

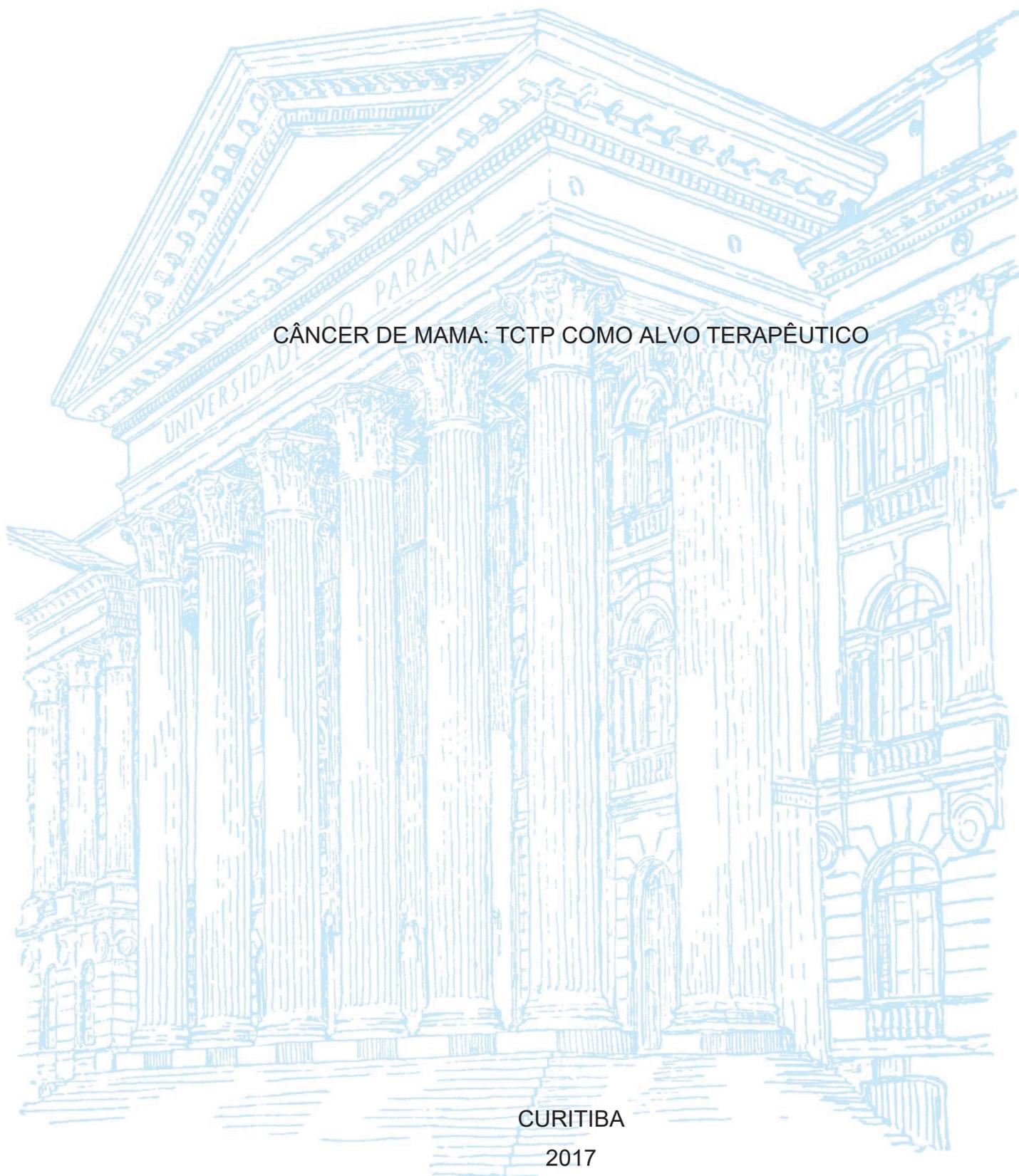
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANTONIELLE BEATRIZ BALDISSERA

CÂNCER DE MAMA: TCTP COMO ALVO TERAPÊUTICO

CURITIBA

2017



ANTONIELLE BEATRIZ BALDISSERA

CÂNCER DE MAMA: TCTP COMO ALVO TERAPÊUTICO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Senff Ribeiro

Coorientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Baldisserra, Antonielle Beatriz
Câncer de mama : TCP como alvo terapêutico. / Antonielle Beatriz
Baldissera. – Curitiba, 2017.
67 p.: il.

Orientador: Andrea Senff Ribeiro.
Coorientadora: Silvio Sanches Veiga.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular.

1. Mamas - Câncer. 2. Sertralina. I. Título. II. Ribeiro, Andrea Senff,
1977-. III. Veiga, Silvio Sanches, 1962-. IV. Universidade Federal do
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 616.99449

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Examinador/Afiliação

Assinatura

Profa. Dra. Andrea Senff Ribeiro
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Giseli Klassen
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Universidade Federal do Paraná

Suplente:

Profa. Dra. Maria Cristina Leme G. dos Santos
Universidade Federal do Paraná

Após arguir a mestranda **Antonielle Beatriz Baldissera**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Câncer de mama: TCTP como alvo terapêutico", são de parecer favorável à APROVAÇÃO da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 24 de Março de 2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por sempre guiar meu caminho, pela proteção diária e por me dar sabedoria nos momentos difíceis.

Agradeço aos meus pais, Cesar e Luzia, por nunca pouparem esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos e concretizar meus objetivos. Sem o apoio de vocês seria impossível chegar até aqui. Agradeço também minha irmã, Lis, por ser a certeza de nunca estar sozinha. Amo vocês.

À minha querida orientadora Prof. Dra. Andrea Senff Ribeiro por me acolher e confiar no meu trabalho. Por todos ensinamentos e incentivos durante estes dois anos. Você é um grande exemplo para mim e sem seu apoio não conseguiria terminar este trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga por proporcionar a oportunidade de me integrar ao Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos.

À Prof. Dra. Olga Meiri Chaim, por todos os conselhos, pessoais e profissionais, dados durante o mestrado.

Ao meu namorado, Guilherme Louro Brezinski, por seu infinito amor, paciência e carinho durante esse período. Obrigada por estar do meu lado em todos os momentos e ser essa pessoa incrível.

À Rose de Paula Louro, por ser minha grande companheira e conselheira. Por sempre estar do meu lado me incentivando e apoiando.

À Marianna Bóia, por me acolher no laboratório e em sua vida, pela paciência infinita para me auxiliar nos experimentos e pela ajuda com a análise de dados. Obrigada por ser uma pessoa tão doce, por me aconselhar e nunca me deixar desistir. Palavras não são suficientes para te agradecer, sem você este trabalho não seria possível.

À Hanna Camara da Justa, por sua amizade e por me alegrar até nos piores dias. Obrigada por todas as conversas, por me acalmar e pelos cafezinhos da tarde.

As IC's, Alana Basílio e Priscila Vieira, por serem meu braço direito, me acompanharem e por fazerem meus dias mais leves no laboratório.

A todos os colegas do LME, Fernando, Gabriel, Larissa, Elidiana, Adriano, Thais, Zelinda, Aline, Bruno, Greicy, Sorocaba e Paula. Agradeço por todas as conversas e momentos de descontração.

À prof. Dra. Giseli Klassen, por nos ceder as linhagens celulares e também por todas as dicas, correções e sugestões durante esses dois anos.

Aos meus queridos amigos de Guarapuava, Greyci, Amanda, Pierre e André, que sempre me apoiaram e me incentivaram a ser uma pessoa melhor. Obrigada por estarem sempre comigo.

À Marlene, secretária do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR por todo o auxílio durante este período.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

A reversão tumoral, processo em que uma célula tumoral perde em parte ou totalmente seu fenótipo maligno, apresenta grande potencial como nova abordagem terapêutica do câncer. A proteína TCTP esta diferencialmente expressa nas células tumorais e nas suas respectivas revertentes (que sofreram reversão tumoral), sendo altamente expressa nas células tumorais. Esta proteína caracteriza-se por ser altamente conservada, apresentar expressão preferencial em tecidos mitoticamente ativos e desempenhar várias funções em diferentes processos biológicos. Por estar relacionada com a reversão tumoral, a TCTP vem sendo considerada como um alvo terapêutico para o câncer. A sertralina, antidepressivo inibidor da recaptação de serotonina, atua sobre a proteína diminuindo seus níveis intracelulares. O importante papel de TCTP nos tumores de mama já foi descrito. Estes tumores destacam-se por ser o câncer mais comum entre as mulheres, além de ser uma doença extremamente heterogênea. O objetivo do trabalho foi melhorar o entendimento do papel biológico da TCTP em linhagens de mama, representantes de diferentes subtipos, MCF7 (hormônio dependente), PMC 42 (fenótipo de célula tronco), SKBR-3 (HER+), MDA-MB- 231 e MDA-MB-436 (triplos negativos). Para tanto, foram avaliados os efeitos do tratamento com a sertralina na viabilidade, níveis intracelulares de TCTP, migração celular e clonogenicidade. Em todas as linhagens estudadas a sertralina diminui os níveis de TCTP e apresentou efeitos antitumorais. Mesmo as linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-436, do subtipo triplo negativo, que apresentam fenótipo agressivo e são pouco responsivas aos tratamentos disponíveis, apresentaram resultados de diminuição da migração e clonogenicidade celular. As outras linhagens (MCF7, SKBR3 e PMC 42), responderam ao tratamento com sertralina, com grande diminuição do fenótipo tumoral. Com destaque para a PMC 42, com características de célula tronco tumoral que foi bastante sensível à sertralina. Portanto, os resultados aqui obtidos evidenciam os efeitos da sertralina e da inibição da proteína TCTP sobre as diferentes linhagens de tumor de mama. Assim, sugerimos que o uso da sertralina, combinada com as estratégias terapêuticas atuais em câncer de mama, é uma possibilidade de tratamento para os pacientes. Inclusive naqueles subtipos menos responsivos clinicamente e com grande chance de resistência, como os triplo-negativos.

Palavras-chave: TCTP, sertralina, câncer de mama e reversão tumoral.

ABSTRACT

Tumor reversion is a process in which a tumor cell loses its malignant phenotype, partially or totally. This cellular reprogramming shows great potential as a new therapeutic approach to cancer. The TCTP protein is differentially expressed in tumor cells and their revertant counterparts (which underwent tumor reversion), being highly expressed in tumor cells. TCTP is a highly-conserved protein, presents preferential expression in mitotically active tissues and performs different functions in several biological processes. Since it is related to tumor reversion, the TCTP has been considered as a therapeutic target for cancer. Sertraline, an inhibitor of serotonin reuptake antidepressant, acts on TCTP by decreasing its intracellular levels. The important role of TCTP in breast tumors has already been described. Breast tumors stand out as the most common cancer among women, besides being an extremely heterogeneous disease. The aim of this study was to improve understanding of the biological role of TCTP in different breast cancer cell lines, representing different subtypes, MCF7 (hormone dependent), PMC-42 (stem cell phenotype), SKBR-3 (HER +), MDA-231 and MDA-MB-436 (triple negative). The effects of treatment with sertraline on viability, intracellular levels of TCTP, cell migration and clonogenicity were evaluated. Sertraline in all studied lines decreased TCTP levels and showed antitumor effects. Even the MDA-MB-231 and MDA-MB-436 lines from the triple negative subtype, which present an aggressive phenotype and are not responsive to the available treatments, presented results of decreased migration and cellular clonogenicity. The other lines (MCF7, SKBR3 and PMC42) responded to sertraline treatment showing a great decrease in tumoral phenotype. Especially PMC 42, showing tumor stem cell characteristics, which was very sensitive to sertraline. Therefore, the results obtained here evidence the effects of sertraline and the inhibition of the TCTP protein on the different lines of breast tumor. Thus, we suggest that the use of sertraline, with current therapeutic strategies in breast cancer, is a potential treatment for patients. Even in those subtypes less responsive and with a greater chance of resistance, such as the triple-negatives.

Keywords: TCTP, sertraline, breast cancer and tumor reversion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo que mostra os parceiros moleculares que interagem com a TPT1/TCTP e como a interação proteína-proteína foi estudada.	23
Figura 2: Esquema representativo do eixo TCTP–MDM2–P53, e as drogas Sertralina e Tioridazina interferindo no eixo. A droga sertralina é capaz de ligar-se com a TCTP, interferindo no eixo MDM2-P53, impedindo que MDM2 ubiquitine P53.	26
Figura 3: Avaliação do tratamento com sertralina na viabilidade celular na linhagem PMC 42 (método MTT)..	39
Figura 4: Avaliação do tratamento com sertralina na viabilidade celular na linhagem MCF7 (método MTT)..	39
Figura 5: Avaliação do efeito da sertralina na viabilidade celular na linhagem SKBR-3 (método MTT)..	40
Figura 6: Avaliação do efeito da sertralina na viabilidade celular na linhagem MDA-MB-231 (método MTT)..	40
Figura 7: Avaliação do tratamento com sertralina na viabilidade celular na linhagem MDA-MB- 436 (método MTT)..	41
Figura 8: Sertralina diminui os níveis intracelulares de TCTP em células PMC 42..	42
Figura 9: Sertralina diminui os níveis intracelulares de TCTP em células MCF7.	43
Figura 10: Sertralina diminui os níveis intracelulares de TCTP em células SKBR-3.	43
Figura 11: Sertralina diminui os níveis intracelulares de TCTP em células MDA-MB-231.	44
Figura 12: Sertralina diminui os níveis intracelulares de TCTP em células MDA-MB 436..	45
Figura 13: Sertralina diminui a migração em células PMC42..	46
Figura 14: Sertralina diminui a migração em células MDA-MB 231.	47
Figura 15: Sertralina diminui a migração em células MDA-MB 436..	48
Figura 16: Sertralina reduz a capacidade clonogênica das células PMC42..	49
Figura 17: Sertralina reduz a capacidade clonogênica das células MCF7..	49
Figura 18: Sertralina reduz a capacidade clonogênica das células SKBR-3.	50
Figura 19: Sertralina reduz a capacidade clonogênica das células MDA-MB231.. ..	51

Figura 20: Sertralina reduz a capacidade clonogênica das células MDA-MB 436 ...51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Subtipos dos tumores de mama com suas respectivas características e expressão.....	21
TABELA 2- Linhagens de mama com seus respectivos subtipos.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ASO- Oligonucleotídeo antisense

ATCC- *American type tissue culture collection*

BSA- Soroalbumina bovina

CSC- *Cancer stem cells*

DMEM- *Dulbecco's minimum essential médium*

DMSO- *Dimethyl sulfoxide*

DNA- Ácido desoxirribonucléico

ER- *Estrogen receptor*

GAPDH- *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

HER2- *Human epidermal growth factor receptor 2*

kDa- Kilodalton

MDM2- *Mouse double minute 2 homolog*

mRNA- RNA mensageiro

p53- gene que codifica a proteína P53

P53 – Proteína P53

PBS- *Phosphate buffered saline*

PKR- *Protein kinase R*

PR- *Progesterone receptor*

RPMI- *Roswell Park Memorial Institute medium*

SDS-PAGE- *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SFB- Soro Fetal Bovino

SIAH1- *Siah E3 ubiquitin protein ligase 1*

siRNA- RNA de interferência

S1P- Esfingosina 1 fosfato

SphK- Esfingosina quinase

TCTP- *Translationaly Controled Tumor Protein*

TNBC- *Triple negative breast câncer*

tpt1- *Tumor protein, translationally – controled 1 gene*

tpt1: gene que codifica TCTP

TSAP6- *Tumor supressor – activated pathway 6*

L – Litro

ml- Mililitro

μ l- Microlitro

M – Mol por litro

mM- Milimol por litro

μ M- Micromol por litro

g- Grama

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1.	JUSTIFICATIVA	16
1.2.	OBJETIVOS	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1.	REVERSÃO TUMORAL.....	17
2.2.	<i>TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOUR PROTEIN (TCTP)</i>	20
2.3.	CÂNCER DE MAMA	27
2.4.	TUMOR DE MAMA E TCTP.....	32
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1.	CULTIVO CELULAR.....	33
3.2.	TRATAMENTO COM SERTRALINA E ENSAIO DE	34
	VIABILIDADE CELULAR	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3.3.	MIGRAÇÃO CELULAR.....	35
3.4.	ENSAIO DE SOFT ÁGAR PARA CLONOGENICIDADE.....	36
3.5.	PREPARO DE EXTRATOS PROTEICOS CELULARES	36
3.6.	ELETROFORESE DE PROTEÍNA EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	37
3.7.	ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO (<i>WESTERN BLOT</i>)	37
3.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4.	RESULTADOS	38
5.	DISCUSSÃO	52
7.	REFERÊNCIAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

A reversão tumoral é definida como sendo o processo biológico no qual uma célula tumoral perde suas características de malignidade, adquirindo um comportamento próximo ao das células normais. Durante este evento, ocorre uma reprogramação celular, ainda não totalmente compreendida, envolvendo ativação e inativação de genes específicos, e, provavelmente, modificações epigenéticas (TUYNDER *et al.*, 2002, AMSON *et al.*, 2013). A reversão tumoral é um processo complexo e fisiologicamente raro, contudo, é um evento que ocorre espontaneamente nas células tumorais (TELERMAN, A.; AMSON, R. 2009; TUYNDER *et al.*, 2004).

Estudos comparativos entre células revertentes e suas equivalentes tumorais revelaram que a proteína TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) estava diferencialmente expressa nestas células (muito pouco expressa nas células revertentes). Posteriormente, evidenciou-se que essa proteína desempenha um importante papel no processo de reversão tumoral, além de ser considerada como um potencial alvo na terapia do câncer (TELERMAN, A.; AMSON, R.; HENDRIX, M.J. 2010; AMSON *et al.*, 2013).

A TCTP é uma proteína altamente conservada, com 23 kDa, expressa em todos os organismos eucariotos. Encontra-se em diversos tecidos, mas apresenta expressão preferencial em tecidos mitoticamente ativos. Diferentes estudos já revelaram que a TCTP está envolvida com vários processos celulares, como crescimento e desenvolvimento celular, síntese de proteínas, resposta imune, apoptose, alterações no DNA, regulação do ciclo celular, liberação de histamina, reversão tumoral, entre outros (ACUNZO *et al.* 2014).

A alta expressão de TCTP foi relatada em diferentes tecidos tumorais. A diminuição dos níveis de TCTP nas células tumorais resulta na supressão do fenótipo maligno, induzindo ao processo de reversão tumoral. Ainda, essa redução de TCTP é capaz de inibir o crescimento de células tumorais e as induzir à apoptose (GNANASEKAR *et al.*, 2009; AMSON *et al.*, 2013).

Algumas drogas são capazes de diminuir os níveis intracelulares de TCTP, como a sertralina, um antidepressivo inibidor da recaptação de serotonina, que já foi estudada em alguns modelos tumorais (TUYNDER *et al.*, 2002; TUYNDER *et al.*, 2004). Recentemente, um estudo *ex-vivo* com células de leucemia mieloide aguda de pacientes mostrou que a inibição de TCTP pela sertralina levou as células tumorais à apoptose, e melhorou a resposta ao quimioterápico de escolha para o tratamento clínico (Ara-C) (AMSON *et al.*, 2013).

Os tumores de mama são considerados a principal causa de morte por câncer entre as mulheres (FERLAY *et al.*, 2010). Os estudos sobre TCTP em tumores de mama mostram que a expressão de TCTP é relevante para o fenótipo maligno e sua alta expressão está associada a um prognóstico ruim. Portanto, esta classe de tumores pode se beneficiar da abordagem da reversão tumoral e do tratamento com sertralina (TUYNDER *et al.*, 2002; AMSON *et al.*, 2012).

