

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
**MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**ESTABELECIMENTO DE UM MODELO *IN VITRO* DE CÂNCER  
DE MAMA PARA AVALIAÇÃO DO RECEPTOR ATIVADO POR  
PROTEASE (PAR) COMO ALVO TERAPÊUTICO.**

**LUCIANA NEVES TUBARÃO**

**Rio de Janeiro**

**2017**



# **INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**

**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**LUCIANA NEVES TUBARÃO**

## **ESTABELECIMENTO DE UM MODELO *IN VITRO* DE CÂNCER DE MAMA PARA AVALIAÇÃO DO RECEPTOR ATIVADO POR PROTEASE (PAR) COMO ALVO TERAPÊUTICO.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos.

**Rio de Janeiro**

**2017**

Ficha catalográfica elaborada pela  
Gestão do Conhecimento – GC  
Bio-Manguinhos / FIOCRUZ - RJ

T884

Tubarão, Luciana Neves.

Estabelecimento de um modelo *in vitro* de câncer de mama para avaliação do receptor ativado por protease (PAR) como alvo terapêutico. / Luciana Neves Tubarão. – Rio de Janeiro, 2017.

xiv, 64 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2017.

Bibliografia: f. 57-64

1. Câncer de mama. 2. Receptor ativado por protease 1 (PAR1). 3. Modelo *in vitro*. I. Título.

CDD 616.99449

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos e na Universidade Federal do Rio de Janeiro, no Laboratório de Tecnologia Imunológica (LATIM/Bio-Manguinhos) e Laboratório de Trombose e Câncer (UFRJ), sob a orientação da Dr<sup>a</sup> Denise Cristina de Souza Matos e do Dr Robson de Queiroz Monteiro.



## **INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**

**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**LUCIANA NEVES TUBARÃO**

### **ESTABELECIMENTO DE UM MODELO *IN VITRO* DE CÂNCER DE MAMA PARA AVALIAÇÃO DO RECEPTOR ATIVADO POR PROTEASE (PAR) COMO ALVO TERAPÊUTICO.**

Orientadores: Profa. Dra. Denise Cristina de Souza Matos  
Prof. Dr. Robson de Queiroz Monteiro

Dissertação aprovada em 31 de julho de 2017.

Examinadores:

Dra. Aline de Almeida Oliveira  
FIOCRUZ / Presidente

Dr. Zilton Farias Meira de Vasconcelos  
FIOCRUZ

Dra. Sandra Konig  
UFRJ

**Rio de Janeiro  
2017**

Aos meus pais, Marcelo e Rosana e meu irmão Vinícius que são minha base e porto seguro. E àquele que mesmo não estando mais neste plano, tenho certeza que ainda se orgulha das minhas conquistas: meu querido avô Zeca.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fiocruz e à Bio-Manguinhos, através do MPTI, pela grande oportunidade de crescimento e aprendizado ao longo desses dois anos.

Aos meus pais, Marcelo e Rosana, pelo apoio incondicional durante toda a minha vida. Obrigada por nunca medirem esforços para que eu e meu irmão tenhamos sempre o melhor. Agradeço também ao meu irmão, Vinícius, por sempre estender a mão quando preciso. Amo vocês!

À minha tia Eliana Neves, por tudo que me ensinou e ainda ensina, por sempre ter me tratado como filha e por ser uma das minhas maiores incentivadoras durante toda a minha vida. Obrigada também ao meu primo Thiago Costa e sua esposa Thais Pacheco, pelo companheirismo e por sempre se preocuparem comigo.

À minha madrinha querida Blandina de Carvalho e minha prima Moehma de Carvalho, minhas grandes companheiras e amigas. Obrigada por sempre vibrarem com minhas conquistas e por sempre acreditarem em mim.

A todos os meus amigos que vibraram e torceram por mim, em especial, à Vivandre Sant'Ana, Jéssica Campello e Rafael Lima, por serem meus grandes companheiros e por tornarem o fardo destes anos mais leve, principalmente durante os meses finais. Obrigada pelo apoio, pela torcida, pela paciência e por me distraírem quando eu estava surtando. Amo vocês!

Ao meu namorado, João Victor Felix, pelo apoio incondicional durante esses dois anos, pela paciência e por entender os momentos em que eu não pude me fazer presente.

Aos meus orientadores, Dr<sup>a</sup> Denise Matos e Dr Robson Monteiro, não só pela exímia orientação deste trabalho, mas pelo carinho e respeito ao longo destes anos. À Denise, minha gratidão pela oportunidade que me foi dada desde a iniciação científica, pela amizade, paciência e companheirismo não só nestes dois anos, mas desde quando entrei no LATIM. Ao Robson, agradeço por ter me

aceitado como aluna antes mesmo de me conhecer, por abrir as portas de seu laboratório e por sempre ter uma palavra otimista quando nada dava certo.

Aos meus grandes amigos do LATIM, Andréa Marques, Alessandro Fonseca e Marcelo Müller pela amizade e carinho de sempre. Em especial, agradeço à Tamiris Azamor, Camilla Bayma e Jane da Silva por toda ajuda na realização dos experimentos. Obrigada, meus amigos, pelos momentos de risadas e por todo apoio durante a realização deste trabalho. Nós somos, sem dúvidas, uma família. Obrigada!

À minha companheira de profissão, de trabalho e de vida, Dr<sup>a</sup> Patrícia Neves, por tudo. Eu não conseguiria escrever nem traduzir nestas poucas linhas o tamanho da minha gratidão por toda a sua ajuda. Obrigada não só pelo suporte científico, mas pelo apoio nas (muitas) vezes em que eu pensei em desistir. Sem você, eu não teria conseguido chegar até aqui, obrigada por tudo!

Agradeço também a todos do Laboratório de Trombose e Câncer da UFRJ que me receberam de braços abertos. Em especial, minha gratidão ao Vitor Hugo Luna, por me acompanhar e me ensinar todas as técnicas desde o começo. Agradeço também à Sandra König e à Carolina Baeta, por todo ensinamento e ajuda experimental.

Às amigas que fiz no MPTI, Jéssica Malheiros, Marina Vergne, Nathália Costa, Larissa Araújo e Beatriz Kaippert, que dividiram comigo os momentos bons e ruins nestes dois anos e que fizeram este período ser mais leve e divertido. Em especial, o meu super agradecimento à Carolina Lindenberg, minha companheira de projeto, de bancada, de trajeto Fiocruz-UFRJ, de desesperos e alegrias, que me ajudou em absolutamente tudo desde o início até o final deste trabalho e que me colocava para cima sempre que eu desanimava. Obrigada por tudo, Carol, sem a sua ajuda eu não teria chegado até o final!

A todos, que de alguma forma, me ajudaram durante a realização deste trabalho, obrigada!

**ÍNDICE**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. Introdução	16
1.1 Câncer	16
1.2 Câncer de mama	4
1.2.1 Fatores de risco	5
1.2.2 Classificação histológica	7
1.2.3 Classificação molecular	8
1.3 Microambiente tumoral e a atuação do sistema imunológico	10
1.4 Tratamentos para câncer de mama	13
1.5 Receptores Ativados por Protease (PAR)	15
1.5.1. Classificação, definição e mecanismo de ativação	15
1.5.2 Receptores PAR1 e câncer	18
2. Objetivos	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. Material e Métodos	22
3.1 Linhagens tumorais utilizadas	23
3.1.1 Cultivo das linhagens tumorais	24
3.2 Demonstração da Expressão de PAR1	25
3.2.1 Extração de RNA das linhagens tumorais	25
3.2.2 Obtenção de cDNA	26
3.2.3 PCR em tempo real (RT-qPCR)	26
3.3 Citometria de fluxo, com imunomarcção de PAR1	27
3.4 Agonista e Antagonista de PAR1	28
3.5 Ensaios Funcionais de PAR1	28
3.5.1 Extração e dosagem de proteínas	28
3.5.2 Western Blotting para marcação de ERK fosforilada (pERK)	29
3.5.3 Ensaio de Proliferação com marcação para BrDU	31
3.5.4 Expressão Gênica	32

3.5.5 Ensaio de microarranjo líquido para dosagem de IL-8 no sobrenadante celular	33
3.6 Análise estatística	35
4. Resultados	36
4.1 Expressão do receptor PAR1	36
4.1.1 Expressão do receptor PAR1 por RT-qPCR	36
4.1.2 Expressão do receptor PAR1 por citometria de fluxo	37
4.2 Ensaio funcionais de PAR1	39
4.2.1 A ativação de PAR1 e seu efeito na via de sinalização ERK	39
4.2.2 Ensaio de proliferação celular utilizando BrDU	41
4.2.3 Quantificação relativa de genes com atividade pró-tumoral IL-8, VEGF e MMP-2	44
4.2.4 Dosagem de IL-8 no sobrenadante celular por microarranjo líquido	47
5. Discussão	49
6. Conclusão	55
7. Referências bibliográficas	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC – Proteína C ativada

BCA - Ácido bicinconínico

BRCA1 – do inglês, *Breast cancer 1*

BRCA2 – do inglês, *Breast cancer 2*

BrDU - 5-bromo-2'-deoxiuridina

BSA – Albumina sérica bovina, do inglês *bovine serum albumin*

CDI – Carcinoma ductal invasivo

CLI – Carcinoma lobular invasivo

DAG – Diacilglicerol

DEPC - Água tratada com dietil pirocarbonato

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*

DNase – Desoxirribonuclease, do inglês *deoxyribonuclease*

EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico, do inglês

ER – Receptor de Estrogênio, do inglês

FDA – do inglês *Food and Drug Administration* - Agência regulatória dos EUA com a função de controlar os alimentos e medicamentos, através de diversos testes e pesquisas

HER2 – Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano

IARC – do inglês *International Agency for Research on Cancer*

IL-8 – Interleucina 8

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IP<sub>3</sub> - Inositol 1,4,5 trifosfato

M1 - Macrófagos classicamente ativados

MFI – Intensidade média de fluorescência, do inglês *Median Fluorescence Intensity*

MDCS – Células supressoras de origem mielóide

MMP – Metaloproteinase de Matriz

NK – Células *natural killer*

Nucel – Núcleo de Terapia Celular e Molecular

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAR – Receptores ativados por protease, do inglês *protease-activated receptors*

PBS – Tampão fosfato salino, do inglês *Phosphate buffer saline*

PE – Ficoeritrina

pERK – ERK fosforilado

PR – Receptor de progesterona, do inglês

RT-qPCR – Reação da transcriptase reversa seguida da Reação de Cadeia Polimerase em Tempo Real

RIPA – do inglês *Radio-Immunoprecipitation Assay*

RNase – Ribonuclease

RPM – Rotações por minuto

RPMI - Meio do Instituto Memorial Roswell Park, do inglês *Roswell Park Memorial Institute Medium*

SFB – Soro fetal bovino

T.A – Temperatura ambiente

TAM – Macrófagos associados ao tumor, do inglês *tumor associated macrophages*

TBS-T - Tampão Tris Salino com 0,1% de Tween

T-regs – Linfócitos T reguladores

USP – Universidade de São Paulo

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês *vascular endothelial growth factor*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Formação de metástase tumoral.	2
<b>Figura 1.2</b> Estatística sobre as principais causas de câncer.	3
<b>Figura 1.3</b> As células do microambiente tumoral.	11
<b>Figura 1.4</b> Células inflamatórias pró e antitumorais no microambiente.	13
<b>Figura 1.5</b> Ativação do receptor PAR por trombina.	16
<b>Figura 1.6</b> Via de ativação de ERK (MAP quinases).	17
<b>Figura 1.7</b> Ligação do vorapaxar ao receptor PAR1.	19
<b>Figura 3.1</b> Demonstração esquemática de cada etapa do trabalho.	25
<b>Figura 4.1</b> Expressão do receptor PAR1 por RT-qPCR.	37
<b>Figura 4.2</b> Expressão do receptor PAR1 por citometria de fluxo.	38
<b>Figura 4.3</b> Percentual da expressão do receptor PAR1 nas células MCF-7, MCF-7 contendo o vetor vazio e MCF-7 PAR1+.	39
<b>Figura 4.4</b> A cinética da fosforilação de ERK.	40
<b>Figura 4.5</b> Representação gráfica da quantificação das bandas de <i>western blotting</i> das células MCF-7 e MCF-7 PAR1+.	41
<b>Figura 4.6:</b> Painel representativo das análises da citometria de fluxo das células MCF-7 e MCF-7 PAR 1+ para avaliar a proliferação celular.	42
<b>Figura 4.7</b> Percentual de células que proliferaram, através da análise de BrDU incorporado.	44
<b>Figura 4.8</b> Cinética de expressão do gene <i>IL-8</i> pelas células MCF-7 e MCF-7 PAR1+.	45
<b>Figura 4.9</b> Cinética de expressão do gene <i>VEGF</i> pelas células MCF-7 e MCF-7 PAR1+.	46
<b>Figura 4.10</b> Cinética de expressão de MMP-2 pelas células MCF-7 e MCF-7 PAR1+.	47
<b>Figura 4.11</b> Dosagem de IL-8 no sobrenadante celular por microarranjo líquido.	48

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.1</b> Taxa de incidência estimada para 2016 (por 100 mil habitantes), para os tipos de câncer mais frequentes (exceto pele não melanoma), em mulheres, nas regiões geográficas do Brasil.	5
<b>Tabela 1.2</b> Classificação histológica do carcinoma mamário invasivo.	7
<b>Tabela 1.3</b> Classificação molecular dos carcinomas de mama por imuno-histoquímica, associados ao marcador Ki67.	9
<b>Tabela 3.1</b> Iniciadores utilizados para expressão gênica de PAR1.	27
<b>Tabela 3.2</b> Anticorpos primários utilizados no ensaio de Western Blotting e suas respectivas diluições.	30
<b>Tabela 3.3</b> Anticorpo secundário utilizado no ensaio de Western Blotting e sua diluição.	31
<b>Tabela 3.4</b> Sequência de iniciadores utilizados para expressão gênica de citocinas por qPCR.	33
<b>Tabela 3.5</b> Demonstração esquemática da diluição da curva padrão.	34

## RESUMO

Câncer é um termo genérico dado para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo, cuja característica principal é o surgimento de células anormais que se dividem sem controle, podendo invadir outros tecidos em um processo denominado metástase. Na atualidade, este vem se tornando um dos mais importantes problemas de saúde pública, e neste cenário, o câncer de mama configurou-se como o segundo mais comum no mundo e o mais frequente entre as mulheres. É importante ressaltar que por se tratar de uma doença de alta complexidade, a maior parte dos tratamentos inclui a combinação de mais de uma terapia. Sendo assim, é relevante o estudo de novos alvos para desenvolvimento de drogas que auxiliem no tratamento destes tumores. Neste trabalho, escolhemos os receptores ativados por protease (PAR) como possíveis alvos terapêuticos, uma vez que sua expressão é associada a um mau prognóstico para diversos tipos de câncer. Os receptores PAR são receptores acoplados a proteína G que possuem sete domínios transmembranas. O PAR1 está diretamente relacionado ao crescimento das células tumorais, invasão e metástase de vários tipos de cânceres malignos, incluindo o câncer de mama. O medicamento Vorapaxar, utilizado para o tratamento de eventos cardiovasculares trombóticos, é um antagonista potente de PAR1 cuja ligação é irreversível. Após sua aprovação, diversos outros análogos vêm sendo desenvolvidos, dentre eles o SCH79797. Os efeitos deste inibidor sobre as vias de ativação do PAR1 ainda não foram descritos para o câncer de mama, sendo, por essa razão, objeto do nosso estudo. Nosso objetivo foi estabelecer um modelo experimental *in vitro* para a avaliação do receptor PAR1 como alvo terapêutico para o câncer de mama. Foram utilizadas duas linhagens celulares: a MCF-7 que expressa níveis baixíssimos do receptor PAR1 e a MCF-7 transfectada com PAR1. Foi possível demonstrar uma maior expressão do receptor PAR1 na linhagem celular MCF-7 PAR1+ em relação à MCF-7. Foi observado que a linhagem MCF-7 PAR1+ tende a promover uma maior ativação da via de sinalização ERK, comparado à linhagem MCF-7, havendo uma ligeira inibição da fosforilação de ERK no tempo de 60 minutos de incubação com SCH 79797. As células tumorais MCF-7 PAR1+ apresentaram maior capacidade proliferativa e uma inibição na proliferação desta célula, após incubação com SCH 79797. Houve um aumento na expressão de fatores de agressividade e invasividade nas células MCF-7 PAR1+ em relação às células MCF-7 avaliadas por RT-qPCR. Somente para o fator IL-8, houve inibição causada pelo SCH 79797. Foi observado também uma tendência no aumento no nível de IL-8 no sobrenadante das células MCF-7 PAR1+ avaliadas por microarranjo líquido quando comparadas com a MCF-7.

## ABSTRACT

Cancer is a generic term given to a large group of diseases that can affect any part of the body, whose main feature is the appearance of abnormal cells that divide without control and can invade other tissues in a process called metastasis. At present, this group of diseases that has been related as one of the most important public health problems, and considering this scenario, the breast cancer became the second most common in the world and the most frequent among women. It is important to note that this highly complex disease depends on most treatments including the combination of more than one therapy. Therefore, is relevant the study of new targets for the development of drugs that helps the treatment of these tumors. Herein, we chose protease-activated receptors (PARs) as possible therapeutic targets, since their expression is associated with a poor prognosis for several types of cancer. PAR receptors are G-protein coupled receptors that possess seven transmembrane domains. PAR1 is directly related to tumor cell growth, invasion and metastasis of various types of malignant cancers, including breast cancer. The drug Vorapaxar, used to treat thrombotic cardiovascular events, is a potent antagonist of PAR1 which binding is irreversible. After this drug was approved, several other analogues have been developed, among them SCH79797. The effects of this inhibitor on PAR1 activation pathways have not yet been described for breast cancer, so, these aspects were study in this work. Our objective was to establish an in vitro experimental model that permits to evaluate the PAR1 receptor as a therapeutic target for breast cancer. Two cell lines were used: MCF-7 expressing very low levels of PAR1 receptor and MCF-7 transfected with PAR1. It was possible to demonstrate a greater expression of the PAR1 receptor in the MCF-7 PAR1 + cell line compared to MCF-7. It was observed that the PAR1 + MCF-7 lineage tends to promote a greater activation of the ERK signaling pathway compared to the MCF-7 lineage, with a slight inhibition of ERK phosphorylation at the 60 minute incubation time with SCH 79797. Tumor cells MCF-7 PAR1 + cells showed higher proliferative capacity and an inhibition in the proliferation of this cell after incubation with SCH 79797. There was an increase in the expression of aggressiveness and invasiveness factors in MCF-7 PAR1 + cells compared to MCF-7 cells evaluated by RT- qPCR. For IL-8 factor only, there was inhibition caused by SCH 79797. A trend in the increase in IL-8 level in the supernatant of MCF-7 PAR1 + cells evaluated by liquid microarray was also observed when compared to MCF-7.

# 1. Introdução

## 1.1 Câncer

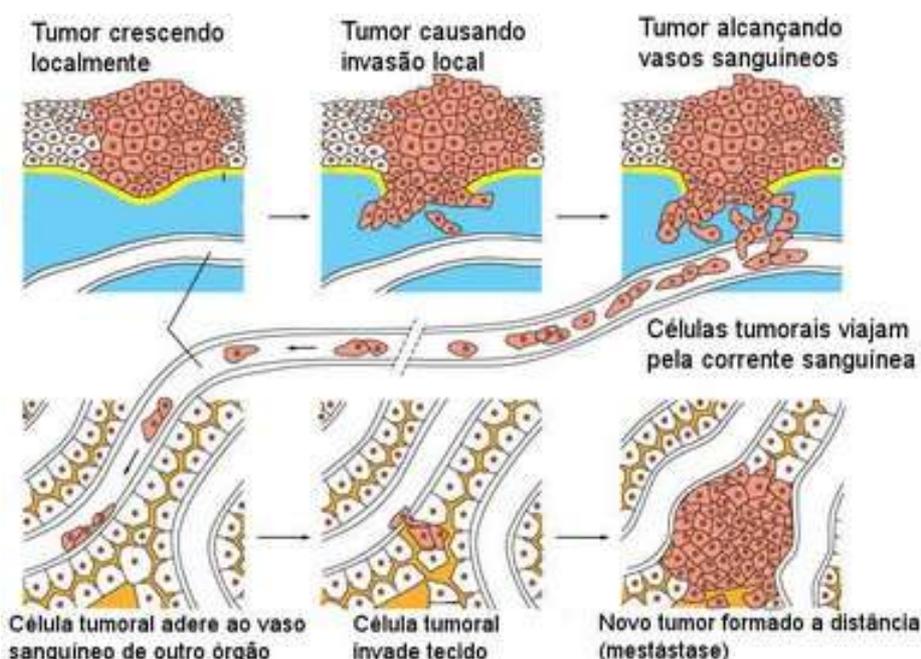
Os termos neoplasia ou tumor são utilizados para definir aumento de volume em quaisquer regiões do organismo, podendo ser classificados em benignos ou malignos. Os tumores benignos se caracterizam por células que possuem crescimento anormal sem a capacidade de invadir outros tecidos e órgãos. Câncer é um termo genérico dado aos tumores malignos, cuja característica principal é o surgimento de células anormais que se dividem sem controle, podendo invadir outros tecidos em um processo denominado metástase (Hanahan e Weinberg 2011; WHO 2016).

