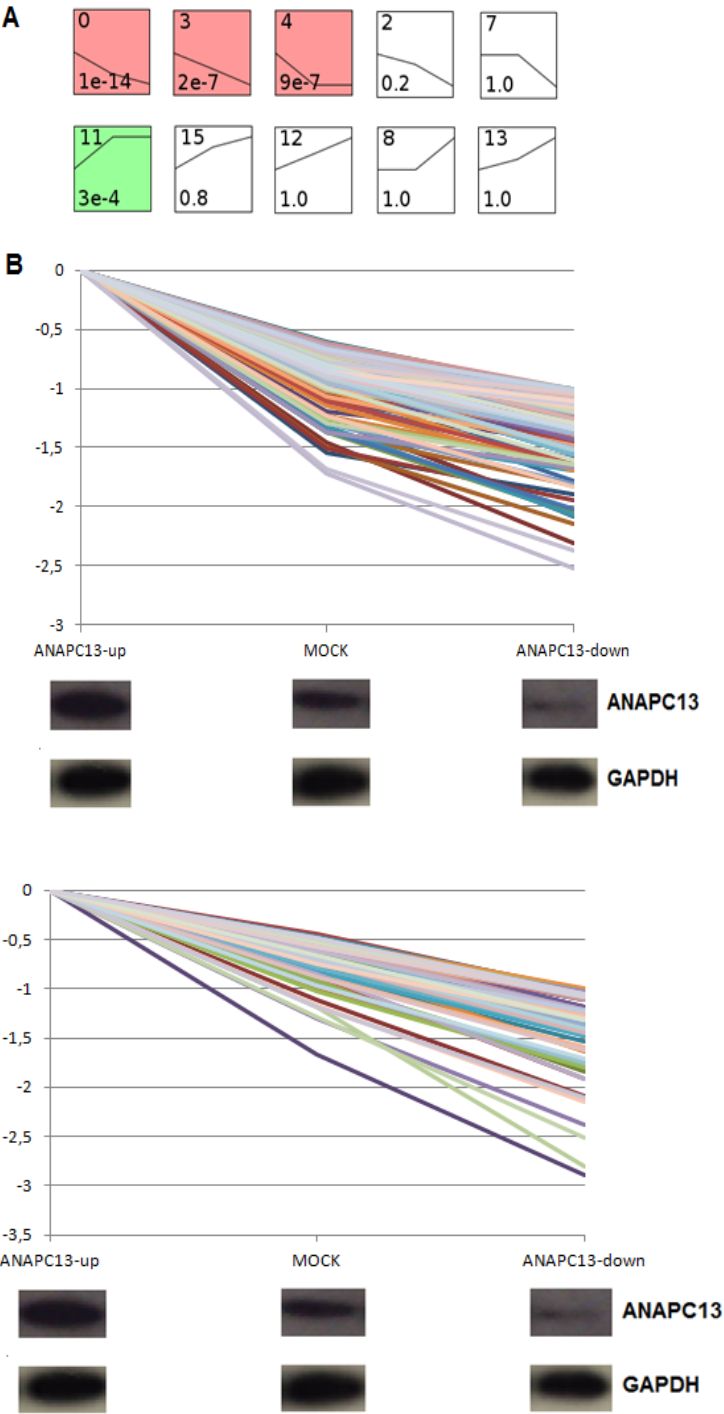
Figura 295 - Análise de redes e vias realizada através dos perfis de genes diretamente ou inversamente relacionados a ANAPC13. A) Rede de genes relacionados a desenvolvimento embrionário e câncer na linhagem MDA-MB-231. B) Rede de genes relacionados a movimento celular, desenvolvimento embrionário e morfologia. A análise foi realizada utilizando o programa Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN®). Os genes apresentados em verde estão downregulados, portanto, apresentam relação direta com o gene ANAPC13. Os genes em vermelho estão upregulados, portanto, apresentam relação inversa com o gene ANAPC13.

4.11.2 Genes comodulados com os níveis de *ANAPC13* na linhagem MCF-7 (ER+, PR-, HER- (luminal B))

A técnica de microarranjos de cDNA foi realizada em um trabalho anterior do grupo (SENS-ABUÁZAR 2012), entretanto, os resultados obtidos foram realizados seguindo as mesmas etapas da análise da linhagem MDA-MB-231.

A partir dos dados obtidos com o programa *STEM*, foi possível identificar os perfis '0', '3', '4' e '11' como significativamente associados com os respectivos comportamentos de diminuição e aumento de expressão por análise seriada ($p < 0,001$). Conforme demonstrado na Figura 38, estes perfis englobam 84, 92, 159 e 136 genes, respectivamente.

Ao determinar os perfis de expressão, os perfis que apresentaram comportamento semelhante ao de *ANAPC13* foram avaliados com base no *Gene Ontology* (GO). A partir destes resultados, foi observado um enriquecimento de processos biológicos relacionados ao ciclo celular como: mitose, organização do fuso mitótico, regulação do ciclo celular, fase M, transdução de sinal intracelular, divisão nuclear, segregação de cromossomo, regulação da organização dos microtúbulos, reparo de DNA, ponto de checagem do fuso, entre outros.