1.1. JUSTIFICATIVA

O trabalho busca aprofundar o entendimento do papel biológico da TCTP nos diferentes subtipos de tumores de mama (linhagens MCF7, PMC-42, SKBR-3, MDA-MB-231 e MDA-MB-436). Em especial, avaliar os efeitos da sertralina nas linhagens provenientes de tumores triplo negativos (MDA-MB), as quais apresentam baixa resposta aos tratamentos. Neste contexto, este trabalho avaliará o tratamento com sertralina e a inibição do conteúdo de TCTP, avaliando a droga como possível estratégia terapêutica em tumores de mama.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo geral

Estudar o papel de TCTP em tumor de mama, utilizando linhagens de diferentes genótipos e fenótipos (representando diferentes subtipos tumorais), buscando validar a utilização de sertralina como possível agente terapêutico no tratamentoclínico destes tumores.

1.2.2. Objetivos específicos

- 1.2.2.1.** Avaliar a viabilidade nas diferentes linhagens celulares após tratamento com sertralina e estabelecer as concentrações para estudo das características tumorais.
- 1.2.2.2.** Avaliar os níveis de expressão de TCTP nas diferentes linhagens celulares após tratamento com sertralina (preparação de extratos celulares e realização de ensaio de imunodeteccção).
- 1.2.2.3.** Avaliar os efeitos do tratamento com sertralina sobre os a migração das diferentes linhagens celulares.
- 1.2.2.4.** Avaliar os efeitos do tratamento com sertralina sobre a clonogenicidade das diferentes linhagens celulares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. REVERSÃO TUMORAL

O processo de transformação de uma célula normal em uma célula tumoral vem sendo cada vez melhor compreendido pela comunidade científica. Diversos fatores explicam como as células normais acabam tornando-se tumorais, entre eles, inativação ou inibição de supressores tumorais, aquisição de imortalidade replicativa, instabilidade genômica, aquisição e acmulo de mutações, processo inflamatório crônico, ativação de processos invasão e metástase, indução da angiogênese, escape da destruição pelo sistema imune, resistência à morte celular, sustentação da sinalização proliferativa e desregulação do metabolismo energético celular (HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A., 2011). Muitos destes fatores têm sido considerados alvos para diferentes tratamentos contra o câncer. Contudo, apesar do conhecimento crescente e acumulado durante muitos anos de

pesquisas, muitos tipos tumorais ainda apresentam prognósticos ruins, opções de tratamento limitadas e muitas vezes ineficientes.

Neste contexto, a reversão tumoral surge como uma abordagem diferente para o estudo da biologia tumoral. A reversão tumoral é definida como sendo o processo biológico no qual as células tumorais, devido a uma reprogramação celular, perdem em grande parte ou totalmente seu fenótipo maligno (características que sustentam o crescimento tumoral). Este processo, apesar de ocorrer espontaneamente com as células de em uma massa tumoral, é um evento fisiologicamente muito raro, somente 1 em cada 10^7 células revertem sua condição tumoral (TELERMAN, A; AMSON, R., 2009). Assim, o estudo da reversão tumoral, por meio da elucidação de seus mecanismos moleculares e de potenciais alvos, pode permitir uma nova abordagem na terapêutica do câncer. A compreensão de como a célula tumoral pode adquirir o conhecimento molecular para se reprogramar perdendo a malignidade permitiria o desenvolvimento de tratamentos antitumorais mais específicos e menos agressivos em idealmente, mais efetivos (TUYNDER *et al.* 2002; TELERMAN, A; AMSON, R., 2009).

Diferentes grupos de pesquisa que estudam o processo de reversão tumoral acreditam que o caminho mais lógico para vencer o câncer é compreender as vias moleculares que levam à reversão tumoral e, então, ser capaz de induzir o processo nos pacientes (TELERMAN, A.; AMSON, R. 2009; TUYNDER *et al.* 2004, POWERS, S.; POLLACK, R.E. 2016).

A reversão tumoral foi descrita pela primeira vez no início do século XX, por Askanazy, através de uma pesquisa com teratocarcinoma ovariano, a qual demonstrou que em estágios iniciais as células tumorais apresentam-se como uma população homogênea e, à medida que o tumor progride, os teratocarcinomas formam grandes tumores que consistem de diferentes tecidos. O fato de que a partir de uma célula tumoral, tecidos que não são malignos podem ser formados representava uma evidência de que a reversão tumoral existe na fisiopatologia humana (TELERMAN, A.; AMSON, R. 2009).

Anos depois, BRIAND e colaboradores (1987) estabeleceram uma nova linhagem celular em laboratório chamada de HMT-3522. A linhagem era originária de fibrose de mama e caracterizava-se por não apresentar tumorigenicidade e manter-se diploide após várias passagens. A utilização constante da linhagem fez com que os pesquisadores pudessem selecionar a partir dela duas novas linhagens, S1 (não tumoral) e T4-2 (tumoral). As duas linhagens foram cultivadas em cultura 3D com matrigel e observou-se que a linhagem S1 se reorganizava em estruturas acinares enquanto que as células T4-2 mostravam-se em estrutura extremamente desorganizadas. A partir disto, o grupo verificou que um receptor de matriz extracelular, integrina $\beta 1$, era mais expressa em T4-2 do que S1. Utilizando anticorpos anti-integrina $\beta 1$, eles conseguiram diminuir a ligação deste receptor com o meio extracelular e foi possível observar uma mudança morfológica dessas células, fazendo com que as células T4-2 formassem estruturas muito semelhantes às encontradas na linhagem S1. Ainda, este fenótipo observado em T4-2 tratadas era reversível quando as células eram dissociadas e os anticorpos removidos (WEAVER *et al.* 1997).

Existem vários genes que estão potencialmente envolvidos no processo de reversão tumoral. Estudos de expressão gênica de células tumorais e de suas revertentes mostraram mais de 300 genes diferencialmente expressos. As principais proteínas que se encontram alteradas: TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) (SUSINI *et al.* 2008; AMSON *et al.*, 2012); SIAH1, uma E3-ligase e alvo transcricional de p53 (AMSON *et al.* 1996; NEMANI *et al.* 1996; FIUCCI *et al.* 2004); presenilina 1 (ROPERCH *et al.* 1998) e TSAP6 (AMSON *et al.* 1996, LESPAGNOL *et al.*, 2008). Quando se fala sobre um potencial alvo no câncer, este pode ser definido como sendo uma proteína/molécula que apresenta expressão ou atividade diferente entre células normais e tumorais (TUYNDER *et al.*, 2004). Segundo TELERMAN, A.; AMSON, R.; HENDRIX, M.J.(2010), destas proteínas a mais bem estudada é a TCTP, capaz de desempenhar um importante papel na reversão de tumores além de ser considerada como um potencial alvo terapêutico no câncer.

A relevância da TCTP para formação de tumores surgiu de duas linhas convergentes de investigação (AMSON *et al.*, 2013). A primeira refere-se a *tsap6* (alvo de transcrição direta de P53), o qual codifica uma proteína de domínio transmembrana (6 domínios), capaz de regular o metabolismo do ciclo celular e apoptose. A proteína TSAP6 interage com a TCTP, sendo capaz de regular sua secreção através de uma via não clássica, por exossomos (AMSON *et al.* 1996; GRANDCHAMP *et al.* 2011). A segunda linha de investigação estudou as bases moleculares da reversão tumoral, através da derivação de células revertentes de linhagens celulares de leucemia e tumores sólidos (TELERMAN *et al.* 1993; TUYNDER *et al.* 2002; TUYNDER *et al.* 2004). O estudo da expressão diferencial de genes entre as células tumorais parentais e as revertentes indicou que a TCTP representava o gene cuja expressão era a mais diminuída nas células revertentes (TUYNDER *et al.* 2002). Trabalhos posteriores evidenciaram que a redução dos níveis de TCTP era capaz de desencadear um efeito antitumoral nas células (TUYNDER *et al.* 2002; TUYNDER *et al.* 2004).

2.2. *Translationally Controlled Tumour Protein (TCTP)*

A proteína TCTP, do inglês *Translationally Controlled Tumour Protein*, apresenta massa molecular aparente de 23 kDa (BRIOUDES *et al.*, 2010) e foi descrita há aproximadamente vinte anos atrás por três grupos de pesquisa independentes envolvidos na busca de proteínas reguladas a nível traducional (GACHET *et al.* 1999). Em geral, a proteína é abundantemente expressa (THIELE *et al.* 2000; GUILLAUME *et al.* 2001), sendo também conhecida como fator de liberação de histamina (HRF), Tpt1, p23 ou fortilina, e é encontrada tanto intra quanto extracelularmente. Além disso, a proteína está envolvida em diversos processos biológicos, como desenvolvimento celular, síntese de proteínas, resposta imune, apoptose, organização de microtúbulos, controle do ciclo celular, liberação de histamina, reversão tumoral, entre outros (GACHET *et al.* 1999; LI *et al.* 2001; YARM, F.R. 2002; BOMMER, U.A.; THIELE, B.J. 2004; ACUNZO *et al.* 2014).

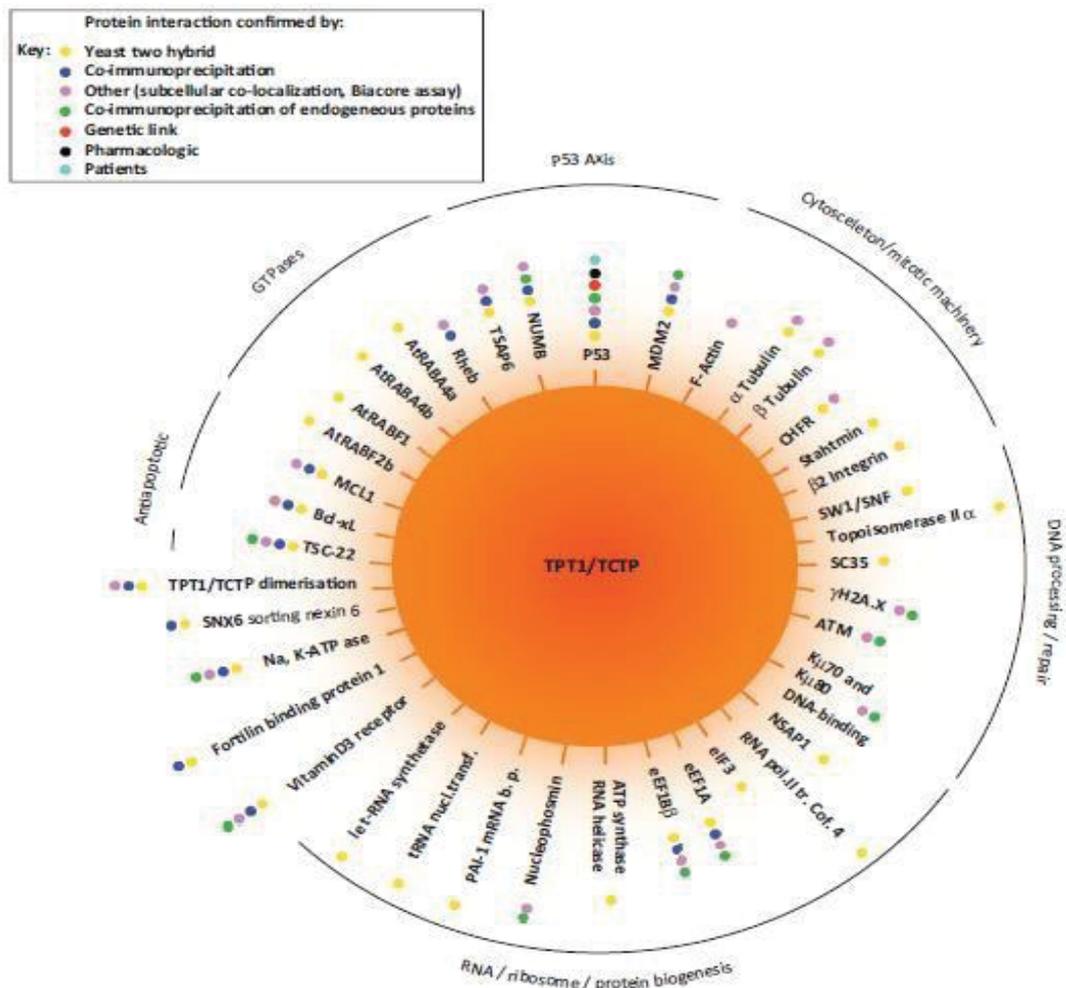
O alinhamento de sequências de TCTP de mais de 30 espécies diferentes mostra um alto grau de conservação durante um longo período de evolução (THAW *et al.* 2001). A estrutura da proteína é formada por três α -hélices e nove folhas β que formam núcleos hidrofóbicos. O gene da TCTP, denominado *tpt1*, foi primeiramente estudado em coelhos. O *tpt1* é organizado em cinco íntrons e seis éxons, totalizando aproximadamente 3820 pares de base. Apesar dos mecanismos moleculares de regulação da expressão não serem totalmente compreendidos, há consenso de que a proteína TCTP é altamente regulada tanto no nível traducional como transcricional (BOMMER *et al.*, 2002; BOMMER, U.A.; THIELE, B.J. 2004).

A TCTP é expressa em mais de 500 tecidos e tipos celulares. Em vários experimentos já foi estabelecido que os níveis de TCTP são altamente regulados em resposta a inúmeros sinais extracelulares e condições celulares. Várias condições de stress, como inanição (BOMMER *et al.*, 2002; BONNET *et al.*, 2000), choque térmico, metais pesados, estresse de cálcio (XU, A.; BELLAMY, A.R.; TAYLOR, J.A. 1999) ou sinais pró-apoptóticos / citotóxicos (OIKAWA *et al.*, 2002; SINHA *et al.*, 2000) resultam em regulação positiva ou negativa dos níveis de TCTP.

A proteína pode desempenhar diversas funções em diferentes processos biológicos e possui muitos parceiros moleculares (FIGURA 01), por isso é chamada de proteína multifuncional (AMSON *et al.*, 2013). Em animais, a TCTP também é responsável pela liberação da histamina em eventos inflamatórios (MACDONALD *et al.*, 2001), além de exercer um controle positivo na proliferação de linfócitos B (KANG *et al.*, 2001). TCTP é capaz de formar complexos proteicos com outras proteínas alterando a atividade das mesmas, como é o caso das bombas de sódio e potássio, responsáveis pela homeostase iônica e pelo potencial de membrana celular. O mRNA da TCTP pode formar estruturas secundárias de dupla fita (*hairpins*), os quais são capazes de interagir com alguns componentes celulares. Nesse caso, as estruturas secundárias resultantes podem ativar uma proteína quinase denominada PKR (BOMMER *et al.*, 2002), que está envolvida na regulação e diferenciação celular, na resposta a estresses, na

apoptose e no mecanismo de defesa celular antiviral (JAGUS, R.; JOSHI, B.; BARBER, G.N. 1999).

Figura 1: Esquema representativo que mostra os parceiros moleculares que interagem com a TPT1/TCTP e como a interação proteína-proteína foi estudada.



Fonte: AMSON *et al.* 2013.

Estudos destacam o papel crucial da TCTP para o desenvolvimento normal. O *knockdown* de TCTP em *Drosophila* causa letalidade em larvas no primeiro estágio tardio e resultam em tamanho reduzido das células, do número de células e do tamanho do órgão (HSU *et al.* 2007). Em camundongos, os animais *knockout* para TCTP são inviáveis, a letalidade ocorre na embriogênese (GACHET *et al.*, 1999).

No ciclo celular, GACHET *et al.* (1999) demonstraram que a TCTP se liga à tubulina e associa-se com microtúbulos durante fases específicas do ciclo celular, separando-se do fuso na transição das fases metáfase e anáfase.

THAW *et al.* (2001) e GNANASEKAR *et al.* (2009) propuseram que a TCTP apresenta atividade molecular de chaperona. Sabe-se que a expressão de TCTP é conhecida por ser altamente regulada em resposta a uma grande variedade de condições de estresse. GNANASEKAR *et al.* (2009) mostrou que a TCTP protege as células do choque térmico, agindo potencialmente como uma chaperona molecular. Além disso, a superexpressão da proteína é capaz de proteger as células da morte celular induzida por choque térmico.

Durante o mecanismo de morte celular programada (apoptose), a TCTP pode ser localizada na mitocôndria, ligando-se a proteínas que apresentam atividade apoptótica, e dessa maneira, evitando a morte celular (LIU *et al.*, 2005; RINNERHALER *et al.*, 2006). O mesmo processo ocorre no citoplasma, onde a proteína TCTP é capaz de fazer a ligação e sequestro de cálcio, diminuindo a apoptose dependente desse íon (GRAIDIST *et al.*, 2007).

A TCTP é encontrada em vários tecidos normais, mesmo que tenha sido nomeada inicialmente como uma proteína de tumor. A TCTP foi identificada pela primeira vez em um tumor ascítico de rato (LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. 1998). A expressão de TCTP está aumentada em tecidos tumorais quando comparado aos seus respectivos tecidos normais, indicando um papel crítico na tumorigênese (TUYNDER *et al.*, 2002; TELERMAN, M.; AMSON, R.; 2009; CHAN *et al.*, 2012; ACUNZO *et al.*, 2014). Estudos da regulação negativa da TCTP utilizando oligonucleotídeos antisense (ASO) ou siRNA (RNA de interferência) em linhagens celulares induzem as células à apoptose e ao bloqueio do ciclo celular (BAYLOT *et al.*, 2012). Em células tumorais humanas de leucemia e tumores sólidos, a inibição de TCTP levou à apoptose *in vitro* e *in vivo*, inibindo a progressão tumoral (TUYNDER *et al.* 2002). Também, em células de carcinoma pulmonar humano a inibição de TCTP induziu a expressão de p53 e a apoptose (RHO *et al.*, 2011). Em 2012 foi mostrado que TCTP e p53 tem uma inibição recíproca, em um eixo que envolve MDM2 (AMSON *et al.*, 2012).

Já foi relatado que esta proteína está envolvida no processo de migração, invasão e metástase celular (BAE *et al.*, 2015). Este processo de metástase caracteriza-se por ser um processo em que as células cancerosas deixam o local de desenvolvimento primário do tumor e instalam-se em sítios secundários e distantes de onde originalmente se iniciaram (COKA *et al.*, 2011). Já foi demonstrado por MA e colaboradores (2010) que a superexpressão de TCTP em células de adenocarcinoma de cólon leva a metástase. Além disso, um aumento de TCTP foi identificada nas metástases em pacientes com hepatocarcinoma (CHAN *et al.*, 2012).

