



2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Interferência da inibição do proteossoma com a via Wnt no cancro do ovário

Interferência da inibição do proteossoma com a via Wnt no cancro do ovário

Patrícia A. F. Pedro

Patrícia Alexandra Fonseca Pedro

2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Interferência da inibição do proteossoma com a via Wnt no Cancro do Ovário

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Henriqueta Coimbra Silva, da Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro e co-orientação da Professora Doutora Maria Paula Marques Catarro (Universidade de Coimbra).

Patrícia Alexandra Fonseca Pedro

2012

Aos meus pais

Agradecimentos

À Professora Doutora Henriqueta Coimbra Silva, pela exigência sem snobismo, pela simpatia, pela oportunidade única de trabalho que me proporcionou, pela ajuda e paciência e por tudo o que fez por mim e pela cientificidade deste trabalho.

À Professora Doutora Anabela Sarmiento Ribeiro, pela disponibilização de recursos humanos e logísticos.

À Professora Doutora Maria Paula Catarro, pela disponibilidade e compreensão, por todo o conhecimento que partilhou no curso de Fármacos e Aditivos, que tão útil foi neste trabalho.

À Dra. Ana Cristina Gonçalves, pela ajuda no estudo de citometria, pela simpatia e disponibilidade.

Ao Professor Doutor Henrique Girão, pela ajuda e pela disponibilização de recursos técnicos.

Ao Dr. Luís Mesquita, pelas explicações e esclarecimentos, pela descontração do ambiente laboratorial que muito contribuiu para minimização de pressão durante a realização deste trabalho, sem nunca descurar a seriedade da investigação.

Aos meus colegas de laboratório, pelos esclarecimentos, pelos almoços e pelo ambiente descontraído.

A todos os meus amigos, os da semana e os do fim-de-semana, pela amizade, pelos sorrisos, pelos convívios a que fui e por aqueles a que não pude ir para realizar este trabalho, por se lembrarem de mim, pelo apoio, pela partilha de experiências, pelo incentivo.

A todos aqueles que mudaram ou ajudaram a mudar a minha perspectiva de vida, com palavras doces ou amargas.

Ao Tiago, por tudo, pelos risos, pelas lágrimas, pelo apoio, pela paciência, pelo entusiasmo, pela ajuda, pelos abraços.

Aos meus pais, que nunca desistiram de mim e que sempre me apoiaram na minha escalada curricular, que me permitiram ter como profissão aquela que escolhi. Ao meu pai, pelo chocolate. À minha mãe, pelo realismo.

A Coimbra, mãe, mestra e rainha.

A minha sincera gratidão.

Índice

Abreviaturas	I
Resumo.....	IV
Abstract.....	VI
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. Cancro do ovário.....	3
1.1.1. Epidemiologia	3
1.1.2. Fatores de risco.....	5
1.1.3. Patologia molecular.....	5
1.1.4. Tratamento	9
1.2. A via WNT.....	10
1.2.1. Componentes	11
1.2.2. Regulação da via Wnt	13
1.2.3. A via Wnt e o cancro.....	15
1.2.4. Genes-alvo da via Wnt/ β -catenina	18
1.2.5. Via Wnt/ β -catenina e transição epitélio-mesênquima.....	19
1.3. A via ubiquitina-proteossoma	21
1.4. Inibidores do proteossoma	26
1.4.1. Mecanismos de ação no cancro	29
1.4.2. Inibidores do proteossoma e cancro do ovário	32
1.5. Objetivos	34
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	35
2.1. Cultura de células.....	36
2.2. Inibidor do proteossoma	36
2.3. Estudos do tipo de morte celular.....	36
2.4. Avaliação dos conjugados de ubiquitina e da ativação da via do NF- κ B	39
2.5. Avaliação dos níveis de expressão génica	41
2.5.1. Extração de RNA	41
2.5.2. Quantificação de RNA	42
2.5.3. Síntese de cDNA	43
2.5.4. PCR em tempo real	44
2.6. Avaliação da transmigração nuclear da β -catenina.....	47
2.7. Ensaio de migração celular.....	48