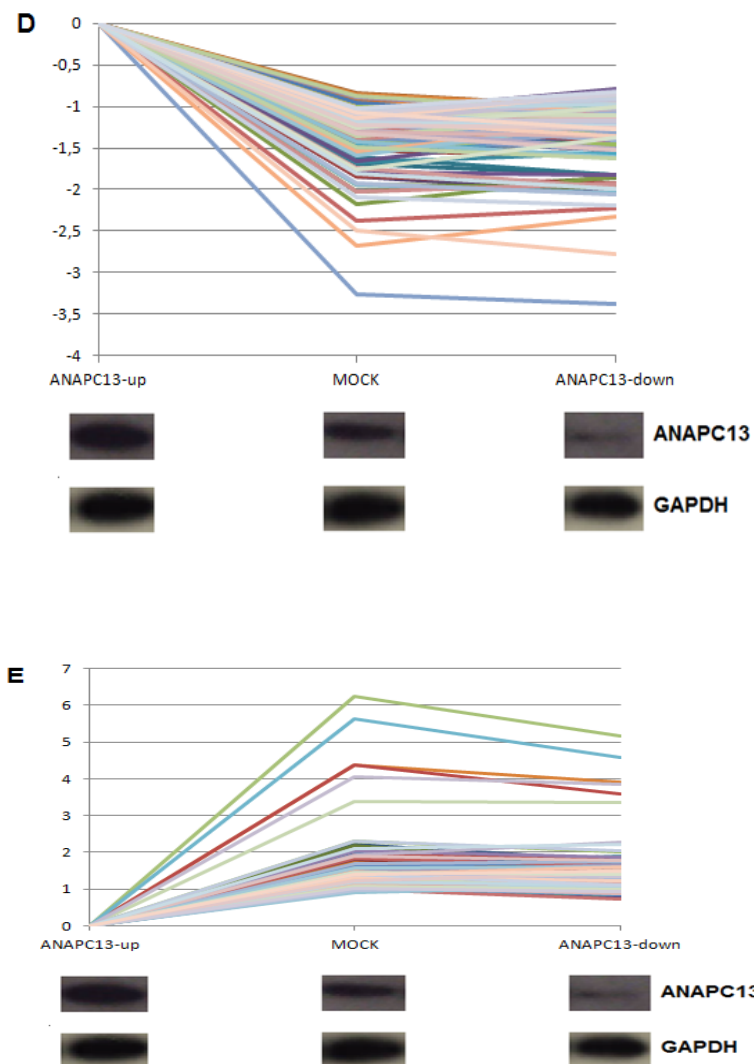
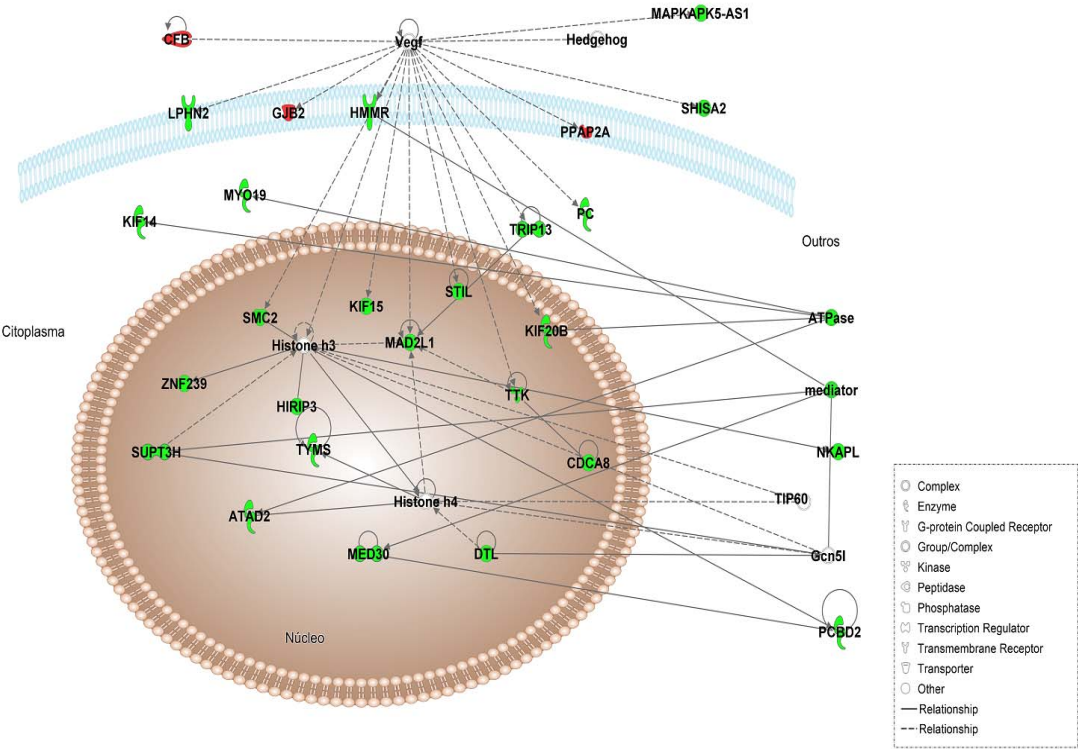
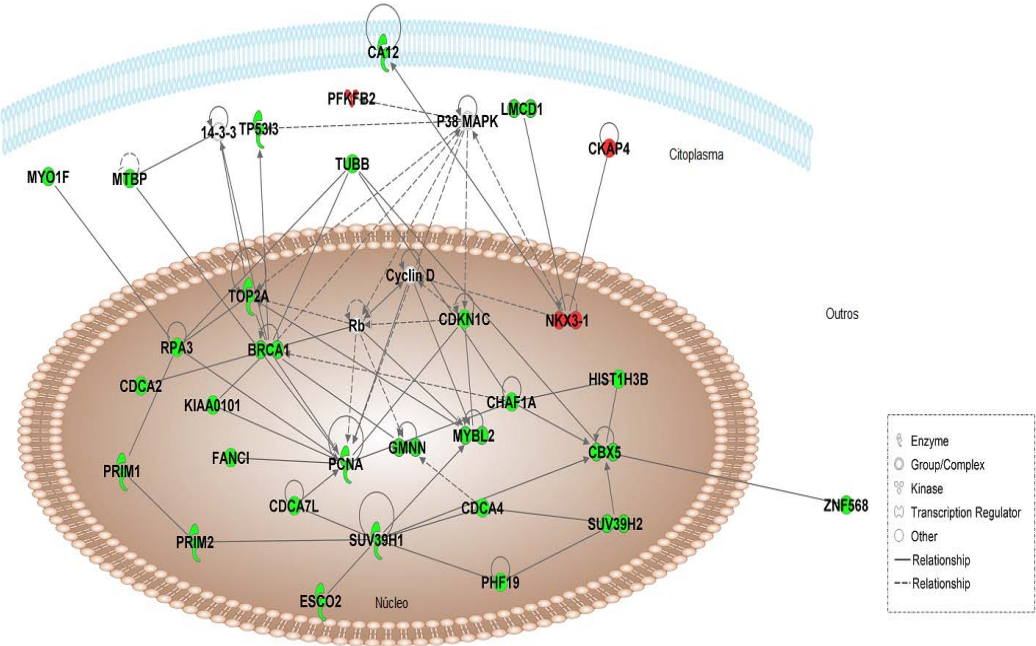


Figura 36 - Perfis de expressão identificados pelo programa STEM gerados para células da linhagem MCF-7. A) Estão representados os perfis que apresentaram comodulação por ANAPC13. Os perfis 0, 3, 4 e 11 foram selecionados por apresentarem correlação com ANAPC13 e significância estatística. Os quadros em verde apresentaram significância com valor de $p < 0,001$. B) Perfil 0, com a representação gráfica dos 84 genes que apresentaram estar comodulados por ANAPC13, valor de $p = 1.10^{-14}$. C) Perfil 3, com a representação gráfica dos 92 genes que apresentaram estar comodulados por ANAPC13, valor de $p = 2.10^{-7}$. D) Perfil 4, com a representação gráfica dos 159 genes que apresentaram estar comodulados por ANAPC13, valor de $p = 9.10^{-7}$. E) Perfil 11, com a representação gráfica dos 136 genes que apresentaram estar comodulados por ANAPC13, valor de $p = 3.10^{-4}$. Nas figuras B, C, D e E, a expressão de ANAPC13 é representada da forma decrescente (ANAPC13-UP; MOCK e ANAPC13-DOWN) com a expressão proteica avaliada por Western Blot, da esquerda para a direita.

A partir dos perfis considerados significantes obtidos com o programa STEM, foi realizada uma análise através do *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) (QIAGEN®), também para a linhagem MCF-7, para verificar em quais redes e vias estão envolvidos os genes que foram encontrados relacionados ao gene ANAPC13 diretamente ou inversamente. Na Figura 39a, b e c estão representadas as principais redes que foram obtidas. A análise funcional destas redes e vias dos genes mapeados revelou funções principalmente associadas ao ciclo celular, replicação, recombinação e reparo do DNA.