O processo de carcinogênese é o processo no qual as células normais se transformam em células cancerígenas, ou seja, o processo de formação do câncer. Esse processo acontece lentamente, podendo levar vários anos até que uma célula cancerosa prolifere e dê origem a um tumor visível. O processo passa por três estágios antes de chegar ao tumor: estágio de iniciação, quando as células sofrem os efeitos dos agentes cancerígenos ou carcinógenos que provocam modificações genéticas nestas células. É o primeiro estágio da carcinogênese e, nesta fase, as células estão geneticamente alteradas, porém, não se detecta o tumor clinicamente. O segundo estágio é chamado de estágio de promoção e nesta fase, as células inicialmente modificadas, sofrem o efeito de agentes cancerígenos denominados oncopromotores. O contato continuado das células com estes agentes faz com que a mesma se transforme em célula maligna, de maneira lenta e gradual. O terceiro estágio, ou estágio de progressão, é a fase na qual ocorre a multiplicação descontrolada células alteradas. Nesta etapa, a multiplicação é irreversível e se estende até as primeiras manifestações clínicas da doença.

A progressão representa a etapa em que as células malignas apresentam fenótipo característico, desenvolvimento de maior agressividade, crescimento rápido e potencial de invasão e disseminação (INCA 2017a).

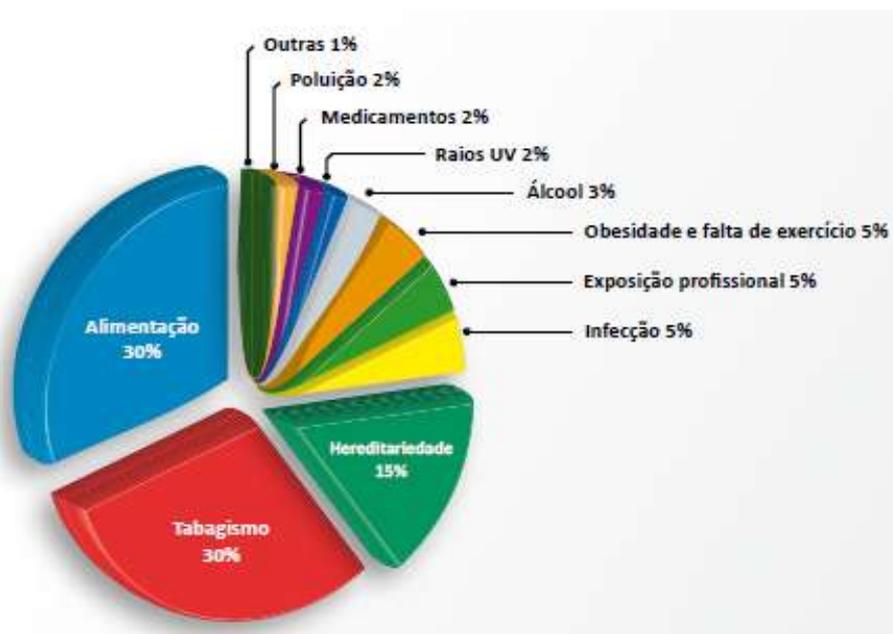
Para chegar ao estágio maligno e invasivo, as células precisam apresentar determinadas características. Em 2000, Hanahan e Weinberg descreveram as primeiras seis características biológicas adquiridas durante o desenvolvimento de múltiplos cânceres humanos. Tais capacidades são responsáveis pela transformação das células normais em células tumorais. Eles incluem a manutenção da sinalização proliferativa, evasão dos supressores de crescimento, resistência à morte celular, a possibilidade de replicação de forma indefinida, indução angiogênese e ativação de invasão e metástase (Hanahan e Weinberg 2000). Em uma revisão realizada onze anos depois, foram adicionadas duas novas características importantes para o processo de carcinogênese: a capacidade de reprogramar o metabolismo energético celular e a evasão do sistema imune (Hanahan e Weinberg 2011).

A figura 1.1 mostra o processo de formação de metástase, quando células alteradas crescem descontroladamente, evadem o local de origem, se disseminando pela corrente sanguínea, havendo a formação de um novo tumor em outro tecido do organismo.



**Figura 1.1: Formação de metástase tumoral.** Retirado de <<http://www.saudemedicina.com/wp-content/uploads/2014/06/metastase.jpg>>

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas se referem não só ao meio ambiente, como também aos hábitos e costumes próprios relacionados ao ambiente social e cultural. As causas internas são pré-determinadas geneticamente, na maioria das vezes. Esses fatores podem interagir de diversas maneiras, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais. De todos os casos, como mostrado na figura 1.2, mais de 80% dos cânceres estão associados a fatores ambientais, como o tabagismo, a alimentação, a obesidade e falta de exercícios, a exposição profissional, a infecção por alguns tipos de vírus, o uso de bebidas alcoólicas, a exposição excessiva ao sol, a poluição, a utilização de alguns medicamentos e outros. O surgimento desta doença depende da intensidade e duração da exposição das células a seus agentes causadores (INCA 2016).



**Figura 1.2: Estatística sobre as principais causas de câncer. INCA, 1997**

O câncer, na atualidade, vem se tornando um dos mais importantes problemas de saúde pública tanto em países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento, sendo responsável por mais de seis milhões de óbitos a cada ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo. Apesar de a maior taxa de incidência ser em países desenvolvidos, dos dez

milhões de novos casos de câncer por ano, cinco milhões e meio são diagnosticados nos países em desenvolvimento (OPAS, 2002).

Para o Brasil, foi estimado, para o biênio 2016-2017, 596 mil novos casos de câncer, sendo esperados, entre os homens, 295.200 novos casos e, entre as mulheres, 300.800 (INCA 2015).

## **1.2 Câncer de mama**

Em 2012, um projeto da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), chamado Globocan 2012, ofereceu a mais atualizada estimativa a respeito de 28 tipos de cânceres em 184 países. Neste cenário, o câncer de mama configurou-se como o segundo câncer mais comum no mundo, sendo o tipo de câncer mais frequente entre as mulheres, com uma estimativa de 1,67 milhões de novos casos de câncer diagnosticados em 2012 (25% de todos os cânceres). Além disso, atingiu a classificação como a quinta causa de morte por câncer em geral (522.000 mortes), sendo a causa mais frequente de morte por câncer em mulheres em regiões menos desenvolvidas (324.000 mortes, 14,3% do total) e a segunda causa de morte por câncer em regiões mais desenvolvidas (198.000 mortes, 15,4%), após o câncer de pulmão (IARC 2012).

Segundo os dados do INCA, o número de casos novos de câncer de mama esperados para o Brasil no biênio 2016-2017, é de 57.960. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer também é considerado o mais frequente nas mulheres das regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste. Na região Norte, foi estimado como o segundo tumor mais incidente, como mostra a tabela 1.1 (INCA 2015).

**Tabela 1.1:** Taxa de incidência estimada para 2016 (por 100 mil habitantes), para os tipos de câncer mais frequentes (exceto pele não melanoma), em mulheres, nas regiões geográficas do Brasil.

	Brasil	Região Norte	Região Nordeste	Região Centro-Oeste	Região Sudeste	Região Sul
1º	Mama feminina (56,20)	Colo do útero (23,97)	Mama feminina (38,74)	Mama feminina (55,87)	Mama feminina (68,08)	Mama feminina (74,30)
2º	Cólon e Reto (17,10)	Mama feminina (22,26)	Colo do útero (19,49)	Colo do útero (20,72)	Cólon e Reto (22,66)	Cólon e Reto (23,27)
3º	Colo do útero (15,85)	Cólon e Reto (5,89)	Cólon e Reto (8,77)	Cólon e Reto (16,93)	Colo do útero (11,30)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (20,61)
4º	Traqueia, Brônquio e Pulmão (10,54)	Estômago (5,82)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (7,24)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (9,37)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (10,56)	Colo do útero (15,17)
5º	Estômago (7,37)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (5,07)	Estômago (6,73)	Ovário (6,96)	Corpo do útero (9,58)	Estômago (8,71)

Fonte: MS / INCA / Estimativa de Câncer no Brasil, 2016. MS / INCA / Coordenação de Prevenção e Vigilância / Divisão de Vigilância

### 1.2.1 Fatores de risco

O câncer de mama é um tipo de câncer considerado multifatorial, envolvendo fatores biológicos e endócrinos, vida reprodutiva, comportamento e estilo de vida (Parkin et al 2001).

Em relação aos fatores menstruais e relacionados à vida reprodutiva da mulher, alguns estudos demonstram o aumento do risco deste tipo de câncer em mulheres com menarca precoce, nuliparidade (ausência de filhos) ou com idade avançada ao ter o primeiro, que nunca amamentaram e que tiveram menopausa tardia (Gao et al. 2000; Msolly et al. 2013). Um ponto comum entre estes fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama é a exposição excessiva e cumulativa ao estrogênio. Este hormônio aumenta a taxa de proliferação celular através da transdução de sinal mediada por receptores de estrogênio (ER)

presentes na mama. As células em divisão ficam mais suscetíveis a erros genéticos durante a replicação do DNA e as mutações produzidas podem, futuramente, conduzir ao desenvolvimento de um tumor (Yager 2000).

Além disso, a dieta caracterizada por um elevado consumo de gorduras totais e gorduras saturadas, pobre em frutas e verduras, rica em carne e álcool, assim como um alto consumo calórico, que tem como consequência a obesidade, somados ao sedentarismo, têm sido considerados como fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama (Alegre et al. 2013). Isto se dá uma vez que uma dieta rica em gordura aumenta os níveis séricos de estrogênio. Por outro lado, uma dieta com baixo teor de gordura, pode diminuir os níveis de estrogênio circulante. Este fato se relaciona com o câncer de mama devido às ações fisiológicas estimulatórias deste hormônio nas glândulas mamárias (Cibeira e Guaragna 2006).

Outro fator epidemiológico de risco bem estabelecido é o histórico familiar da doença. Entre 5 e 10% de todos os casos de câncer de mama estão relacionados à herança de mutações genéticas, tendo como característica a instalação da doença em mulheres jovens. A análise do histórico familiar revela, frequentemente, a existência de vários outros casos da doença com características peculiares. A ocorrência dessas características sugere a existência de um componente genético hereditário que predispõe à doença (Amendola e Vieira 2005).

Ainda que os cânceres relacionados à hereditariedade sejam responsáveis por uma pequena porcentagem de todos os casos de câncer de mama, indivíduos que possuem mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* podem ter o risco de desenvolver câncer de mama de 60% a 80%. Isto faz com que as mutações nestes genes sejam os fatores de risco de maior magnitude para o câncer de mama, atualmente (Fackenthal e Olopade 2007).

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* desempenham um importante papel no controle do ciclo celular e reparo a danos no DNA, uma vez que são genes supressores tumorais. Os danos a estes genes acarretam a maior propensão das células em desenvolverem alterações genéticas que poderão conduzir ao câncer, aumentando o risco de mulheres contraírem câncer de mama e de ovário (Teng et al. 2008).

Outro agente potencial para o desenvolvimento deste tipo de câncer é a exposição contínua e excessiva, geralmente ocupacional, a radiações ionizantes. A radiação aumenta o risco de câncer de mama, produzindo danos diretamente ao DNA e alterando funções celulares e intracelulares. Dados genéticos recentes indicam que mulheres com mutações genéticas que podem aumentar sua susceptibilidade a desenvolver câncer de mama (mutação em *BRCA1* ou *BRCA2*, por exemplo), podem estar particularmente em risco em relação aos efeitos indutores de câncer advindos da exposição à radiação ionizante (Fenga 2016).

### 1.2.2 Classificação histológica

Em relação à histologia, o câncer de mama pode ser classificado a partir de sua origem epitelial no revestimento interno dos ductos ou lóbulos da mama. Além disso, deve-se levar em consideração duas questões principais: se o tumor é limitado ao componente epitelial da mama (carcinoma *in situ*) ou se o mesmo invadiu o estroma para se tornar carcinoma invasivo (Makki 2015).

A OMS publicou, em 2012, a classificação atual de tumores de mama e em relação aos carcinomas invasivos, são reconhecidos o carcinoma mamário invasivo de tipo não especial e 20 tipos histológicos especiais definidos predominantemente por critérios morfológicos, listados na tabela 1.2 (IARC 2012).

**Tabela 1.2:** Classificação histológica do carcinoma mamário invasivo.

Carcinoma invasivo de tipo não especial
Carcinoma lobular invasivo
Carcinoma tubular
Carcinoma cribriforme
Carcinoma com características medulares
Carcinoma metaplásico
Carcinoma com diferenciação apócrina
Carcinoma adenoide cístico
Carcinoma mucoepidermoide
Carcinoma polimorfo

Carcinoma mucinoso e carcinoma com células em anel de sinete
Carcinoma com características neuroendócrinas
Carcinoma papilífero invasivo
Carcinoma micropapilífero invasivo
Carcinoma secretor
Carcinoma oncocítico
Carcinoma sebáceo
Carcinoma rico em lipídeos
Carcinoma de células claras rico em glicogênio
Carcinoma de células acinares

Fonte: OMS, 2012.

Usualmente identificado como carcinoma ductal invasivo (CDI), o carcinoma mamário invasivo de tipo não especial corresponde a cerca de 70% dos casos e é definido como uma neoplasia epitelial mamária invasiva que não preenche critério para nenhum tipo especial e, por isso, constitui um grupo de tumores bastante heterogêneo. Já em relação aos tipos histológicos do tipo especiais, o carcinoma lobular invasivo (CLI) é o mais prevalente (aproximadamente 15% dos casos). Estes carcinomas são mais homogêneos, com critérios diagnósticos mais rígidos. Além disso, um mesmo carcinoma pode apresentar áreas com diferentes morfologias, sendo considerados carcinomas de padrão misto ducto/lobular invasivo. Estes correspondem a aproximadamente 13% dos casos (Geyer 2013).

### 1.2.3 Classificação molecular

Além disso, o câncer de mama também pode ser classificado a partir de assinaturas moleculares. Os subtipos, neste caso, são geralmente diagnosticados com base na presença ou ausência de três receptores: receptores de estrogênio (ER), receptores de progesterona (PR) e o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). Dessa maneira, um câncer de mama pode ter a presença ou ausência destes receptores, sendo subdivididos em: receptor de estrogênio (RE) positivo ou negativo, receptor de progesterona (RP) positivo ou negativo e receptor HER2 positivo ou negativo (Chen e Russo 2009).

Além destes receptores, a proteína Ki67 também atua como um biomarcador para prognóstico e sensibilidade das células cancerosas à terapia endócrina ou quimioterapia, sendo considerada como um dos fatores que poderiam servir para a classificação dos diferentes subtipos moleculares de câncer de mama. Esta proteína nuclear está intimamente associada com o crescimento e invasão do câncer de mama (Goldhirsch et al. 2011), sendo esta expressa nas células em divisão durante as fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, mas não detectável na fase G0, ou seja, em células em repouso, funcionando como um marcador de proliferação celular. A detecção de expressão de Ki67 por imuno-histoquímica atua como um dos indicadores do estado proliferativo de células cancerosas. Os cânceres Ki67 positivos se caracterizam por células que crescem mais rapidamente, sendo mais agressivas no processo de invasão a outros tecidos (Scholzen e Gerdes 2000).

Os tipos de classificação molecular dos carcinomas de mama por imuno-histoquímica, associados ao marcador Ki67 estão representados pela tabela 1.3.

**Tabela 1.3:** Classificação molecular dos carcinomas de mama por imuno-histoquímica, associados ao marcador Ki67.

Subtipos Moleculares	Marcadores classificatórios	Marcador Ki67
Luminal A	ER+ e/ou PR+ ; HER2 –	< 14%
Luminal B (HER2 negativo)	ER+ e/ou PR+ ; HER2 –	> 14%
Luminal B (HER2 positivo)	ER+ e/ou PR+ ; HER2+	*
Super-expressão de HER2 (HER2 +)	ER- ; PR- ; HER2+	*
Triplo negativo	ER- ; PR- ; HER2-	*

Fonte: Adaptado de (Fulawka e Halon 2017).

O símbolo (\*) representa qualquer tipo de expressão de Ki67.

Os carcinomas do tipo luminal são os mais frequentes e representam 45% a 60% dos tumores de mama, sendo os que apresentam o melhor prognóstico. Os luminais A são aqueles que, além da expressão do ER, podem ou não apresentar PR positivo, baixa expressão de Ki67 (< 14%) e HER-2 negativo. Este subtipo representa cerca de 60% dos carcinomas de mama e apresenta, em relação aos demais, o melhor prognóstico. O grupo de tumores luminais B apresenta o mesmo padrão de ER e PR, porém apresenta alta expressão de Ki67 e pode expressar ou não HER-2, o que lhe confere pior prognóstico comparativamente ao tipo luminal A (Dunnwald et al. 2007).

Em relação ao gene HER2, o aumento da sua expressão e da síntese da proteína Ki67 pelas células tumorais está associado a um pior prognóstico e pior resposta à quimioterapia em comparação com tumores que não o expressam. Além disso, o risco de mortalidade é significativamente maior para os pacientes com tumores do tipo HER2+, comparados com os dos tipos luminais, independentemente do estágio tumoral ou idade do paciente (Chia et al. 2008).

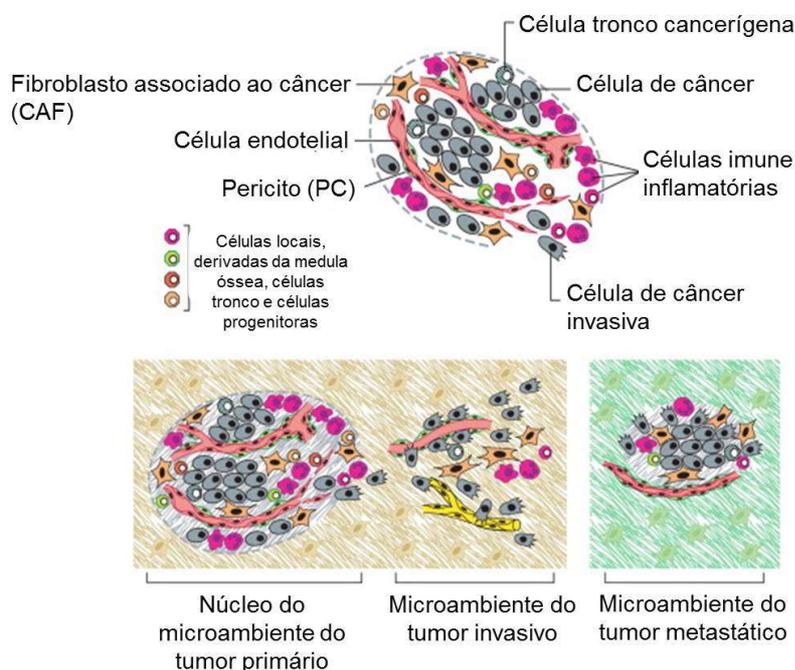
Os tumores triplo-negativos não apresentam expressão de ER, RP e HER2. Apontam elevada mutação no gene supressor tumoral TP53, acentuado polimorfismo nuclear e maior grau histológico. O prognóstico é pior quando comparado aos tumores luminais (Foulkes et al. 2010).

### **1.3 Microambiente tumoral e a atuação do sistema imunológico**

Ao longo dos anos, os tumores estão sendo cada vez mais reconhecidos como uma estrutura com alto grau de complexidade e, dessa maneira, sua biologia não pode mais ser entendida como apenas uma coleção de células tumorais com características homogêneas. Dessa maneira, a biologia de um tumor só pode ser entendida ao estudar os tipos individuais de células que o compõe assim como o microambiente tumoral que eles constroem durante o curso da tumorigênese (Hanahan e Weinberg 2011).

O microambiente tumoral desempenha um papel indispensável no desenvolvimento e progressão do câncer. Seu compartimento estromal é composto por uma variedade de tipos de células, incluindo células endoteliais, fibroblastos e células imunes, cada uma possuindo funções distintas e

complementares que suportam a arquitetura e a manutenção dos tumores (Nair et al. 2017). Essas células estão mostradas na figura 1.3.



**Figura 1.3: As células do microambiente tumoral.** Na parte de cima: os tipos celulares distintos que constituem a maioria dos tumores sólidos. Tanto o parênquima quanto o estroma de tumores contêm tipos e subtipos celulares distintos que permitem coletivamente o crescimento e progressão tumoral. Na parte de baixo: microambientes de tumores que mudam à medida que os tumores invadem o tecido normal e, depois disso, colonizam tecidos distantes. A abundância, a organização histológica e as características fenotípicas dos tipos de células do estroma, bem como da matriz extracelular evoluem durante a progressão, possibilitando o crescimento primário, invasivo e, então, metastático. Adaptado de Hanahan e Weinberg 2011.