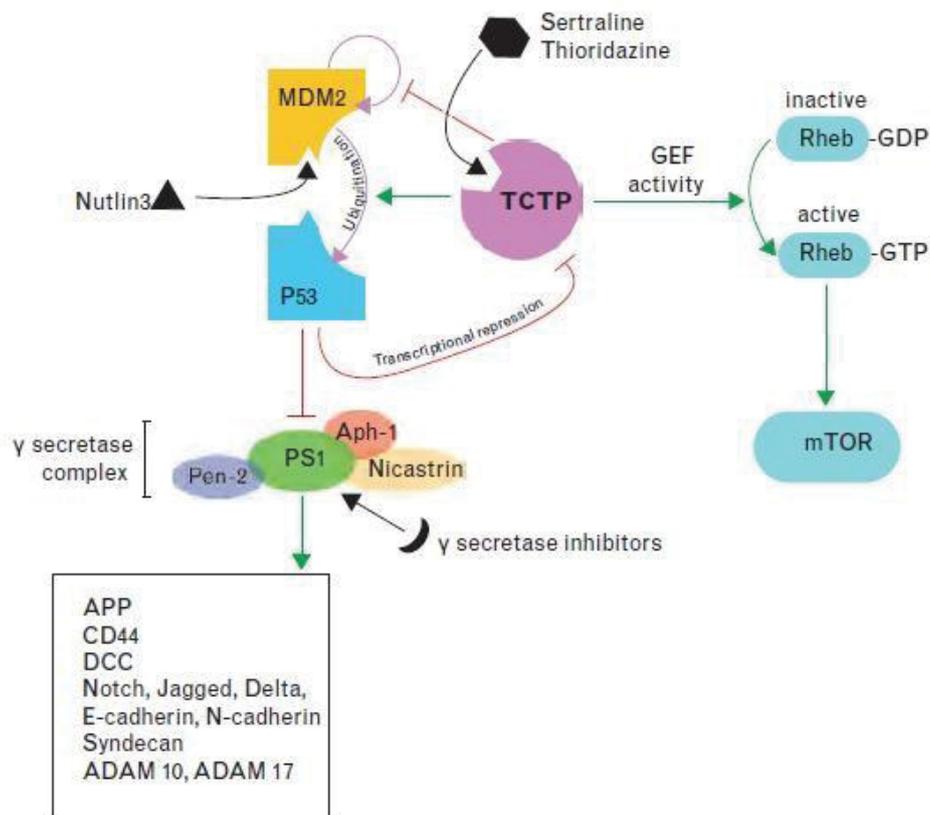
A TCTP, no contexto do processo de reversão tumoral, tem chamado atenção durante os últimos anos, sendo considerada como um alvo terapêutico em diferentes tipos de câncer, como de pulmão, próstata, cólon, melanoma e mama (ACUNZO *et al.*, 2014). Uma das vias através da qual a TCTP pode promover o câncer é através da inibição recíproca com a proteína P53. Estudos já demonstraram que o aumento da expressão de TCTP em carcinoma de pulmão foi capaz de reverter a apoptose mediada por P53, enquanto o *knock-down* aumentou a apoptose (RHO *et al.*, 2011). Assim, alguns autores demonstraram que a TCTP está relacionada com P53, inibindo a apoptose mediada por P53 (CHEN *et al.*, 2011).

Com o objetivo de encontrar drogas capazes de diminuir os níveis de TCTP, TUYNDER e colaboradores (2004) realizaram um *screening* com diferentes drogas. Entre as drogas estudadas, descobriu-se que a sertralina e atioridazina apresentaram redução dos níveis intracelulares de TCTP em diferentes linhagens celulares tumorais (MDA-MB-231: Tumor de mama e U937: Leucemia).

A sertralina, uma droga antidepressiva e ansiolítica, inibidora da recaptação de serotonina, inibiu o crescimento de células tumorais *in vitro* e *in vivo*, além de provocar apoptose em células tumorais (TUYNDER *et al.* 2004). Recentemente, verificou-se que a droga liga-se diretamente à TCTP (AMSON *et al.* 2012). Por meio dessa ligação, a sertralina antagoniza a função da TCTP no eixo P53-MDM2.

Dessa maneira, a TCTP ligada à sertralina não induz a ubiquitinação de P53 por MDM2, restaurando os níveis de P53, o que explica como a droga leva as células tumorais à apoptose (FIGURA 02). No estudo realizado por AMSON e colaboradores (2012) utilizando a sertralina, revelou-se que a droga induziu um aumento acentuado na quantidade de P53 e simultaneamente uma diminuição de TCTP em células tumorais (AMSON *et al.*, 2012).

Figura 2: Esquema representativo do eixo TCTP–MDM2–P53, e as drogas Sertralina e Tioridazina interferindo no eixo. A droga sertralina é capaz de ligar-se com a TCTP, interferindo no eixo MDM2–P53, impedindo que MDM2 ubiquitine P53.



Fonte: AMSON *et al.*, 2013.

2.3. CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres no mundo (STEWART, B.W.; WILD, C.P. 2014). No Brasil é o câncer mais frequente em mulheres das Regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste. Já na região Norte é o segundo tumor mais incidente. De acordo com o INCA (Instituto Nacional de Câncer) em 2012 esta neoplasia representou aproximadamente 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados nas mulheres (INCA, 2016).

No Brasil, aproximadamente 22% dos casos tratados de câncer são de mama e a taxa de mortalidade é extremamente alta devido ao fato da doença ser diagnosticada, na maioria dos casos, em estágios avançados (INCA, 2014).

O câncer de mama apresenta-se como um problema de saúde pública já que as taxas anuais de incidência e mortalidade da doença são grandes, sendo a segunda causa de morte por câncer nos países desenvolvidos (atrás do câncer de pulmão) e a maior causa de morte por câncer nos países em desenvolvimento (INCA, 2016).

O aumento da taxa de incidência e mortalidade está associada a diversos fatores internos, como a predisposição hereditária ou dependente da constituição hormonal, e externos, como fatores ambientais capazes de causar danos ao genoma, sejam eles relacionados com estilo de vida, hábitos reprodutivos e meio ambiente (VERONESI, U. 2002).

Estudos levaram à identificação de dois principais genes de susceptibilidade ao câncer de mama, BRCA1 e BRCA2 (MIKI *et al.* 1994; WOOSTER *et al.* 1995; KING, M.C. 2014). O primeiro gene de predisposição ao câncer de mama, BRCA1, localiza-se no braço longo do cromossomo 17 (17q21), sendo composto por 24 éxons, e o segundo gene

de susceptibilidade, BRCA2, localiza-se no braço longo do cromossomo 13q12, e é composto por 27 éxons (TAVTIGIAN *et al.* 1996).

Os genes BRCA apresentam funções em diferentes processos celulares, entre eles a ativação e regulação transcricional, reparo de lesões do DNA e controle do ciclo celular, proliferação e diferenciação celular. Estes genes foram classificados como genes supressores de tumor pela frequente perda de heterozigidade nos tumores desenvolvidos por indivíduos portadores de mutações nesses genes. (WELCSH, P.L.; OWENS, K.N.; KING, M.C. 2000; PONDER, B.A.J.; 2001).

Estudos demonstraram que pessoas que são portadores da mutação BRCA1 apresentam 57% de chance de desenvolver o câncer de mama (CHEN, S.; PARMIGIANI, J.G. 2007), além de serem susceptíveis a desenvolverem câncer de ovário e próstata. Já aqueles que apresentam-se como portadores da mutação BRCA2 possuem risco elevado para câncer de mama em ambos os sexos e também para câncer de ovário, próstata, pâncreas, estômago e vias biliares (WELCSH, P.L.; KING, M.C. 2001).

Hoje, existem várias estratégias que podem ser utilizadas para reduzir o risco de câncer, morbidade e mortalidade em mulheres que apresentam mutações patogênicas de BRCA1/2, como rastreamento regular por exames de imagens para detectar tumores em fase inicial, cirurgia profilática (mastectomia de redução de risco) e quimioprevenção (COUCH *et al.* 2014).

De acordo com o INCA (2015), as terapias atuais utilizadas para o tratamento de câncer resumem-se principalmente a quimioterapia e radioterapia. Há também os tratamentos que utilizam inibidores de hormônios e são válidos para pacientes que apresentam tumores com expressão de receptores hormonais, como é o caso de lúmens A e B. Já para aqueles pacientes que apresentam superexpressão de HER2, utiliza-se a terapia anti-Her2, que usa alvos terapêuticos como Trastuzumabe ou Lapatinibe.

Os tumores de mama são altamente heterogêneos e são classificados com base na histologia do tecido como carcinoma ductal ou carcinoma lobular. Quanto ao perfil de expressão de receptores de hormônios, avalia-se a superexpressão dos receptores progesterona (PR) e estrogênio (ER), assim como a expressão de HER-2 (receptor tirosina quinase) como observa-se na TABELA 01 (YARDEN, Y. 2001).

TABELA 01: Subtipos dos tumores de mama com suas respectivas características e expressão.

SUBTIPO	SUPER-EXPRESSION	CARACTERÍSTICA
Normal <i>Like</i>	-	Perfil similar a mama normal (DAI <i>et al.</i> , 2015)
Luminal	(ER+/PR+/Her2-) ou (ER+/PR-/ Her2+)	Luminal A: melhor prognóstico Luminal B: Alto índice proliferativo (CIRQUEIRA <i>et al.</i> , 2011)
HER2	(ER-/Her2+)	Tumores agressivos e é alvo molecular para terapias específicas (HENJES <i>et al.</i> , 2012)
Triplo Negativo	(ER-/PR-/ Her2-)	Tumores apresentam tamanho maior do que os outros subtipos e também alto índice mitótico (BADVE <i>et al.</i> , 2011)

PEROU *et al.* (2000) através da técnica de *microarray* de DNA classificou os tumores de mama em cinco subtipos intrínsecos conforme seu padrão de expressão gênica: luminal A e luminal B (ER+/PR+/Her2- ou ER+/PR-/ Her2-), superexpressão de HER2 (ER-/Her2+), basal (ER-/PR-/ Her2-) e *normal-like*. Estes subtipos em grande parte correspondem, mas não se sobrepõem, com grupos definidos por receptores hormonais ER e PR, e HER2 (BIANCHINI *et al.* 2016).

Mais tarde foi feito um estudo utilizando 3.527 espécimes provenientes de doze tipos diferentes de câncer, entre eles o de mama, e foram classificados onze subtipos moleculares principais (HOADLEY *et al.* 2014). Na pesquisa confirmou-se que o câncer de mama *basal-like* (BLBC) é uma doença única, (PEROU *et al.* 2000;

SORLIE *et al.* 2001; PARKER *et al.* 2009), em que as células tumorais expressam genes característicos de células basais (FOULKES, W. D.; SMITH, I. E.; REIS-FILHO, J. S 2010).

Os tumores de fenótipo triplo negativo (*TNBC, triple negative breast cancer*) são aqueles que não expressam receptores de estrógeno, progesterona ou o receptor de tirosina quinase HER2 (TOKUNAGA, E. 2006). Os TNBCs apresentam prognóstico ruim e baixa resposta aos tratamentos (VAN'TVEER *et al.* 2002). Estes tumores acometem frequentemente mulheres com menos de 50 anos, sendo mais prevalentes entre afrodescendentes e apresentando um comportamento mais agressivo (REIS-FILHO, J.S.; TUTT, A.N.J. 2008). Dentro dos TNBC 80% são do tipo *basal-like* (BIANCHINI *et al.*, 2016).

Para melhor compreender a heterogeneidade tumoral do tipo triplo negativo LEHMANN e colaboradores (2011) baseando-se em perfis de expressão gênica definiram seis novos subtipos intrínsecos de triplo negativo, entre eles: dois subgrupos *basal-like* (BL1, BL2), dois subgrupos relacionados ao mesênquima (mesenquimal e mesenquimal-tronco), um subgrupo imunomodelador (IM) e um subgrupo luminal de receptor andrógeno (LAR).

Já o subtipo basal apresenta esse nome devido ao fato das células tumorais expressarem genes característicos de células basais/mioepiteliais normais, como KRT5, KRT14, KRT17 e EGFR (FOULKES, W. D.; SMITH, I. E.; REIS-FILHO, J. S. 2010). Os tumores apresentam tamanho maior do que os outros subtipos e também rápido crescimento (HO-YEN, C.; BOWEN, R.L.; JONES, J. 2012; RAKHA *et al.* 2006).

O tumor do subtipo luminal A, representa aproximadamente 60% dos casos dos carcinomas de mama e é considerado o câncer com melhor prognóstico (WEIGEL, M.T.; DOWSETT, M. 2010). Apresenta baixa taxa de proliferação e grau patológico, porém, elevada diferenciação morfológica. Este câncer é geralmente menos sensível à quimioterapia adjuvante, mas, tipicamente, responde bem à terapia endócrina (HOADLEY *et al.* 2014). Esta terapia endócrina baseia-se na utilização de substâncias semelhantes ou supressoras de hormônios que são capazes de inibir o crescimento tumoral (BRITOL, C.; PORTELA, M.C.; VASCONCELLOS, M.T.L.

2014). O câncer luminal apresenta essa denominação pela similaridade que as células neoplásicas desse grupo apresentam com as células mamárias normais, que ficam em contato direto com o lúmen dos ductos mamários, as chamadas células luminais (SOTIRIOU *et al.* 2003).

Os tumores do subtipo luminal B caracterizam-se por expressarem genes de proliferação celular (MKI67-Ki-67, CCNB1 e MYBL2) (SORLIE *et al.* 2001). Estes tumores apresentam receptores de estrogênio e progesterona positivos, e Her2+, porém, sem superexpressão. O subtipo apresenta um alto índice proliferativo e por essa razão, traz consigo um pior prognóstico em relação aos tumores luminais A (SORLIE *et al.* 2001). Também, o tumor está associado a um maior risco de recorrência e à maior possibilidade de resistência ao tratamento com tamoxifeno (KENNECKE *et al.* 2010).

Já o subtipo HER2+, possui superexpressão do receptor tirosina quinase codificado pelo oncogene ERBB2 (POLYAK, K.; METZGER-FILHO, O. 2012). OHER-2 é responsável por codificar um receptor de membrana das células tumorais, que desencadeia sinalização para proliferação celular, tornando os tumores mais agressivos (SLAMON *et al.* 1987). Este subtipo não expressa os receptores hormonais. Estes tumores apresentam alta instabilidade cromossômica com alta taxa de mutação em único nucleotídeo, é classificado como neoplasia de alto grau e apresenta alta ocorrência de metástase cerebral (HOADLEY *et al.* 2014). A superexpressão do HER-2 é reconhecida como importante marcador de doença agressiva e é alvo molecular para terapias específicas com anticorpos monoclonais para o HER2 (PICCART-GEBHART *et al.* 2005). A frequência em que esses subtipos ocorrem é de 70% para luminal, 20% para dos HER2+ e 10% são triplo negativos (POLYAK, K.; METZGER-FILHO, O.2012).

A análise da expressão gênica de tumores de mama primários forneceu algumas indicações importantes de algumas propriedades genéticas inerentes aos diferentes subtipos de tumor primário que podem predispor as células tumorais para um fenótipo mais agressivo (DRUKKER *et al.* 2014; MITTEMPERGHER *et al.* 2013). A caracterização desses genes é importante, para identificação de tumores com elevado risco de progressão desde o início, tendo implicações no diagnóstico e na terapêutica (LUCIBELLO *et al.* 2015).

Neste sentido, a caracterização de novos biomarcadores implicados na progressão do tumor proporciona novas oportunidades para a combinação de terapias com agentes quimioterapêuticos clássicos. Há pouco tempo, foi descrito que a regulação positiva de TCTP está correlacionada com tumores pouco diferenciados, incluindo câncer de mama, ressaltando o potencial da proteína como biomarcador para prognóstico (AMSON *et al.*, 2012; MIAO *et al.* 2013; SLABY *et al.* 2009; ZHANG *et al.* 2013).

2.4. TUMOR DE MAMA E TCTP

A primeira evidência do papel biológico de TCTP na malignidade de tumores de mama ocorreu durante o início dos estudos para o desenvolvimento de modelos de reversão tumoral (TUYNDER *et al.*, 2002). A relevância da TCTP para as características tumorais de células de tumor de mama foi observada em modelos de crescimento em matrigel-3D, desenvolvidos pela cientista Mina Bissel (WEAVER *et al.* 1997; TUYNDER *et al.*, 2002). Células de câncer de mama (MCF7, T47D) em culturas de matrigel tridimensional foram completamente reprogramadas através da diminuição do nível intracelular de TCTP. As células de mama crescem de maneira organizada, formando estruturas ductais em torno de um lúmen. Porém, as células de câncer de mama não conseguem formar estas estruturas e acabam crescendo em grupos desorganizados. O uso de técnicas de antisenso ou siRNA para silenciamento de TCTP resulta em uma reorganização notável, ocorrendo a formação de estruturas que lembram as observadas nas culturas de células normais da mama (TUYNDER *et al.* 2002).

Em um estudo posterior, que testou diferentes drogas para avaliar seus efeitos sobre os níveis intracelulares de TCTP, foi mostrada a diminuição do desenvolvimento tumoral em modelo animal xenográfico *in vivo* inoculado com MDA-MB-231 (linhagem de mama triplo negativo) e tratado com sertralina em uma concentração de 18 mg/kg (TUYNDER *et al.*, 2004). Estes dados demonstram que a diminuição das quantidades intracelulares de TCTP é suficiente para desencadear o programa de

reversão tumoral ou mesmo a morte celular por apoptose em tumores de mama.

Recentemente, foi descrita a regulação positiva de TCTP em biópsias de tumores de mama pouco diferenciados, ressaltando assim potencial da TCTP como biomarcador para prognóstico e alvo de interesse terapêutico neste tipo tumoral (AMSON *et al.* 2012; MIAO *et al.* 2013; SLABY *et al.* 2009; ZHANG *et al.* 2013). As células tronco tumorais (CSC, do inglês *cancer stem cells*) têm sido implicadas na origem e progressão de tumores. A expressão de TCTP é maior nestas células (CSC) quando comparada com células de tumor de mama sem características de células tronco (AMSON *et al.*, 2012). Em células do modelo animal ErbB2 (rato), quando ocorre a perda de P53 há uma expansão de célulastronco tumorais, porém, quando há diminuição de TCTP ocorre um aumento da quantidade de P53 acompanhada por uma redução de 50% na eficiência de formação de mamosferas (colônias formadas por clones). Isso indica um importante papel entre a regulação TCTP-P53 em células-tronco tumorais de mama.

A sertralina liga-se diretamente a TCTP antagonizando a função desta proteína no eixo p53-MDM2 e assim, restaura os níveis de P53 o que faz com que este iniba a expressão de TCTP. Pelo fato da P53 ser um repressor transcricional de TCTP, a proteína é capaz de diminuir a TCTP e inibir a formação de mamosferas (AMSON *et al.* 2012). Dessa maneira, o uso da sertralina, podeseer uma possibilidade terapêutica muito interessante na terapia combinada dos tumores de mama.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CULTIVO CELULAR

As linhagens celulares PMC 42, MCF7, SKBR-3, MDA-MB-231 e MDA- MB-436 provenientes da *American Type Tissue Culture Colection* - ATCC (Manassas, USA), foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Giseli Klassen, do Departamento de Patologia Básica (UFPR). As linhagens foram escolhidas baseando-se no seu subtipo molecular e

também nas suas características para que posteriormente fosse possível analisar os resultados das linhagens entre si (TABELA 02). A linhagem PMC 42 é uma linhagem incomum, que apresenta características de célula tronco tumoral, porém é semelhante às células mitoticamente ativas do tecido epitelial de mama normal (GIT *et al.*, 2008). A MCF7 é proveniente de um adenocarcinoma de mama e apresenta p53 selvagem (*wt*) (LU *et al.*, 2001). A SKBR-3 é uma linhagem utilizada como controle positivo em ensaios para HER2+, adenocarcinoma de mama e possui p53 mutado (ATCC, 2013). As linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-436 são provenientes de tumores do subtipo triplo negativo, adenocarcinoma de mama e apresentam p53 mutado (OLIVIER *et al.*, 2002).

As linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab). Em todos os meios foi adicionado 40 mg/L de gentamicina (Schering-Plough, Kenilworth, USA). As células foram mantidas a 37°C, em atmosfera com 5 % de CO₂.

TABELA 02: Linhagens de mama com seus respectivos subtipos.

Linhagem	Subtipo
PMC 42	Fenótipo similar ao de células-tronco tumorais (GIT <i>et al.</i> , 2008)
MCF7	Luminal A (HOLLIDAY, D.L.; SPEIRS, V. 2011.)
MDA-MB-231	Basal (CHAVEZ, K.J.; GARIMELLA, S.V.; LIPKOWITZ, S. 2010.)
MDA-MB-436	Basal (CHAVEZ, K.J.; GARIMELLA, S.V.; LIPKOWITZ, S. 2010.)
SKBR-3	HER2+ (HOLLIDAY, D.L.; SPEIRS, V. 2011.)