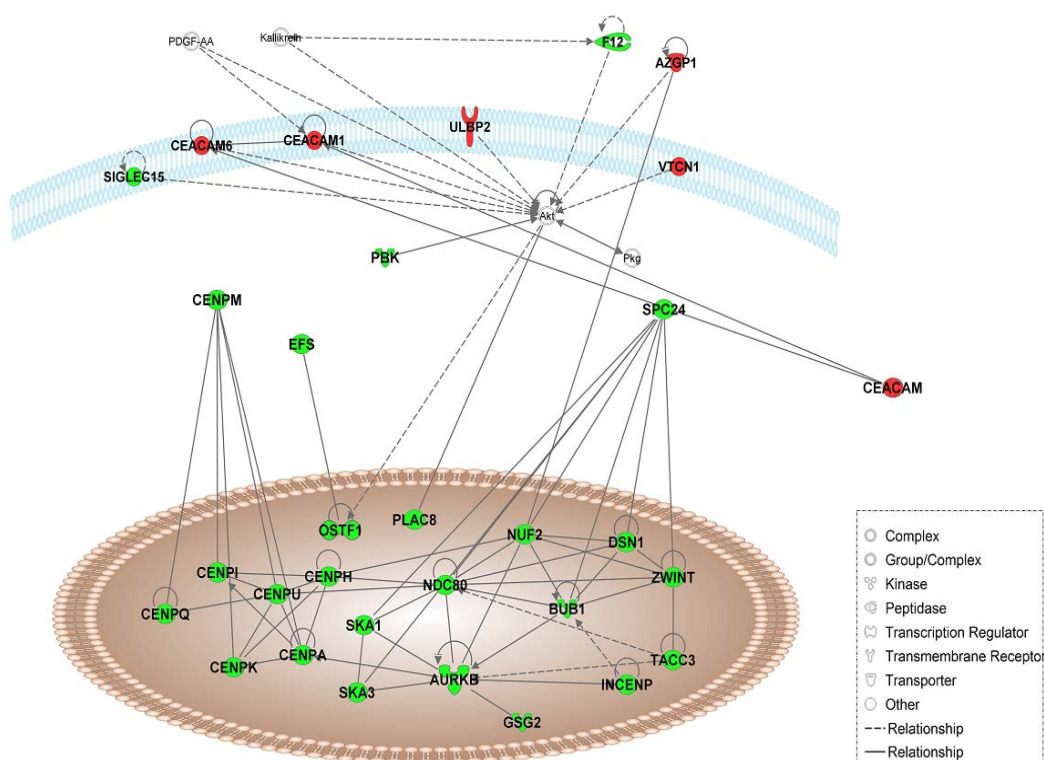


Figura 37 - Análise de redes e vias realizada através dos perfis de genes diretamente ou inversamente relacionados a ANAPC13. Nas figuras A, B e C estão representadas as redes de genes relacionados ao ciclo celular, replicação, recombinação e reparo de DNA. A análise foi realizada utilizando o programa Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN®). Os genes apresentados em verde estão downregulados, portanto, apresentam relação direta com o gene ANAPC13. Os genes em vermelho estão upregulados, portanto, apresentam relação inversa com o gene ANAPC13.

5 DISCUSSÃO

O carcinoma ductal de mama engloba um grupo heterogêneo de tumores e pode apresentar-se como carcinoma ductal *in situ* (DCIS) ou carcinoma ductal invasivo (IDC). A progressão do DCIS para IDC ainda não é completamente elucidada (MA et al. 2003; CARRARO et al. 2014; KIM et al. 2015). Em um trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa, foi observado que alterações moleculares ocorrem em lesões pré-invasivas que possuem morfologia semelhante à de células puramente intraductais, evidenciando que alterações moleculares ocorrem antes de mudanças morfológicas durante a progressão do carcinoma ductal de mama. Neste mesmo trabalho, foram identificados genes diferencialmente expressos entre as células isoladas de DCIS e o componente *in situ* da lesão invasiva (DCIS-IDC). Dentre estes genes, o *ANAPC13* foi validado e apresentou correlação com a progressão do carcinoma ductal de mama, mostrando diminuição gradual de expressão durante o curso da progressão dos tumores (CASTRO et al. 2008, SENS-ABUÁZAR et al. 2012).

A progressão do câncer está relacionada à capacidade de células tumorais invadirem o tecido adjacente, podendo alcançar a circulação sanguínea e metastatizar para tecidos distantes. Uma vez que a diminuição da proteína *ANAPC13* apresentou relação com a progressão do carcinoma ductal de mama, as habilidades de adesão, migração e de invasão celular foram investigadas comparando diferentes níveis de expressão desta

proteína nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. Inicialmente, a capacidade de adesão às proteínas extraídas da matriz extracelular (MEC) foi testada em ambas as linhagens, e revelou que as células com alta expressão desta proteína apresentam maior adesão ao Geltrex® (composta por laminina, colágeno IV, heparan-sulfato e entactina) em comparação às demais condições (WT, MOCK e ANAPC13-DOWN) na linhagem MDA-MB-231, portanto, sugere que uma maior expressão de ANAPC13 pode estar relacionada à maior adesão a proteínas da matriz extracelular. Em um segundo momento, foram investigadas as habilidades de migração e de invasão celular, e foi observado que as células com baixa expressão de ANAPC13 (ANAPC13-DOWN) apresentaram maior capacidade tanto de migração quanto de invasão quando comparadas às células das demais condições (WT, MOCK, ANAPC13-UP) na linhagem MDA-MB-231, sugerindo que a ausência ou diminuição na expressão desta proteína apresenta relação com a aquisição de um fenótipo mais invasivo de células tumorais. Para a linhagem MCF-7, não foram observadas diferenças em relação à capacidade de adesão, migração e invasão, comparando as condições.

Em estudos recentes, a alteração em moléculas envolvidas na transição epitélio-mesênquima foi fortemente relacionada ao processo metastático por conferir malignidade a células tumorais aumentando a motilidade, invasividade e resistência a apoptose (CHENG et al. 2007; HARTWELL et al. 2006; HUBER et al. 2005; MANI et al. 2007; PEINADO et al. 2007). Neste contexto, ao observar que a diminuição da proteína

ANAPC13 na linhagem MDA-MB-231 confere maior capacidade invasiva, foi investigada a relação desta proteína com a transição epitélio-mesênquima, verificando a expressão da proteína E-CADERINA, utilizada como marcador epitelial, e a proteína VIMENTINA como marcador mesenquimal. Como resultado, foi observado que as células com a expressão diminuída de *ANAPC13* (*ANAPC13-DOWN*) apresentaram baixa expressão de *CDH1* (E-CADERINA) e alta expressão de *VIM* (VIMENTINA) quando comparada aos controles e a *ANAPC13-UP*. Estes resultados foram concordantes ao comparar o nível de expressão de mRNA e de proteína.