No que diz respeito ao câncer de mama, por se tratar de uma doença de alta heterogeneidade, podem ocorrer vários tipos de interações celulares em seu microambiente. Foi demonstrado que macrófagos associados ao tumor (TAMs), quando cultivados com linhagens tumorais de mama, influenciam a progressão do tumor, invasão tumoral e metástase. As células endoteliais também estão associadas à adesão e invasão tumoral. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um importante fator pró-angiogênico, que, ao se ligar ao seu receptor em células endoteliais presentes no microambiente tumoral, pode induzir adesão e migração celular, além de aumentar a capacidade do tumor de formar canais semelhantes a vasos através da diferenciação de células

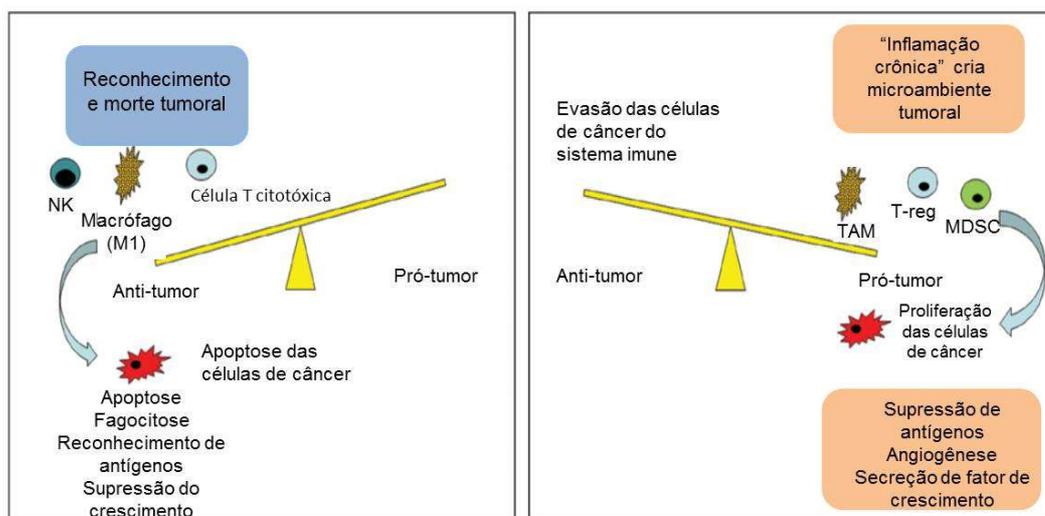
endoteliais, tanto *in vitro* como *in vivo*, gerando lacunas de sangue cercadas por células tumorais (Yu e Di 2017). Além disso, as células que constituem o microambiente tumoral podem aumentar as propriedades invasivas do tumor através da super expressão da citocina IL-8 e de metaloproteinasas de matriz (MMPs), que possuem caráter pró-tumoral. A IL-8 induz múltiplas vias de sinalização intracelular constitutivamente ativas em células tumorais, neutrófilos e TAMs, estando também associada à angiogênese, à proliferação, à migração de células tumorais e à progressão tumoral para estágios agressivos da doença (Espinoza-Sánchez et al. 2017). As MMPs atuam na migração e invasão tumoral através da remodelação de matriz, permitindo que as células endoteliais migrem e invadam outros locais. Além disso, as MMPs liberam fatores de crescimento angiogênicos, como o VEGF, propiciando a formação de novos vasos sanguíneos (Watnick 2012).

Em resumo, a agressividade de um câncer é fortemente influenciada pela forma como as células tumorais se comunicam com outras células dentro do estroma tumoral. Considerando a heterogeneidade genética intra e inter-tumoral, além da capacidade de evasão destas células, torna-se difícil o desenho de estratégias terapêuticas eficientes (Espinoza-Sánchez et al. 2017).

Recentemente, tem-se discutido e aplicado diversas estratégias imunoterápicas no tratamento dos diversos tipos de câncer de inclusive o de mama. Estas estratégias baseiam-se em aspectos de vigilância imunológica que ocorrem durante o processo patológico desta doença. Os tumores sólidos apresentam baixos níveis imunogênicos e mecanismos de escape que driblam seu reconhecimento pelas células do sistema imunológico, promovendo desregulação de marcadores antigênicos de superfícies, como integrinas, bem como, o recrutamento de células supressoras (linfócitos T reguladores – T-regs) e células supressoras de origem mielóide (MDCS). Estas observações reforçam a ideia de que a restauração da imunogenicidade ou a depleção de células supressivas pode aumentar a capacidade de o sistema imunológico localizar e atingir tumores.

Em geral, entende-se que a forma como o sistema imunológico responde a um tumor depende do tipo de resposta gerada pelo microambiente desse tumor. Se um tumor desencadeia o recrutamento de células T CD8<sup>+</sup> / Th1, células *natural killer* (NK) e macrófagos classicamente ativados (M1), então a

progressão do tumor provavelmente será interrompida e o tumor será destruído ou pelo menos gravemente comprometido em sua capacidade de progredir. No entanto, se o tumor conduz a uma resposta de células T CD4<sup>+</sup> / Th2 / T-reg, MDSC e TAMs, então provavelmente estas células imunes podem ativamente auxiliar a progressão do tumor para metástases (Allen e Jones 2015). A figura 1.4 demonstra o equilíbrio de influência que as células inflamatórias podem exercer no microambiente do tumor dependendo dos níveis relativos dos diferentes tipos de células.



**Figura 1.4: Células inflamatórias pró e antitumorais no microambiente.** Células NK e células T citotóxicas juntamente com macrófagos classicamente ativados (M1) levaria à morte de tumores e a um bom prognóstico. No entanto, níveis aumentados de MDSC imunossupressor, T-regs e macrófagos alternativamente ativados (TAM) levam a evasão imunológica tumoral, angiogênese e progressão do câncer invasivo. Adaptado de (Allen e Jones 2015).

## 1.4 Tratamentos para câncer de mama

Devido à complexidade que envolve o desenvolvimento dos tumores e sua interação com o microambiente, conforme descrito anteriormente, foram desenvolvidos diversos protocolos para o tratamento do câncer de mama, dependendo do seu tipo e estágio. As chamadas terapias locais tratam o tumor sem afetar o resto do corpo. Os tipos de tratamentos locais utilizados para câncer de mama incluem cirurgia e terapia utilizando radiação. Esse último é mais comumente utilizado em cânceres em estágios menos avançados, embora também possa ser utilizado em outras situações. Já as terapias sistêmicas são um tipo de tratamento realizado com a utilização de drogas, que podem ser

administradas via oral ou intravenosa. Dependendo do tipo de câncer de mama, podem ser utilizados diferentes tipos de drogas, incluindo quimioterapia, terapia hormonal e terapia direcionada. A escolha da terapia vai depender a classificação do câncer em relação aos subtipos moleculares, podendo ser realizado a quimioterapia, a radioterapia, cirurgia e, em muitos casos, combinando mais de uma modalidade (American Cancer Society 2014).

A quimioterapia tem como um dos mecanismos principais a inibição da proliferação celular de maneira não seletiva, uma vez que os agentes utilizados nesse tipo de tratamento afetam tanto as células neoplásicas quanto as células normais, porém eles acarretam maior dano às células malignas do que às normais, devido às diferenças quantitativas entre os processos metabólicos destes dois tipos celulares (INCA 2017).

A radioterapia é um método capaz de destruir as células tumorais empregando feixe de radiações ionizantes. Aplica-se uma dose pré-calculada de radiação em um determinado espaço de tempo, a um volume de tecido que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células tumorais, com o menor dano possível às células normais circunvizinhas. A radioterapia pode ser radical (ou curativa), quando se busca a cura total do tumor; remissiva, quando o objetivo é apenas a redução tumoral; profilática, quando se trata a doença em fase subclínica, isto é, não há volume tumoral presente, mas possíveis células neoplásicas dispersas; paliativa, quando se busca a remissão de sintomas tais como dor intensa, sangramento e compressão de órgãos; e ablativa, quando se administra a radiação para suprimir a função de um órgão (INCA 2017).

Alguns tumores necessitam de hormônios para se desenvolver mais rapidamente. A utilização de drogas anti-hormonais como agentes quimioterápicos tem apresentado resultados favoráveis em relação ao tratamento de algumas neoplasias de mama hormônio dependente. O mecanismo de ação destes fármacos consiste em antagonizar o hormônio que está estimulando a proliferação de células tumorais (Riggs e Hartmann 2003).

Já em relação às pacientes que apresentam a super expressão de HER2, o tratamento atual mais adequado é a imunoterapia. Cerca de 20% a 25% dos tumores de mama expressam a proteína HER2/neu, um fator de crescimento

epitelial. O anticorpo monoclonal anti-HER2/neu, trastuzumabe, demonstrou resultados positivos em pacientes com tumores metastáticos que apresentam super expressão dessa proteína, podendo também diminuir a recidiva de pacientes tratadas com este anticorpo por um ano pós cirurgia (Romond et al. 2005).

É importante ressaltar que por se tratar de uma doença de alta complexidade, a maior parte dos tratamentos para câncer de mama inclui a combinação de mais de uma terapia. Sendo assim, é relevante o estudo de novos alvos para desenvolvimento de drogas que auxiliem no tratamento destes tumores. Neste trabalho, escolhemos os receptores ativados por protease (PAR) como possíveis alvos terapêuticos, uma vez que sua expressão é associada a um mau prognóstico para diversos tipos de câncer (Elste e Petersen 2010), conforme descrito a seguir.

## **1.5 Receptores Ativados por Protease (PAR)**

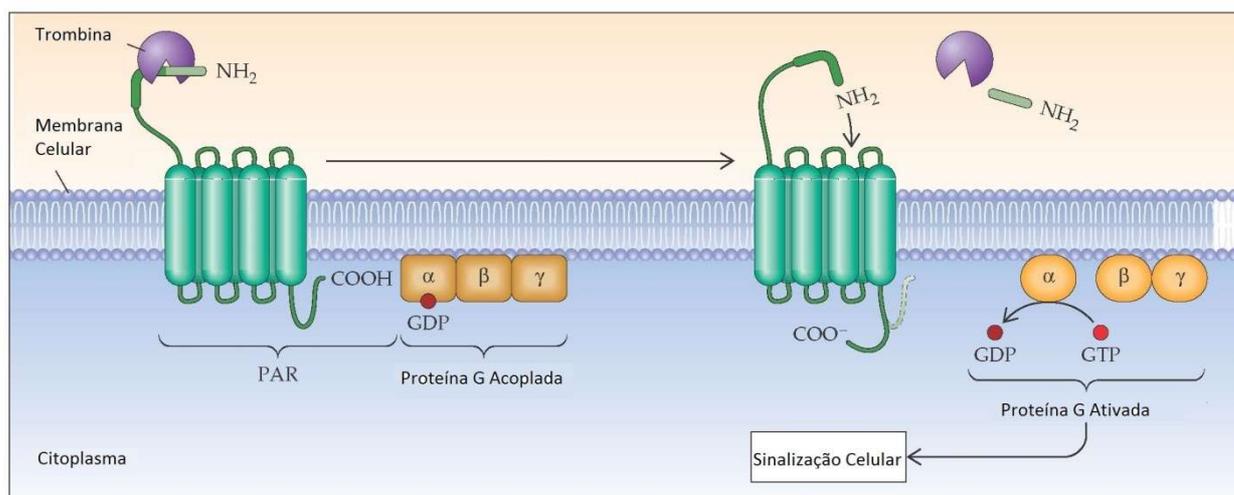
### **1.5.1. Classificação, definição e mecanismo de ativação**

Os receptores PAR são uma subfamília de receptores acoplados a proteína G que possuem sete domínios transmembranas (De Meis et al. 2010). Em 1991, o primeiro receptor ativado por protease (PAR1), foi identificado como sendo receptor plaquetário para trombina (Vu et al. 1991). De maneira subsequente, um segundo PAR foi identificado (PAR2), como não sendo sensível à trombina, mas ativado por tripsina e outras serina-proteases, como por exemplo, triptase de mastócitos e fatores de coagulação VIIa e Xa (Nystedt et al. 1994; Mirza et al. 1997). Sucessivamente, PARs adicionais foram identificados, sendo o PAR3 ativado também por trombina e PAR4 ativado tanto por trombina quanto por tripsina (Ishihara et al. 1997; Xu et al. 1998).

Estes receptores são expressos em diversos tipos de tecidos e células, como plaquetas, o músculo esquelético, músculo liso, monócitos, mastócitos, células endoteliais, células epiteliais, astrócitos e neurônios (Macfarlane et al. 2001; Wojtukiewicz et al. 2015). Por estarem localizados em diversos tecidos,

estes receptores estão envolvidos em processos patológicos e fisiológicos, possuindo funções críticas na hemostase, trombose, desenvolvimento embrionário, proliferação celular, cicatrização de feridas, inflamação e progressão do câncer (De Meis et al. 2010; Zhao et al. 2014).

Todos os receptores partilham o mesmo mecanismo base de ativação, no qual proteases clivam um local específico do domínio N-terminal extracelular, expondo um novo domínio de ligação. Esta nova alça N-terminal age como próprio ligante, ocorrendo então uma transativação, com a nova alça se ligando na segunda alça extracelular conservada do receptor, desencadeando uma mudança conformacional do PAR e sinalização intracelular. Este mecanismo de ativação é referido como ativação canônica ou clássica de PAR (Zhao et al. 2014). O mecanismo de clivagem e ativação dos receptores PAR está exemplificado na figura 1.5.

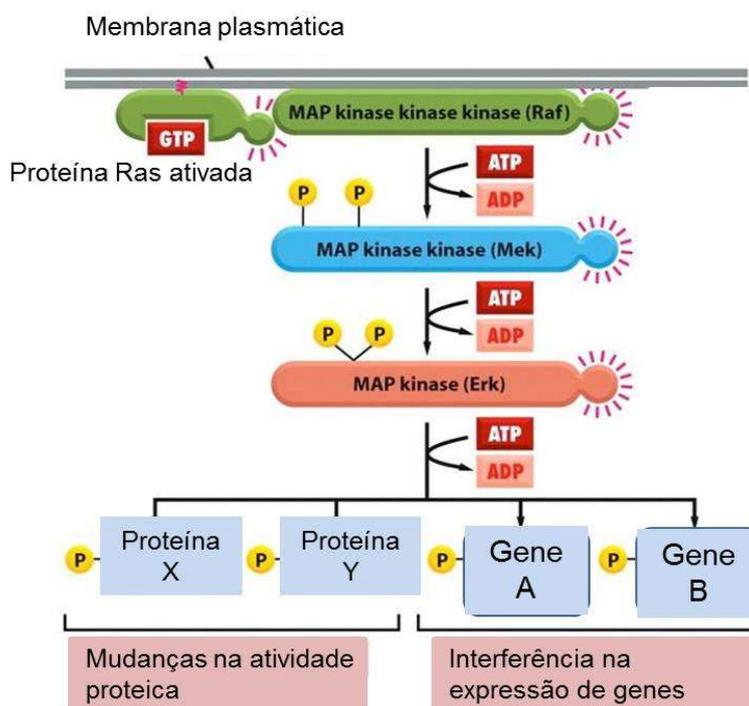


**Figura 1.5: Ativação do receptor PAR por trombina.** Adaptado de <<http://what-when-how.com/wp-content/uploads/2012/04/tmp4B45.jpg>>

Neste tipo de ativação de PAR, as vias de transdução de sinais intracelulares têm sido bastante estudadas, principalmente para PAR1, que interage com subunidades da proteína G, ativando fosfolipase C, levando à produção de inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG), também induzindo a mobilização de Ca<sup>++</sup> e ativação da proteína quinase C, respectivamente. Além disso, a sinalização concomitante das subunidades G<sub>αq</sub> e G<sub>αi</sub> estimula a ativação da via de ERK1/2, além de ocorrer também a ativação de proteínas Rho e Rho-quinases que induz efeitos celulares, como o aumento

da permeabilidade endotelial, desarme das junções aderentes e reorganização do citoesqueleto de actina (Sidhu et al. 2014).

Essa ativação promove o aumento da transcrição de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que regulam a proliferação celular, adesão e migração, que levam ao crescimento, invasão e metástase de um tumor (Wojtukiewicz et al. 2015). A figura 1.6 mostra a ativação da via de ERK (via das MAP quinases), que resulta em mudanças nas atividades de proteínas e/ou alteração na expressão gênica, conferindo ao tumor um caráter mais agressivo.



**Figura 1.6: Via de ativação de ERK (MAP quinases).** Resulta em mudanças nas atividades de proteínas e/ou alteração na expressão gênica, conferindo ao tumor um caráter mais agressivo. Adaptado de < <http://www.ebah.com.br/vias-sinalizacao-celular-aula-pdf>>

Além deste tipo de ativação, denominada ativação canônica ou clássica, que é mediada por trombina, existem casos em que outras proteases ativam o receptor PAR1 em outro sítio de ligação que não o da trombina, promovendo alterações na resposta à ativação do receptor, a este tipo de ativação, denominamos ativação não canônica, que pode ser realizada, por exemplo, pela proteína C ativada (APC). A ativação de PAR1 por esta proteína promove a ativação da via mediada por  $\beta$ -arrestina, independente da via mediada pela proteína G, promovendo uma resposta anti-inflamatória, diferente da resposta

promovida pela ativação por trombina, que é de caráter pró-inflamatório (Zhao et al. 2014).

### 1.5.2 Receptores PAR1 e câncer

PAR1 é super-expresso em tumores invasivos e metastáticos e os níveis de expressão deste receptor estão diretamente correlacionados com o grau de invasividade do tumor (García-López et al. 2010).

Uma característica comum em pacientes com câncer é o alto nível de formação de trombina em células tumorais. Demonstrou-se que numerosos tipos de células tumorais expressam o fator tecidual proteico transmembranar, que, quando exposto ao fator circulante VII, ativa o fator X, levando à geração de trombina (HAN et al. 2011).

A trombina, então, induz uma resposta de sinalização através da interação direta com o receptor PAR-1 no ambiente tumoral. Estudos *in vitro* com várias linhagens celulares de câncer mostraram uma correlação direta entre a super-expressão de PAR1 em células cancerosas e uma maior capacidade de formação de angiogênese, invasão e desenvolvimento de metástases distantes. A expressão de PAR1 foi confirmada em melanoma, câncer de mama, do pulmão, esôfago, estômago, cólon, próstata, pancreático, de fígado, de ovário, de endométrio e em câncer de cabeça e pescoço (Elste e Petersen 2010; Wojtukiewicz et al. 2015).

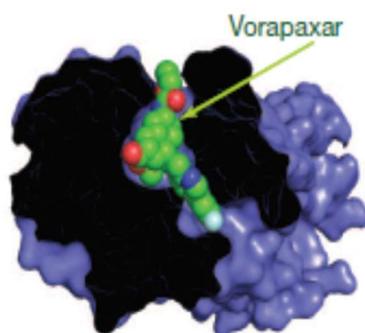
O receptor PAR1 está diretamente relacionado ao crescimento das células tumorais, invasão e metástase de vários tipos de cânceres malignos, incluindo o câncer de mama (Morris et al. 2006; Nguyen et al 2006; Rydén et al 2010).

Estudos utilizando um lipopéptido antagonista de PAR1 em modelos de câncer de mama avançado sugerem que o bloqueio deste receptor por este lipopeptídeo em conjunto com pequenas moléculas, como o SCH 205831, tem diversos efeitos antitumorais como inibir a formação de metástases e aumentar a citotoxicidade *in vivo*, além de induzir a apoptose tumoral tanto *in vitro* quanto

*in vivo*, havendo um efeito sinérgico quando outros agentes anti-tumorais são utilizados (Yang et al. 2009).

Porém, apesar dos avanços, o papel do receptor PAR1 na invasão de celular no câncer de mama ainda não é completamente compreendido. Tem sido sugerido que a trombina indiretamente induz rearranjos celulares, ativando PAR1 e transativando o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR e /ou HER2) fornecendo pior prognóstico para pacientes com este tipo de câncer (Hernández et al. 2009).

Recentemente, foi aprovado pelo FDA a droga vorapaxar (SCH 530348, Merck) para a redução de eventos cardiovasculares trombóticos em pacientes com história de infarto do miocárdio ou doença arterial periférica. O Vorapaxar é um antagonista potente de PAR1, que se liga em um local incomum muito perto da superfície extracelular deste receptor, diferente do que ocorre com inibidores de outros receptores ligados de proteína G que costumam penetrar mais profundamente na região transmembranar (TM) destas proteínas. O bolso de ligação ao vorapaxar é composto por resíduos das regiões TM3, TM4, TM5, TM6 e TM7, bem como dos *loops* extracelulares ECL2 e ECL3, formando um túnel através do receptor. A ligação desta pequena molécula ao PAR1 é praticamente irreversível e apesar do desenvolvimento de efeitos colaterais, principalmente sangramentos, o mesmo foi recomendado para uso em determinados casos (Zhang et al. 2012). A figura 1.7 mostra a ligação do vorapaxar ao bolso do receptor PAR1.



**Figura 1.7: Ligação do vorapaxar ao receptor PAR1.** Visão superficial mostrando a ligação do vorapaxar ao bolso do receptor PAR1 durante a simulação da dinâmica molecular (Zhang et al. 2012).