3.2. TRATAMENTO COM SERTRALINA E ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Com o objetivo de avaliar os efeitos da sertralina (Sigma) nas diferentes linhagens celulares de mama foi realizado o ensaio de viabilidade celular para estabelecer as concentrações de sertralina a serem utilizadas

para os demais ensaios. Foram plaqueadas 5×10^3 células em placas de 96 poços e, em seguida, foi adicionado o tratamento aos poços (sertralina 0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M). Os controles foram somente meio (meio de cultivo) e o solvente da sertralina (DMSO), sempre utilizado na maior concentração utilizada nos testes (0,01% v/v). Após 24, 48 e 72 horas a viabilidade das células foi determinada por meio do método MTT. O meio foi retirado e os poços da placa foram lavados com 100 μ l de PBS. Em seguida foi adicionado a todos os poços 100 μ l da solução de MTT (0,5 mg/mL), e a placa foi incubada a 37°C por duas horas. Após esse período, a solução de MTT foi retirada e adicionou-se 100 μ l de DMSO. Os poços foram homogeneizados e em seguida foi realizado a leitura em 550 nm no espectrômetro Meridian/EL x800.

Após essa avaliação, utilizamos as concentrações de 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M de sertralina (concentrações selecionadas a partir de ensaio piloto de viabilidade celular). Os controles foram realizados utilizando o solvente da sertralina, DMSO, sempre na maior concentração (v/v) utilizada no ensaio.

3.3. MIGRAÇÃO CELULAR

A metodologia utilizada para avaliar a migração celular foi o ensaio de *scratch*. As células foram plaqueadas (5×10^5 por poço) em placa de cultura de 96 poços em meio RPMI contendo 10% SFB. Após 4 horas o meio foi aspirado e foi adicionado meio sem SFB. Após 16 horas, as células foram tratadas com mitomicina C (Sigma) 10 μ g/mL por 2 horas (droga que inibe a proliferação celular). Após esse período foi feito um *scratch*, isto é, um risco na placa removendo as células (RODRIGUEZ, L.G.; WU, X.; GUAN, J.L. 2005). Logo após o *scratch* as células foram tratadas com o DMSO (controle) e a sertralina nas concentrações de 1, 5 e 10 μ M. As células foram mantidas a 37°C e 5% CO₂ e foram fotografadas nos tempos 0h, 24h, 48h e 72h. A área entre as duas margens do *scratch* foi medida utilizando o programa Image J. Em todas as imagens capturadas foram utilizadas para determinar a migração das células. O ensaio de migração celular não foi realizado com a linhagem MCF7 pois esta não apresenta mobilidade.

3.4. ENSAIO DE SOFT ÁGAR PARA CLONOGENICIDADE

Para avaliar a capacidade de formação de colônias (clonogenicidade, crescimento independente de ancoragem) foram utilizadas placas de 6 poços contendo uma camada de ágar 1% em respectivo meio de cultura contendo 10% SFB e gentamicina (40 mg/L) (1,5mL/poço). Após a solidificação desta camada, foi preparada uma solução contendo 5×10^3 células em ágar 0,7% em meio contendo 10% SFB e gentamicina (40 mg/L) a qual foi adicionada aos poços (1,5mL/poço) previamente preparados. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ por 20 dias. Nestes ensaios as células foram plaqueadas na presença de diferentes concentrações de sertralina (0.1, 1 e 5 µM). Após este tempo, as células foram coradas com 500 µL de Cristal Violeta 0,005% (g/mL) por 1 hora. As colônias foram contadas utilizando microscópio invertido Leica DM IL, da marca *Leica Microsystems*.

3.5. PREPARO DE EXTRATOS PROTEICOS CELULARES

Os extratos proteicos das diferentes linhagens celulares foram obtidos a partir de aproximadamente 10^5 células. Após os procedimentos experimentais, as células foram coletadas das garrafas de cultivo ou placas e ressuspensas em 200 µL de tampão de lise (Tris- HCl 20 mmol/L, NaCl 100 mmol/L e Triton x-1000,1% v/v). Após ressuspensão foram sonicadas em potência média por 15 segundos a 4°C, e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 20.000 xg por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e a quantidade de proteína foi dosada pelo método Micro BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific, Waltham, USA). O método Micro BCA consiste na quantificação de proteína total em solução diluída após reação com ácido bicinonínico (BCA). A concentração de proteína, então, é determinada através da curva que relaciona diferentes concentrações de soro albumina bovina pura (BSA), no intervalo de 0,5 a 200 µg/ml, com a

absorbância correspondente, no comprimento de onda de 540 nm. É um método sensível e excepcionalmente linear.

3.6. ELETROFORESE DE PROTEÍNA EM GEL DE POLIACRILAMIDA

As eletroforeses foram realizadas em géis de poliacrilamida 15% (SDS- PAGE) em condições redutoras. Para separação das proteínas (50 µg do extrato total) foi aplicada corrente de 25 mA constante (HARLOW, E.; LANE, D. 1988).

3.7. ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO (*Western Blot*)

Os ensaios de *Western Blot* foram realizados para avaliar e identificar a presença das proteínas TCTP e GAPDH (controle endógeno) nos extratos celulares. Após eletroforese em SDS-PAGE 15%, as proteínas (50 µg do extrato total) foram transferidas do gel para membranas de nitrocelulose (Whatman, Dassel, Alemanha) com aplicação de voltagem constante (15 V) por 15 minutos em tampão de transferência. As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com PBS contendo caseína, por 1 hora à temperatura ambiente. Para detecção das proteínas TCTP e GAPDH nos extratos, as membranas de nitrocelulose contendo 50 µg de proteínas do extrato foram incubadas com anticorpo policlonal específico por 16 horas à temperatura 4°C. (anti-TCTP, 1:6000, produzido em coelho (Sigma- cód: SAB4503030-100UG) e anti-GAPDH, 1:7000, produzido em rato (Sigma- cód: G8795-100UL). Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário, conjugado à peroxidase, durante 1 hora à temperatura ambiente (anti-IgG de coelho para o anti-TCTP e anti-IgG de rato para o anti-GAPDH). Para revelação foi utilizado substrato quimioluminescente (West Dura, Pierce Co.) (HARLOW, E.; LANE, D. 1988). A densitometria das bandas para normalização da quantidade de extrato proteico foi realizada através do programa *ImageJ*.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram submetidos à análise estatística, sendo as repetições e o tratamento avaliados (replicatas técnicas e biológicas). Os resultados dos ensaios foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com auxílio do programa *Graphpad Prism 7.02*. A significância foi definida como * $p < 0,1$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ou **** $p < 0,0001$. Para análise da densitometria de bandas foi utilizado o programa *ImageJ*.

4. RESULTADOS

Inicialmente, foi realizada uma padronização das doses de sertralina a serem utilizadas nos estudos. Os objetivos do trabalho foram avaliar os efeitos do tratamento com sertralina e da diminuição dos níveis de TCTP no fenótipo de diferentes linhagens celulares de tumor de mama. As concentrações de sertralina escolhidas para os experimentos foram de 0.1, 1, 5 e 10 μM . Os estudos avaliaram os efeitos *in vitro* da sertralina sobre a viabilidade celular, a migração celular e a clonogenicidade, além de determinar os níveis intracelulares proteicos de TCTP (imunodeteção).

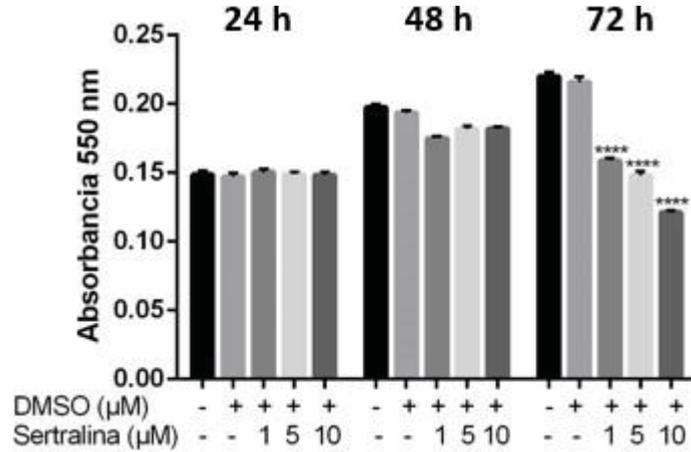
4.1. VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular após o tratamento com sertralina foi avaliada pelo ensaio utilizando a técnica de MTT, que se baseia na atividade mitocondrial das células viáveis. Após o plaqueamento, as células foram tratadas com as concentrações de 1, 5 e 10 μM de sertralina e a viabilidade avaliada após 24, 48 e 72 horas de tratamento. Os resultados obtidos para o tratamento com sertralina foram sempre comparados com os resultados obtidos com a mesma quantidade de solvente (DMSO) utilizado para os tratamentos.

Nas FIGURAS 3 e 4 estão apresentados os resultados dos estudos com as linhagens PMC 42 e MCF7, respectivamente. Nas condições testadas a menor concentração de sertralina (1 μM) não afetou a viabilidade celular das linhagens de forma significativa em 24 e 48 horas. O maior efeito da sertralina foi observado com a maior concentração (10 μM)

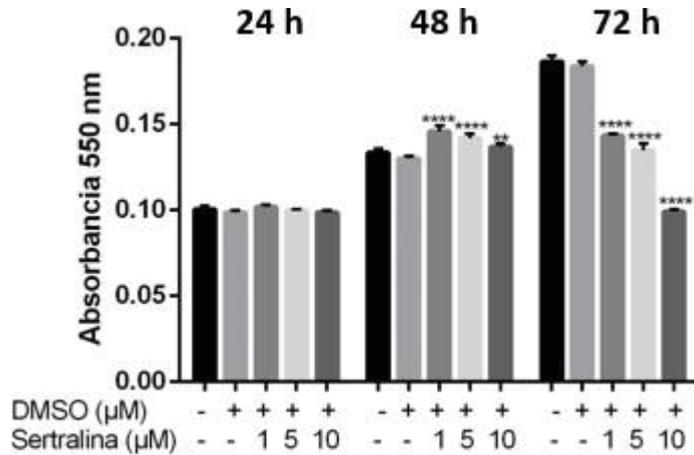
após 72 horas, com redução de 40% da viabilidade para PMC 42, e 38%, para MCF7.

Figura 3: Avaliação do tratamento com sertralina na viabilidade celular na linhagem PMC 42 (método MTT). Três experimentos independentes (n=5). *p<0,1, ***p<0,001 e ****p<0,0001.



Fonte: O autor (2017).

Figura 4: Avaliação do tratamento com sertralina na viabilidade celular na linhagem MCF7 (método MTT). Três experimentos independentes (n=5). *p<0,1, *** p<0,001 e ****p<0,0001.



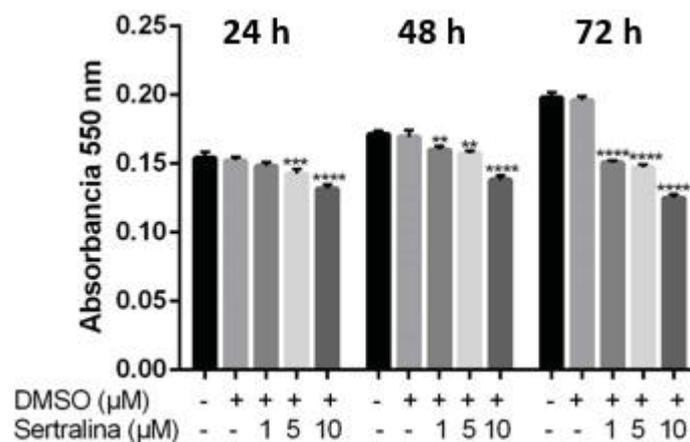
Fonte: O autor (2017).

Os ensaios de viabilidade seriam todos realizados por avaliação da quantidade de ATP por luminescência. Contudo, devido a problemas no equipamento que faz a detecção da luminescência (TECAN), disponível no laboratório do Prof. Dr. Luis Claudio Fernandes (Departamento de Fisiologia) nossos experimentos tiveram que ser interrompidos. Infelizmente, este é o único equipamento que faz leitura de luminescência no Setor de Ciências Biológicas (UFPR). Cabe aqui ressaltar que para as linhagens

MCF7 e PMC 42 foi possível realizar o experimento pelo método de luminescência que avalia a quantidade de ATP intracelular (*kit Cell Titer Glo*, Promega), e os resultados obtidos (dados não mostrados) estão de acordo com os resultados obtidos pelo método MTT.

A viabilidade da linhagem SKBR-3 apresentou uma diminuição da viabilidade já após 24 horas de tratamento. O tratamento com a maior concentração de sertralina, em 72 h, ocasionou uma diminuição de até 30% na viabilidade, como observa-se na FIGURA 5.

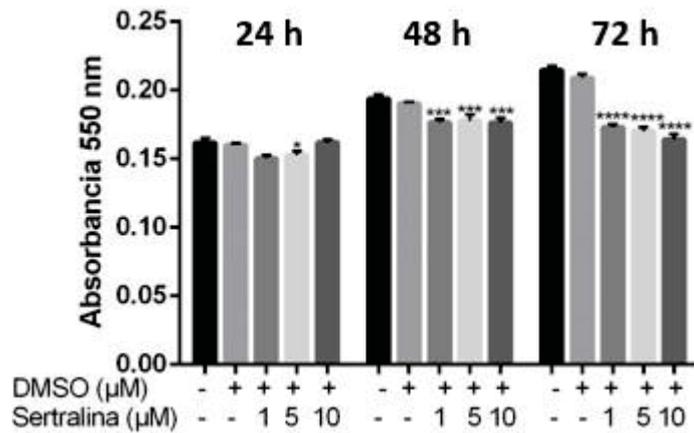
Figura 5: Avaliação do efeito da sertralina na viabilidade celular na linhagem SKBR-3 (método MTT). Três experimentos independentes (n=5). **p<0,01, *** p<0,001 e ****p<0,0001.



Fonte: O autor (2017).

O tratamento da linhagem MDA-MB-231 (FIGURA 6) com sertralina também diminui a viabilidade das células. Após 72 horas de tratamento, a diminuição da viabilidade foi de 19% e 25% para as concentrações de 5 e 10 µM, respectivamente.

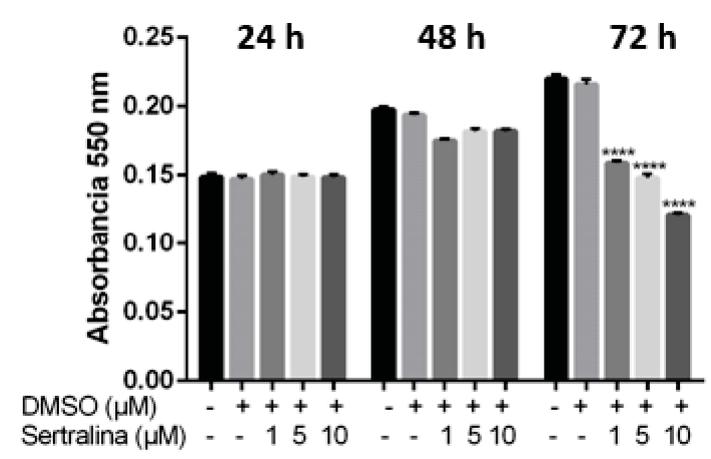
Figura 6: Avaliação do efeito da sertralina na viabilidade celular na linhagem MDA-MB-231 (método MTT). Três experimentos independentes (n=5). *p<0,1, ** p<0,01 e ***p<0,001.



Fonte: O autor (2017).

Os resultados dos ensaios de viabilidade da linhagem MDA-MB-436 após tratamento com sertralina estão apresentados na FIGURA 7. Observa-se que as concentrações de 5 e 10 µM de sertralina, após 72 horas, diminuem a viabilidade em 50% e 30%, respectivamente.

Figura 7: Avaliação do tratamento com sertralina na viabilidade celular na linhagem MDA-MB-436 (método MTT). Três experimentos independentes (n=5). ** p<0,01 e ****p<0,0001.



Fonte: O autor (2017).

4.2. ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO DE TCTP

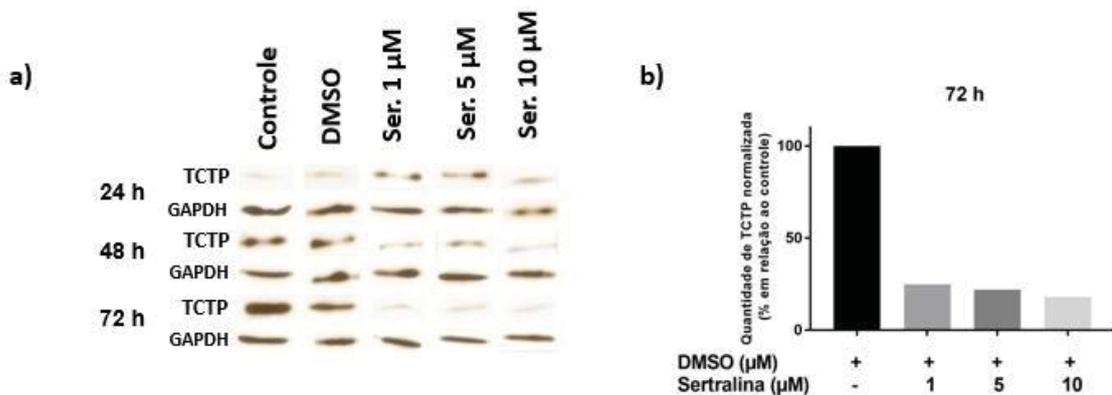
Para a análise dos níveis proteicos intracelulares de TCTP após tratamentos com sertralina foram realizados ensaios de imunodeteção (*Western Blott*) utilizando o extrato celular das linhagens estudadas.

Após a transferência para nitrocelulose, as proteínas TCTP e GAPDH foram detectadas por meio de anticorpos primários específicos e seguidos

de anticorpos secundários conjugados com peroxidase. Os resultados foram analisados sempre em comparação com GAPDH, para normatização da quantidade de células analisada em cada amostra. Nos gráficos estão apresentadas as quantidades de TCTP normatizadas pelos níveis de GAPDH em relação ao controle (considerado 100%).

A linhagem PMC 42 (FIGURA 8) apresenta redução dos níveis proteicos de TCTP tempo dependente após o tratamento com sertralina, sendo bastante evidente após 72 horas de tratamento, em todas concentrações estudadas. Os níveis de TCTP reduziram em 70% após 72 horas de tratamento com 1 μ M.

Figura 8: Sertralina diminui os níveis intracelulares de TCTP em células PMC 42. a) Imunodeteção de TCTP em extratos celulares (50 μ g de proteínas) das diferentes condições experimentais de tratamento. Extratos foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE e, após a transferência para nitrocelulose, foram incubados com os anticorpos primários anti-TCTP e anti-GAPDH (controle). Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase foram detectados utilizando o reagente para quimioluminescência. b) Gráfico que representa as quantidades de TCTP, mensuradas por densitometria e normatizadas pelos níveis de GAPDH, em relação ao controle DMSO (considerado 100%).

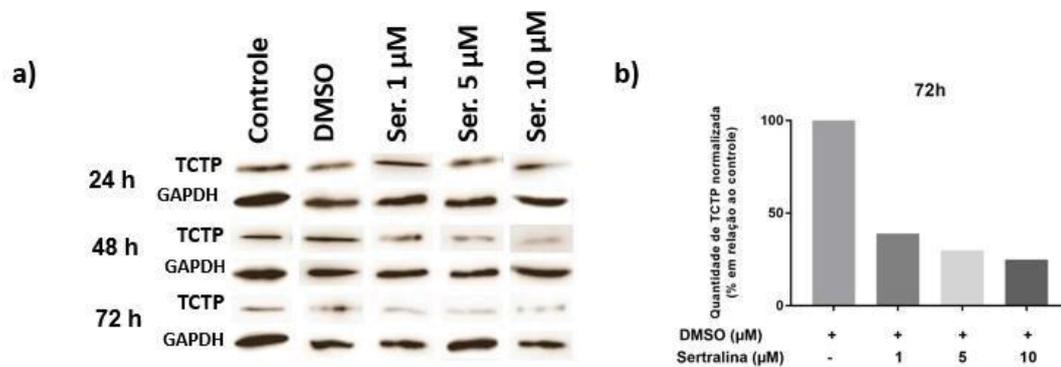


Fonte: O autor (2017).