As moléculas de adesão celular são essenciais para a regulação da interação célula-célula, migração e sinalização, sendo de extrema importância em processos fisiológicos normais (NOLLET et al. 2000). As caderinas são moléculas de adesão que compreendem uma família de glicoproteínas transmembrana cálcio-dependentes que mantém a estrutura do tecido em condições normais. Em células tumorais, a diminuição da expressão da E-CADERINA pode estar relacionada à perda de interações célula-célula e consequente possibilidade de migrar, invadir e então metastatizar para tecidos distantes onde podem iniciar um tumor secundário (HALE et al. 2012). A transição epitélio-mesênquima resulta da aquisição do fenótipo de células-tronco (MANI et al. 2008), portanto, além da perda de marcadores epiteliais, as células adquirem fenótipo mesenquimal.

A VIMENTINA é um dos marcadores mesenquimais relacionados a transição epitélio-mesênquima que é encontrada em células de diversos tipos de tecido. Esta proteína é uma das moléculas responsáveis pela

manutenção da arquitetura do citoesqueleto, intermediação da organização da polaridade dos microtúbulos e indução à malignidade de células cancerosas. O aumento de expressão de VIMENTINA está associado a um pior prognóstico e pior sobrevida em diversos tipos de câncer, inclusive de mama (LIU et al. 2015).

Análises genômicas de linhagens celulares de adenocarcinoma de mama mostraram subgrupos de células com aumento de expressão de genes relacionados a marcadores da TEM e alto potencial invasivo, que são as células do subtipo basal, sendo que estas células possuem um perfil genético mesenquimal. Em contraste, as células com subtipo luminal possuem baixa capacidade invasiva, baixa expressão de marcadores da TEM e possuem um perfil genético epitelial (BLICK et al. 2008). As células MDA-MB-231, apresentam o gene *CDH1* (E-CADERINA) *downregulado*, enquanto que a *VIM* (VIMENTINA) aparece *upregulada* (NAGARAJA et al. 2006; LIU et al. 2015), estando de acordo com o fenótipo altamente invasivo desta linhagem. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a expressão diminuída de *ANAPC13* pode contribuir para a transição epitélio-mesênquima, aumentando a capacidade invasiva das células, entretanto, estudos adicionais incluindo outros marcadores precisam ser realizados para elucidar melhor estes mecanismos.

As células da linhagem celular MCF-7 possuem alta expressão de E-CADERINA e são consideradas VIMENTINA-negativas (ROSS e PEROU 2001; NAGARAJA et al. 2006; LIU et al. 2015). Neste trabalho, foi observado que a alteração causada unicamente na expressão da proteína ANAPC13

sugere que não foi suficiente para mudar o comportamento destas células em relação a migração.

A proliferação celular depende estritamente da atividade do Complexo Promotor de Anáfase/Ciclossomo (APC/C), o qual está envolvido com o controle do ciclo celular (PETERS 2006; BARFORD 2011). Uma vez que a proteína ANAPC13 é uma das subunidades do APC/C, a capacidade de proliferação celular e diferenças no ciclo celular foram investigadas em células com diferentes níveis de expressão desta proteína. Na linhagem MCF-7, as células com alta expressão de ANAPC13 (ANAPC13-UP) apresentaram maior índice proliferativo quando comparadas aos controles, assim como as células da condição ANAPC13-DOWN apresentaram menor proliferação celular em relação aos controles, indicando que as células com alta expressão de ANAPC13 podem aumentar a capacidade proliferativa e a diminuição na expressão de ANAPC13 pode estar relacionada a menor proliferação celular. Em relação ao ciclo celular, não foi observada diferença entre as condições.

O metabolismo, e principalmente o consumo de glicose, são chaves quantitativas relacionadas a proliferação celular e manutenção das células cancerosas. Para sustentar a proliferação celular crônica e descontrolada, característica de células tumorais, as taxas de reação metabólica e a demanda por glicose apresentam-se extremamente aumentadas nestas células (HASSANEIN et al. 2011). Uma das características das células altamente proliferativas é a reprogramação do metabolismo de glicose, passando a produzir energia a partir da glicólise, ou seja, ocorre a chamada

“glicólise aeróbica”, conhecida como efeito Warburg, mostrando que o câncer pode levar a uma deficiência do metabolismo mitocondrial. As células que não sofrem alterações nas taxas metabólicas não sobrevivem ao microambiente tumoral, resultando em uma seleção de células com o fenótipo metabólico transformado (GATENBY e GILLIES 2004; TENNANT et al. 2009; HANAHAN e WEINBERG 2011). Neste sentido, investigamos o metabolismo celular e o consumo de glicose das células com diferentes níveis de expressão de ANAPC13. Como resultado, foi observado que as células da linhagem MCF-7 com baixa expressão de ANAPC13 (ANAPC13-*DOWN*) apresentaram menor taxa de metabolismo mitocondrial, assim como menor consumo de glicose em relação as demais condições, mostrando que as células que obtiveram menor índice proliferativo, também apresentaram menor viabilidade e menor alteração metabólica. As células da linhagem MDA-MB-231 não apresentaram diferença significativa nas taxas de metabolismo e consumo de glicose, assim como na proliferação celular, indicando que a alteração no nível de expressão de ANAPC13 não interfere nestas características para esta linhagem. Entretanto, uma comparação entre as duas linhagens, mostra que a linhagem MDA-MB-231 apresenta menor consumo de glicose quando comparada a MCF-7, o que faz sentido, pois tem menor proliferação do que a MCF-7.

Em um trabalho anterior do grupo, a localização celular da proteína ANAPC13 foi investigada através de imunohistoquímica, avaliando amostras de pacientes com lesões puramente intraductais comparando com o componente *in situ* de lesões invasivas. Este estudo não observou diferença

no número de amostras puramente intraductais (DCIS puro) quando avaliou-se positividade nuclear de ANAPC13. As diferenças na positividade de ANAPC13 entre os dois tipos de lesões foi verificada somente na positividade citoplasmática em que, a proteína ANAPC13 encontrava-se mais frequentemente positiva em amostras de DCIS pura (SENS-ABUÁZAR et al. 2012). No presente trabalho, a localização celular de ANAPC13 foi avaliada com a técnica imunofluorescência realizada para ambas as linhagens celulares e obtivemos que a linhagem MCF-7, menos invasiva, apresenta localização de ANAPC13 tanto nuclear quanto citoplasmática, entretanto, a localização principal está no núcleo. Na linhagem MDA-MB-231, a localização foi estritamente citoplasmática, sugerindo que a localização de ANAPC13 possui diferentes papéis de acordo com sua localização celular, sendo que, a presença no núcleo confere função relacionada com a proliferação celular e a presença no citoplasma possui influência na adesão, migração e invasão celular. Contudo, outros estudos devem ser realizados para melhor compreensão deste fenômeno.