Após a aprovação deste medicamento, diversos outros análogos vêm sendo desenvolvidos, dentre eles o SCH79797. Este antagonista de PAR1 demonstrou-se recentemente como capaz de inibir a ativação do fator de transcrição pró-tumoral NF- $\kappa$ B em células MDA-MB-231. Como resultado, observou-se a de-fosforilação das proteínas MLC2 e FAK, que representa a inibição da ativação das mesmas, além de um efeito repressor da expressão de paxilina após o tratamento com MMP-1, como ativadora de PAR1. MLC2, FAK e paxilina facilitam o movimento celular, e conseqüentemente, a invasão celular. Estes dados indicam que este possa se caracterizar como uma boa molécula para a inibição da atividade do PAR1 na célula tumoral (Nguyen et al. 2015). No entanto, outros efeitos deste inibidor sobre as vias de ativação do PAR1 ainda não foram descritos, sendo, por essa razão, objeto do nosso estudo.

Conforme explicitado anteriormente, o câncer vem se tornando um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo, sendo responsável por milhões de óbitos a cada ano. O câncer de mama se configura como o tipo de câncer de maior prevalência e morbidade em mulheres, havendo sempre uma tendência a uma combinação de protocolos de tratamentos, tornando necessários estudos na busca de novos alvos capazes de eliminar o surgimento e a disseminação de focos metastáticos. Dessa maneira, uma vez demonstrado que os receptores PAR1 estão envolvidos na progressão de diversos tipos de carcinomas, inclusive o de mama, estes receptores se mostram como possíveis alvos para opções terapêuticas futuras.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar duas linhagens tumorais, MCF-7 e a MCF-7 transfectada com plasmídeo que codifica o receptor PAR1, como modelos experimentais *in vitro* para o estudo do receptor PAR1 como alvo terapêutico no câncer de mama.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão do receptor PAR1, através de RT-qPCR e citometria de fluxo, na linhagem celular de câncer de mama MCF-7 e na linhagem MCF-7 transfectada com plasmídeo que codifica o receptor PAR1;
- Avaliar, utilizando a técnica de *Western blotting*, a ativação da via de sinalização ERK nas duas linhagens celulares, na presença do inibidor e/ou do agonista sintético de PAR1;
- Avaliar a capacidade de proliferação das células tumorais na presença do inibidor e/ou do agonista sintético de PAR1, por citometria de fluxo;
- Avaliar a expressão de fatores de agressividade e invasividade na presença do inibidor e/ou do agonista sintético de PAR1, utilizando o método de RT-qPCR;
- Avaliar a secreção de IL-8 no sobrenadante das células na presença do inibidor e/ou do agonista sintético de PAR1, por imunensaio, utilizando microarranjo líquido.

### 3. Material e Métodos

Inicialmente, para este trabalho, foi idealizado utilizar e comparar dois tipos de linhagens tumorais de câncer de mama diferentes: uma expressando baixos níveis do receptor PAR1 – MCF-7 – e outra expressando este receptor em níveis elevados – MDA-MB-231. Porém, os testes iniciais realizados com estas duas células não se mostraram reprodutíveis e as células MDA-MB-231 apresentaram diferença de comportamento quando foram realizados testes para a avaliação da migração celular. Por este motivo, optou-se pela utilização e comparação das células MCF-7 com células MCF-7 transfectadas, que passaram a expressar o receptor PAR1. As células MDA-MB-231 foram utilizadas apenas a título de comparação no ensaio de RT-qPCR para a avaliação do nível de expressão de PAR1.

Além disso, com o objetivo de se avaliar a ativação ou o bloqueio dos receptores PAR1, foram utilizados um agonista capaz de mimetizar a ativação do receptor por trombina – TRAP1 – e um antagonista análogo ao medicamento vorapaxar, que se liga de maneira irreversível ao receptor – SCH 79797.

Dessa maneira, tanto as células MCF-7 quanto as células MCF-7 transfectadas com PAR1, foram divididas em 3 grupos:

- **Grupo controle:** contendo apenas as células. Estas não foram submetidas à incubação com nenhum dos tratamentos;
- **Grupo de células incubadas com o agonista TRAP1:** neste grupo, as células foram incubadas com o agonista TRAP1 durante os tempos avaliados em cada ensaio. O objetivo desta incubação foi observar se, de fato, havia ativação do receptor PAR1 nas células transfectadas;

- **Grupo de células incubadas com o antagonista SCH 79797:** neste grupo, as duas linhagens tumorais foram incubadas com o antagonista SCH 79797 por 1h, seguido da incubação com o agonista TRAP1 pelo tempo determinado em cada ensaio. Esta incubação com TRAP1 após a incubação com o SCH 79797, foi realizada com o objetivo de avaliar se, de fato, o antagonista foi capaz de bloquear a ativação do receptor por TRAP1, uma vez que o SCH 79797 é um inibidor alostérico e liga-se irreversivelmente ao PAR1.

### 3.1 Linhagens tumorais utilizadas

Neste trabalho, utilizamos a linhagem MCF-7, uma linhagem de câncer de mama humano derivado a partir de uma paciente do sexo feminino de 69 anos com adenocarcinoma de mama metastático (ATCC 2017). Esta linhagem celular é uma das linhagens mais utilizadas para estudos com câncer de mama e expressa níveis baixíssimo do receptor PAR1 (Kamath et al. 2001).

Para avaliar quais seriam os efeitos da presença do PAR1, esta célula foi transformada, passando a expressar este receptor. A MCF-7 modificada foi desenvolvida e gentilmente cedida pelo Núcleo de Terapia Celular e Molecular (Nucel), na USP, sob a coordenação da Dr<sup>a</sup> Mari Cleide Sogayar. As células transfectadas foram denominadas, neste trabalho, como MCF-7 PAR1+.

Para fins de comparação dos níveis de expressão de PAR1 com estas linhagens citadas, utilizamos a linhagem MDA-MB-231, de adenocarcinoma de mama retirado de uma paciente de 51 anos de idade (ATCC 2017). Esta linhagem é altamente metastática e expressa níveis elevados de PAR1, PAR2 e PAR4 (Hernández et al. 2009).

Também apenas para a comparação dos níveis de expressão de PAR1 com as outras linhagens citadas a cima, foi utilizada a linhagem MCF-7 transfectada apenas com o vetor plasmideal vazio.

### 3.1.1 Cultivo das linhagens tumorais

As linhagens celulares MCF-7, MCF-7 PAR1+ e MCF-7 vetor vazio foram cultivadas em garrafas de cultura de célula com meio RPMI (Meio do Instituto Memorial Roswell Park - *Roswell Park Memorial Institute Medium* - Gibco® Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), suplementado com gentamicina 50 mg/mL (Gibco® Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), solução HEPES 1M (Gibco® Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco® Thermo Fisher Scientific, MA, EUA).

Cada passagem de célula foi realizada utilizando 2 mL de Tripsina-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich®, MO, EUA) para soltá-las da garrafa de cultura. Em seguida, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 RPM e mantidas novamente em garrafas de cultura com meio RPMI suplementado com gentamicina 50 mg/mL (Gibco® Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), solução HEPES 1M (Gibco® Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e 10% de soro fetal bovino (Gibco® Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Além disso, a linhagem celular transfectada – MCF-7 PAR1+ - foi submetida a ciclos de seleção dos clones transfectados que foram realizados a cada 3-4 semanas. Esta seleção foi feita utilizando-se o antibiótico Geneticin® 1g (G418) (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), na concentração de 800 µg/mL.

Já a linhagem MDA-MB-231 foi cultivada em garrafas de cultura de célula com meio DMEM (Meio Dulbecco Modificado – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) alta glicose com L-glutamina (Gibco® Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), suplementado com gentamicina 50 mg/mL (Gibco® Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), solução HEPES 1M (Gibco® Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco® Thermo Fisher Scientific, MA, EUA).

Cada passagem de célula foi realizada utilizando 2 mL de Tripsina-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich®, MO, EUA) para soltá-las da garrafa de cultura. Em seguida, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 RPM e mantidas novamente em garrafas de cultura com meio DMEM alta glicose com L-glutamina (Gibco® Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) suplementado com gentamicina 50

mg/mL (Gibco® Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), solução Hepes 1M (Gibco® Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e 10% de soro fetal bovino (Gibco® Thermo Fisher Scientific, MA, EUA).

As linhagens foram submetidas aos testes tanto para a demonstração de PAR1 quanto aos testes funcionais para o mesmo receptor. O resumo dos experimentos realizados está esquematizado abaixo pela figura 3.1.

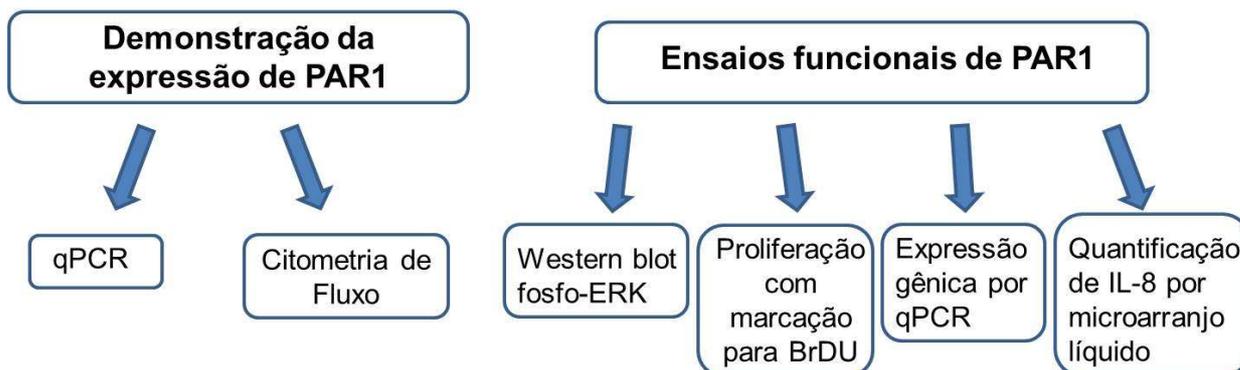


Figura 3.1: Demonstração esquemática de cada etapa do trabalho.

## 3.2 Demonstração da Expressão de PAR1

### 3.2.1 Extração de RNA das linhagens tumorais

As células de cada linhagem citadas no item 3.1 foram distribuídas em garrafas de cultura de células de 25 cm<sup>2</sup> a uma concentração de 1 x 10<sup>6</sup> células/garrafa. No dia seguinte, com as células aderidas, o meio de cultura RPMI ou DMEM contendo 10% de soro fetal bovino foi retirado de cada garrafa, sendo adicionado às mesmas, meio de cultura RPMI ou DMEM sem soro fetal bovino, deixando as células em um estado denominado período de *starving*, por 18h. Isto foi realizado para que todas as células mantivessem o ciclo celular estacionado na fase G0. Após este período, as células foram lavadas com 1 mL de PBS 1X - (tampão fosfato salino, do inglês *phosphate buffer saline*). Após a lavagem, adicionou-se 1 mL de Trizol em cada garrafa. O lisado celular foi então reconstituído adicionando-se, ao mesmo, 200 µL de clorofórmio (Merck, MO, EUA), incubando-se por 3 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000 G/2-8°C. A fase aquosa foi retirada e então se adicionou 500 µL de álcool isopropílico (Merck, MO, EUA), seguindo

uma incubação na bancada por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 G, 2-8°C. Após esta etapa, os sobrenadantes foram retirados e foi adicionado 1 mL de etanol 75% (Merck, MO, EUA) aos sedimentos formados. As amostras foram agitadas rapidamente e centrifugadas por 5 minutos a 9.000 G/2-8°C. Após a centrifugação, todo o sobrenadante foi retirado e as amostras foram deixadas em repouso até a completa evaporação do etanol.

Em seguida, foram adicionados 30 µL de água ultrapura, livre de RNAses, DNAses e resíduos de proteínas – água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) – e as amostras foram incubadas no banho seco a 56°C por 10 minutos. As amostras foram, então, mantidas em gelo e sua quantificação realizada no aparelho NanoDrop™ (Thermo Fischer Scientific, MA, EUA).

### **3.2.2 Obtenção de cDNA**

Às amostras obtidas no item anterior, foram adicionados: 2 µL de RT *buffer* 10x, 0,8 µL de dNTP Mix 25x (100 mM), 2 µL de Random Primers 10x, 1 µL da enzima Multiscribe Reverse Transcriptase e água 9 µL DEPC (todos os itens do kit da empresa Thermo Fischer Scientific, MA, EUA). As amostras foram incubadas sob o seguinte ciclo: 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 37°C (2 vezes) e 5 segundos a 85°C.

### **3.2.3 PCR em tempo real (RT-qPCR)**

A expressão de PAR1 foi avaliada por RT-qPCR, em duplicatas, utilizando as linhagens MCF-7, MCF-7 PAR+ e também na linhagem MCF-7 contendo o vetor de clonagem vazio, tendo como comparação a linhagem de câncer de mama MDA-MB-231. Como controle de gene constitutivo foi utilizado o GAPDH. Para a dosagem de PAR1, cada poço continha 1 µL de amostra, 0,35 µL de iniciador de PAR1 senso e 0,35 µL de iniciador de PAR1 antisenso, 5 µL de mix SYBR Green e 3,3 µL de água DEPC. Para o controle, cada poço continha 1 µL de amostra, 0,2 µL de iniciador de GAPDH senso e antisenso, 3 µL de mix SYBR Green e 2,8 µL de água DEPC. Na tabela 3.1 são apresentadas as sequências dos iniciadores utilizados.

**Tabela 3.1:** Iniciadores utilizados para expressão gênica de PAR1.

Iniciador	Sequência Senso	Sequência Anti-Senso
<b>PAR1</b>	GCCAGAATCAAAGCAACAAA	TCATTTTTCTCCTCATCCTCC
<b>GAPDH</b>	AGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT	CAACAGCCTCAAGATCATCAGCAA

### 3.3 Citometria de fluxo, com imunomarcção de PAR1

As células das linhagens MCF-7, MCF-7 PAR1+ e MCF-7 vetor vazio foram distribuídas em garrafas de cultura de células de 25 cm<sup>2</sup> a uma concentração de 1 x 10<sup>6</sup> células/garrafa com meio de cultura RPMI contendo 10% de soro fetal bovino, sendo deixadas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, com as células aderidas, o meio de cultura RPMI contendo 10% de soro fetal bovino foi retirado de cada garrafa, sendo adicionado às mesmas, meio de cultura RPMI sem soro fetal bovino, deixando as células em um estado denominado período de *starving*, com duração de 18h. Após este período, as células foram retiradas das garrafas utilizando-se 1 mL de Tripsina-EDTA 0,25%. Em seguida, foram centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos e posteriormente distribuídas em tubos de poliestireno a uma concentração de 1 x 10<sup>6</sup> células/tubo. As células foram então lavadas com 800 µL de solução de citometria (PBS 1X com 10% de SFB) e submetidas à marcação com 2 µL de anticorpo já conjugado Anti-hPAR1-APC (R&D Systems, MN, EUA) por 30 minutos à temperatura ambiente (T.A) e ao abrigo da luz. Após esta incubação, as células foram novamente lavadas com 800 µL de solução de citometria e fixadas com paraformaldeído 2% por 15 minutos a T.A. Em seguida, as amostras foram submetidas à leitura no citômetro LSR Fortessa (BD-Biosciences, NJ, EUA). As análises foram feitas com auxílio do programa FlowJo 10.0 (Tree star). Para as análises, foi construído um gráfico do tipo dot plot tamanho x granulosidade (FSC x SSC), onde um *gate* foi desenhado para a seleção da população de células e exclusão dos *debris*. A partir deste *gate*, foram construídos histogramas hPAR1-APC+, onde foi posicionado o marcador a partir da população de células marcadas com o isotipo, considerado como controle negativo para a marcação. Os percentuais obtidos foram utilizados para a construção do gráfico.

### 3.4 Agonista e Antagonista de PAR1

O agonista utilizado foi o TRAP1 (SFLLRN-NH<sub>2</sub>) (Pepmic Co., LTD), peptídeo que mimetiza a clivagem do receptor pela trombina, já descrito na literatura (Huang 2007). O antagonista utilizado foi o SCH79797 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), análogo ao medicamento Vorapaxar, conforme descrito na introdução (item 1.5). Foram utilizadas as concentrações descritas nos itens abaixo, conforme estabelecidas previamente em nosso laboratório.

### 3.5 Ensaios Funcionais de PAR1

#### 3.5.1 Extração e dosagem de proteínas

As células das linhagens MCF-7 e MCF-7 PAR1+ foram distribuídas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> na concentração de 1 x 10<sup>6</sup> células e incubadas com meio de cultura RPMI com 10% de soro fetal bovino em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, depois de aderidas, foram incubadas com meio RPMI sem soro fetal bovino por 18 horas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, as células das duas linhagens tumorais foram divididas nos 3 grupos já citados anteriormente: grupo controle, grupo de células incubadas com o agonista TRAP1 na concentração de 50 µM e grupo de células incubadas com o antagonista SCH 79797 na concentração de 1 µM, seguido da incubação com TRAP1 na concentração de 50 µM. As células foram então incubadas nos tempos de 15, 30 e 60 minutos em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após os tempos determinados, as células foram lavadas com PBS 1x gelado, e mantidas em PBS 1x, no gelo, por alguns minutos. O PBS foi então completamente retirado, sendo adicionados 50 µL de tampão RIPA (*Radio-Immunoprecipitation Assay*) suplementado de 10% de inibidor de fosfatase e 10% de inibidor de protease. As células foram então raspadas, e os extratos celulares foram colocados em tubos de poliestireno e armazenados em freezer a -80 °C.

Para a dosagem de proteínas dos extratos celulares obtidos, utilizou-se o método de dosagem por ácido bicinconínico (BCA), de acordo com o kit do fabricante (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). As amostras foram retiradas do

freezer e mantidas em gelo por 30 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 13.000 G por 15 minutos a 4°C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante com as proteínas de interesse foi utilizado para a dosagem e para o ensaio de Western Blotting. Para a dosagem, foi utilizada uma microplaca de 96 poços com fundo chato. A curva padrão foi feita com *albumina* sérica bovina (BSA), nas concentrações 2 mg, 1 mg, 0,5 mg, 0,25 mg, 0,125 mg e 0,06 mg. As amostras foram colocadas em duplicata, em uma diluição de 1:20. Foram adicionados 25 µL, tanto das amostras quanto da curva. Em seguida, 200 µL da solução de trabalho contendo BCA e 2% de cobre foram adicionados em todos os poços da placa, que foi incubada por 30 minutos em estufa à 37°C. Após este período, a leitura foi realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 562 nm. A concentração das amostras foi calculada pelo método de 4 parâmetros utilizando o programa SoftMax Pro.

### **3.5.2 Western Blotting para marcação de ERK fosforilada (pERK)**

Foram realizadas corridas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS page, na concentração de 8 %. As amostras previamente quantificadas foram preparadas a uma concentração final de 50 µg por poço. O tampão de amostra foi previamente preparado no laboratório, estando a uma concentração de 4x no estoque a -80°C. Este tampão foi diluído para 1X, relativo ao volume final de cada amostra, que foi de 20 µL. As amostras foram então levadas para o bloco aquecido por 5 minutos a 95°C para a desnaturação das proteínas, seguido de sua aplicação no gel. A corrida foi realizada a 90 V até todas as amostras chegarem ao final do gel.

As membranas de nitrocelulose foram preparadas para a transferência: o corte da mesma foi realizado nas dimensões necessárias (7,5 cm x 8,5 cm), identificando o canto superior e colocando em álcool absoluto por 30 segundos. As membranas foram lavadas com água destilada por 2 minutos e mantidas em PBS 1x.

Para a realização da transferência, o gel foi retirado e colocado em um recipiente com tampão de transferência. Um sistema foi montado, de forma que um “sanduíche” entre o gel e a membrana fosse formado e fechado de forma a

não entrar ar no sistema. O sistema foi então inserido em uma cuba com gelo e tampão de transferência suficiente para a passagem de corrente. O processo de transferência foi realizado a 110 V por 2 horas. Após a transferência, seguiu-se com o bloqueio: as membranas foram retiradas e incubadas em solução de bloqueio (Tampão Tris Salino com 0,1% de Tween (TBS-T) com 5% de leite desnatado) por 1 hora com leve agitação. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas com solução TBS-T por 5 minutos, 3 vezes, sob leve agitação. Em seguida, os anticorpos primários foram incubados da seguinte maneira: solução TBS-T com 0,5% de leite desnatado mais a diluição desejada de cada anticorpo primário *overnight* à 4°C. Como controle positivo do teste, foi utilizada a proteína estrutural  $\beta$ -actina. A descrição dos anticorpos primários e suas respectivas diluições estão demonstradas na tabela 3.2.

**Tabela 3.2:** Anticorpos primários utilizados no ensaio de Western Blotting e suas respectivas diluições.

<b>Anticorpos primários</b>	<b>Diluição utilizada</b>
$\beta$ -Actin (13E5) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology®, MA, EUA)	1:1000
p-ERK ½ Thr 177/Thr160 rabbit policlonal sc-23759 (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA)	1:200

Após a incubação com os anticorpos primários, cada membrana foi lavada com TBS-T por 5 minutos, 3 vezes, sob leve agitação. Procedeu-se, então, com o preparo da diluição do anticorpo secundário: solução TBS-T com 0,5% de leite desnatado mais a diluição desejada do anticorpo. As membranas foram incubadas com esta solução, por 1 hora, sob leve agitação abrigo da luz. A descrição e diluição do anticorpo secundário utilizado estão demonstradas na tabela 3.3. Após este tempo, as membranas foram novamente lavadas 3 vezes por 5 minutos sob leve agitação.