Os níveis de TCTP da linhagem MCF7 após 72 horas de tratamento com sertralina estão apresentados na FIGURA 9. Em todas as

concentrações (1, 5 e 10 μM), após 72 horas, a quantidade de TCTP está bem reduzida quando comparada ao controle negativo (DMSO). Observa-se uma redução de 70, 73 e 79%, respectivamente.

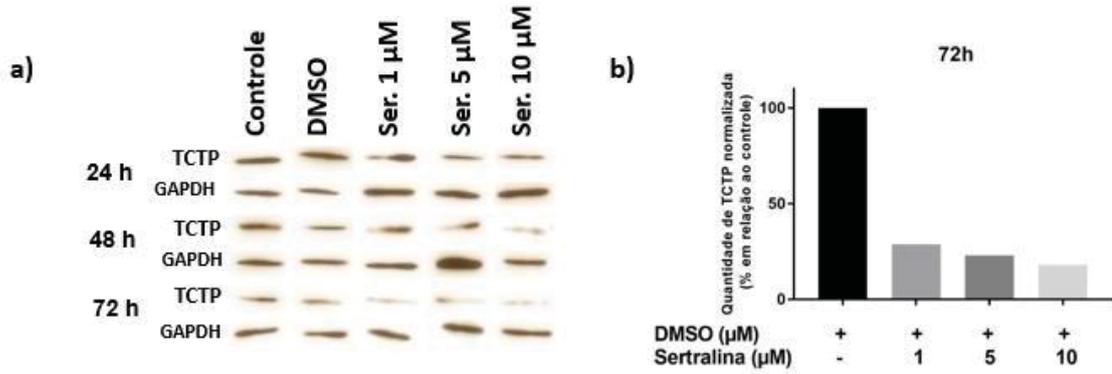
Figura 9: Sertralina diminui os níveis intracelulares de TCTP em células MCF7. a) Imunodeteção de TCTP em extratos celulares (50 μg de proteínas) das diferentes condições experimentais de tratamento. Extratos foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE e, após a transferência para nitrocelulose, foram incubados com os anticorpos primários anti-TCTP e anti-GAPDH (controle). Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase foram detectados utilizando o reagente para quimioluminescência. b) Gráfico que representa as quantidades de TCTP, mensuradas por densitometria e normalizadas pelos níveis de GAPDH, em relação ao controle DMSO (considerado 100%).



Fonte: O autor (2017).

A linhagem SKBR-3 apresentou redução bastante significativa da quantidade de TCTP após os tratamentos com sertralina (FIGURA 10). A concentração mais baixa utilizada (1 μM) provocou uma redução bastante evidente nos níveis de TCTP após 48 horas (~23%) (gráfico não mostrado) e chegando a 68% após 72 horas de tratamento.

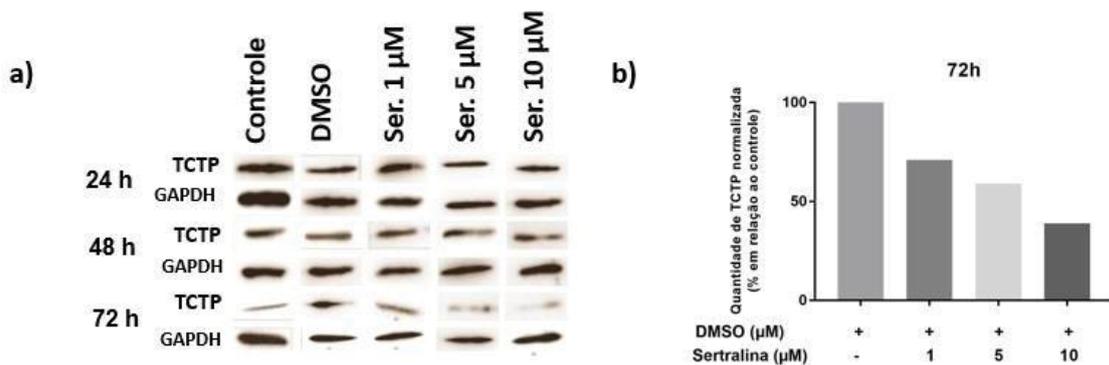
Figura 10: Sertralina diminui os níveis intracelulares de TCTP em células SKBR-3. a) Imunodeteção de TCTP em extratos celulares (50 μg de proteínas) das diferentes condições experimentais de tratamento. Extratos foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE e, após a transferência para nitrocelulose, foram incubados com os anticorpos primários anti-TCTP e anti-GAPDH (controle). Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase foram detectados utilizando o reagente para quimioluminescência. b) Gráfico que representa as quantidades de TCTP, mensuradas por densitometria e normalizadas pelos níveis de GAPDH, em relação ao controle DMSO (considerado 100%).



Fonte: O autor (2017).

Os resultados da linhagem MDA-MB-231 (FIGURA 11) apresentaram diminuição nas concentrações de TCTP nos tempos e tratamentos avaliados. Os resultados foram tempo e dose dependentes, em 72 horas as concentrações de 1, 5 e 10 μM reduziram os níveis de TCTP para 32, 41 e 59%, respectivamente.

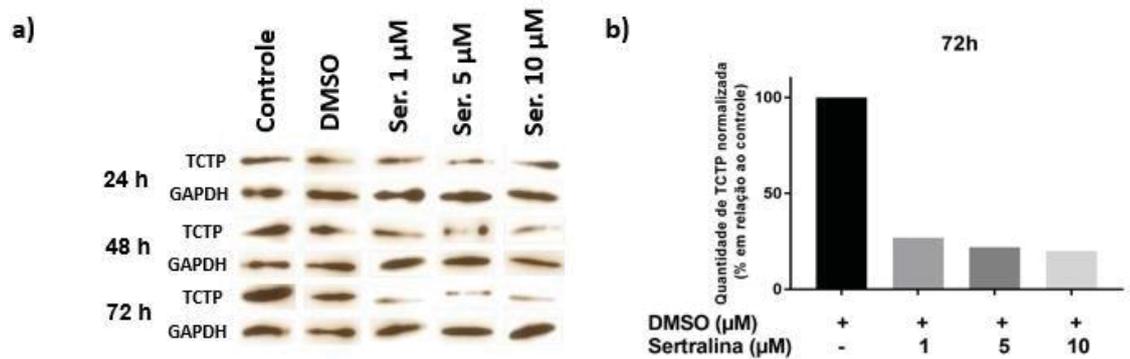
Figura 11: Ensaio de imunodeteção de TCTP na linhagem MDA-MB-231 após tratamento com sertralina. a) Extratos celulares (50 μg de proteínas) das diferentes condições experimentais foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE e, após a transferência para nitrocelulose, foram incubados com os anticorpos primários anti-TCTP e anti-GAPDH (controle). Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase foram detectados utilizando o reagente para quimioluminescência. b) Gráfico que representa as quantidades de TCTP, mensuradas por densitometria, normalizadas pelos níveis de GAPDH em relação ao controle DMSO (considerado 100%).



Fonte: O autor (2017).

A linhagem MDA-MB-436 também apresentou redução das quantidades intracelulares de TCTP após os tratamentos com sertralina. A diminuição de TCTP foi bastante pronunciada em todas as concentrações estudadas: 67% (1 μM) e 78% (10 μM) após 72 horas (FIGURA 12).

Figura 12: Sertralina diminui os níveis intracelulares de TCTP em células MDA-MB 436. a) Imunodeteção de TCTP em extratos celulares (50 µg de proteínas) das diferentes condições experimentais de tratamento. Extratos foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE e, após a transferência para nitrocelulose, foram incubados com os anticorpos primários anti-TCTP e anti-GAPDH (controle). Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase foram detectados utilizando o reagente para quimioluminescência. b) Gráfico que representa as quantidades de TCTP, mensuradas por densitometria e normalizadas pelos níveis de GAPDH, em relação ao controle DMSO (considerado 100%).



Fonte: O autor (2017).

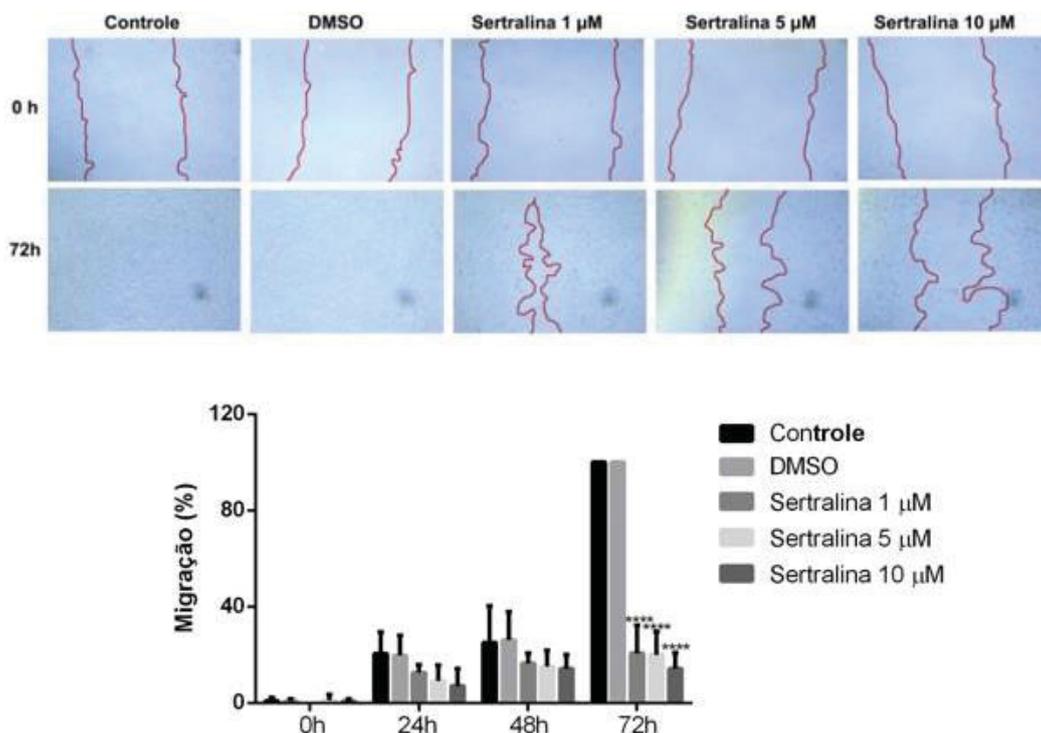
A avaliação da quantidade de TCTP por imunodeteção confirmou o efeito da sertralina na diminuição dos níveis celulares proteicos de TCTP em todas as linhagens de tumor de mama estudadas. A redução de TCTP pela sertralina foi tempo e concentração dependente.

4.3. MIGRAÇÃO

Para avaliar o efeito da sertralina sobre a migração das células de tumor de mama utilizamos a metodologia do ensaio por *scratch*. Nestes experimentos, após a formação de uma monocamada pelas células, é passado um objeto pontiagudo sobre a monocamada, removendo as células nestes locais. Forma-se uma área livre de células. Por meio da avaliação do preenchimento desta área sem células, ao longo do tempo, é avaliada a taxa de migração celular. Utiliza-se um inibidor de proliferação celular (mitomicina C) para garantir que a área seja preenchida pela migração das células e não devido a eventos de mitose.

Para todas as linhagens foram realizados 3 experimentos independentes utilizando pentaplicatas, em todas as replicatas biológicas de cada linhagem foram observados os mesmos efeitos inibitórios da sertralina. Nas figuras de cada uma das linhagens apresentamos dados e fotos de um experimento representativo. Na FIGURA 13 estão os resultados obtidos para a linhagem PMC 42. Em todos os tempos avaliados foi possível observar a diminuição da migração das células tratadas com sertralina. Os controles negativos (meio de cultura e DMSO) fecharam a área de *scratch* em 72 horas. A linhagem PMC42 mostrou-se bastante sensível ao tratamento com a sertralina, observamos uma redução da migração muito pronunciada (80%) mesmo na menor concentração ensaiada (1 μM). Os valores de migração diminuíram em 78% e 84%, nos tratamentos com 5 e 10 μM de sertralina, respectivamente.

Figura 13: Sertralina diminui a migração em células PMC42. Avaliação da migração celular por “scratch” na presença de sertralina (1, 5 e 10 μM). A área livre de células foi fotografada nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas e as análises foram realizadas utilizando o “software” Image J. Experimento único representativo (n=5). **** $p < 0,0001$.

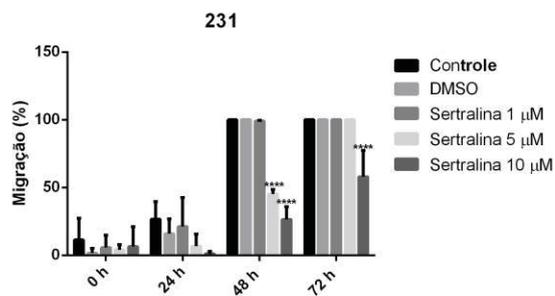
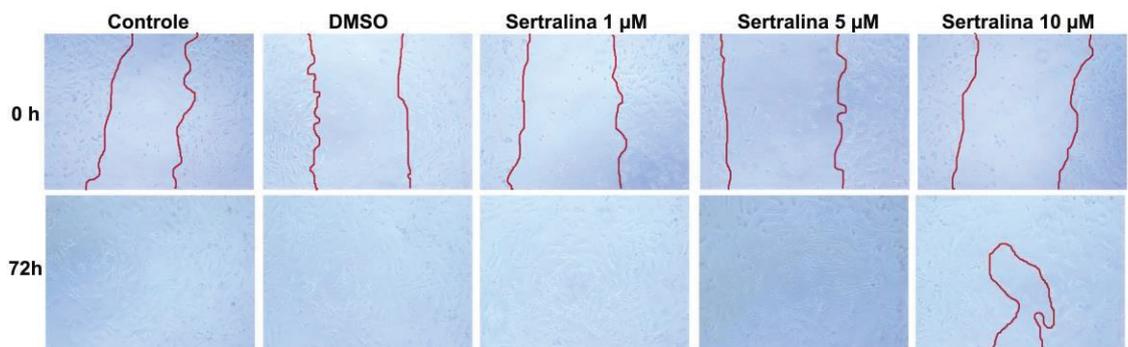


Fonte: O autor (2017).

Não foi realizado ensaio de migração celular para a linhagem MCF7, uma vez que a linhagem caracteriza-se por não apresentar atividade migratória (Bartucci *et al.*, 2001).

Na migração da linhagem MDA-MB-231 houve diminuição de 23,8% na presença de 10 μM de sertralina em 72 horas (FIGURA 14). Nas outras condições de tratamento, a área de “scratch” foi completamente preenchida por células no tempo 72 horas, contudo em 48 horas podemos evidenciar a inibida migração na concentração de 5 μM .

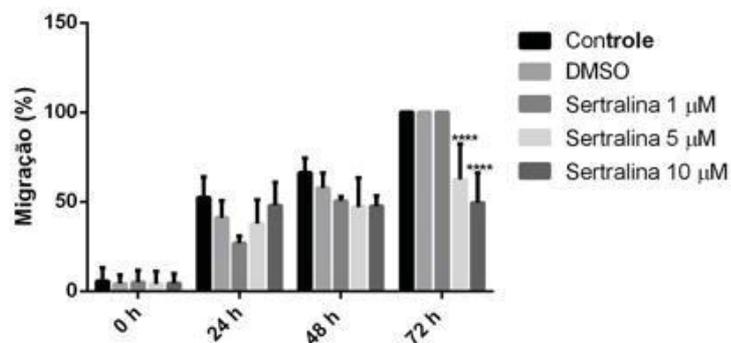
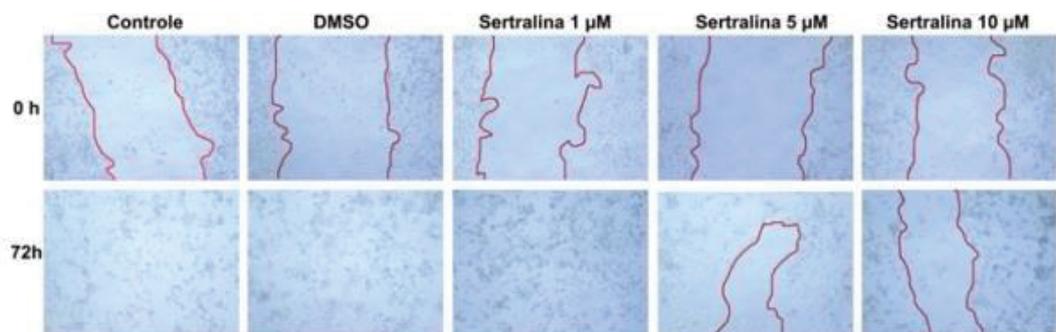
Figura 14: Sertralina diminui a migração em células MDA-MB 231. Avaliação da migração celular por “scratch” na presença de sertralina (1, 5 e 10 μM). A área livre de células foi fotografada nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas e as análises foram realizadas utilizando o “software” Image J. Experimento único representativo (n=5) ****p<0,0001.



Fonte: O autor (2017).

A linhagem MDA-MB-436 apresentou redução significativa na migração celular em 72 horas (FIGURA 15). As concentrações de 5 e 10 μM de sertralina reduziram a migração em 37,5 e 50,6%, respectivamente. A concentração de 1 μM não resultou em inibição significativa da migração.

Figura 15: Sertralina diminui a migração em células MDA-MB 436. Avaliação da migração celular por “scratch” na presença de sertralina (1, 5 e 10 μM). A área livre de células foi fotografada nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas e as análises foram realizadas utilizando o “software” Image J. Experimento único representativo (n=5). ****p<0,0001.



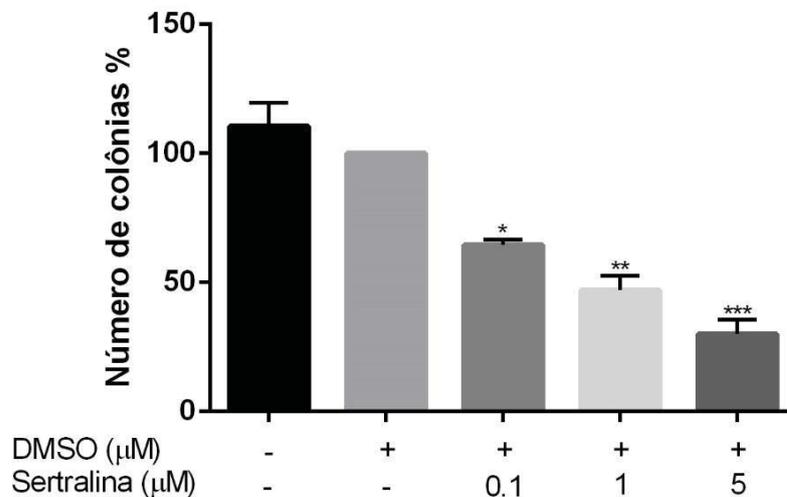
Fonte: O autor (2017).

4.4. CLONOGENICIDADE CELULAR

Nos ensaios de clonogenicidade a capacidade de proliferação independente de ancoragem das células foi avaliada. Esta é uma característica comum das células tumorais e tem sido relacionada com as células responsáveis pela proliferação tumoral (células-tronco tumorais). Neste experimento foram utilizadas as concentrações de 0.1, 1 e 5 μM .