Para avaliar a capacidade de tumorigênese *in vivo*, utilizamos o modelo de xenoenxerto em camundongos *Balb/C nude* (imunossuprimidos) com injeção heterotópica subcutânea. Dentre os diversos modelos disponíveis para pesquisa de carcinomas de mama, os *nudes* são os mais utilizados devido a ausência de um timo funcional e de células T ativas (KIM et al. 2004). Neste modelo, foi comparada a capacidade tumorigênica de camundongos *nude* injetados com as células das diferentes condições de expressão de ANAPC13 (baixa, moderada e alta expressão), tanto para a

linhagem MCF-7 quanto para a linhagem MDA-MB-231. Nossos resultados apresentaram grande variabilidade entre as condições para ambas as linhagens celulares durante o crescimento tumoral no período acompanhado, e essa variabilidade também foi observada quanto aos parâmetros de peso e volume tumoral. Entretanto, as células humanas de carcinoma mamário estão entre as mais difíceis de apresentar tumorigênese em ensaios animais, sendo que na literatura é reportada uma taxa de aproximadamente 7-20% de sucesso de transplante de células diretamente em camundongos *nude* (MEHTA et al. 1993). Após análise histológica nos grupos que receberam a linhagem MCF-7, foi observada a formação de apenas um tumor dentre os 15 animais deste grupo, enquanto que na linhagem MDA-MB-231 houve uma maior capacidade tumorigênica das células, 5 dos 15 animais apresentaram formação de tumor. Entretanto, os resultados obtidos não foram conclusivos devido à grande variabilidade obtida entre as condições e entre os grupos. O número de animais foi bastante limitado para realização deste estudo, portanto, devido às limitações, este modelo não foi considerado adequado.

As diferenças encontradas nos resultados para as duas linhagens utilizadas neste trabalho podem estar relacionadas às diferentes capacidades invasivas das duas linhagens, além disso, às características moleculares, sendo uma do subtipo luminal e outra do subtipo basal. Além disso, NAGARAJA et al. (2006) encontraram aproximadamente 400 genes que aparecem diferencialmente expressos entre estas linhagens, sendo que foi observada uma significativa *upregulação* de cinco transcritos relacionados

à proliferação celular na MCF-7 em relação a MDA-MB-231, e ao silenciar estes genes na MCF-7, as células passaram a ter comportamento mais parecido com o da MDA-MB-231, o que pode explicar as principais diferenças observadas nos experimentos. Um dos genes que apresentou *upregulação* na MCF-7 e *downregulação* na MDA-MB-231 é a *AURKB* (NAGARAJA et al. 2006), que dá origem à quinase mitótica AURORA B, que assim como outras quinases mitóticas, é um alvo do Complexo Promotor de Anáfase (APC/C) (PETERS 2006; FLOYD et al. 2013; SIVAKUMAR e GORBSKY 2015). A proteína AURORA B possui um importante papel na adesão das cromátides-irmãs aos polos dos fusos mitóticos (MUSACCHIO e SALMON 2007), e a ausência desta proteína pode levar a uma aneuploidia, que é uma das características comuns de carcinomas de mama avançados (SATYA-PRAKASH et al. 1981; HEGYI et al. 2012). Na linhagem MCF-7, nossos resultados demonstraram que o gene *AURKB* aparece comodulado pela expressão de *ANAPC13*, apresentando relação direta. Contudo, a AURORA B está frequentemente aumentada em carcinomas de mama, mas apresenta relação exclusivamente dependente de proliferação celular (HEGYI et al. 2012).

Para identificar genes envolvidos em processos biológicos coregulados pela expressão de *ANAPC13*, foi realizada uma avaliação da expressão gênica das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, e foi encontrado que, para a linhagem MCF-7, os genes que apresentam coregulação por *ANAPC13* estão principalmente relacionados ao ciclo celular, como mitose, organização do fuso mitótico, regulação do ciclo celular, fase M, transdução

de sinal intracelular, divisão nuclear, replicação e reparo de DNA, segregação de cromossomo, entre outros. Além disso, foi observado que ao diminuir a expressão de *ANAPC13*, há uma *upregulação* de genes relacionados a regulação da apoptose, consistente com os resultados obtidos de proliferação e de viabilidade celular. Para a linhagem MDA-MB-231, foi observado um enriquecimento de vias principalmente relacionadas ao desenvolvimento embrionário, movimento celular e sinalização celular, o que também foi consistente com os dados obtidos nos ensaios *in vitro* e na expressão de marcadores da transição epitélio-mesênquima, que mostra que as células mais invasivas adquirem características de células desdiferenciadas, portanto, relacionadas ao desenvolvimento embrionário. Portanto, os resultados encontrados para ambas as linhagens corroboram com os nossos achados observados *in vitro*, mostrando dados robustos e concordantes a nível molecular e funcional.

6 CONCLUSÕES

1. O aumento na expressão de ANAPC13 na linhagem MCF-7 está associado a um maior índice de proliferação celular e na linhagem MDA-MB-231 está associado à maior capacidade de adesão às proteínas de matriz extracelular.
2. As células com baixa expressão de ANAPC13 na linhagem MCF-7 possuem menor capacidade proliferativa, assim como estão relacionadas a uma menor taxa de metabolismo e consumo de glicose.
3. A proteína ANAPC13 está localizada principalmente no núcleo nas células da linhagem MCF-7, enquanto que nas células da linhagem MDA-MB-231, a proteína ANAPC13 está localizada principalmente no citoplasma.
4. Na linhagem MDA-MB-231, a redução da expressão de ANAPC13 mostrou estar relacionada a maior habilidade invasiva e maior capacidade de migração das células.
5. A redução da expressão de ANAPC13, que levou ao comportamento mais invasivo das células MDA-MB-231 está relacionado de alguma forma com as proteínas chaves da transição epitélio-mesênquima (EMT).
6. Os perfis de expressão gênica obtidos para a linhagem MCF-7 que apresentaram coregulação pela expressão de *ANAPC13* estão

relacionados principalmente ao ciclo celular, corroborando com nossos resultados observados *in vitro*.

7. As redes de interação gênica obtidos para a linhagem MDA-MB-231 através dos genes que apresentaram coregulação pela expressão de *ANAPC13* estão relacionados principalmente a movimento celular e desenvolvimento embrionário.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ACS] American Cancer Society. **Types of breast cancers**. Available from: <URL:<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-breast-cancer-types>> [2014 fev 15].

ACEA Bioscience, Inc. **E-Plate 16**. Available from: <URL:http://www.aceabio.com/product_info.aspx?id=195> [2015 fev 18]

Barford D. Structure, function and mechanism of the anaphase-promoting complex (APC/C). **Q Rev Biophys** 2011; 44:153-90.

Bertucci F, Finetti P, Rougemont J, et al. Gene expression profiling identifies molecular subtypes of inflammatory breast cancer. **Cancer Res** 2005; 65:2170-8.

Blick T, Widodo E, Hugo H, et al. Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines. **Clin Exp Metastasis** 2008; 25:629-42.

Bombonati A, Sgroi DC. The molecular pathology of breast cancer progression. **J Pathol** 2011; 223:307-17.

Castellana B, Escuin D, Peiró G, et al. ASPN and GJB2 are implicated in the mechanisms of invasion of ductal breast carcinomas. **J Cancer** 2012; 3:175-83.