**Tabela 3.3:** Anticorpo secundário utilizado no ensaio de Western Blotting e sua diluição.

<b>Anticorpo secundário</b>	<b>Diluição utilizada</b>
IRDye® 680LT Goat anti-Rabbit (LI-Cor Biosciences, NE, EUA)	1:10000

A revelação foi realizada pelo aparelho Odyssey (LI-COR Biosciences, NE, EUA) com o software Image Studio™ Lite, com a detecção da fluorescência do anticorpo secundário pelo aparelho. A quantificação foi feita utilizando-se o software Quantity One® (Bio-Rad, CA, EUA), através do cálculo de densidade das bandas, sendo o resultado da quantificação das bandas expresso em intensidade de pixel por área (mm<sup>2</sup>).

### **3.5.3 Ensaio de Proliferação com marcação para BrDU**

As células das linhagens MCF-7 e MCF-7 PAR1+ foram distribuídas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> na concentração de  $1 \times 10^6$  células e incubadas com meio de cultura RPMI com 10% de soro fetal bovino em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, depois de aderidas, foram incubadas com meio RPMI sem soro fetal bovino por 18 horas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, as células foram incubadas com 5-bromo-2'-deoxiuridina 10 µM (BrDU) (Sigma-Aldrich®, MO, EUA), procedendo-se da incubação com o agonista e o antagonista a partir da divisão dos 3 grupos já citados. As células permaneceram em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e os tempos de coleta foram de 24h e 48h. As células controle e as cultivadas na presença do agonista e do antagonista foram recuperadas, contadas e distribuídas em tubos de poliestireno a uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/tubo. Após esta etapa, foram fixadas com 150 µL de paraformaldeído a 2% por 15 minutos e depois permeabilizadas com 800 µL de solução de permeabilização: PBS 1X com 0,5% de saponina. Foi realizada uma centrifugação por 5 minutos a 1500 RPM e, após outro processo de lavagem com a solução de permeabilização, seguiu-se de outra centrifugação sendo, em seguida, descartado o sobrenadante, e o sedimento incubado com 20 µL de Anti-

BrdU/DNAse (BrdU-FITC/DNAse) (BD-Biosciences, NJ, EUA) por 1 hora a 37°C. Após este período, as células foram reconstituídas em 200 µL da solução de permeabilização e centrifugadas novamente a 1500 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram reconstituídas em 150 µL de paraformaldeído a 2%, para posterior leitura no citômetro LSR Fortessa (BD-Biosciences, NJ, EUA). As análises foram realizadas com auxílio do programa FlowJo 10.0 (Tree star). Para as análises, foi construído um gráfico do tipo dot plot tamanho x granulosidade (FSC x SSC), onde um *gate* foi desenhado para a seleção da população de células e exclusão dos *debris*. A partir deste *gate*, foram construídos dot plots BrdU-FITC+ x tamanho, onde foi posicionado o quadrante a partir da população de células marcadas com o isotipo, considerado como controle negativo para a marcação. Os percentuais obtidos foram utilizados para a construção do gráfico.

#### 3.5.4 Expressão Gênica

Para a avaliação da expressão gênica dos fatores de malignidade e invasividade nas linhagens MCF-7 e MCF-7 PAR+ tratadas ou não com o agonista e antagonista, foi utilizada a metodologia de RT-qPCR com o sistema SYBR Green. As células das linhagens MCF-7 e MCF-7 PAR1+ foram distribuídas em garrafas de cultura de células de 25 cm<sup>2</sup> a uma concentração de 1 x 10<sup>6</sup> células/garrafa. No dia seguinte, com as células aderidas, o meio de cultura RPMI contendo 10% de soro fetal bovino foi retirado de cada garrafa, sendo adicionado, às mesmas, meio de cultura RPMI sem soro fetal bovino, deixando as células em um estado denominado período de *starving*, com duração de 18h. Após este período, as células foram lavadas com 1 mL de PBS 1X (*Phosphate buffer saline*). Após a lavagem, adicionou-se 1 mL de Trizol em cada garrafa.

O processo de extração de RNA e obtenção de cDNA seguiu de acordo com os itens 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente. Cada amostra então foi amplificada contendo uma mistura de 10 µM de cada par de iniciador (fatores analisados: IL-8, VEGF e MMP-2), utilizando 5 µL de QuantTect SYBR Green PCR Master Mix, 5 ng de cada cDNA e água livre de RNase e DNase para um volume final de 10

$\mu$ L. As amplificações foram feitas no sistema RT-qPCR ViiA 7 (Applied Biosystems®, CA, EUA), nas condições: 95° C por 15 minutos, 40 ciclos a 94° C por 15 segundos, 60° C por 30 segundos e 72° C por 30 segundos, para obtenção da curva de *melting* e ao final da reação, as amostras serão mantidas a 4° C. Na tabela 3.4 estão apresentadas as sequências de iniciadores utilizados neste trabalho. O gene constitutivo RPL13 foi utilizado como controle.

**Tabela 3.4:** Sequência de iniciadores utilizados para expressão gênica de citocinas por RT-qPCR.

Iniciador	Sequência Senso	Sequência Anti-Senso
<b>IL-8</b>	AGCACACAAGCTTCTAGGAC	GCAAAACTGCACCTTCACA
<b>VEGF</b>	TTCTTCTCTGTGGCGTGTTTC	TTTGCTTGCATAAGCCGTGG
<b>MMP-2</b>	CTACGATGGAGGCGCTAATGG	AGGTATTGCACTGCCAACTCTTT
<b>RPL13</b>	GACAAGAAAAGCGGATGGT	GTA CTTCCAGCCAACCTCGT

Os resultados de CT para cada gene pesquisado foram descontados do CT obtido para o gene constitutivo (RPL13) de cada amostra. Este resultado foi subtraído do CT da amostra considerada calibrador (MCF-7 controle sem tratamento). O resultado foi utilizado como expoente na operação  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Foram obtidos, assim, os índices de expressão relativa, utilizados para a construção dos gráficos.

### 3.5.5 Ensaio de microarranjo líquido para dosagem de IL-8 no sobrenadante celular

Para a quantificação da citocina IL-8, um importante fator indicativo de malignidade secretado pelas células tumorais, foi realizado o ensaio de microarranjo líquido baseado em microesferas conjugadas a anticorpos específicos Human High Sensitivity Luminex Performance Assay-Luminex® (R&D Systems, MN, EUA).

As células foram cultivadas na presença ou ausência do agonista e antagonista da mesma maneira como foi descrito nos itens anteriores, sob os tempos de 24 horas e 48 horas. Os sobrenadantes destas células foram

coletados em cada tempo, distribuídos em tubos de poliestireno e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da dosagem.

A diluição do padrão para a construção da curva padrão foi realizada com as concentrações mostradas no esquema da tabela 3.5.

**Tabela 3.5:** Demonstração esquemática da diluição da curva padrão.



Estoque ( $\mu\text{l}$ )	128	50	50	50	50	50	50	50
Meio diluente ( $\mu\text{l}$ )	72	150	150	150	150	150	150	150

Como controle positivo, foram utilizadas amostras do próprio kit, diluídas 1:10 em PBS 1x. Antes de serem incubadas, as microesferas já acopladas ao anticorpo de captura foram homogeneizadas, seguindo o processo de 5 segundos no vortex e 5 segundos no sonicador, por duas vezes. As microesferas foram diluídas em uma concentração de 1:25 e foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  desta diluição por poço em uma microplaca de 96 poços e fundo chato. Da mesma maneira, 50  $\mu\text{L}$  de controle positivo e 50  $\mu\text{L}$  de amostra foram colocados nos poços determinados, em duplicata. A placa foi selada com fita adesiva e incubada por 30 minutos à  $37^{\circ}\text{C}$  sob agitação de 600 RPM, ao abrigo de luz. Após este tempo, a placa foi lavada duas vezes na lavadora de placas (Tecan, Suíça), com 100  $\mu\text{L}$  tampão de lavagem.

Após a lavagem, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  do anticorpo biotilado em todos os poços. A placa foi novamente selada com fita adesiva e incubada por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  sob agitação de 600 RPM, ao abrigo de luz. Após este tempo, a placa foi lavada duas vezes na lavadora de placas (Tecan, Suíça), com 100  $\mu\text{L}$  tampão de lavagem.

A estreptavidina conjugada ao fluorocromo ficoeritrina (PE) foi diluída na concentração de 1:100 e sendo adicionados 50  $\mu\text{L}$  desta diluição em todos os

poços da placa, sendo a mesma novamente selada com fita adesiva e incubada por 10 minutos a 37°C sob agitação de 600 RPM, ao abrigo de luz. Após este tempo, a placa foi lavada novamente duas vezes na lavadora de placas (Tecan, Suíça), com 100 µL tampão de lavagem.

Terminada a lavagem, foram adicionados 100 µL de tampão de ensaio em todos os poços da placa, ressuspensando sempre as amostras. A leitura da placa foi realizada no equipamento MAGPIX™ (Luminex Corp, Austin, TX, EUA). Os níveis de cada fator em intensidade média de fluorescência (MFI) foram determinados pelo leitor. A concentração de cada analito foi calculada frente à respectiva curva-padrão em pg/ml utilizando-se o software do fabricante (xPONENT® v3.1 software).

### **3.6 Análise estatística**

Os resultados das quantificações das bandas (*western blotting*), dos ensaios de proliferação com BrDU e do microarranjo líquido para a quantificação da produção de IL-8 foram submetidos à análise de variância pelo teste *two way* ANOVA com pós teste Bonferroni (\*  $p \leq 0,05$ ), utilizando o programa *GraphPad Prisma* (GraphPad Software Inc., CA, EUA). Comparou-se os grupos MCF-7 selvagem x MCF-7 PAR1+ em todos os tratamentos.

## **4. Resultados**

### **4.1 Expressão do receptor PAR1**

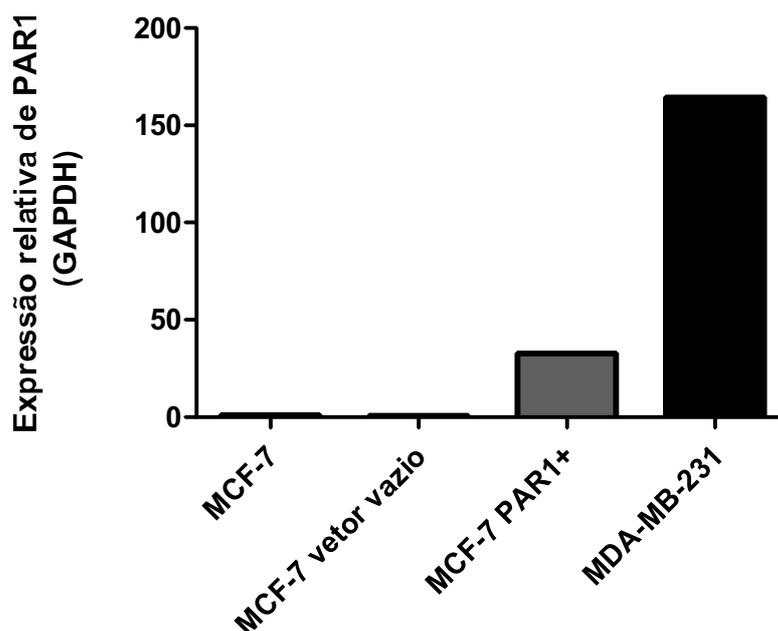
#### **4.1.1 Expressão do receptor PAR1 por RT-qPCR**

A primeira análise para avaliar a expressão do receptor PAR1 nas células transfectadas em relação à linhagem MCF-7 selvagem, foi feita por RT-qPCR. Nesta análise, também foi utilizada uma linhagem de carcinoma mamário humano altamente invasiva que expressa altos níveis deste receptor, a MDA-MB-231, a título de comparação.

Observou-se que a célula MCF-7 PAR1+ expressou cerca de 50 vezes mais o receptor PAR1 do que a célula MCF-7. Já em relação à célula MDA-MB-231, foi possível observar que MCF-7 PAR1+ expressou PAR1 cerca de 100 vezes menos (figura 4.1).

Ainda que não seja possível observar valores estatisticamente significativos, foi possível observar que, de maneira relativa, a linhagem MCF-7 PAR1+ expressa mais o receptor do que a linhagem de origem, MCF-7.

Além disso, para este teste, foi utilizada também a célula contendo o vetor vazio, a fim de se fazer o controle do processo de transfecção, garantindo que a expressão do receptor foi dependente do gene inserido no vetor. Foi observado que, o nível de expressão desta célula com o vetor vazio se manteve igual à expressão de MCF-7, mostrando que a inserção plasmideal não interferiu na expressão de PAR1.



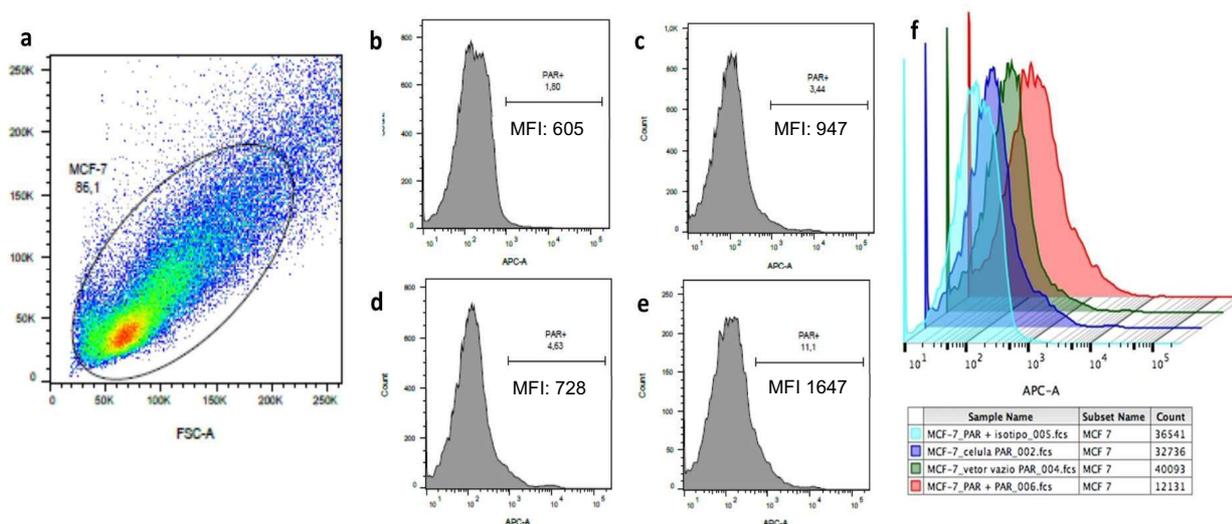
**Figura 4.1: Expressão do receptor PAR1 por RT-qPCR.** Método de comparação relativa entre as linhagens celulares tumorais de câncer de mama: MCF-7, MCF-7 contendo o vetor plasmideal vazio, MCF-7 PAR1+ e MDA-MB-231. Valores referentes a 1 experimento.

#### 4.1.2 Expressão do receptor PAR1 por citometria de fluxo

Para confirmar a expressão (fenótipo) do receptor PAR1 nas células MCF-7, MCF-7 vetor vazio e MCF-7 PAR1+, foi realizado o ensaio de citometria de fluxo através da marcação de superfície celular desta molécula. Como forma de comparação, foram utilizadas células sem marcação e também células marcadas com um anticorpo não relacionado, de mesmo isotipo (controle de isotipo). A figura 4.2, item **a**, mostra o *dot plot* relativo à morfologia das células, através do parâmetro tamanho x granulosidade. Os histogramas relativos à marcação com o fluorocromo APC estão representados na figura 4.2, itens **b**, **c**, **d** e **e**. O item **f** da figura 4.2 mostra a sobreposição dos picos.

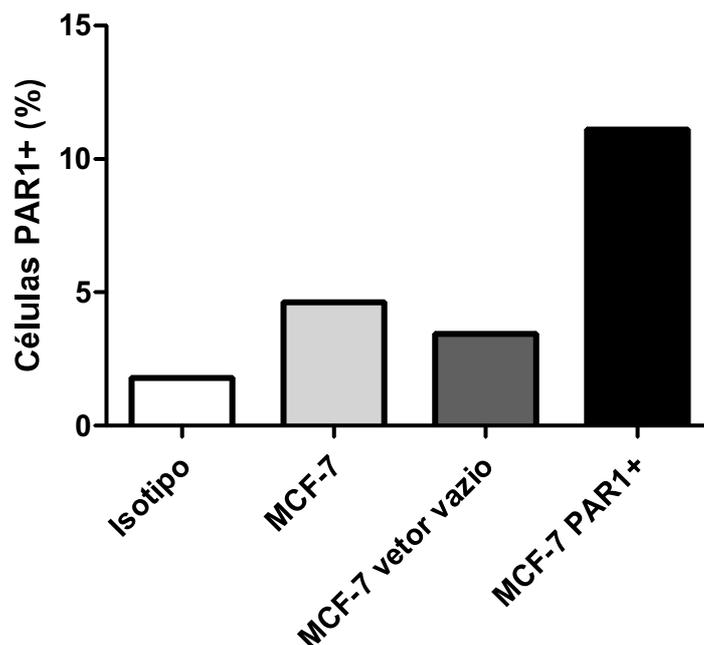
Quando os histogramas da linhagem MCF-7 (item **c** da figura 4.2 e pico azul escuro no item **f** da figura 4.2) foram comparados com os da linhagem MCF-7 PAR1+ (item **e** da figura 4.2 e pico vermelho no item **f** da figura 4.2), os das células contendo o vetor vazio (item **d** da figura 4.2 e pico verde no item **f**

da figura 4.2) e os das células com controle de isotipo (item **b** da figura 4.2 e pico azul claro no item **f** da figura 4.2), foi observado um deslocamento discreto do pico de marcação. Isso mostra que, ainda que em um nível baixo, a expressão do receptor PAR1 nas células MCF-7 PAR1+ foi maior quando comparada às células MCF-7 selvagem e com o vetor vazio, o que é demonstrado também através dos valores de intensidade média de fluorescência (MFI) mostrados em cada histograma da figura 4.2.



**Figura 4.2: Expressão do receptor PAR1 por citometria de fluxo.** O item **a** mostra o dot plot tamanho x granulosidade demonstrando a morfologia das células MCF-7; o item **b** mostra o histograma referente à fluorescência APC no controle de isotipo; o item **c** mostra o histograma referente à fluorescência APC nas células MCF-7 selvagens; o item **d** o histograma referente à fluorescência APC nas células incubadas contendo o vetor plasmidial vazio; o item **e** o histograma referente à fluorescência APC nas células MCF-7 PAR1+ e o item **f** mostra a sobreposição dos histogramas, com as células não marcadas representadas em azul escuro, as células com o vetor vazio representadas em verde, as células incubadas com o controle de isotipo representadas em azul claro e as células MCF-7 PAR1+ representadas em vermelho. Representativo de 1 experimento. MFI: Intensidade média de fluorescência.

Em seguida, a figura 4.3 mostra que na análise da expressão do receptor por citometria de fluxo, houve uma tendência no aumento da expressão de PAR1 nas células MCF-7 PAR1+ quando comparadas às células MCF-7 selvagem ou contendo o vetor vazio.



**Figura 4.3:** Percentual da expressão do receptor PAR1 nas células MCF-7, MCF-7 contendo o vetor vazio e MCF-7 PAR1+. A coluna branca representa a marcação com o controle de isotipo, a barra cinza claro representa a marcação na linhagem MCF-7, a coluna cinza escuro representa a marcação na linhagem MCF-7 contendo o vetor plasmidial vazio e a coluna preta representa a marcação nas células MCF-7 PAR1+. N = 1 experimento independente.

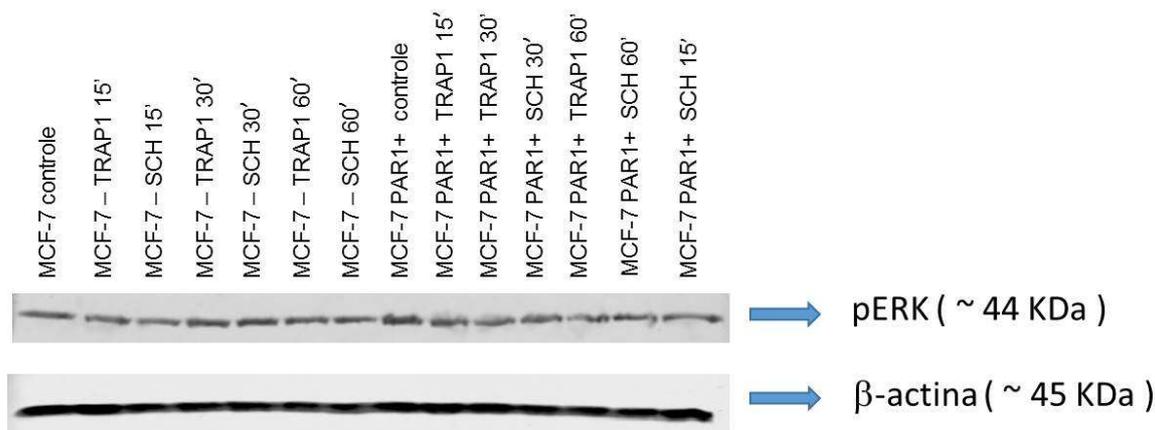
## 4.2 Ensaio funcionais de PAR1

### 4.2.1 A ativação de PAR1 e seu efeito na via de sinalização ERK

Para observar se o agonista de PAR1, TRAP1, e o antagonista de PAR1, SCH 79797, foram capazes de ativar e/ou inibir a via de sinalização ERK, foram realizadas cinéticas utilizando as moléculas TRAP1 e SCH 79797, nos tempos 15 minutos, 30 minutos e 60 minutos, nas células MCF-7 selvagem e MCF-7 PAR1+.