Os resultados dos experimentos com a linhagem PMC 42 estão mostrados na FIGURA 16. Observa-se uma redução significativa no número de colônias formadas, mesmo na menor concentração de sertralina usada (0,1 μM) há uma diminuição de 35% no número de colônias formadas quando comparado ao controle (DMSO). Já a maior concentração (5 μM) apresentou uma redução de aproximadamente 70% no número de colônias.

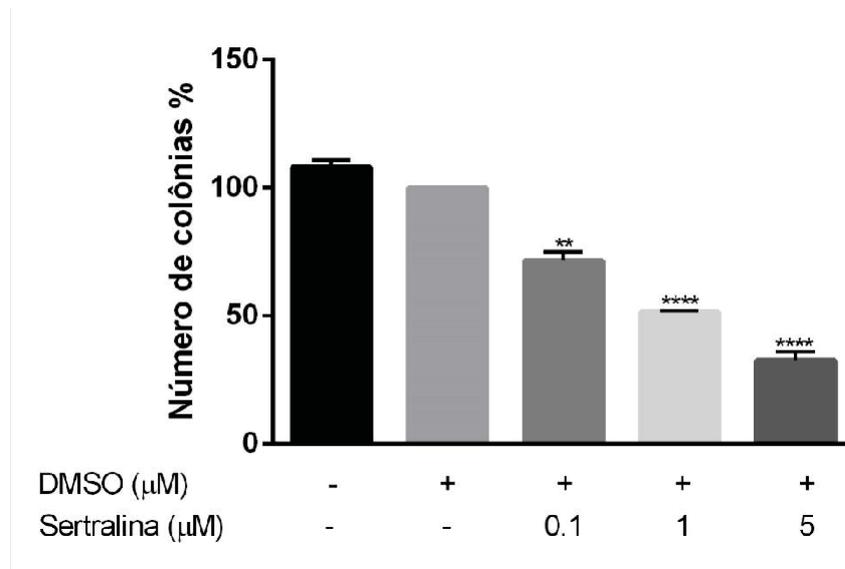
Figura 16: Sertralina reduz a capacidade clonogênica das células PMC42. Ensaio de clonogenicidade em ágar mole (5000 células incubadas meio semi-sólido por 21 dias). Três experimentos independentes (n=5). * $p < 0,1$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.



Fonte: O autor (2017).

Na linhagem MCF7 a capacidade de clonogenicidade também foi reduzida na presença de sertralina (FIGURA 17). A concentração de 0,1 μM de sertralina reduziu o número de colônias em 32%. As concentrações de 1 e 5 μM de sertralina resultaram em grande inibição da formação de colônias, número de colônias foi aproximadamente 50% e 55% do controle, respectivamente.

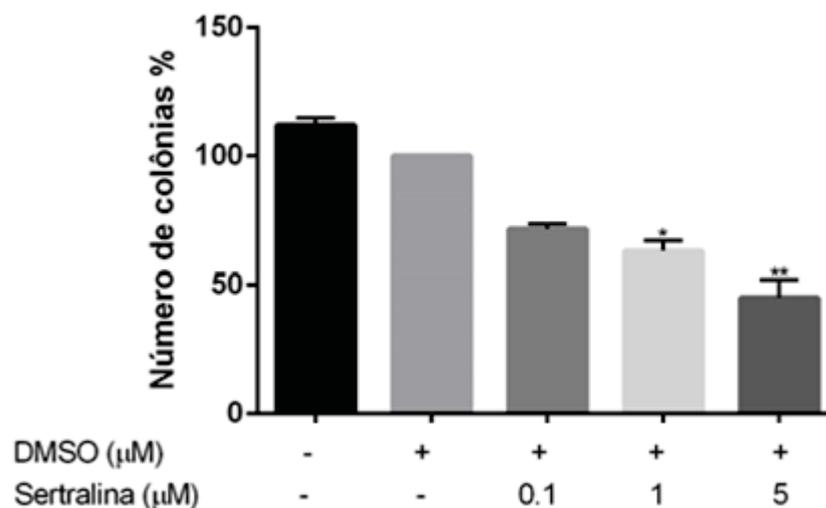
Figura 17: Sertralina reduz a capacidade clonogênica das células MCF7. Ensaio de clonogenicidade em ágar mole (5000 células incubadas meio semi-sólido por 21 dias). Três experimentos independentes (n=5). ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$.



Fonte: O autor (2017).

A linhagem SKBR-3 (subtipo Her2+) também foi avaliada quanto à clonogenicidade na presença da sertralina (FIGURA 18). Observa-se que as concentrações de 1 e 5 μM de sertralina foram capazes de inibir a formação de colônias em 27% e 36%, respectivamente.

Figura 18: Sertralina reduz a capacidade clonogênica das células SKBR-3. Ensaio de clonogenicidade em ágar mole (5000 células incubadas meio semi-sólido por 21 dias). Três experimentos independentes (n=5). * $p < 0,1$ e ** $p < 0,01$.

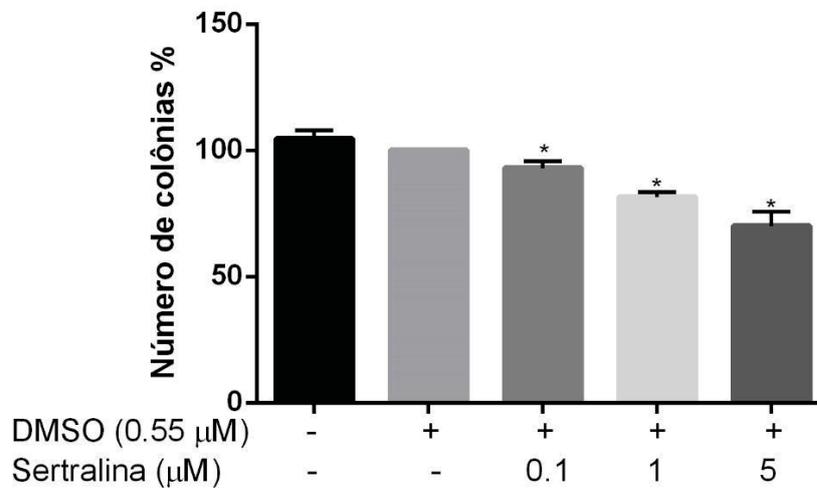


Fonte: O autor (2017).

As linhagens triplo negativas, MDA-MB-231 e MDA-MB-436, também apresentaram diminuição do número de colônias formadas no ensaio de

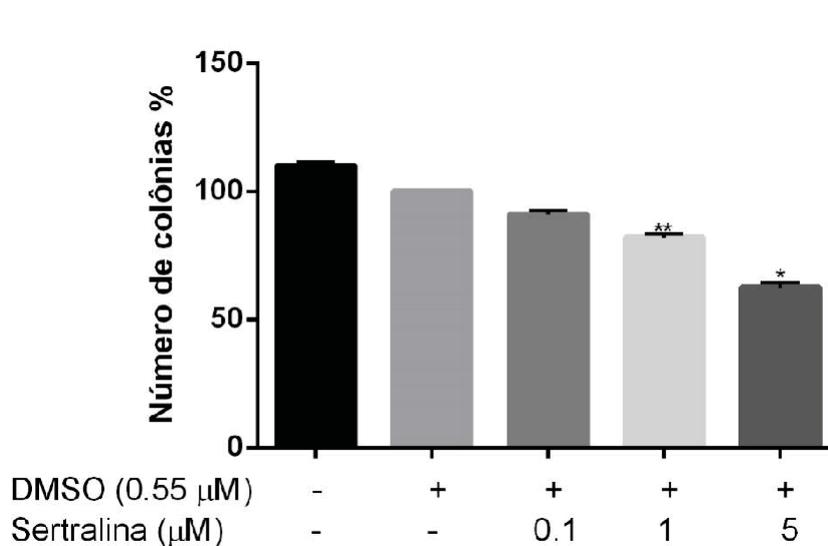
clonogenicidade em ágar mole. A linhagem MDA-MB-231 (FIGURA 19) apresentou uma diminuição de 41% e 27% no número de colônias formadas na presença de 1 e 5 μM de sertralina, respectivamente. Na FIGURA 20, os resultados do ensaio de clonogenicidade para a linhagem MDA-MB-436. As concentrações de 1 e 5 μM de sertralina reduziram em 18% e 30% o número de colônias formadas no ensaio, respectivamente.

Figura 19: Sertralina reduz a capacidade clonogênica das células MDA-MB231. Ensaio de clonogenicidade em ágar mole (5000 células incubadas meio semi-sólido por 21 dias). Três experimentos independentes (n=5). *p<0,1.



Fonte: O autor (2017).

Figura 20: Sertralina reduz a capacidade clonogênica das células MDA-MB 436. Ensaio de clonogenicidade em ágar mole (5000 células incubadas meio semi-sólido por 21 dias). Três experimentos independentes (n=5). *p<0,1 e ** p<0,01.



Fonte: O autor (2017).

5. DISCUSSÃO

Desde os primeiros estudos da relação da proteína TCTP com tumores a presença de grande quantidade de TCTP foi caracterizada em inúmeros tipos de cânceres (ACUNZO *et al.*, 2014). A relação direta entre os níveis de expressão de TCTP e as características tumorais vem sendo estudada por diferentes grupos de pesquisa (AMSON *et al.*, 2012; BAE *et al.*, 2015; SEO, J.E.; EFFERTH, T. 2016; BOMMER *et al.*, 2017).

Devido ao caráter de histaminérgico da TCTP, drogas anti-histamínicas foram avaliadas quanto a seus efeitos nos níveis proteicos de TCTP e sua possível ação antitumoral (TUYNDER *et al.*, 2004). Por similaridade estrutural com os anti-histamínicos drogas como a sertralina (antidepressivo, inibidor da recaptação de serotonina), a tioridazina (antipsicótico) e a paroxetina (antidepressivo, inibidor da recaptação de serotonina) também foram estudadas. Essas drogas mostraram redução dos níveis de TCTP que foram correlacionados com efeitos antitumorais (TUYNDER *et al.*, 2004). Estudos mais recentes mostraram a interação direta da sertralina e da tioridazina com a TCTP (AMSON *et al.*, 2012). Um estudo mais recente mostrou outras duas drogas, levomepromazina (antipsicótico) e buclizina (estimulante de apetite), ligantes de TCTP, com propriedades antitumorais (SEO, J.E.; EFFERTH, T. 2016). A TCTP se apresenta como um alvo terapêutico diferencial uma vez que sua inibição está relacionada com a reversão tumoral (TELERMAN, A.; AMSON, R. 2009). Neste processo ocorre a perda do fenótipo maligno por reprogramação celular. Neste contexto, a diminuição dos níveis de TCTP é uma estratégia terapêutica inovadora com menos efeitos deletérios e de seleção de resistência que os tratamentos quimioterápicos citotóxicos atuais.

Nos últimos anos tem crescido o número de estudos que apontam a sertralina, droga antidepressiva, como possível agente terapêutico no tratamento antitumoral. A droga já foi estudada como regulador negativo da

expressão de TCTP, efeito que está associado com sua ação antiproliferativa *in vitro* em diferentes tipos celulares. A sertralina, a partir da ligação direta à TCTP, inibe a ligação de TCTP à MDM2, portanto reduz a ubiquitinação de P53 via MDM2.

Assim, quando a célula é tratada com o antidepressivo, ocorre a ativação de P53 e sua ligação ao elemento responsivo na região promotora da TCTP, levando à inibição da transcrição do mRNA de TCTP (AMSON *et al.*, 2012; ACUNZO *et al.*, 2014). Contudo, observamos efeitos antitumorais também em células onde p53 está mutado, portanto, a reprogramação desencadeada pela diminuição dos níveis de TCTP deve envolver outras moléculas também.

A relevância de TCTP no contexto dos tumores de mama já foi demonstrada em linhagens celulares (TUYNDER *et al.*, 2002; TUYNDER *et al.*, 2004; SEO, J.E.; EFFERTH, T. 2016) e também em amostras clínicas (AMSON *et al.*, 2012). Contudo, este é o primeiro estudo comparativo entre linhagens com diferentes genótipos e fenótipos. Para fazer a análise da relevância de TCTP na malignidade dos diferentes tipos de tumor de mama foram escolhidas linhagens que representam as diferentes classes clínicas de tumores: dependentes de hormônios (MCF7), HER positivos (SKBR3), triplo negativos (MDAMB231 e MDAMB436), e uma linhagem com características de células-tronco (PMC42).

Nos estudos iniciais de viabilidade celular, observamos que a sertralina provoca uma diminuição no número de células viáveis quando comparado com o controle em todas as linhagens celulares. É importante ressaltar que quando comparamos os resultados de viabilidade das células tratadas não observamos uma diminuição no número de células viáveis na sequência dos tempos avaliados, o que sugere uma ação citostática nestas concentrações, de inibição da proliferação. Recentemente, um estudo utilizando outras drogas antihistamínicas (levomepromazina e buclizina), que também diminuem os níveis de TCTP, mostrou que a ação destas drogas sobre células MCF7 é citostática (SEO, J.E.; EFFERTH, T. 2016). Os pesquisadores avaliaram o ciclo celular, a externalização de fosfatidilserina

(marcador de apoptose), expressão de MCL- 1L e MCL-1S (proteínas reguladoras do ciclo celular, anti-apoptótica e pró- apoptótica, respectivamente) e ensaio de azul de Trypan e os resultados indicam que a ação destas drogas não é citotóxica, como a da doxorrubicina (utilizada para comparação). Contudo, sabemos que a sertralina e a diminuição de TCTP podem também estar relacionada com o aumento da apoptose (AMSON *et al.*, 2012). Estudos complementares serão necessários para avaliar o efeito da sertralina sobre a indução de apoptose e determinar se sua ação está mais relacionada a um efeito citostático ou citotóxico.

Nos resultados de imunodeteção nos extratos celulares observamos que há diminuição nos níveis intracelulares de TCTP com o tratamento com sertralina em todas as linhagens de tumor de mama avaliadas. A ação da sertralina na diminuição dos níveis de TCTP já foi mostrada para linhagens celulares, como de mama (MDA-MB-231) e em leucemia monocítica (U937) (TUYNDER *et al.* 2004), e também em linhagens de leucemia obtidas de pacientes (*ex-vivo*) (AMSON *et al.*, 2013). Já é bem estabelecido na literatura que os efeitos da sertralina estão relacionados à diminuição dos níveis de TCTP. O mesmo perfil de resposta é obtido com técnicas de inibição de expressão de TCTP (siRNA e oligonucleotídeos) (TUYNDER *et al.*, 2002). Portanto, nossos resultados estão de acordo com os estudos que sugerem que a proteína TCTP tem um papel chave nas características de malignidade das células tumorais. TUYNDER e colaboradores (2002) estudaram duas linhagens de células de câncer de mama (MCF7 e T47D), em sistema de cultura 3D em matrigel, o silenciamento da TCTP desencadeou uma reorganização celular, com crescimento e organização muito semelhante aos das células normais nas mesmas condições (estruturas em forma de ducto). Em modelos de reversão tumoral, a expressão da proteína TCTP encontra-se diminuída, contrastando com a expressão aumentada em vários tipos de câncer. Nas linhagens celulares de tumor de mama (BT20 e MDA-MB-231), a TCTP foi regulada negativamente na reversão tumoral (TUYNDER *et al.*, 2004; TUYNDER *et al.*, 2002). Além disso, em estudo que avaliou a TCTP em 508 biópsias de mama, a expressão desta proteína foi correlacionada com os parâmetros clínicos e

patológicos de doença agressiva nos tumores de mama (AMSON *et al.*, 2012).

A proteína TCTP está principalmente aumentada em células mitoticamente ativas (BAYLOT *et al.*, AMSON *et al.*, 2012). No ensaio de clonogenicidade é avaliada a capacidade de proliferar gerando clones e formando colônias na ausência de ancoragem (meio semi-sólido). Este procedimento experimental também está relacionado à avaliação de células tumorais com características de células-tronco (células tronco tumorais) (CSC, do inglês *Cancer Stem Cells*).

As células tronco tumorais estão envolvidas com a origem e progressão do tumor e já foram caracterizadas em vários tipos de câncer, inclusive mama (PECE *et al.*, 2010). Portanto, a diminuição no número de colônias formadas na presença de sertralina, observada em todas as linhagens testadas, demonstra que a expressão de TCTP está relacionada ao crescimento independente de ancoragem, uma característica comum das células tronco tumorais. Este aspecto é ainda mais relevante nos resultados obtidos para PMC 42, que possui fenótipo bastante semelhante às células tronco tumorais. Estudos anteriores mostraram que a inibição da expressão de TCTP em fibroblastos transformados levou a um processo de reversão do fenótipo maligno com recuperação da morfologia característica de fibroblastos normais, retorno à inibição por contato e do crescimento dependente de ancoragem. Assim, relacionando a diminuição dos níveis de TCTP ao processo de reversão tumoral (TUYNDER *et al.*, 2004). Em células de tumor de mama que apresentam marcadores de célula tronco tumoral a expressão de TCTP está aumentada quando comparada com células de tumor de mama sem características de célula tronco tumoral de mama. A diminuição dos níveis de TCTP resultou em uma diminuição na formação de mamíferas (AMSON *et al.*, 2012). Esses dados em conjunto com os dados da literatura sugerem que a TCTP apresenta um papel regulador na atividade de células tronco tumorais dos tumores de mama e a valida como alvo terapêutico em tumores em que estes tipos celulares (CSC) já foram relacionados à progressão tumoral.

O eixo TCTP-P53, com repressão recíproca entre as proteínas, já está bem caracterizado na literatura, inclusive em células tronco tumorais (AMSON *et al.*, 2012). A sertralina, ao diminuir os níveis de TCTP, ocasiona o aumento da expressão da proteína P53, a qual também atua na diminuição dos níveis de TCTP, inibindo sua transcrição e estimulando sua secreção via exossomos (AMSON *et al.*, 2012). Contudo, no presente estudo não avaliamos os níveis de P53 após o tratamento com sertralina. Os dados da literatura mostram as linhagens MCF7 e PMC-42 como portadoras de p53 selvagem e as linhagens MDM-MD 231, MDM-MB 436 e SKBR-3 como portadoras de p53 mutado. Os efeitos antitumorais da sertralina foram observados em todas as linhagens estudadas.

A migração celular é um aspecto muito relevante dentro da biologia tumoral e está relacionada com os eventos de metástase no contexto da progressão dos tumores. Migração celular é um termo definido para descrever qualquer movimento dirigido da célula no organismo (KRAMER *et al.*, 2013). A TCTP já foi relacionada à migração e ao processo de metástase. Estudos anteriores mostraram que a superexpressão de TCTP ocasiona um aumento da migração celular, enquanto o seu silenciamento reduz o perfil de migração (BAE *et al.*, 2015; KLOC *et al.*, 2012; MA *et al.* 2010; BOIA-FERREIRA *et al.*, 2017).

Em estudos com melanoma murino em nosso laboratório, o silenciamento da TCTP provocou uma redução de aproximadamente 75% na migração celular destas linhagens (BOIA-FERREIRA *et al.*, 2017). Os resultados do presente trabalho apontam para um papel bastante importante da TCTP na capacidade de migração das células de tumor de mama. As linhagens de mama estudadas neste trabalho apresentaram diminuição na migração celular com o tratamento com sertralina. A diminuição de TCTP por shRNA em células de câncer de cólon reduziu significativamente migração celular, invasão e metástase para o fígado em modelo de camundongo (MA *et al.*, 2010). Porém, o mecanismo pelo qual a TCTP contribui para a migração e o processo de metástase não é compreendido totalmente. Ainda não há estudos sobre os mecanismos moleculares específicos pelos quais a diminuição de TCTP reduz a

capacidade de migração, ou ainda se isto é uma consequência do processo de reversão tumoral. O fenótipo de migração celular está intimamente ligado aos processos de progressão tumoral, invasão e metástase e o papel da TCTP merece ser melhor investigado em estudos posteriores.