Castro NP, Osorio CA, Torres C, et al. Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal carcinoma. **Breast Cancer R** 2008; 10:R87.

Carraro DM, Elias EV, Andrade VP. Ductal carcinoma *in situ* of the breast: morphological and molecular features implicated in progression. **Biosci Rep** 2014; 34:19-28.

Cell Biolabs, Inc. **24-Well cell invasion assays, basement membrane**. Available from: <URL:<http://www.cellbiolabs.com/cell-invasion-assays-24-well-basement%20membrane>> [2015 fev 12]

Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, Wang LH. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. **Cancer Res** 2007; 67:1979-87.

Chang L, Zhang Z, Yang J, McLaughlin SH, Barford D. Molecular architecture and mechanism of the anaphase-promoting complex. **Nature** 2014; 513:388-93.

Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. **Cancer Res** 2009; 69:1302-13.

Chekhun S, Bezdenezhnykh N, Shvets J, Lukianova N. Expression of biomarkers related to cell adhesion, metastasis and invasion of breast cancer cell lines of different molecular subtype. **Exp Oncol** 2013; 35:174-9.

Cowell CF, Weigel B, Sakrb RA, et al. Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: Revisited. **Mol Oncol** 2013; 7:859-69.

Ellis IO, Schmitt SJ, Sastr-Garau X, et al. Invasive breast carcinoma. In: Tavassoli FA, Devilee P, editors. **Pathology & genetics: tumours of the breast and female genital organs**. Lyon: IARC; 2003. p.13-59. [IARC WHO Classification of Tumours, n° 4].

Espina V, Liotta LA. What is the malignant nature of human ductal carcinoma in situ? **Nat Rev Cancer** 2011; 11:68-75.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. **GLOBOCAN 2012 - Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase** No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2014. Available from: <URL:<http://globocan.iarc.fr>, accessed on 16/01/2015>.

Floyd S, Whiffin N, Gavilan MP, et al. Spatiotemporal organization of Aurora-B by APC/CCdh1 after mitosis coordinates cell spreading through FHOD1. **J Cell Sci** 2013; 126: 2845-56.

Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nat Rev Cancer** 2004; 4:891-9.

Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. **Ann Oncol** 2013; 24:2206-2223.

Hale JS, Li M, Lathia JD. The malignant social network: cell-cell adhesion and communication in cancer stem cells. **Cell Adh Migr** 2012; 6:346-55.

Hartwell L, Mankoff D, Paulovich A, Ramsey S, Swisher E. Cancer biomarkers: a system approach. **Nat Biotechnol** 2006; 24:905-8.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 114:646-74.

Hassanein M, Weidow B, Koehler E, et al. Development of high-throughput quantitative assays for glucose uptake in cancer cell lines. **Mol Imaging Biol** 2011; 13:840-52.

Hegyi K, Egervári K, Sándor Z, et al. Aurora Kinase B expression in breast carcinoma: cell kinetic and genetic aspects. **Pathobiology** 2012; 79:314-322.

Herzog F, Primorac I, Dube P, et al. Structure of the anaphase-promoting complex/cyclosome interacting with a mitotic checkpoint complex. **Science** 2009; 323:1477-81.

Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. **Curr Opin Cell Biol** 2005; 17:548-58.

Invitrogen. **pcDNA3.1/myc-HisA User Manual Catalog no. V800-20**. Rev. Date: 28 October 2010. Available from: <URL:http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pcdna3_1mychis_plus_man.pdf> [2015 mar 12]

Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global Cancer Statistics. **CA Cancer J Clin** 2011; 61:69-90.

Jiang BJ, Zhan XL, Fu CZ, et al. Identification of ANAPC13 gene polymorphisms associated with body measurement traits in *Bos taurus*. **Genet Mol Res** 2012; 11:2862-70.

Kim JB, O'Hare MJ, Stein R. Models of breast cancer: is merging human and animal models the future? **Breast Can Res** 2004; 6:22-30.

Kim SY, Jung SH, Kim MS, et al. Genomic differences between pure ductal carcinoma *in situ* and synchronous ductal carcinoma *in situ* with invasive breast cancer. **Oncotarget** 2015; 6:7597-607.

Knudsen ES, Ertel A, Davicioni E, et al. Progression of ductal carcinoma *in situ* to invasive breast cancer is associated with gene expression programs of EMT and myoepithelia. **Breast Cancer Res Treat** 2012; 133:1009-24.

Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. **Breast Can Res** 2004; 83:249-89.

Liao S, Desouki MM, Gaile DP, et al. Differential copy number aberrations in novel candidate genes associated with progression from *in situ* to invasive ductal carcinoma of the breast. **Genes Chromosomes Cancer** 2012; 51:1067-78

Liu CY, Lin HH, Tang MJ, Wang YK. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. **Oncotarget** 2015; Apr 18.

Ma XJ, Salunga R, Tuggle JT, et al. Gene expression profiles of human breast cancer progression. **Proc Natl Acad Sci** 2003; 100:5974-5979.

Mani SA, Yang J, Brooks M, et al. Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. **Proc Natl Acad Sci** 2007; 104:10069-74.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell** 2008; 133:704-15.

Mehta RR, Graves JM, Hart GD, Shilkaitis A, Das Gupta TK. Growth and metastasis of human breast carcinomas with Matrigel in athymic mice. **Breast Cancer Res Treat** 1993; 25:65-71.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2007; 8:379-93.

Nagaraja GM, Othman M, Fox BP, et al. Gene expression signatures and biomarkers of noninvasive and invasive breast cancer cells: comprehensive profiles by representational difference analysis, microarrays and proteomics. **Oncogene** 2006; 25:2328-38.

Nollet F, Kools P, Van Roy F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. **J Mol Biol** 2000; 299:551-72.

Passmore LA, McCormack EA, Au SW, et al. Doc1 mediates the activity of the anaphase-promoting complex by contributing to substrate recognition. **EMBO J** 2003; 22:786-96.

Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumor progression: na alliance against the epithelial phenotype? **Nat Rev Cancer** 2007; 7:415-28.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 2000; 406:747-52.

Peters JM. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2006; 7:644-56.

Ragunath PK, Reddy BV, Abhinand PA, et al. Relevance of system biological approach in the differential diagnosis of invasive lobular carcinoma e invasive ductal carcinoma. **Bioinformation** 2012; 8:359-64.

Ross DT, Perou CM. A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines. **Dis Markers** 2001; 17:99-109.

Satya-Prakash KL, Pathak S, Hsu TC, et al. Cytogenetic analysis on eight human breast tumor cell lines: high frequencies of I q, 11q and hela-like marker chromosomes. **Cancer Genet Cytogenet** 1981; 3:61-73.

Schnitt SJ. Normal anatomy and development. In: Hayes DF, editor. **Atlas of breast cancer**. London: Mosby; 1995. p.3.2-3.4.

Schuetz CS, Bonin M, Clare SE, et al. Progression-specific genes identified by expression profiling of matched ductal carcinomas *in situ* and invasive breast tumors, combining laser capture microdissection and oligonucleotide microarray analysis. **Cancer Res** 2006; 66:5278-86.