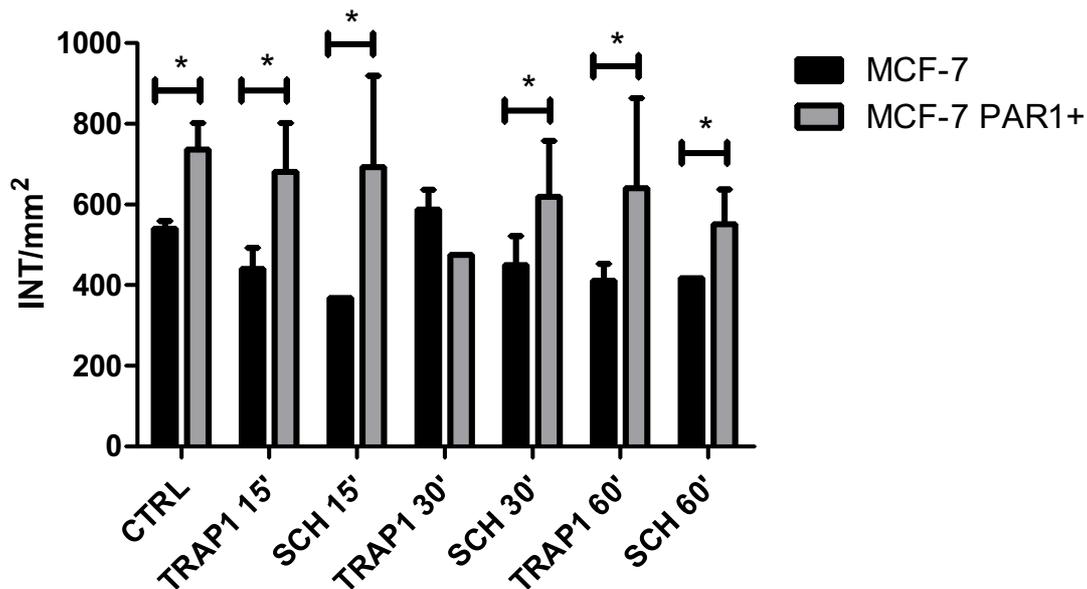
Para confirmar se houve ou não ativação da via, a quantidade de ERK fosforilado (pERK) foi avaliada através da técnica de *western blotting*.

A figura 4.4 mostra as bandas referentes à cinética de fosforilação de ERK e do controle positivo, a proteína estrutural  $\beta$ -actina.



**Figura 4.4: A cinética da fosforilação de ERK.** Representação das bandas de pERK, da esquerda para direita, as células MCF-7 selvagem e MCF-7 PAR1+ controles e incubadas com o agonista e antagonista nos diferentes tempos. N= 2 experimentos independentes.

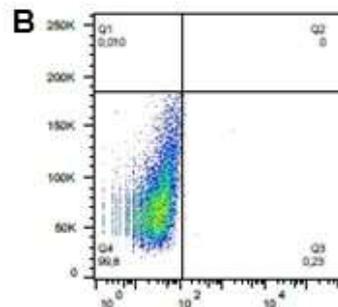
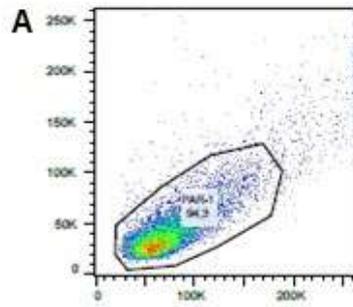
A figura 4.5 mostra a representação gráfica da quantificação da densidade das bandas feita pelo software Quantity One® (Bio-Rad, CA, EUA). O resultado foi obtido através do cálculo da intensidade de pixels de cada banda pela área da mesma ( $\text{mm}^2$ ). Nesta figura, foi observado que a fosforilação de ERK é cerca de 200 INT/ $\text{mm}^2$  maior quando as células MCF-7 PAR1+ controle são comparadas com as células MCF-7 controle e que em todos os tempos de incubação, a ativação de ERK foi significativamente maior em MCF-7 PAR1+ quando comparado à MCF-7 (\* $p \leq 0,05$ ). Em relação aos tratamentos, não foi observado nenhuma ativação maior relacionada ao agonista TRAP1, porém, houve uma tendência na redução de ativação da via de ERK nas células MCF-7 PAR1+ 60 minutos após a utilização do antagonista SCH 79797.



**Figura 4.5:** Representação gráfica da quantificação das bandas de *western blotting* das células MCF-7 e MCF-7 PAR1+. A ativação da via ERK foi demonstrada através da quantificação das bandas contendo proteína pERK. As colunas representam as células MCF-7 selvagem (preto) e MCF-7 PAR1+ (cinza), controles e após incubação com o agonista (TRAP1) e antagonista (SCH 79797) nos diferentes tempos. N= 2 experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  *two way* ANOVA pós teste Bonferroni, comparando os grupos MCF-7 selvagem e MCF-7 PAR1+.

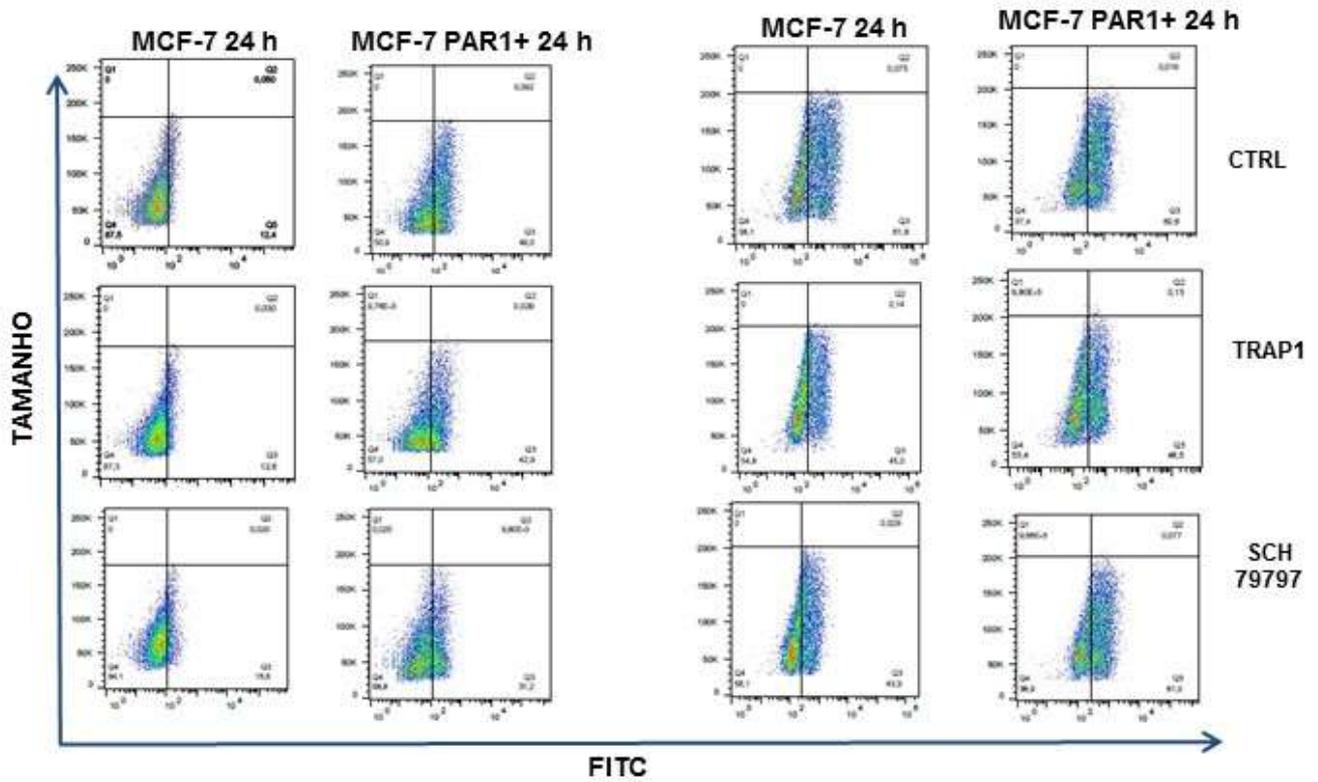
#### 4.2.2 Ensaio de proliferação celular utilizando BrDU

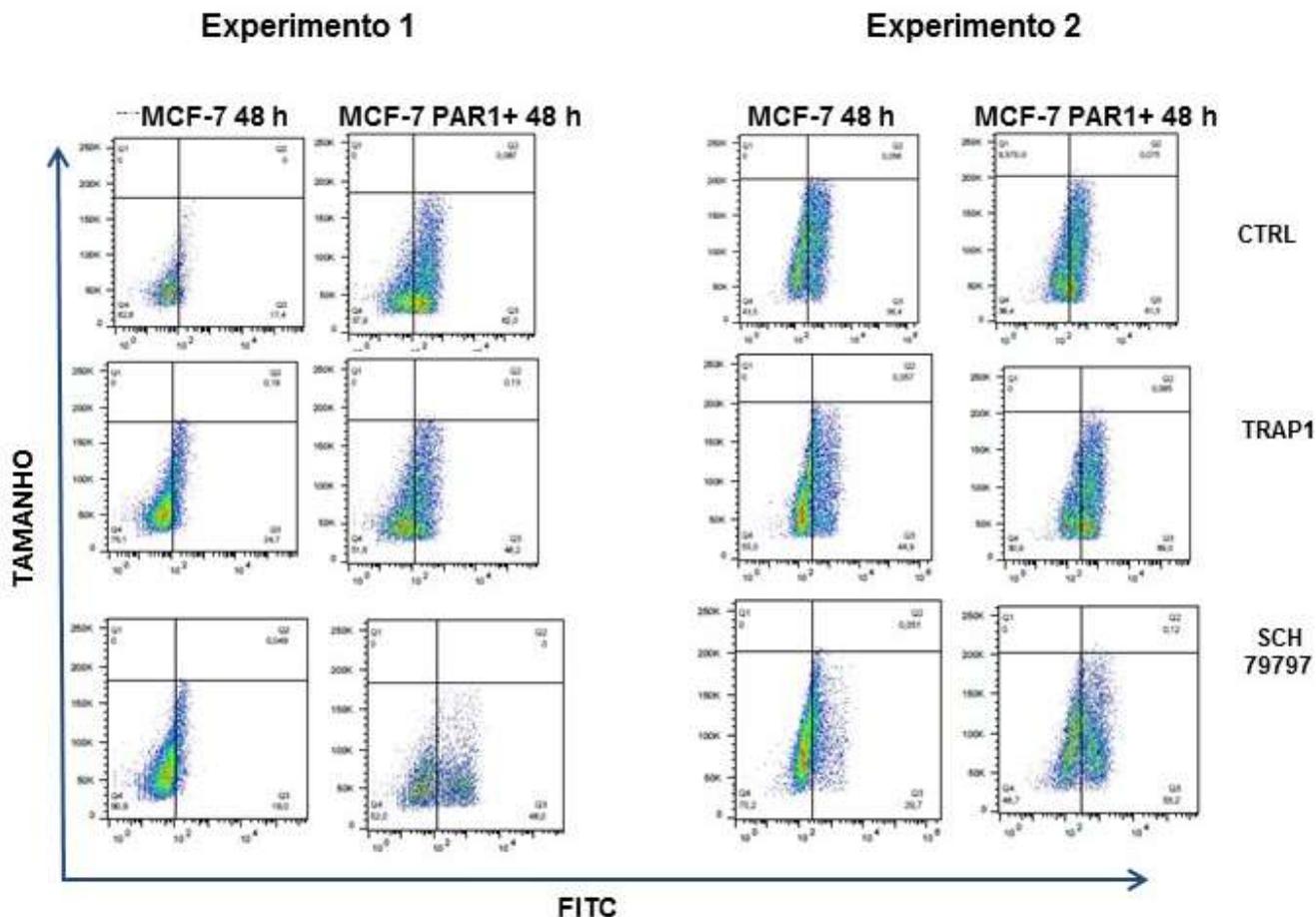
Com o objetivo de avaliar a capacidade das células tumorais MCF-7 e MCF-7 PAR1+ de proliferarem na presença do agonista de PAR1, TRAP1 e do antagonista deste receptor, SCH 79797, foi realizado o ensaio de proliferação utilizando o marcador 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrDU), que se incorpora ao DNA de células em divisão celular. A figura 4.6 mostra os gráficos representativos das análises da citometria de fluxo para as células MCF-7 e MCF-7 PAR1+, nos tempos 24 e 48 horas.



Experimento 1

Experimento 2

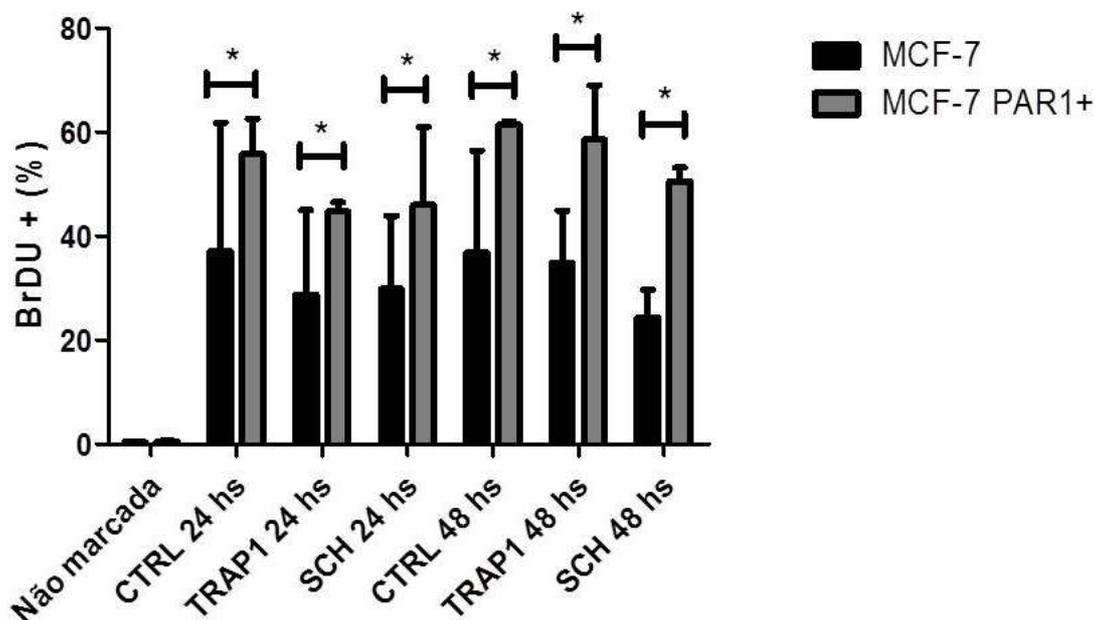




**Figura 4.6:** Painel representativo das análises da citometria de fluxo das células MCF-7 e MCF-7 PAR 1+ para avaliar a proliferação celular. O item A representa o dot plot tamanho x granulosidade das populações. O item B representa as células não marcadas utilizadas para o posicionamento dos quadrantes. Cada dot plot representa o percentual de células BrDU+ em cada condição e tempo testados, conforme indicado na figura. N de dois experimentos representados na figura.

A figura 4.7 demonstra o percentual de células que proliferaram, levando em consideração a incorporação de BrDU. Observou-se que existe diferença estatisticamente significativa entre as médias dos percentuais de células BrDU+ quando a linhagem MCF-7 PAR1+ foi comparada à linhagem MCF-7. No entanto, quando foi avaliado o efeito do agonista e antagonista, não houve diferença nos percentuais de células BrDU+ dos controles quando comparado às células incubadas com o agonista TRAP1. Em relação ao antagonista (SCH

79797), foi observado que, em ambos os tempos, há uma tendência à diminuição do percentual de proliferação celular.



**Figura 4.7: Percentual de células que proliferaram, através da análise de BrDU incorporado.** As colunas representam as células MCF-7 selvagem (preto) e MCF-7 PAR1+ (cinza), controles e após incubação com o agonista (TRAP1) e antagonista (SCH 79797) nos diferentes tempos. N= 2 experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  two way ANOVA pós teste Bonferroni, comparando os grupos MCF-7 selvagem e MCF-7 PAR1+.

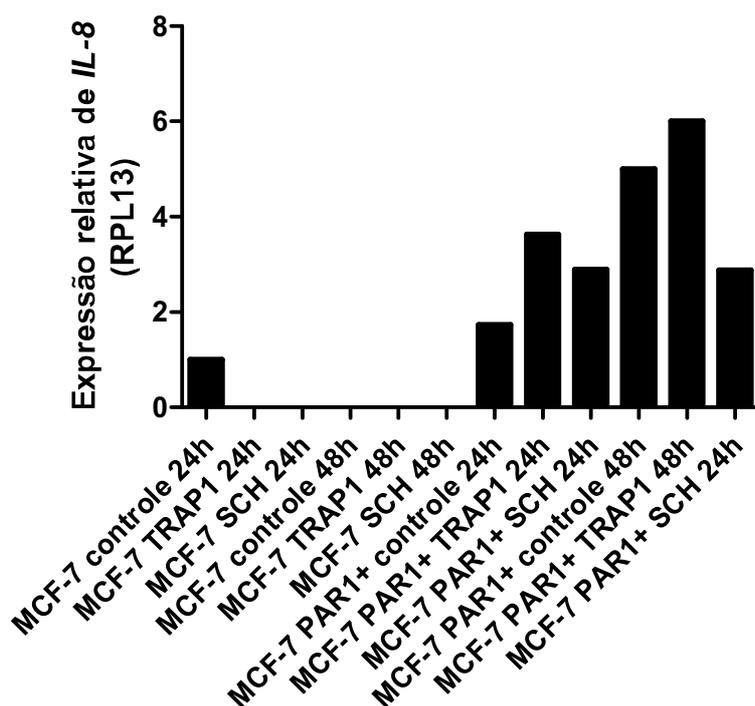
#### 4.2.3 Quantificação relativa de genes com atividade pró-tumoral *IL-8*, *VEGF* e *MMP-2*

A técnica de RT-qPCR foi utilizada para a avaliação da expressão gênica de fatores de malignidade associados ao câncer de mama. Para isso, além das células controle, avaliou-se tanto a linhagem MCF-7 quanto a linhagem MCF-7 PAR1+ incubadas com o agonista de PAR1, TRAP1, e com o antagonista deste receptor, SCH 79797, com tempos de incubação de 24h e 48h.

Nos ensaios de RT-qPCR, por ser um teste qualitativo e comparativo, ficou estabelecido como controle normalizador, os dados obtidos com as

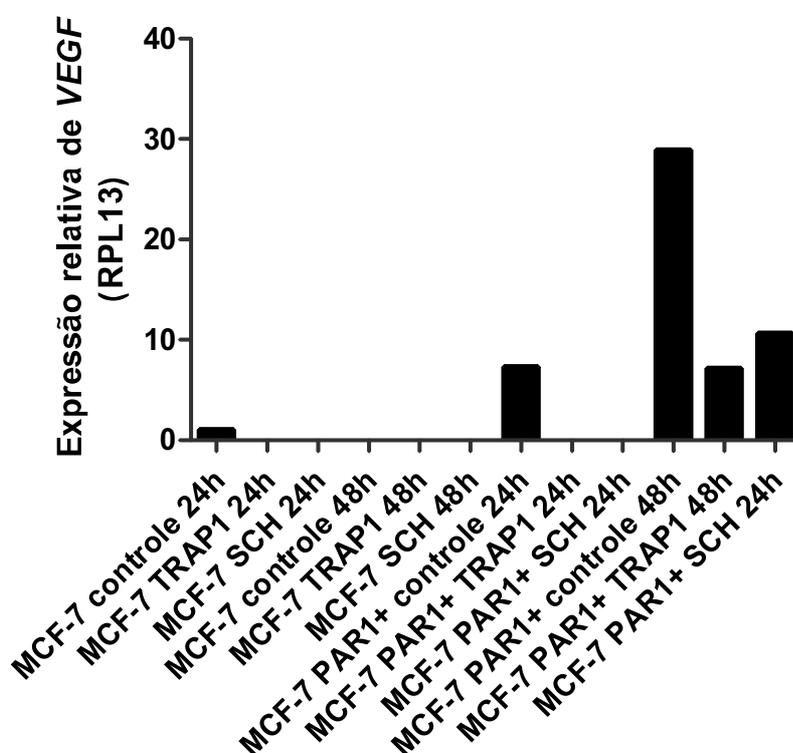
células MCF-7 controle sem tratamento, sendo estas, em todos os testes, consideradas como 1.