BAE e colaboradores (2015) hipotetizaram que como a TCTP inibe a Na^+, K^+ -ATPase, sugerida como um marcador de transição epitelial-mesenquimal (EMT), foi sugerido que a TCTP também pode servir como um indutor de EMT. A EMT caracteriza-se por ser um processo em que as células epiteliais perdem suas características e adquirem propriedades de células mesenquimais (GREENBURG, G.; HAY, E.D. 1982). Este fenótipo mesenquimal enfatiza-se pelo aumento da capacidade migratória e invasiva, além de resistência a apoptose (KALLURI, R.; WEINBERG, R.A. 2009). Dessa maneira, a TCTP foi caracterizada um regulador positivo de EMT e a regulação negativa da TCTP inibe a transição de EMT, tanto em células epiteliais renais como em células de melanoma, além de suprimir a metástase pulmonar de melanoma. Além disso, nas células de melanoma (B16F10) com silenciamento de TCTP tanto a migração como a invasão reduziram significativamente quando comparadas com o controle. Estes resultados confirmam que a regulação negativa da TCTP inibe a metástase pulmonar, reduzindo a invasividade e migração das células de melanoma (BAE *et al.* 2015).

Comparativamente, as linhagens que apresentaram maior sensibilidade ao tratamento com sertralina nas doses avaliadas foram a PMC-42, a MCF7 e em seguida a SKBR-3. As linhagens subtipo triplo negativo (basal), MDA-MB-231 e MDA-MB-436, foram menos sensíveis ao tratamento com sertralina, mas o tratamento foi capaz de reduzir as características tumorais destas células. Acredita-se que a resposta da linhagem está associada com seu subtipo já que a linhagem MDA-MB-231 faz parte do subtipo basal. As linhagens desta classificação molecular caracterizam-se por apresentar fenótipo invasivo, maior índice mitótico, maior grau histológico e comportamento mais agressivo que os outros subtipos (YERSAL, O.; BARUTCA, S. 2014). Além disso, clinicamente este subtipo apresenta-se pouco responsivo aos tratamentos convencionais de

câncer de mama (radioterapia e quimioterapia). Quando comparamos as duas linhagens, MDA-MB-436 e MDA-MB-231, a literatura traz que a linhagem 231 teria um fenótipo ainda mais metastático que a linhagem 436 (TU et al., 2011). Analisando os resultados apresentados para estas linhagens observamos que a sertralina diminui o fenótipo migratório e clonogênico de ambas as linhagens, portanto, a sertralina apresenta-se como opção terapêutica para estes tipos tumorais. O uso de doses mais altas de sertralina poderia superar essa menor susceptibilidade característica destas células. Esta é uma opção bastante pertinente, uma vez que as doses utilizadas são bastante baixas, e que deverá ser estudada.

Estudos anteriores corroboram com a proposição da relação entre subtipo e susceptibilidade, LUCIBELLO e colaboradores (2015), durante seu estudo com a droga dihidroartemisinina (DHA), testaram a sensibilidade de células de câncer de mama a quimioterápicos juntamente com a dihidroartemisinina. Para a linhagem MDA-MB-231 foram utilizados três fármacos: doxorrubicina, cisplatina e paclitaxel, e para a linhagem SKBR-3 utilizou-se trastuzumab. Para as duas linhagens houve diminuição da proliferação celular e viabilidade celular, o que indica que a regulação da TCTP pode proporcionar uma alternativa eficaz para inibir a progressão das células de câncer de mama. Da mesma forma, em um estudo realizado por AMSON e colaboradores (2013), utilizando a sertralina em leucemia mieloide aguda, eles observaram que a droga foi capaz de reduzir a viabilidade de células de pacientes com leucemia mieloide aguda em experimentos *ex-vivo*. A sertralina também diminuiu o conteúdo intracelular de TCTP e o uso concomitante com quimioterápico Ara-C (droga de escolha para o tratamento de leucemia mieloide aguda) promoveu uma maior inibição do crescimento celular quando comparado à utilização das drogas isoladas (AMSON *et al.*, 2013). Estudos realizados pelo nosso grupo em modelo de melanoma murino mostram que uso de sertralina combinado com a dacarbazina (fármaco de escolha no tratamento de melanoma) apresentou resultados melhores que o uso do quimioterápico isolado. E, surpreendentemente, o tratamento com sertralina isolada (10mg/kg) foi

mais efetivo que o uso da dacarbazina isolada (60 mg/kg) (Boia-Ferreira et al., 2017). Portanto, o uso de quimioterápicos aliados à sertralina em linhagens de mama pode ser uma alternativa terapêutica com melhor resultado para os pacientes submetidos a este regime de tratamento.

Os resultados obtidos para a linhagem MCF7 são muito promissores. Apesar deste subtipo tumoral ter uma boa resposta clínica, a utilização de sertralina como auxiliar no tratamento pode ajudar na resposta terapêutica. A TCTP apresenta propriedades antiapoptóticas e a diminuição de seus níveis pode auxiliar na resposta à radioterapia e quimioterapia (ACUNZO *et al.* 2014; CHAN *et al.* 2012). Dados da literatura apontam para um perfil de baixa invasividade celular e sem migração nesta linhagem, portanto foram estudados os efeitos do tratamento com sertralina na viabilidade celular, clonogenicidade e imunodeteção, e não foi realizado ensaio de migração celular.

A linhagem SKBR3, representante do subtipo HER2+ (superexpressão do receptor tirosina quinase codificado pelo oncogene ErbB2), não teve sua análise completa, ainda serão realizados os ensaios de viabilidade e de migração celular. Como discutido anteriormente os tumores HER+ tem um fenótipo mais agressivo que os dependentes de hormônios (POLYAK, K.; METZGER-FILHO, O. 2012). Os resultados quanto aos níveis de TCTP após o tratamento com sertralina e de capacidade de formação de colônias na presença de sertralina são muito promissores. E estão de acordo com os dados prévios do papel de TCTP em células de um modelo de animal transgênico ErbB2 (AMSON *et al.*, 2012).

Vários estudos associam a expressão de TCTP com tumores agressivos e metastáticos sendo um fator de prognóstico negativo (KIM et al., 2008; NIFOROU et al., 2008; ZHU et al., 2008; SLABY et al., 2009). Sugere-se que diferenças nos níveis da proteína TCTP nos diferentes tipos celulares poderia acarretar uma variação do potencial de metástase (NICOLSON et al., 1978; NAKAMURA et al., 2002). Recentemente, um estudo em câncer de cólon verificou que os níveis de TCTP são regulados

positivamente no estágio inicial do desenvolvimento deste câncer, nos adenomas, e atingem o nível máximo já no estágio do adenocarcinoma não metastático (BOMMER *et al.* 2017). Estes resultados corroboram com o estudo de outro grupo de pesquisa: XIAO e colaboradores (2016) observaram um aumento significativo nos níveis de TCTP já no estágio de adenoma e estabeleceram uma associação entre o nível elevado de TCTP com alto grau de patologia e baixa sobrevida do paciente. Também analisaram que os níveis de TCTP são mais elevados em amostras de tumores metastáticos quando comparado com biópsias de tumor primário.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No desenvolvimento deste trabalho foi possível observar que os dados obtidos corroboram com dados da literatura que apontam TCTP como alvo terapêutico e a sertralina como estratégia clínica. A utilização de droga que diminuía os níveis de TCTP durante o tratamento é interessante e pode potencializar os efeitos de agentes citotóxicos além de poder inibir ou superar dificuldades de resistência clínica. Nos experimentos realizados, em todas as linhagens estudadas, o tratamento com sertralina apresentou efeito antitumoral que está relacionado à diminuição dos níveis de TCTP. Especialmente, os resultados das linhagens triplo negativo, mostraram-se relevantes já que este subtipo de tumor de mama apresenta-se refratário às terapias quimioterápicas atualmente empregadas.

7. REFERÊNCIAS

ACUNZO, J.; BAYLOT, V.; SO, A.; ROCCHI, P. TCTP as therapeutic target in cancers. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, p.760-769. 2014.

AMSON, R.B.; NEMANI, M.; ROPERCH, J.P.; ISRAELI, D.; BOUGUELERET, L.; LE GALL, I.; MEDHIOUB, M.; LINARES-CRUZ, G.; LETHROSNE, F.; PASTURAUD, P.; PLOUFFRE, L.; PRIEUR, S.; SUSINI, L.; ALVARO, V.; MILLASSEAU, P.; GUIDICELLI, C.; BUI, H.; MASSART, C.; CAZES, L.; DUFOUR, F.; BRUZZONI-GIOVANELLI, H.; OWADI, H.; HENNION, C.; CHARPAK, G.; TELERMAN, A. Isolation of 10 differentially expressed cDNA in p53-induced apoptosis: activation of the vertebrate homologue of the drosophila seven in absentia gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 3953-3957. 1996.

AMSON, R.; PECE, S.; LESPAGNOL, A.; VYAS, R.; MAZZAROL, G.; TOSONI, D.; COLALUCA, I.; VIALE, G.; RODRIGUES-FERREIRA, S.; WYNENDAELE, J.; CHALOIN, O.; HOEBEKE, J.; MARINE, J.C.; DI FIORE, P.P.; TELERMAN, A.
Reciprocal repression between P53 and TCTP. **Nature medicine**, v. 18, p.91– 99. 2012.

AMSON, R.; KARP, J.E.; TELERMAN, A. Lessons from tumor reversion for cancer treatment. **Current Opinion in Oncology**, v. 25, p.59-65. 2013.

BAE, S.Y.; KIM, H.J.; LEE, K.J.; LEE, K. Translationally controlled tumor protein induces epithelial to mesenchymal transition and promotes cell migration, invasion and metastasis. **Scientific Reports**, v.5, 2015.

BADVE, S.; DABBS, D.J.; SCHNITT, S.J.; BAEHNER, F.L.; DECKER, T.; EUSEBI, V.; FOX, S.B.; ICHIHARA, S.; JACQUEMIER, J.; LAKHANI, S.R.; PALACIOS, J.; RAKHAN, E.A.; RICHARDSON, A.L.; SCHMITT, F.C.; TAN, P.H.; TSE, G.M.; WEIGEL, B.; ELLIS, I.O.; REIS-FILHO, J.S. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. **Modern Pathology**, p. 157–167. 2011.

BARTUCCI, M.; MORELLI, C.; MAURO, L.; ANDO, S.; SURMACZ, E. Differential Insulin-like Growth Factor I Receptor Signaling and Function in Estrogen Receptor(ER)-positive MCF-7 and ER-negative MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. **CancerResearch**. p. 6747–6754. 2001.

BAYLOT, V.; KATSOGIANNOU, M.; ANDRIEU, C.; TAIEB, D.; ACUNZO, J.; GIUSIANO, S.; FAZLI, L.; GLEAVE, M.; GARRIDO, C.; ROCCHI, P. Targeting TCTP as a new therapeutic strategy in castration resistant prostate cancer. **Molecular Therapy**. v. 12. p. 2244-2256. 2012.

BIANCHINI, G.; BALKO, J.M.; MAYER, I.A.; SANDERS, M.E.; GIANNI, L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nature Reviews Clinical Oncology**. 13(11):674-690. 2016.

BOIA-FERREIRA, M.; BASÍLIO, A. B.; HAMASAKI, A. E.; MATSUBARA, F.H.; APPEL, M.H.; DA COSTA, C.R.V.; AMSON, R.; TELERMAN, A.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S.; SENFF-RIBEIRO, A. TCTP as a therapeutic target in melanoma treatment. **British Journal of Cancer**, v. 1, p. 1-13, 2017.

BOMMER, U.A.; BOROVJAGIN, A.V.; GREAGG, M. A.; JEFFREY, I. W.; RUSSEL, P.; LAING, K. G.; LEE, M.; CLEMENS, M. J. The mRNA of the translationally controlled tumor protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR. **Rna**, v. 8, p. 478-496, 2002.

BOMMER, U. A.; THIELE, B. J. The translationally controlled tumour protein (TCTP). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 379-385, 2004.

BOMMER, U.A.; VINE, K.L.; PURI, P.; ENGEL, M.; BELFIORE, L.; FILDES, K.; BATTERHAM, M.; LOCHHEAD, A.; AGHMESHEH, M. Translationally controlled tumour protein TCTP is induced early in human colorectal tumours and contributes to the resistance of HCT116 colon cancer cells to 5-FU and oxaliplatin. **Cell Commun Signal**. 15: 9. 2017.

BONNET, C.; PERRET, E.; DUMONT, X.; PICARD, A.; CAPUT, D.; LENAERS, G. Identification and transcription control of fission yeast genes repressed by an ammonium starvation growth arrest. **Yeast**, 16, 23–33. 2000.

BRIAND, P.; PETERSEN, O.W.; VAN DEURS, B. A new diploid nontumorigenic human breast epithelial cell line isolated and propagated in chemically defined medium. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**. 23(3):181-8. 1987.

BRIOUDES, F.; THIERRY, A.M.; CHAMBRIER, P.; MOLLEREAU, B.; BENDAHMANE, M. Translationally controlled tumor protein is a conserved mitotic growth integrator in animals and plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 107, p.16384-16389. 2010.

BRITOL, C.; PORTELA, M.C.; VASCONCELLOS, M.T.L. Fatores associados à persistência à terapia hormonal em mulheres com câncer de mama. **Revista Saúde Pública**. 48(2):284-295. 2014.

CHAN, T.H.; CHEN, L.; GUAN, X.Y. Role of translationally controlled tumor protein in cancer progression. **Biochemistry Research International**. 2012.

CHAVEZ, K.J.; GARIMELLA, S.V.; LIPKOWITZ, S. Triple Negative Breast

Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. **Breast Disease**, p. 35-48. 2010.

CHEN, S.; PARMIGIANI, G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. **Journal of Clinical Oncology**. 25(11):1329-33. 2007.

CHEN, Y.; FUJITA, T.; ZHANG, D.; DOAN, H.; PINKAEW, D.; LIU, Z.; WU, J.; KOIDE, Y.; CHIU, A.; LIN, C.C.; CHANG, J.Y.; RUAN, K.H.; FUJISE, K. Physical and functional antagonism between tumor suppressor protein p53 and fortilin, an anti-apoptotic protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 32575- 32585, 2011.

CIRQUEIRA, M.B.; MOREIRA, M.A.R.; SOARES, L.R.; FREITAS-JÚNIOR, R. Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina**, v.39, 2011.

COOKA, L.M; HURSTA, D.R; WELCH, D.R. Metastasis suppressors and the tumor microenvironment. **Seminars in Cancer Biology**. 21(1): p. 113–122. 2011.

COUCH, F.J.; NATHANSON, K.L.; OFFIT, K. Two Decades After *BRCA*: Setting Paradigms in Personalized Cancer Care and Prevention. **Science**. 343(6178): 1466–1470. 2014.

DAI, X.; LI, T.; BAI, Z.; YANG, Y.; LIU, X.; ZHAN, J.; SHI, B. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **American Journal of Cancer Research**. p. 2929-2943. 2015.

DRUKKER, C.A.; VAN TINTEREN, H.; SCHMIDT, M.K.; RUTGERS, E.J.; BERNARDS, R.; VAN DE VIJVER, M.J.; VAN'T VEER, L.J. Long-term impact of the 70-gene signature on breast cancer outcome. **Breast cancer research and treatment**, v.143, p. 587–592.2014.

FERLAY, J.; SHIN, H.R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D.M. **Cancer Incidence and Mortality Worldwide**. 2010. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>. Acesso em: 20 abr. 2015.

FIUCCI, G.; BEAUCOURT, S.; DUFLAUT, D.; LESPAGNOL, A.; STUMPTNER- CUVELETTE, P.; GEANT, A.; BUCHWALTER, G.; TUYNDER, M.; SUSINI, L.; LASSALLE, J.M.; WASYLYK, C.; WASSYLYK, B.; OREN, M.; AMSON, R.; TELERMAN, A. Siah-1b is a direct transcriptional target of p53: identification of the functional p53 responsive elemento in the siah-1b promoter. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 3510-3515. 2004.

FOULKES, W. D.; SMITH, I. E.; REIS-FILHO, J. S. Triple-negative breast cancer. **The New England Journal of Medicine**. 11;363(20):1938-48. 2010.

GACHET, Y.; TOURNIER, S.; LEE, M.; LAZARIS- KARATZAS, A.; POULTON, T.; BOMMER, U.A. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. **Journal of Cell Science**. v. 112. p. 1257– 1271. 1999.

GIT, A.; SPITERI, I.; BLENKIRON, C.; DUNNING, M.J.; POLE, J.C.M.; CHIN, S.; WANG, Y.; SMITH, J.; LIVESEY, F.J.; CALDAS, C. PMC 42, a breast progenitor cancer cell line, has normal-like mRNA and microRNA transcriptomes. **Breast Cancer Research**. Vol 10 N° 3, 2008.

GNANASEKAR, M.; THIRUGNANAM, S.; ZHENG, G.; CHEN, A.; RAMASWAMY, K. Gene silencing of translationally controlled tumor protein (TCTP) by siRNA inhibits cell growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells, **International Journal of Oncology**. v. 34. p.1241-1246. 2009.

GRAIDIST, P.; YAZAWA, M.; TONGANUNT, M.; NAKATOMI, A.; LIN, C.C.; CHANG, J.Y.; PHONGDARA, A.; FUJISE, K. Fortilin binds Ca²⁺ and blocks Ca²⁺ dependent apoptosis in vivo. **Biochemical Journal**, v. 408, p. 181–191. 2007.

GRANDCHAMP, B.; HETET, G.; KANNENGIESSER, C.; OUDIN, C.; BEAUMONT, C.; RODRIGUES-FERREIRA, S.; AMSON, R.; TELERMAN, A.; NIELSEN, P.; KOHNE, E.; BALSER, C.; HEIMPEL, H. A novel type of congenital hypochromic anemia associated with a nonsense mutation in the STEAP3/TSAP6 gene. **Blood**, v. 118, p.6660-6666. 2011.

GREENBURG, G.; HAY, E.D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. **Journal of Cell Biology**. v. 95. p. 333-339. 1982.

GUILLAUME, E.; PINEAU, C.; EVRARDETAL, B. Cellular distribution of translationally controlled tumor protein in rat and human testes. **Proteomics**, v. 1, p. 880–889, 2001.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674. 2011.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. CSHL Press. 1. ed. New York, 1988.

HENJES, F.; BENDER, C.; VON DER HEYDE, S.; BRAUN, L.; MANNSPERGER, H.A.; SCHIMIDT, C.; WIENMANN, S.; HASMANN, M.; AULMANN, S.; BEISSBARTH, T.; KORF, U. Strong EGFR signaling in cell line models of ERBB2-amplified breast cancer attenuates response towards ERBB2-targeting drugs. **Oncogenesis**, p. 01-09. 2012.

HOADLEY, K.A.; ANDRE, F.; ELLIS, M.J.; PEROU, C.M. Breast cancer intrinsic subtypes. **Nature**, 2014.

HOLLIDAY, D.L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research**, p.215. 2011.

HO-YEN, C.; BOWEN, R.L.; JONES, J. Characterization of basal-like breast cancer: an update. **Diagnostic Histopathology**. 18: 104-111. 2012.

HSU, Y.C.; CHERN, J.J.; CAI, Y.; LIU, M.; CHOI, K.W. Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. **Nature**. 445(7129):785–8. 2007.

INCA. **Tipos de Câncer**. 2014.

Disponível em:

http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama. Acesso em: 04 abr. 2015.

JAGUS, R.; JOSHI, B.; BARBER, G.N. PKR, apoptosis and cancer. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.31, p.123–138, jan, 1999.

KALLURI, R.; WEINBERG, R.A. Reviews series the basics of epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Clinical Investigation**. v. 119. p. 1420-1428. 2009.