Schwickart M, Havlis J, Habermann B, et al. Swm1/Apc13 is an evolutionarily conserved subunit of the anaphase-promoting complex stabilizing association of Cdc16 e Cdc27. **Mol Cell Biol** 2004; 24:3562-76.

Sens-Abuázar C. **Identificação e validação de marcadores moleculares para risco de progressão de carcinoma ductal de mama**. São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Sens-Abuázar C, Napolitano e Ferreira E, Osório CABT, et al. Down-regulation of ANAPC13 and CLTCL1: early events in the progression of preinvasive ductal carcinoma of the breast. **Transl Oncol** 2012; 5:113-23.

Sivakumar S, Gorbsky G. Spatiotemporal regulation of the anaphase-promoting complex in mitosis. **Mol Cell Bio** 2015; 16:82-94.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:10869-74.

Tennant DA, Durán RV, Boulahbel H, Gottlieb E. Metabolic transformation in cancer. **Carcinogenesis** 2009; 30:1269-80.

Thornton BR, Ng TM, Matyskiela ME, Carroll CW, Morgan DO, Toczyski DP. An architectural map of the anaphase-promoting complex. **Genes Dev** 2006; 20:449-60.

Toss A, Cristofanilli M. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. **Breast Cancer Res** 2015; 17:60.

Ufano S, San-Segundo P, Del-Rey F, et al. *SWM1*, a developmentally regulated gene, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 1999; 19:2118-29.

Yamaguchi M, Yu S, Qiao R, et al. Structure of na APC3-APC16 complex: insights into assembly of the anaphase promoting complex/cyclosome. **J Mol Biol** 2015; 427:1748-64.

Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? **Nat Rev Clin Oncol** 2009; 6:718-30.

Wellings SR, Jensen HM. On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast. **J Natl Cancer Inst** 1973; 50:1111-1118.

Zhou W, Jirström K, Amini RM, et al. Molecular subtypes in ductal carcinoma in situ of the breast and their relation to prognosis: a population-based cohort study. **BMC Cancer** 2013; 13:512.

**Anexo 1 - Carta de Aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais da
Fundação Antônio Prudente**



A.C. Camargo
Cancer Center

CEUA/FAP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA
FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE

São Paulo, 16 de agosto de 2013.

A
Dra. Dirce Maria Carraro.

Aluna: Daiana Karol Koshimae Marin (Mestrado).

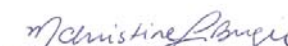
Ref. Projeto de Pesquisa nº 059/13

**Título: "Investigação funcional do gene ANAPC13 na progressão do
carcinoma ductal de mama"**

Prezado(a) Doutor(a):

O projeto de pesquisa acima mencionado, foi apreciado pela Comissão de Ética no
Uso de Animais (CEUA) da Fundação Antonio Prudente - Hospital A.C. Camargo,
em sua Reunião de 09 de agosto de 2013. Os membros desta comissão
consideraram **aprovada** a realização deste estudo nos moldes apresentados no
formulário e projeto de pesquisa encaminhados para análise.

Atenciosamente,


Dra. Michele Christine Landemberger
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Anexo 2 – Genes do perfil 7 da linhagem MDA-MB-231

Genes diretamente comodulados por ANAPC13 na linhagem MDA-MB-231	
TRIM7	PTPN18
MFAP1	FAM84B
IL18	CAMKMT
KLF5	PIKFYVE
DHX15	PIKFYVE
TFRC	CCDC25
CAPZA2	ECT2
ACBD3	PTGER4
ZNF184	CDC42EP4
SUCLG2	THAP9-AS1
RNF111	PDGFC
SDCBP2	AXL
SLC39A10	FBXL16
MAN2A1	PARD6B
FAM221A	NME7
SLC7A11	RNF19A
MYC	COG3
ATP5A1	EPRS
TOP2A	CEPT1
CTSC	MBOAT2
E2F5	RNF20
ZBTB33	RAPGEF6
RPS15AP10	CLMN
TMEM116	EGFEM1P
SLC4A7	FAM3C
TACC1	DDIAS
ITGA6	PINLYP
CCT4	CREBZF
SP4	ADPRM
BCKDHB	SCAI
PLS3	ARL6IP6
DNASE2	RBM7
PI4K2B	ACVR1
SNX7	DFNA5
FIGN	TUBE1
FEZ2	RSL24D1
PAQR3	ZFP1
TNPO1	PRDM8
TFB2M	SFT2D1
SLC35B3	MRPS30
BDP1	CSNK1A1L
ETF1	TM9SF2
USPL1	CCDC80
YIPF4	MS4A7
LNX2	MS4A4A
INTU	

Anexo 3 – Genes do perfil 8 da linhagem MDA-MB-231

Genes inversamente comodulados por ANAPC13 na linhagem MDA-MB-231	
SMC1A	MFI2
AGR2	CXXC5
GNG13	IFFO2
SPTLC3	RPGR
ZC3H12A	MAN1A2
C6orf47	BATF
TNFSF10	TPBGL
IL6	SNX8
ASB2	TMEM217
HLA-DRB1	VWA1
IGSF9	TMEM95
C2	SNRNP35
IL1B	MYO5A
RGAG4	MOCS3
CDA	VASN
TFF1	SH3PXD2B
FAM174B	FKRP
STX2	PCDHGB4
TMEM189	CLSTN1
SCNN1A	UCP3
FBLIM1	FMNL3
HTRA1	PPFIA4
TNS2	PPP1R16B
PLOD1	SRGAP2B
DPYSL3	HLA-DQB1
TLN1	PCDHB10
TSPAN15	FBXO2
ANAPC13	ZMYND11
SNORA28	OTOS
PIM2	KLHDC9
C3	PRSS22
ARHGEF10L	FER1L4
SLC34A3	RMRP
MUC1	PLEKHN1
ABCD1	TNS4
CSRP2BP	PPP1R14A
PSD4	SLC43A2
TBX1	TMEM200C
HMGB3P1	LMAN1L
STRN3	RIN3

Anexo 4 – Genes dos perfis 0, 3 e 4 da linhagem MCF-7

Genes diretamente modulados por ANAPC13 na linhagem MCF-7	
KIAA0101	SUV39H2
APH1A	PHF19
CCNA2	KIF15
CENPQ	H19
MND1	MT1L
JADE1	TCF19
BRCA1	FAM64A
CTS2	E2F7
CEP55	CDC25C
RAD54L	RMI2
HIST1H4A	TRIP13
LINC00482	TNFAIP8
CENPI	SUV39H1
ESCO2	DOK1
ACYP1	ART4
TIMELESS	STON1
KIF18A	BUB1
MT1F	RDM1
DIAPH3	ZEB1-AS1
TGM2	ESPL1
HIST1H1D	OSR2
RFC4	EHD2
BIRC5	HOXA7
DTYMK	MRPL15
CDC7	LINC00618
CDCA5	POLE2
ATAD2	FAM132A
INCENP	NME7
FANCC	MELK
HIST1H4L	C14orf80
RAD54B	C16orf59
RAD51	POC1A
GPR68	RECQL4
NEBL-AS1	MT1B
LINC00634	MIS18A
ZC3H7B	LINC00152
NLN	ARHGAP11A
CYBRD1	ZNF833P
LOXL3	MT1HL1
FOXM1	HIST1H1B
C5orf34	TACC3
CEP83	FCGRT
MAD2L1	NKAPL
MTG1	PBK
THAP9	FANCD2
CATSPER3	PYROXD2
ZNF331	CMSS1
LINC00669	SMYD2
OTOA	HIST1H2AL
LIMK1	GPR124
TMEM27	TH