A figura 4.8 mostra a comparação da expressão do gene *IL-8* entre as duas linhagens. Foi observado que houve um ligeiro aumento na expressão das células controle MCF-7 PAR1+ quando comparado às células MCF-7. Na linhagem MCF-7 PAR1+ foi observado um aumento da expressão do gene *IL-8* quando as células foram incubadas com o agonista TRAP1 no tempo de 24h, ocorrendo uma diminuição quando estas células foram incubadas com SCH 79797. Porém, a expressão de *IL-8* pelas células após incubação com SCH 79797 não foi menor quando comparada à expressão pelas células controle. Já no tempo de 48h, a expressão de *IL-8* foi maior quando as células foram incubadas com TRAP1 e diminuíram quando incubadas com o antagonista, sendo neste caso, a expressão menor do que no controle.



**Figura 4.8:** Cinética de expressão do gene *IL-8* pelas células MCF-7 e MCF-7 PAR1+ por RT-qPCR. As colunas representam os resultados da expressão do gene da citocina IL-8 pelas células MCF7 e MCF7 PAR1+, tratadas e não tratadas com o agonista e antagonista em diferentes tempos de incubação. N=1 experimento independente.

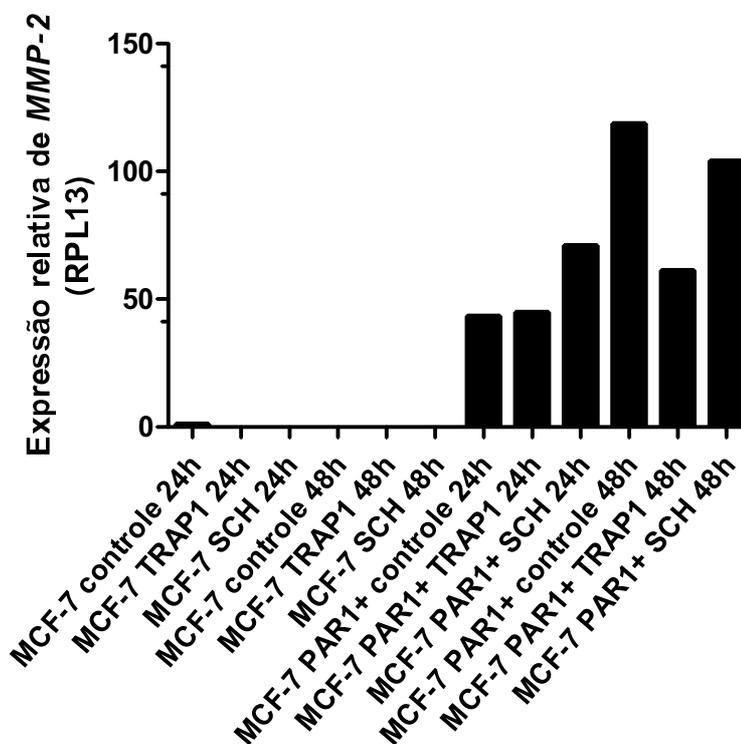
A figura 4.9 representa a comparação da expressão do gene *VEGF* entre as linhagens MCF-7 e MCF-7 PAR1+. Foi demonstrado que, em relação às células MCF-7 controle, houve um pequeno aumento da expressão de *VEGF* nas células MCF-7 PAR1+ no tempo de 24h e um aumento maior no tempo de 48h. Já em relação à incubação com o agonista e antagonista de PAR1, não houve, entre eles, diferença de expressão, sendo esta menor que a expressão das células controle.



**Figura 4.9: Cinética de expressão do gene *VEGF* pelas células MCF-7 e MCF-7 PAR1+ por RT-qPCR.** As colunas representam os resultados da expressão do gene *VEGF* pelas células MCF7 e MCF7 PAR1+, tratadas e não tratadas com o agonista e antagonista em diferentes tempos de incubação. N=1 experimento independente.

A figura 4.10 mostra o resultado da avaliação da expressão de *MMP-2* comparando as duas linhagens. Foi observado um aumento de cerca de 50 vezes no nível de expressão pelas células MCF-7 PAR1+ controle no tempo de

24h, em relação às células MCF-7 controle. Não houve nenhum efeito ativador do agonista TRAP1 e nem inibidor do antagonista SCH 79797 para o gene pró-angiogênico *MMP-2*.

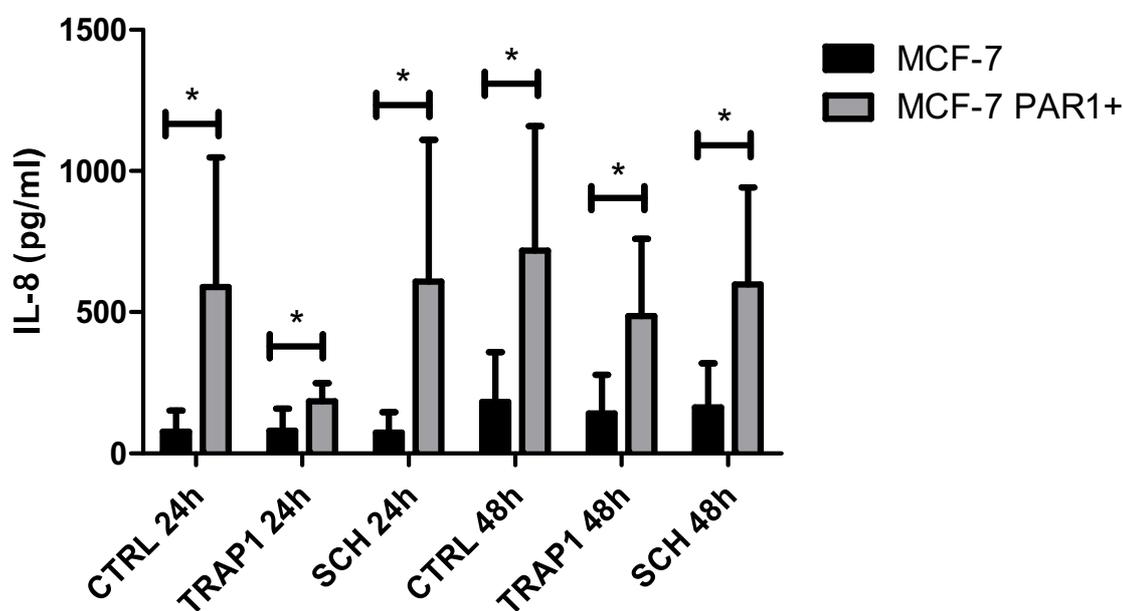


**Figura 4.10:** Cinética de expressão do gene *MMP-2* pelas células MCF-7 e MCF-7 PAR1+ por RT-qPCR. As colunas representam os resultados da expressão do gene *MMP-2* pelas células MCF7 e MCF7 PAR1+, tratadas e não tratadas com o agonista e antagonista em diferentes tempos de incubação. N=1 experimento independente.

#### 4.2.4 Dosagem de IL-8 no sobrenadante celular por microarranjo líquido

Após a avaliação da expressão gênica do gene da citocina IL-8 nas células MCF-7 e MCF-7 PAR1+, foi investigado a produção desta citocina no sobrenadante de cada linhagem celular. O teste foi realizado com os sobrenadantes recuperados das linhagens celulares utilizadas para extrair o RNA no ensaio de RT-qPCR, ou seja, com os grupos controle e grupos com células incubadas com o agonista de PAR1 ou o antagonista deste receptor de cada linhagem celular.

A figura 4.11, mostra que houve um aumento significativo no nível de IL-8 no sobrenadante das células MCF-7 PAR1+ quando comparado às células MCF-7 controle, em todos os tratamentos e tempos observados. Porém, ainda que tenha ocorrido esta diferença entre as linhagens celulares, ao comparar as células incubadas com TRAP1 com as células controle das duas linhagens, foi observado que a concentração de IL-8 no sobrenadante das células incubadas com o agonista foi menor. Foi observada apenas uma ligeira diminuição nos níveis de IL-8 das células incubadas com SCH 79797 quando comparadas com o controle, no tempo de 48 horas.



**Figura 4.11: Dosagem de IL-8 no sobrenadante celular por microarranjo líquido.** As colunas representam as células MCF-7 selvagem (preto) e MCF-7 PAR1+ (cinza), controles e após incubação com o agonista (TRAP1) e antagonista (SCH 79797) nos diferentes tempos. Os dados gerados em intensidade média de fluorescência (MFI) foram calculados frente à respectiva curva-padrão e expressos em pg/mL utilizando-se o programa (xPONENT® v3.1 software). n = 3 experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  two way ANOVA pós teste Bonferroni, comparando os grupos MCF-7 selvagem e MCF-7PAR1+.

## 5. Discussão

O receptor ativado por protease 1 (PAR1) tem sido descrito como envolvido em processos invasivos e metastáticos de vários tipos de câncer (Burns e Thévenin 2015). Por exemplo, a presença de PAR1 já foi descrita em tumores de mama, cólon, pâncreas, próstata, melanoma e pulmão com os efeitos de crescimento tumoral, promoção da metástase, invasão e angiogênese (Nierodzik et al. 1992; Zain et al. 2000; Adams et al. 2015). Por este motivo, este receptor tem sido pesquisado como alvo terapêutico por diversos grupos, inclusive o nosso (Varki e Varki 2002; Jin et al. 2010; Teng et al. 2010; Lima e Monteiro 2013).

O presente estudo teve como objetivo estabelecer um modelo *in vitro* para avaliação do receptor PAR1 como alvo terapêutico no câncer de mama. Foi utilizado como modelo de estudo a célula MCF-7, descrita na literatura como uma célula que expressa baixos níveis dos receptores PAR2 e PAR4 e níveis baixíssimos do receptor PAR1 (Kamath et al. 2001).

Inicialmente, foi idealizado realizar uma comparação entre a célula selvagem e uma célula MCF-7 transfectada para expressar artificialmente o receptor PAR1. Os resultados por RT-qPCR demonstraram que a expressão de PAR1 nas células MCF-7 PAR1+ é 50 vezes maior quando comparado à expressão deste receptor nas células MCF-7 selvagem. Já em relação aos testes realizados por citometria de fluxo, foi observado que, embora discreto, houve um deslocamento do pico de expressão de PAR1 na análise realizada. Apesar do número de reproduções dos experimentos ter sido baixo, tanto para o RT-qPCR, quanto para a citometria de fluxo, conseguimos demonstrar que a célula transfectada apresentou maior expressão do receptor PAR1.

Após ter sido demonstrado as diferenças na expressão do receptor PAR1 nas duas linhagens celulares estudadas, foi avaliada a ativação do receptor PAR1 na superfície da célula e seu consequente desdobramento em efeitos intracelulares, como o aumento da fosforilação de ERK. Quando as células MCF-7 controle foram comparadas com as da linhagem transformada MCF-7 PAR1+, foi possível observar maior quantidade de ERK fosforilado (pERK) nestas últimas, demonstrando que as células transformadas foram capazes de ativar com mais intensidade esta via pró-tumoral. É provável que este resultado seja observado porque, de fato, as células MCF-7 PAR1+ expressam o receptor PAR1 em maior quantidade, comparado às células MCF-7. A fosforilação de ERK é um importante indicador da ativação de PAR1, pois, já foi demonstrado que, ao ser ativado, PAR1 se acopla à proteína G, ativando a via ERK (Soh e Trejo 2011). Esta via de sinalização desempenha um papel direto no desenvolvimento de um fenótipo pró-inflamatório, aumentando a capacidade invasiva das células tumorais (Garrido et al. 2017).

Em acordo com o que foi observado para a fosforilação de ERK, os resultados também indicaram um aumento da capacidade proliferativa da célula MCF-7 PAR1+ mensurado através da técnica de incorporação de BrDU. A marcação de BrDU como análogo da timidina caracterizado pela incorporação desta molécula ao DNA da célula em divisão, vem sendo utilizada para avaliar a proliferação celular em diversos modelos, como por exemplo, câncer de cólon e fibroblastos para o tratamento de glaucoma (Kim et al. 2017; Stahnke et al. 2017; Tischlerova et al. 2017).

Apesar de ter sido observado uma tendência na condição proliferativa maior das células MCF-7 PAR1+ em relação às células MCF-7, o número de experimentos independentes deve ser aumentado para que seja obtido resultados mais robustos que demonstrem valores estatisticamente significativos. Ainda que estes dados não tenham apresentado significância estatística, nossas observações mostraram estar de acordo com os resultados relatados em um outro estudo envolvendo as células MCF-7 transfectadas com PAR1. Os autores mostraram que em ensaios de formação de tumores em camundongos *nude*, a capacidade de proliferação das células PAR1 + também foi aumentada (Boire et al. 2005).

Conforme descrito anteriormente, a ativação de PAR e, conseqüentemente, a fosforilação de ERK desencadearam eventos pró-inflamatórios e de aumento na malignidade das células tumorais. Para definir a malignidade da célula tumoral, diversos marcadores podem ser utilizados. A IL-8, por exemplo, tem sido descrita como um importantíssimo fator pró-tumoral no câncer de mama. Esta citocina já foi demonstrada como sendo um fator regulador de células tronco tumorais, descritas pela primeira vez no câncer de mama, como sendo aquelas capazes de iniciar as massas tumorais (Dontu et al. 2003; Charafe-Jauffret et al. 2009; Singh et al. 2013). Da mesma maneira, a IL-8 também tem importante papel, não só na iniciação, mas também na progressão tumoral, conforme demonstrado em modelos de melanoma, carcinoma hepatocelular, câncer gástrico e de próstata (Gabellini et al. 2009; Jiang et al. 2016; Chung e Lim 2017; Setty Balakrishnan et al. 2017).

Desta maneira, corroborando o papel pró-tumoral da ativação do receptor PAR1, neste estudo foi observado que houve um aumento na expressão e na secreção de IL-8 pelas células MCF-7 PAR-1+ em relação às células MCF-7 selvagens. De fato, as células MCF-7 foram descritas como baixas produtoras de IL-8 (Freund et al. 2003), conforme foi observado nos experimentos, tanto no RT-qPCR como na dosagem dos sobrenadantes por microarranjo líquido.

Outros fatores, como o VEGF e a MMP-2, são também relevantes na progressão dos tumores, de uma maneira geral, e poderiam sofrer alteração pela ativação do PAR1.

O VEGF é um potente peptídeo angiogênico com ação no desenvolvimento de células tronco hematopoiéticas, na remodelação da matriz extracelular e na regeneração de citocinas inflamatórias. É um fator de crescimento e permeabilidade vascular e, assim como a IL-8, está superexpresso em células tumorais e está associado a um mau prognóstico (Pradeep et al. 2005; Tan et al. 2014). Além disso, a ativação de seus receptores está implicada em diversas outras patologias que não o câncer, como doenças inflamatórias como a artrite reumatoide, psoríase, hipertiróidismo e aterosclerose (Alitalo e Carmeliet 2002).

Um estudo realizado por Zhang et al mostrou que, ao se transfectar um gene que codifica VEGF em células MCF-7, os tumores formados pela célula transformada eram mais vascularizados do que àqueles formados pela célula selvagem, mostrando o papel fundamental desse fator em eventos angiogênicos tumorais (Zhang et al. 1995). Outro estudo demonstrou que VEGF é expresso quando há ativação de PAR1 (Liu et al. 2006), o que corrobora com o resultado deste estudo onde foi possível observar que as células MCF-7 PAR1+ controle expressam mais VEGF do que as células MCF-7, principalmente, quando foi avaliado o tempo de 48h.

As metaloproteinases de matriz (MMP) são enzimas proteolíticas que agem degradando componentes da membrana basal. Elas encontram-se expressas em diversos tumores malignos e a expressão destas enzimas é de fundamental importância para o fenótipo maligno e metastático das células de câncer, uma vez que essas enzimas são capazes de degradar a matriz celular, promovendo a penetração destas células na membrana basal, propiciando a invasão e metástase tumoral (Cheng et al. 2017).

A detecção de MMP-2 é considerada um indicador muito sensível de metástase de câncer. A degradação da rede celular estabelecida por moléculas de adesão, como a E-caderina aumenta a metástase e correlaciona-se com a sobrevida reduzida em pacientes com carcinoma primário de mama. Um baixo nível de MMP-2 está ligado ao prognóstico favorável em pacientes com tumores de mama associados a alto risco. Além disso, este fator desempenha um papel fundamental na migração celular de outros tipos de câncer, como o câncer gástrico, pancreático e de próstata (Jezierska e Motyl 2009). Apesar de preliminares, nossos dados indicaram um aumento na expressão de MMP-2 na célula MCF-7 transfectada, estando, portanto, em acordo com dados encontrados na literatura.

Todos os testes realizados por RT-qPCR neste trabalho podem ser melhorados, tendo como abordagem o aprimoramento e ajuste do protocolo empregado, através de avaliações de diferentes reagentes SYBR Green, monitoramento da qualidade da extração do RNA total e da síntese de cDNA, uso de outros iniciadores de genes constitutivos, além de diferentes volumes de

reação, concentração e volume dos iniciadores e distintos números de ciclagens térmicas, escolhendo as opções que melhor se adequarem ao nosso modelo. Os genes constitutivos utilizados podem não ter sido os mais adequados para o nosso ensaio e outros poderão ser testados. Além disso, será necessário incluir, tanto para os testes de expressão gênica por RT-qPCR, quanto para microarranjo líquido, a pesquisa de outros fatores pró-tumorais relevantes, como IL-1 $\beta$ , MMP-1, MMP-9 e TGF- $\beta$ . (Boire et al. 2005; Tilli et al. 2016; Melzer et al. 2017; Mon et al. 2017; Wang e Yin 2017; Webb et al. 2017).

Um segundo objetivo deste trabalho foi observar os efeitos de um agonista do receptor PAR-1, o peptídeo TRAP1, e de um antagonista sintético, o SCH 79797. Porém, não foi possível observar nenhum efeito do agonista neste estudo, ao contrário do que foi observado no estudo de Lin et al., o agonista SFLLRN-NH<sub>2</sub>, o mesmo utilizado no nosso estudo, promoveu um aumento na secreção na citocina pró-tumoral IL-8 (Lin et al. 2006). Uma das razões de não ter sido observado o aumento na produção de IL-8, pode ter sido pela dosagem do agonista utilizada, ou ainda, outros tempos de incubação deveriam ser avaliados.

Por outro lado, foi possível observar um efeito parcial do antagonista SCH 79797 neste estudo, nos testes de fosforilação de ERK, na proliferação por BrDU, nas expressões gênicas dos fatores IL-8 e VEGF e na secreção de IL-8 no sobrenadante celular. Apenas um trabalho anterior mostrou os efeitos deste inibidor em células tumorais. Os autores demonstraram um potente efeito antiproliferativo deste antagonista em linhagens de melanoma, fibroblatos e de rim de embriões humanos, o que está em acordo com os dados obtidos neste estudo (Di Serio et al. 2007). Um outro trabalho, realizado em células endoteliais, mostrou que o antagonista SCH 79797 foi capaz de inibir totalmente a via ERK, sendo esta uma das principais vias ativadas como consequência da ativação de PAR1 (Zania et al. 2006). No entanto, em nosso trabalho observamos apenas uma redução no tempo de 60 minutos nas células MCF-7 PAR1+. De uma maneira geral, os efeitos observados aqui foram bem menores do que os previamente descritos na literatura, o que pode ser explicado pela diferença nas doses de SCH 79797 utilizadas, bem como pela diferença do tipo de linhagem celular utilizada.

Nossos resultados, apesar de preliminares, apontam que o receptor PAR1 tem um papel no desenvolvimento dos tumores, uma vez que sua expressão em células transfectadas promove aumento dos indicadores de malignidade e invasividade, podendo ser utilizado para a obtenção de novas moléculas terapêuticas. Recentemente, um fármaco usado para tratamento de tumores, a doxyciclina, foi descrito como tendo o PAR1 também como alvo. O estudo demonstrou que a doxyciclina apresenta maior efeito anti-tumoral em células que expressam o receptor PAR1, mostrando que este receptor, de fato, é um alvo terapêutico importante (Zhong et al. 2017). Porém, da mesma maneira que o agonista, mais estudos e testes com concentrações distintas e testes de dose-resposta serão necessários para definir a ação deste inibidor e o perfil de resposta promovida por estas moléculas em células de linhagem de câncer de mama.

## 6. Conclusão

Neste estudo foi possível iniciar o estabelecimento de um modelo experimental *in vitro* para o estudo do receptor PAR1 como alvo terapêutico no câncer de mama, uma vez que foram demonstradas diferenças no comportamento das linhagens MCF-7 e MCF-7 PAR1+. No entanto, mais estudos deverão ser realizados para observar os efeitos do agonista e do antagonista de PAR1. Sendo assim, temos como conclusões deste estudo:

- Foi demonstrado a expressão do receptor PAR1, através de RT-qPCR e citometria de fluxo, na linhagem celular de câncer de mama MCF-7 e na linhagem celular MCF-7 PAR1+, onde se observou uma maior expressão do receptor na linhagem MCF-7 PAR1+;
- Foi observado, utilizando a técnica de *Western blotting*, a ativação da via ERK, mostrando que a linhagem MCF-7 PAR1+ promove uma maior ativação desta via, comparado à linhagem MCF-7 e que há uma ligeira inibição da fosforilação de ERK no tempo de 60 minutos de incubação com SCH 79797;
- Foi demonstrado uma maior capacidade proliferativa das células tumorais MCF-7 PAR1+, utilizando o marcador de proliferação BrDU em ensaios de citometria de fluxo, assim como uma tendência de inibição de proliferação causada pela incubação com SCH 79797;
- Houve uma tendência à maior expressão dos fatores de agressividade e invasividade pelas células MCF-7 PAR1+ em relação às células MCF-7 avaliadas por RT-qPCR e, somente para a IL-8, houve inibição causada pelo SCH 79797;
- Foi observado também uma maior secreção de IL-8 no sobrenadante das células MCF-7 PAR1+ avaliadas por microarranjo líquido.