KANG, H.S.; LEE, M.J.; SONG, H.; HAN, S.H.; KIM, Y.M.; IM, J.Y.; CHOI, I. Molecular identification of IgE-dependent histamine-releasing factor as a B cell growth factor. **Journal of Immunology**, v.166, p.6545–6554, mar, 2001.

KENNECKE, H.; YERUSHALMI, R.; WOODS, R.; CHEANG, M.C.U.; VODUC, D.; SPEERS, C.H.; NIELSEN, T.O.; GELMON, K. Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, p. 3271-3277. 2010.

KING, M.C.; LEVY-LAHAD, E.; LAHAD, A. Population-based screening for BRCA1 and BRCA2: 2014 Lasker Award. **Jama**. 312(11):1091-2. 2014.

KLOC, M.; TEJPAL, N.; SIDHU, J.; GANACHARI, M.; FLORES-VIALLANUEVA, P.; JENNINGS, N.B.; SOOD, A.K.; KUBIAK, J.Z.; GHOBRIAL, R.M. Inverse relationship between TCTP/RhoA and p53/cyclin A/actin expression in ovarian cancer cells. **Folia Histochemica et Cytobiologica**. 50(3): 358–367. 2012.

KRAMER, N.; WALZL, A.; UNGER, C.; ROSNER, M.; KRUPITZA, G.; HENGSTSCHLAGER, M.; DOLZNIG, H. In vitro cell migration and invasion assays. **Mutation Research**. 752. 10-24. 2013.

LEHMANN, B.D.; BAUER, J.A.; CHEN, X.; SANDERS, M.E.; CHAKRAVARTHY, A.B.; SHYR, Y.; PIETENPOL, J.A. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **The Journal of Clinical Investigation**. 121(7):2750-67. 2011.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Principles of Biochemistry with an Extended Discussion of Oxygen – Binding Proteins. 2. ed. **Worth Publishers Inc.**, New York, 1998.

LESPAGNOL, A.; DUFLAUT, D.; BEEKMAN, C.; BLANC, L.; FIUCCI, G.; MARINE, J.C.; VIDAL, M.; AMSON, R.; TELERMAN, A. Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice. **Cell Death and Differentiation**. (11):1723-33. 2008.

LI, F.; ZHANG, D.; FUJISE, K. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 276. p. 47542–47549. 2001.

LIU, H.; PENG, H.W.; CHENG, Y.S.; YUAN, H.S.; YANG-YEN, H.F. Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. **Molecular Cell Biology**, v.25, p.3117-3126, 2005.

LU, X.; ERRINGTON, J.; CURTIN, N.J.; LUNEC, J.; NEWELL, D.R. The impact of p53 status on cellular sensitivity to antifolate drugs. **Clinical Cancer Research**. 7:2114-23. 2001.

LUCIBELLO, M.; ADANTI, S.; ANTELMINI, E.; DEZI, D.; CIAFRE, S.; CARCANGIU, M.L.; ZONFRILLO, M.; NICOTERA, G.; SICA, L.; DE BRAUD, F.; PIERIMARCHI, P. Phospho-TCTP as a therapeutic target of dihydroartemisinin for aggressive breast cancer cells. **Oncotarget**, v. 10, p. 5275-5291. 2015.

MA, Q.; GENG, Y.; XU, W.; WU, Y.; HE, F.; SHU, W.; HUANG, M.; DU, H.; LI, M. The role of translationally controlled tumor protein in tumor growth and metastasis of colon adenocarcinoma cells. **Journal of Proteome Research**. 9, 40–49, 2010.

MACDONALD, S.M.; BHISUTTHIBAN, J.; SHAPIRO, T.A.; ROGERSON, T.E.; TAYLOR, T.J.; TEMBO, M.; LANGDON, J.M.; MESHNICK, S.R. Immune mimicry in malaria: Plasmodium falciparum secretes a functional histamine-releasing factor homolog in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p.10829– 10832, set, 2001.

MIAO, X.; CHEN, Y.B.; XU, S.L.; ZHAO, T.; LIU, J.Y.; LI, Y.R.; WANG, J.; ZHANG, J.; GUO, G.Z. TCTP overexpression is associated with the development and progression of glioma. **Tumour biology**, v. 34, p.3357–3361. 2013.

MIKI, Y.; SWENSEN, J.; SHATTUCK-EIDENS, D.; FUTREAL, P.A.; HARSHMAN, K.; TAVTIGIAN, S.; LIU, Q.; COCHRAN, C.; BENNETT, L.M.; DING, W.; BELL, R.; ROSENTHAL, J.; HUSSEY, C.; TRAN, T.; MCCLURE, M.; FRYE, C.; HATTIER, T.; PHELPS, R.; HAUGEN-STRANO, A.; KATCHER, H.; YAKUMO, K.; GHOLAMI, Z.; SHAFFER, D.; STONE, S.; BAYER, S.; WRAY, C.; BOGDEN, R. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science**. 266(5182):66-71. 1994.

MITTEMPERGHER, L.; SAGHATCHIAN, M.; WOLF, D.M.; MICHIELS, S.; CANISIUS, S.; DESSEN, P.; DELALOGUE, S.; LAZAR, V.; BENZ, S.C.; TURSZ,

T.; BERNARDS, R.; VAN'T VEER, L.J. A gene signature for late distant metastasis in breast cancer identifies a potential mechanism of late recurrences. **Molecular Oncology**, v. 7. p. 987–999. 2013.

NAKAMURA, K.; YOSHIKAWA, N.; YAMAGUCHI, Y.; KAGOTA, S.; SHINOZUKA, K.; KUNITOMO, M. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. **Life Science**, v.70, p.791-798, 2002.

NEMANI, M.; LINARES-CRUZ, G.; BRUZZONI-GIOVANELLI, H.; ROPERCH, J.P.; TUYNDER, M.; BOUGUELERET, L.; CHERIF, D.; MEDHIOUB, M.; PASTURAUD, P.; ALVARO, V.; DER SARKISSAN, H.; CAZES, L.; LE PASLIER, D.; LE GALL, I.; ISRAELI, D.; DAUSSET, J.; SIGAUX, F.; CHUMAKOV, I.; OREN, M.; CALVO, F.; AMSON, R.B.; COHEN, D.; TELERMAN, A. Activation of the human homologue of the Drosophila sina gene in apoptosis and tumor suppression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 9039-9042. 1996.

NICOLSON, G.L.; BRUNSON, K.W.; FIDLER, I.J. Specificity of arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cell lines. **Cancer Research**, v.38, p.4105-4111, 1978.

OIKAWA, K.; OHBAYASHI, T.; MIMURA, J.; FUJII-KURUYAMA, Y.; TESHIMA, S.; ROKUTAN, K.; MUKAI, K.; KURODA, M. Dioxin stimulates synthesis and secretion of IgE-dependent histamine-releasing factor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 290, 984–987. 2002.

OLIVIER, M.; EELES, R.; HOLLSTEIN, M.; KHAN, M.A.; HARRIS, C.C.; HAINAUT, P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. **Human mutation**. 19(6):607-14. 2002.

PARKER, J.S.; MULLINS, M.; CHEANG, M.C.; LEUNG, S.; VODUC, D.; VICKERY, T.; DAVIES, S.; FAURON, C.; HE, X.; HU, Z.; QUACKENBUSH, J.F.; STIJLEMAN, I.J.; MARRON, J.S.; NOBEL, A.B.; MARDIS, E.; NIELSEN, T.O.; ELLIS, M.J.; PEROU, C.M.; BERNARD, P.S. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **Journal of Clinical Oncology**. 10;27(8):1160-7. 2009.

PECE, S.; TOSONI, D.; CONFALONJERI, S.; MAZZAROL, G.; VECCHI, M.; RONZONI, S.; BERNARD, L.; VIALE, G.; PELICCI, P.G.; DI FIORE, P.P. Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. **Cell**. 140(1):62-73. 2010.

PEROU, C.M.; SORLIE, T.; EISEN, M.B.; VANDE RIJN, M.; JEFFREY, S.S.; REES, C.A.; POLLACK, J.R.; ROSS, D.T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L.A.; FLUGE, O.; PERGAMENSHIKOV, P.; WILLIAMS, C.; ZHU, S.X.; LONNING, P.E.;

BORRESEN-DALE, A.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, 406, 747–752. 2000.

PICCART-GEBHART, M.J.; PROCTER, M.; LEYLAND-JONES, B.; GOLDHIRSCH, A.; UNTCH, M.; SMITH, I.; GIANNI, L.; BASELGA, J.; BELL, R.; JACKISCH, C.; CAMERON, D.; DOWSETT, M.; BARRIOS, C.H.; STEGER, G.; HUANG, C.S.; ANDERSSON, M.; INBAR, M.; LICHINITSER, M.; LANG, I.; NITZ, U.; IWATA, H.; THOMSEN, C.; LOHRISCH, C.; SUTER, T.M.; RUSCHOFF, J.; SUTO, T.; GREATOREX, V.; WARD, C.; STRAEHLE, C.; MCFADDEN, E.; DOLCI, M.S.; GELBER, R.D. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER-2-positive breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.353, p.1659-1672. 2005.

POLYAK, K.; METZGER-FILHO, O. Snapshot: Breast Cancer. **Cancer Cell**, v. 22. 2012.

PONDER, B.A.J. Cancer genetics. **Nature**. 411(17):336-41. 2001.

POWERS, S.; POLLACK, R.E. Inducing stable reversion to achieve cancer control. **Nature Reviews Cancer**. 16, 266–270. 2016.

RAKHA, E.A.; PUTTI, T.C.; ABD EL-REHIM, D.M.; PAISH, C.; GREEN, A.R.; POWE, D.G.; LEE, A.H.; ROBERTSON, J.F.; ELLIS, I.O. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. **The Journal of Pathology**. 208: 495-506. 2006.

REIS-FILHO, J.S.; TUTT, A.N.J. Triple negative tumours: a critical review. **Histopathology**, v.52, p. 108–118, 2008.

RINNERTHALER, M.; JAROLIM, S.; HEEREN, G.; PALLE, E.; PERJU, S.; KLINGER, H.; BOGENGRUBER, E.; MADEO, F.; BRAUN, R.J.; BREITENBACH-KOLLER, L.; BREITENBACH, M.; LAUN, P. YKL056c, TMA19, the yeast orthologue of the translationally controlled tumor protein (TCTP) has apoptotic functions and interacts with both microtubules and mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1757, p.631-638. 2006.

RHO, S.B.; LEE, J.H.; PARK, M.S.; BYUN, H.J.; KANG, S.; SEO, S.S.; KIM, J.Y.; PARK, S.Y. Anti-apoptotic protein TCTP controls the stability of the tumor suppressor p53. **FEBS Lett**, v. 585. p. 29-35. 2011.

RODRIGUEZ, L.G.; WU, X.; GUAN, J.L. Wound-healing assay. **Methods in Molecular Biology**, 294:23-9. 2005.

ROPERCH, J.P.; ALVARO, V.; PRIEUR, S.; TUYNDER, M.; NEMANI, M.; LETHROSNE, F.; PLOUFFRE, L.; GENDRON, M.C.; ISRAELI, D.; DAUSSET, J.; OREN, M.; AMSON, R.; TELERMAN, A. Inhibition of

presenilin 1 expression is promoted by p53 and p21WAF-1 and results in apoptosis and tumor suppression. **Nature Medicine**, v. 4, p. 835-838. 1998.

SEO, J.E.; EFFERTH, T. Interaction of antihistaminic drugs with human translationally controlled tumor protein (TCTP) as novel approach for differentiation therapy. **Oncotarget**, feb. 2016.

SINHA, P.; KOHL, S., FISCHER, J.; HUTTER, G., KERN, M.; KOTTGEN, E.; DIETEL, M.; LAGE, H.; SCHNOLZER, M.; SCHADENDORF, D. Identification of novel proteins associated with the development of chemoresistance in malignant melanoma using two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, 21, 3048– 3057. 2000.

SLABY, O.; SOBKOVA, K.; SVOBODA, M.; GARAJOVA, I.; FABIAN, P.; HRSTKA, R.; NENUTIL, R.; SACHLOVA, M.; KOCAKOVA, I.; MICHALEK, J.; SMERDOVA, T.; KNOFLICKOVA, D.; VYZULA, R. Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. **Oncology reports**, v. 21, p.1235-1241, 2009.

SLAMON, D.J.; CLARK, G.M.; WONG, S.G.; LEVIN, W.J.; ULLRICH, A.; MGUIRE, W.L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of HER-2/ neu oncogene. **Science**, v.235, p. 177-182.1987.

SORLIE, T.; PEROU, C.M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M.B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S.S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J.C.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D.; LONNING, P.E.; BORRESEN-DALE, A.L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 10869-10874.2001.

SOTIRIOU, C.; NEO, S.Y.; MCSHANE, L.M.; KORN, E.L.; LONG, P.M.; JAZAERI, A.; MARTIAT, P.; FOX, S.B.; HARRIS, A.L.; LIU, E.T. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population- based study. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 10393-10398, 2003.

STEWARD, B. W.; WILD, C. P. (Ed.) **World Cancer Report**. Lyon: International Agency for Research on Cancer; Geneva: World Health Organization, 2014.

SUSINI, L.; BESSE, S.; DUFLAUT, D.; LESPAGNOL, A.; BEEKMAN, C.; FIUCCI, G.; ATKINSON, A.R.; BUSO, D.; POUSSIN, P.; MARINE, J.C.; MARTINOU, J.C.; CAVARELLI, J.; MORAS, D.; AMSON, R.; TELERMAN, A. TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, p. 1211-1220. 2008.

TAVTIGIAN, S.V.; SIMARD, J.; ROMMENS, J.; COUCH, F.; SHATTUCH-EIDENS, D.; NEUHAUSEN, S.; MERAIVER, S.; THORLACIUS, S.; OFFIT, K.; STOPPA-LYONNET, D.; BELANGER, C.; BELL, R.; BERRY, S.; BOGDEN, R.; CHEN, Q.; DAVIS, T.; DUMONT, M.; FRYE, C.; HATTIER, T.; JAMMULAPATI, S.; JANECKI, T.; JIANG, P.; KEHRER, R.; LEBLANC, J.F.; MITCHELL, J.T.; MCARTHUR-MORRISON, J.; NQUYEN, K.; PENG, Y.; SAMSON, C.; SCHROEDER, M.; SNYDER, S.C.; STEELE, L.; STRINGFELLOW, M.; STROUP, C.; SWEDLUND, B.; SWENSE, J.; TENG, D.; THOMAS, A.; TRAN, T.; TRANCHANT, M.; WEAVER-FELDHAUS, J.; WONG, A.K.; SHIZUYA, H.; EYFJORD, J.E.; CANNON-ALBRIGHT, L.; TRANCHANT, M.; LABRIE, F.; SKOLNICK, M.H.; WEBER, B.; KAMB, A. GOLDGAR, D.E. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. **Nature Genetics**. 12(3):333-7. 1996.

TELERMAN, A.; TUYNDER, M.; DUPRESSOIR, T.; ROBAYE, B.; SIGAUX, F.; SHAULIAN, E.; OREN, M.; ROMMELAERE, J.; AMSON R. A model for tumor suppression using H-1 parvovirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 8702–8706. 1993.

TELERMAN, A.; AMSON, R. The molecular programme of tumour reversion: The steps beyond malignant transformation. **Nature Reviews Cancer**. v. 9, p. 206- 216. 2009.

TELERMAN, A.; AMSON, R.; HENDRIX, M.J. Tumor reversion holds promise. **Oncotarget**, v.1, p. 233-234. 2010.

THAW, P.; BAXTER, N.J.; HOUNSLOW, A.M.; PRICE, C.; WALTHO, J.P.; CRAVEN, C.J. Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. **Nature Structural & Molecular Biology**. 8(8):701–4. 2001.

THIELE, H.; BERGER, M.; SKALWEIT, A.; THIELE, B.J. Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled turn out protein (TCTP). **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p.5473– 5481, 2000.

TOKUNAGA, E. Akt is frequently activated in HER2/neu-positive breast cancers and associated with poor prognosis among hormone-treated patients. **International Journal of Cancer**, v.118, p.284–289, 2006.

TU, Y.F.; KAIPPARETTU, B.A.; MA, Y.; WONG, L.J. Mitochondria of highly metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231 exhibits increased autophagic properties. **Biochimica et Biophysica**. 1807(9):1125-32. 2011.

TUYNDER, M.; SUSINI, L.; PRIEUR, S.; BESSE, S.; FIUCCI, G.; AMSON, R.; TELERMAN, A. Biological models and genes of tumor reversion: Cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 14976-14981. 2002.

TUYNDER, M.; FIUCCI, G.; PRIEUR, S.; LESPAGNOL, A.; G'EANT, A.; BEAUCOURT, S.; DUFLAUT, D.; BESSE, S.; SUSINI, L.; CAVARELLI, J.;

MORAS, D.; AMSON, R.; TELERMAN, A. Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101. n. 43. 2004.

VAN'T VEER, L.J.; DAI, H.; VAN DE VIJVER, M.J.; HE, Y.D.; HART, A.A.; MAO, M.; PETERSE, H.L.; VAN DER KOOY, K.; MARTON, M.J.; WITTEVEEN, A.T.; SCHREIBER, G.J.; KERKHOVEN, R.M.; ROBERTS, C.; LINSLEY, P.S.; BERNARDS, R.; FRIEND, S.H. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, v. 415, p.530–536. 2002.

VERONESI, U. **Mastologia oncológica**. Rio de Janeiro: Medsi; 2002.

XIAO, B.; CHEN, D.; LUO, S.; HAO, W.; JING, F.; LIU, F.; LIU, T.; WANG, S.; GENG, Y.; LI, L.; XU, W.; ZHANG, Y.; LIAO, X.; ZUO, D.; WU, Y.; LI, M.; MA, Q. Extracellular translationally controlled tumor protein promotes colorectal cancer invasion and metastasis through Cdc42/JNK/ MMP9 signaling. **Oncotarget**. 7(31): 50057–50073. 2016.

XU, A.; BELLAMY, A. R.; TAYLOR, J. A. Expression of translationally controlled tumour protein is regulated by calcium at both the transcriptional and post- transcriptional level. **Biochemical Journal**, 342, 683–689. 1999.

WEAVER, V.M.; PETERSEN, O.W.; WANG, F.; LARABELL, C.A.; BRIAND, P.; DAMSKY, C.; BISSEL, M.J. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three dimensional culture and in vivo. **The Journal of Cell Biology**, v.137, p.231-245.1997.

WEIGEL, M.T.; DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. **Endocrine Related Cancer**, v. 17, p. 245-262.2010.

WELCSH, P.L.; OWENS, K.N.; KING, M.C. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. **Trends in Genetics**. 16(2):69-74 2000.

WELCSH, P.L.; KING, M.C. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. **Human Molecular Genetics**. 10(7):705-13. 2001.

WOOSTER, R.; BIGNELL, G.; LANCASTER, J.; SWIFT, S.; SEAL, S.; MANGION, J.; COLLINS, N.; GREGORY, S.; GUMBS, C.; MICKLEM, G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. **Nature**. 378(6559):789-92. 1995.

YARDEN, Y. Biology of HER2 and Its Importance in Breast Cancer. **Oncology**, v. 61, p. 1–13. 2001.

YARM, F.R. Plk phosphorylation regulates the microtubule- stabilizing protein TCTP. **Molecular and Cellular Biology**. v. 22. p. 6209–6221. 2002.

YERSAL, O.; BARUTCA, _S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. **World Journal of Clinical Oncology**. 5(3):412-24.2014.

ZHANG, F.; LIU, B.; WANG, Z.; YU, X.J.; NI, Q.X.; YANG, W.T.; MUKAIDA, N.; LI, Y.Y. A Novel Regulatory Mechanism of Pim-3 Kinase Stability and Its Involvement in Pancreatic Cancer Progression. **Molecular Cancer Research**, v. 11, p. 1508–1520. 2013.