GGH	UBE2QL1
CENPA	CPAMD8
SIVA1	LOC100128398
EFHD1	PRR11
PKMYT1	LOC101930611
KLF8	ABLIM3
NPM3	CLSTN2
PCK2	DICER1-AS1
FANCB	SHISA2
GCSH	DANCR
CA12	DNAJB4
PKN3	MYBL2
PFN4	PKP2
C19orf40	BMP7
PRIM2	EDN1
PSRC1	CDKN3
SKA3	ITPK1
HMMR	CHN1
PCOLCE2	LINC01116
GPR19	ZNF695
FAM161A	DIO2
CCDC114	CTNNAL1
FOXRED1	F12
CDCA8	AVP
PLK4	NLRP3
MTBP	TXNRD2
PIF1	FAM13B
ZNF530	TYMS
MIS18BP1	FBXO17
HJURP	TTC30B
CBLN3	MYC
PROCA1	HMGB2
OIP5	TOP2A
FAM72A	RADIL
CEP97	STMN1
EME1	NT5E
SPIN4	TIGD3
SKA1	PDE5A
TUBBP5	AURKB
NDC80	CDCA2
LINC01160	KIF23
DLGAP5	CISH
FBLN1	IQGAP3
CKS2	CCDC153
TTK	ZGRF1
METTTL8	C12orf76
SETD9	NPTX1
AUH	EFCAB11
TK1	SYNDIG1
PCBD2	SYNDIG1
STIL	THNSL1
KIF14	TEX30
CKS1B	CEP78
CENPK	TRAIP
PRTFDC1	DMRTA1
KIF20B	C12orf4
MTFR2	U2AF1L4
MPP6	IGFLR1

MPHOSPH6	MAN1B1-AS1
DUT	MFAP2
ZNF239	ZWINT
SPATA33	MYO19
C20orf195	ITGB3BP
CDKN1C	CENPM
OSTF1	CDC45
AGTPBP1	TFPI
TRIP6	CBX5
KIAA1958	RIBC2
MAGOH	KLHL7
FANCE	NCCRP1
CDCA4	S100A10
KDM4D	EXO1
RACGAP1	DSCC1
PLAC8	DOCK4
LGALS13	TUBB
FAM86JP	TUBB2A
CKAP2L	TTC32
CENPW	RASGRP1
NUF2	EFS
ADGRL2	FABP5
GSG2	FABP5P1
JMJD1C-AS1	OXTR
STXBP5L	KIF22
ZNF285	DTL
WIPF1	HIRIP3
MMP9	TMEM105
C5	CHEK1
SFR1	DDIAS
HMCN1	TMCO6
TMEM136	HEG1
PCNA	DSN1
SPC24	CHTF18
ATP6V1G2	WDR34
FUZ	FANCI
PRIM1	NUDT1
COL9A3	QPCTL
TMEM107	LMCD1
KNTC1	BLM
CCDC34	NRM
TMEM187	FAM65C
UNC13D	LY6D
TP53I3	GMNN
SNRPA	NDC1
POLD1	LINC01144
NRGN	SMYD2
NTN1	HIST1H2AL
SSC5D	ADGRA2
TMEM116	TH
TMEM65	UBE2QL1
ACRBP	CPAMD8
DNAH11	PRR11
CTF1	ABLIM3
FAM216A	CLSTN2
EID2B	DICER1-AS1
NUPR1L	SHISA2
MXD3	DANCR

IMMP2L	DNAJB4
MCM2	WISP2
MCM7	CDCA7L
MYO1F	FBXL5
ZNF850	ANKRD36B
XK	RPA3
RFX3	SNHG1
MED30	BRIP1
RBM26-AS1	MRPL36
DNAAF3	SGPP2
HIST1H3B	SUPT3H
RBP7	SIGLEC15
APOC1	HAUS8
LIG1	RNASEH2A
LRIG1	NUDT7
MUTYH	CENPH
DKK1	FANCG
FAM228B	CDT1
CENPU	MAPKAPK5-AS1
CHAF1A	PLEKHG4
SMC2	MYBL1
TMEM130	SH3GL1P2
ORC1	MCM5
SLC25A15	FBF1
NPNT	PC
ORC3	PODXL
NUDT6	AREG
LINC00173	
C5orf58	
ZNF568	
RTKN	

Anexo 5 – Genes do perfil 11 da linhagem MCF-7

Genes inversamente comodulados por ANAPC13 na linhagem MCF-7	
NPC2	AES
FAAH2	RCAN1
INHBA	ABCA12
BCL3	S100A9
IL18	TBX10
DHCR24	SLC12A7
ARHGAP26	NREP
AMOT	ELL2
TNFSF10	GALNT7
TMEM63C	GALNT15
TNFSF9	PFKFB2
NFKBIE	DUSP6
PDIA3	STEAP2
RELB	MCF2L-AS1
FUCA1	SLC39A6
HLA-DRB1	NUCB2
NELL2	FAM83E
GSTA4	PDIA5
P4HA2	BIRC3
ICAM1	HLA-DQB2
EHD3	CSGALNACT1
VTCN1	RDH10
ALCAM	DLGAP1-AS2
RHOV	BMF
CAMP	PPM1H
CHAMP1	CEACAM6
QSOX1	RRAGD
CEACAM1	MAN2A2
HSP90B1	CXADR
IGFBP3	MFSD2A
PARP8	GM2A
MFSD1	KIAA1841
IL6ST	GOLGA8J
LARP6	HLA-DQB1
SPTSSA	RGCC
GJB2	IGF2R
HLA-DRB4	CFB
TSPAN3	CCL17
CACNA1C	LCN2
FAM169A	CKAP4
MVP	THSD4
MBLAC1	ADRB1
LYST	MDK
ZNF503-AS2	SLC41A1
VLDLR	FAM3C
SMPD3	SDF2L1
RNF145	PSTPIP2
ASPHD2	CREB3L2
AZGP1	FRMD6-AS1
CD63	WFDC21P
CMTM8	SLC46A3

OSTM1
SLC45A3
HLA-DRB5
RBPMS2
NANP
QPCT
CPNE4
C12orf49
RNF43
C4B
C4A
FGD6
SERTAD2
FAM13A
TNFAIP3
FAM189A1
PPFIA4
SPINK8

RASSF5
NKX3-1
PPAP2A
SEPT3
NUAK2
SLC12A2
CPD
HOMER2
CCDC136
SLC30A3
ULBP2
ZNF469
C10orf10
SEC24D