Os resultados deste estudo apontam que melhorias e aprimoramento de algumas abordagens tornarão os dados mais robustos e com conclusões mais definidas.

Com base nessa perspectiva, serão realizados novos experimentos tendo como objetivo a avaliação das seguintes variáveis:

- Aumento do número de experimentos independentes em cada teste para avaliação estatística dos dados;
- Utilização de várias concentrações do agonista e do antagonista para avaliarmos a que melhor se aplica ao modelo proposto;
- Aprimoramento e monitoração dos testes de RT-qPCR;
- Avaliação de outros fatores pró-tumorais, além de marcadores de ciclo celular;
- Realização de ensaios de viabilidade celular;
- Realização de ensaios de migração em câmara de Boyden e de invasão em matrigel para avaliarmos a malignidade tumoral;
- Testar outras linhagens de câncer de mama e comparar as células transfectadas com PAR1 com células tumorais que naturalmente expressam este receptor.

## 7. Referências bibliográficas

Adams GN, Rosenfeldt L, Frederick M, Miller W, Waltz D, Kombrinck K, et al. **Colon Cancer Growth and Dissemination Relies upon Thrombin, Stromal PAR-1, and Fibrinogen**. *Cancer Res*. 1º de outubro de 2015;75(19):4235–43.

Alegre MM, Knowles MH, Robison RA, O'Neill KL. **Mechanics behind breast cancer prevention - focus on obesity, exercise and dietary fat**. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2013;14(4):2207–12.

Alitalo K, Carmeliet P. **Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease**. *Cancer Cell*. abril de 2002;1(3):219–27.

Allen MD, Jones LJ. **The role of inflammation in progression of breast cancer: Friend or foe? (Review)**. *Int J Oncol*. 1º de setembro de 2015;47(3):797–805.

Amendola LC, Vieira R. **A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama** [Internet]. 2005 [citado 19 de março de 2016]. Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/rbc/n\\_51/v04/pdf/revisao3.pdf](http://www1.inca.gov.br/rbc/n_51/v04/pdf/revisao3.pdf)

American Cancer Society. **Breast Cancer** [Internet]. 2014 [citado 19 de março de 2016]. Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003090-pdf.pdf>

ATCC. MCF7 ATCC® HTB-22™ [Internet]. **American Type Culture Collection**. 2016 [citado 1º de maio de 2017]. Disponível em: <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx>

ATCC. **MDA-MB-231 ATCC® HTB-26™** [Internet]. 2017 [citado 16 de agosto de 2017]. Disponível em: <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx>

Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A. **PAR1 Is a Matrix Metalloprotease-1 Receptor that Promotes Invasion and Tumorigenesis of Breast Cancer Cells**. *Cell*. 11 de fevereiro de 2005;120(3):303–13.

Burns KE, Thévenin D. **Down-Regulation of PAR1 Activity with a pHLIP-based Allosteric Antagonist Induces Cancer Cell Death**. *Biochem J*. 15 de dezembro de 2015;472(3):287–95.

Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P, et al. **Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature.** *Cancer Res.* 15 de fevereiro de 2009;69(4):1302–13.

Chen J-Q, Russo J. **ER $\alpha$ -Negative and Triple Negative Breast Cancer: Molecular Features and Potential Therapeutic Approaches.** *Biochim Biophys Acta.* dezembro de 2009;1796(2):162–75.

Cheng T-C, Din Z-H, Su J-H, Wu Y-J, Liu C-I. **Sinulariolide Suppresses Cell Migration and Invasion by Inhibiting Matrix Metalloproteinase-2/-9 and Urokinase through the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Human Bladder Cancer Cells.** *Mar Drugs.* 2 de agosto de 2017;15(8):238.

Chia S, Norris B, Speers C, Cheang M, Gilks B, Gown AM, et al. **Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers.** *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 de dezembro de 2008;26(35):5697–704.

Chung HW, Lim J-B. **High-mobility group box-1 contributes tumor angiogenesis under interleukin-8 mediation during gastric cancer progression.** *Cancer Sci.* agosto de 2017;108(8):1594–601.

Cibeira GH, Guaragna RM. **Lipídio: fator de risco e prevenção do câncer de mama.** *Rev Nutr.* fevereiro de 2006;19(1):65–75.

De Meis, LIMA L, NUNES P, MONTEIRO R, LOBO T. **Distúrbios da coagulação sanguínea no câncer.** In: *Bases Moleculares em Clínica Médica.* 1º ed São Paulo; 2010. p. 541–53.

Di Serio C, Pellerito S, Duarte M, Massi D, Naldini A, Cirino G, et al. **Protease-Activated Receptor 1-Selective Antagonist SCH79797 Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis by a Protease-Activated Receptor 1-Independent Mechanism.** *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 1º de julho de 2007;101(1):63–9.

Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. **Stem cells in normal breast development and breast cancer.** *Cell Prolif.* outubro de 2003;36 Suppl 1:59–72.

Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. **Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients.** *Breast Cancer Res BCR.* 2007;9(1):R6.

Elste AP, Petersen I. **Expression of proteinase-activated receptor 1-4 (PAR 1-4) in human cancer.** *J Mol Histol.* abril de 2010;41(2–3):89–99.

Espinoza-Sánchez NA, Chimal-Ramírez GK, Mantilla A, Fuentes-Pananá EM. **IL-1 $\beta$ , IL-8, and Matrix Metalloproteinases-1, -2, and -10 Are Enriched upon Monocyte–Breast Cancer Cell Cocultivation in a Matrigel-Based Three-Dimensional System.** *Front Immunol [Internet].* 8 de março de 2017 [citado 3 de

agosto de 2017];8. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5340783/>

Fackenthal JD, Olopade OI. **Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations**. *Nat Rev Cancer*. dezembro de 2007;7(12):937–48.

Fenga C. **Occupational exposure and risk of breast cancer**. *Biomed Rep*. março de 2016;4(3):282–92.

Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. **Triple-negative breast cancer**. *N Engl J Med*. 11 de novembro de 2010;363(20):1938–48.

Freund A, Chauveau C, Brouillet J-P, Lucas A, Lacroix M, Licznar A, et al. **IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor-negative status of breast cancer cells**. *Oncogene*. 16 de janeiro de 2003;22(2):256–65.

Fulawka L, Halon A. **Ki-67 evaluation in breast cancer: The daily diagnostic practice**. *Indian J Pathol Microbiol*. 4 de janeiro de 2017;60(2):177.

Gabellini C, Trisciuglio D, Desideri M, Candiloro A, Ragazzoni Y, Orlandi A, et al. **Functional activity of CXCL8 receptors, CXCR1 and CXCR2, on human malignant melanoma progression**. *Eur J Cancer*. 1º de setembro de 2009;45(14):2618–27.

Gao YT, Shu XO, Dai Q, Potter JD, Brinton LA, Wen W, et al. **Association of menstrual and reproductive factors with breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study**. *Int J Cancer*. 15 de julho de 2000;87(2):295–300.

García-López MT, Gutiérrez-Rodríguez M, Herranz R. **Thrombin-activated receptors: promising targets for cancer therapy?** *Curr Med Chem*. 2010;17(2):109–28.

Garrido P, Shalaby A, Walsh EM, Keane N, Webber M, Keane M, et al. **Impact of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression on triple negative breast cancer outcome and activation of EGFR and ERK signaling pathways**. *Oncotarget* [Internet]. 27 de julho de 2017 [citado 7 de agosto de 2017];5(0). Disponível em:  
[http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=19631&path\[\]=62719](http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=19631&path[]=62719)

Geyer F. **Tipos histológicos especiais de câncer de mama**. 2013;5.

Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J, et al. **Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011**. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. agosto de 2011;22(8):1736–47.

HAN N, JIN K, HE K, CAO J, TENG L. **Protease-activated receptors in cancer: A systematic review**. *Oncol Lett*. julho de 2011;2(4):599–608.

Hanahan D, Weinberg RA. **The Hallmarks of Cancer**. Cell. 7 de janeiro de 2000;100(1):57–70.

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

Hernández NA, Correa E, Avila EP, Vela TA, Pérez VM. **PAR1 is selectively over expressed in high grade breast cancer patients: a cohort study**. J Transl Med. 18 de junho de 2009;7:47.

Huang S-C. **Protease-activated receptor-1 (PAR1) and PAR2 but not PAR4 mediate relaxations in lower esophageal sphincter**. Regul Pept. 5 de julho de 2007;142(1):37–43.

IARC. **Pathology and genetics of tumours of the Breast and female genital organs**. 4<sup>o</sup> ed. Lyon, França; 2012.

INCA. INCA - **Dia Nacional de Combate ao Câncer | 2015** [Internet]. 2015 [citado 10 de julho de 2017]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>

INCA. **Como é o processo de Carcinogênese?** - INCA [Internet]. 2017a [citado 2 de julho de 2017]. Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=319](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319)

INCA. **Quimioterapia** - INCA [Internet]. 2017b [citado 18 de julho de 2017]. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=101](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101)

INCA. **Radioterapia** - INCA [Internet]. 2017c [citado 18 de julho de 2017]. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?ID=100](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=100)

Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Wu Zheng Y, Timmons C, et al. **Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans**. Nature. 3 de abril de 1997;386(6624):502–6.

Jezierska A, Motyl T. **Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review**. Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res. fevereiro de 2009;15(2):RA32-40.

Jiang G, Zhang L, Zhu Q, Bai D, Zhang C, Wang X. **CD146 promotes metastasis and predicts poor prognosis of hepatocellular carcinoma**. J Exp Clin Cancer Res CR. 29 de fevereiro de 2016;35:38.

Jin K, Shen Y, He K, Xu Z, Li G, Teng L. **Aflibercept (VEGF Trap): one more double-edged sword of anti-VEGF therapy for cancer?** Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex. agosto de 2010;12(8):526–32.

Kamath L, Meydani A, Foss F, Kuliopulos A. **Signaling from Protease-activated Receptor-1 Inhibits Migration and Invasion of Breast Cancer Cells**. Cancer Res. 1<sup>o</sup> de agosto de 2001;61(15):5933–40.

Kim E-K, Cho JH, Kim E, Kim YJ. **Ursodeoxycholic acid inhibits the proliferation of colon cancer cells by regulating oxidative stress and cancer stem-like cell growth.** PloS One. 2017;12(7):e0181183.

Lima LG, Monteiro RQ. **Activation of blood coagulation in cancer: implications for tumour progression.** Biosci Rep [Internet]. 4 de setembro de 2013 [citado 7 de agosto de 2017];33(5). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3763425/>

Lin C-H, Cheng H-W, Hsu M-J, Chen M-C, Lin C-C, Chen B-C. **c-Src Mediates Thrombin-Induced NF- $\kappa$ B Activation and IL-8/CXCL8 Expression in Lung Epithelial Cells.** J Immunol. 1º de setembro de 2006;177(5):3427–38.

Liu J, Schuff-Werner P, Steiner M. **Thrombin/thrombin receptor (PAR-1)-mediated induction of IL-8 and VEGF expression in prostate cancer cells.** Biochem Biophys Res Commun. 28 de abril de 2006;343(1):183–9.

Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. **Proteinase-activated receptors.** Pharmacol Rev. junho de 2001;53(2):245–82.

Makki J. **Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance.** Clin Med Insights Pathol. 21 de dezembro de 2015;8:23–31.

Melzer C, von der Ohe J, Hass R, Ungefroren H. **TGF- $\beta$ -Dependent Growth Arrest and Cell Migration in Benign and Malignant Breast Epithelial Cells Are Antagonistically Controlled by Rac1 and Rac1b.** Int J Mol Sci. 20 de julho de 2017;18(7).

Mirza H, Schmidt VA, Derian CK, Jesty J, Bahou WF. **Mitogenic responses mediated through the proteinase-activated receptor-2 are induced by expressed forms of mast cell alpha- or beta-tryptases.** Blood. 15 de novembro de 1997;90(10):3914–22.

Mon NN, Senga T, Ito S. **Interleukin-1 $\beta$  activates focal adhesion kinase and Src to induce matrix metalloproteinase-9 production and invasion of MCF-7 breast cancer cells.** Oncol Lett. fevereiro de 2017;13(2):955–60.

Morris DR, Ding Y, Ricks TK, Gullapalli A, Wolfe BL, Trejo J. **Protease-Activated Receptor-2 Is Essential for Factor VIIa and Xa-Induced Signaling, Migration, and Invasion of Breast Cancer Cells.** Cancer Res. 1º de janeiro de 2006;66(1):307–14.

Msolly A, Gharbi O, Ben Ahmed S. **Impact of menstrual and reproductive factors on breast cancer risk in Tunisia: a case-control study.** Med Oncol Northwood Lond Engl. março de 2013;30(1):480.

Nair N, Calle AS, Zahra MH, Prieto-Vila M, Oo AKK, Hurley L, et al. **A cancer stem cell model as the point of origin of cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment.** Sci Rep. 28 de julho de 2017;7(1):6838.

Nguyen CH, Senfter D, Basilio J, Holzner S, Stadler S, Krieger S, et al. **NF- $\kappa$ B contributes to MMP1 expression in breast cancer spheroids causing**

**paracrine PAR1 activation and disintegrations in the lymph endothelial barrier *in vitro*.** *Oncotarget*. 17 de novembro de 2015;6(36):39262–75.

Nierodzik MLR, Kajumo F, Karpatkin S. **Effect of Thrombin Treatment of Tumor Cells on Adhesion of Tumor Cells to Platelets in Vitro and Tumor Metastasis *in Vivo*.** *Cancer Res*. 15 de junho de 1992;52(12):3267–72.

Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J. **Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 de setembro de 1994;91(20):9208–12.

OPAS. **Policies and managerial guidelines for national cancer control programs.** *Rev Panam Salud Pública Pan Am J Public Health*. novembro de 2002;12(5):366–70.

Pradeep CR, Sunila ES, Kuttan G. **Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies.** *Integr Cancer Ther*. dezembro de 2005;4(4):315–21.

Riggs BL, Hartmann LC. **Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice.** *N Engl J Med*. 13 de fevereiro de 2003;348(7):618–29.

Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, et al. **Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer.** *N Engl J Med*. 20 de outubro de 2005;353(16):1673–84.

Scholzen T, Gerdes J. **The Ki-67 protein: from the known and the unknown.** *J Cell Physiol*. março de 2000;182(3):311–22.

Setty Balakrishnan A, Nathan AA, Kumar M, Ramamoorthy S, Ramia Mothilal SK. **Withania somnifera targets interleukin-8 and cyclooxygenase-2 in human prostate cancer progression.** *Prostate Int*. junho de 2017;5(2):75–83.

Sidhu TS, French SL, Hamilton JR. **Differential signaling by protease-activated receptors: implications for therapeutic targeting.** *Int J Mol Sci*. 11 de abril de 2014;15(4):6169–83.

Singh JK, Simões BM, Howell SJ, Farnie G, Clarke RB. **Recent advances reveal IL-8 signaling as a potential key to targeting breast cancer stem cells.** *Breast Cancer Res BCR*. 2013;15(4):210.

Soh UJK, Trejo J. **Activated protein C promotes protease-activated receptor-1 cytoprotective signaling through  $\beta$ -arrestin and dishevelled-2 scaffolds.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13 de dezembro de 2011;108(50):E1372-1380.

Stahnke T, Kowtharapu BS, Stachs O, Schmitz K-P, Wurm J, Wree A, et al. **Suppression of TGF- $\beta$  pathway by pirfenidone decreases extracellular matrix deposition in ocular fibroblasts *in vitro*.** *PLoS One*. 2017;12(2):e0172592.

Tan PHS, Chia SS, Toh SL, Goh JCH, Nathan SS. **The Dominant Role of IL-8 as an Angiogenic Driver in a Three-Dimensional Physiological Tumor Construct for Drug Testing.** *Tissue Eng Part A*. 1º de junho de 2014;20(11–12):1758–66.

Teng L, Zheng Y, Wang H. BRCA1/2 associated hereditary breast cancer. *J Zhejiang Univ Sci B*. fevereiro de 2008;9(2):85–9.

Teng L-S, Jin K-T, He K-F, Wang H-H, Cao J, Yu D-C. **Advances in combination of antiangiogenic agents targeting VEGF-binding and conventional chemotherapy and radiation for cancer treatment.** *J Chin Med Assoc JCMA*. junho de 2010;73(6):281–8.

Tilli TM, Castro C da S, Tuszynski JA, Carels N. **A strategy to identify housekeeping genes suitable for analysis in breast cancer diseases.** *BMC Genomics* [Internet]. 15 de agosto de 2016 [citado 18 de agosto de 2017];17. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4986254/>

Tischlerova V, Kello M, Budovska M, Mojzis J. **Indole phytoalexin derivatives induce mitochondrial-mediated apoptosis in human colorectal carcinoma cells.** *World J Gastroenterol*. 28 de junho de 2017;23(24):4341–53.

Varki NM, Varki A. **Heparin inhibition of selectin-mediated interactions during the hematogenous phase of carcinoma metastasis: rationale for clinical studies in humans.** *Semin Thromb Hemost*. fevereiro de 2002;28(1):53–66.

Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. **Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation.** *Cell*. 22 de março de 1991;64(6):1057–68.

Wang G, Yin T. **Rapamycin enhances the antiproliferative effect of transforming growth factor- $\beta$  on MCF-7 human breast cancer cells.** *Exp Ther Med*. julho de 2017;14(1):748–52.

Watnick RS. **The Role of the Tumor Microenvironment in Regulating Angiogenesis.** *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. dezembro de 2012 [citado 3 de agosto de 2017];2(12). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3543072/>

Webb AH, Gao BT, Goldsmith ZK, Irvine AS, Saleh N, Lee RP, et al. **Inhibition of MMP-2 and MMP-9 decreases cellular migration, and angiogenesis in vitro models of retinoblastoma.** *BMC Cancer* [Internet]. 20 de junho de 2017 [citado 8 de agosto de 2017];17. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5477686/>

WHO. WHO | **Cancer** [Internet]. 2017 [citado 1º de julho de 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>

Wojtukiewicz MZ, Hempel D, Sierko E, Tucker SC, Honn KV. **Protease-activated receptors (PARs)—biology and role in cancer invasion and metastasis.** *Cancer Metastasis Rev*. 2015;34:775–96.

Xu W, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, et al. **Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4**. Proc Natl Acad Sci U S A. 9 de junho de 1998;95(12):6642–6.

Yager JD. **Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation**. J Natl Cancer Inst Monogr. 2000;(27):67–73.

Yang E, Boire A, Agarwal A, Nguyen N, O’Callaghan K, Tu P, et al. **Blockade of PAR1 signaling with cell-penetrating pepducins inhibits Akt survival pathways in breast cancer cells and suppresses tumor survival and metastasis**. Cancer Res. 1º de agosto de 2009;69(15):6223–31.

Yu T, Di G. **Role of tumor microenvironment in triple-negative breast cancer and its prognostic significance**. Chin J Cancer Res. junho de 2017;29(3):237–52.

Zain J, Huang Y-Q, Feng X, Nierodzik ML, Li J-J, Karpatkin S. **Concentration-dependent dual effect of thrombin on impaired growth/apoptosis or mitogenesis in tumor cells: Presented at the 40th annual meeting of the American Society of Hematology, Miami, FL, December 1998**. Blood. 15 de maio de 2000;95(10):3133–8.

Zania P, Kritikou S, Flordellis CS, Maragoudakis ME, Tsopanoglou NE. **Blockade of Angiogenesis by Small Molecule Antagonists to Protease-Activated Receptor-1: Association with Endothelial Cell Growth Suppression and Induction of Apoptosis**. J Pharmacol Exp Ther. 1º de julho de 2006;318(1):246–54.

Zhang C, Srinivasan Y, Arlow DH, Fung JJ, Palmer D, Zheng Y, et al. **High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1**. Nature. 20 de dezembro de 2012;492(7429):387–92.

Zhang H-T, Craft P, Scott PAE, Ziche M, Weich HA, Harris AL, et al. **Enhancement of Tumor Growth and Vascular Density by Transfection of Vascular Endothelial Cell Growth Factor Into MCF–7 Human Breast Carcinoma Cells**. JNCI J Natl Cancer Inst. 1º de fevereiro de 1995;87(3):213–9.

Zhao P, Metcalf M, Bunnett NW. **Biased signaling of protease-activated receptors**. Front Endocrinol. 2014;5:67.

Zhong W, Chen S, Zhang Q, Xiao T, Qin Y, Gu J, et al. **Doxycycline directly targets PAR1 to suppress tumor progression**. Oncotarget. 7 de fevereiro de 2017;8(10):16829–42.

**Fact Sheets by Cancer** [Internet]. [citado 19 de março de 2016a]. Disponível em: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)

**O que é o câncer? - INCA** [Internet]. [citado 16 de março de 2016b]. Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)