2.7.1. Migração em câmara <i>transwell</i>	49
2.7.2. Ensaio de wound-healing	50
2.8. Estatística	51
Capítulo 3 – Resultados e Discussão.....	52
3.1. Avaliação do tipo de morte celular.....	53
3.2. Avaliação da inibição do proteossoma	56
3.3. Avaliação da activação da via NF- κ B	58
3.4. Avaliação da ativação da via Wnt/ β -catenina	60
3.5. Expressão dos genes <i>hTERT</i> e <i>SNAIL</i>	64
3.6. Avaliação da migração celular	67
Capítulo 4 – Conclusão	71
Referências Bibliográficas	74
Anexos	93

Abreviaturas

APC	Adenomatous Poliposis Coli
ATP	Adenosina Trifosfato
AV	Anexina V
BAX	Bcl-2-associated X protein
BCL-2	B-cell CLL/lymphoma 2 protein
BCL-9	B-cell CLL/lymphoma 9 protein
<i>BRAF</i>	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
<i>BRCA1</i>	Gene supressor tumoral de cancro da mama, tipo 1
<i>BRCA2</i>	Gene supressor tumoral de cancro da mama, tipo 2
β -Trcp	β -transducin repeat-containing protein
Ca^{2+}	Ião biprotonado de Cálcio
CBP	Cyclic AMP response element binding protein-binding protein
<i>CCND1</i>	Gene codificante da ciclina D1
<i>CDH1</i>	Gene codificante da E-caderina
CDK	Cyclin-dependent kinase
cDNA	Ácido desoxirribonucleíco complementar
COX-2	Ciclooxigenase 2
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>
CtBP	Carboxy-terminal binding protein
<i>CTNNB1</i>	Gene codificante da β -catenina
<i>DAPI</i>	4',6-diamidino-2-phenylindole
DKK1	Proteína homóloga de Dickkopf-1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido

dNTP	Deoxiribonucleótido trifosfato
DVL/ Dsh	Proteína Dishevelled
E1	Enzima activadora da ubiquitina
E2	Enzima de conjugação da ubiquitina
E3	Ligase da ubiquitina
EDTA	Ácido etilodiamino tetra-acético
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Isotiocianato de Fluroresceína
FZD	Frizzled-1
GSK3 β	Glicogénio sintetase cinase 3 β
HNPCC	Cancro colorretal hereditário não polipótico
<i>hTERT</i>	Gene codificante da subunidade catalítica da telomerase
IAP	Família de proteínas inibidoras de apoptose
IC ₅₀	Concentração Inibitória Máxima de 50% da função biológica
ICAT	Proteína inibidora de β -catenina e TCF/LEF
I κ B	Inibidor de NF- κ B
IP	Iodeto de propídeo
<i>KRAS</i>	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LRP5/6	Proteína relacionada com a lipoproteína de baixa densidade 5/6
MDR	Multidrug resistance
MMTV	Mouse mammary tumour virus
MMP7	Matrilisina
MSI	Instabilidade de microssatélites
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1

p27	Proteína inibidora de cinases 1
p53	Proteína supressora tumoral 53
PCR	Reacção de polimerização em cadeia
<i>PIK3CA</i>	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
<i>PTEN</i>	Phosphatase and tensin homolog
<i>PUMA</i>	p53 upregulated modulator of apoptosis
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
R^2	<i>Coeficiente de determinação</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SBF	Soro Bovino Fetal
sFRP	Secreted frizzled-related protein 1
<i>SNAIL</i>	Gene codificante da proteína SNAIL
TCF/LEF	T-cell factor/lymphoid enhancer factor
<i>TP53</i>	Gene suppressor tumoral codificante da p53
Ub	Ubiquitina
UP	Ubiquitina-proteossoma
UPR	Unfolded protein response
VEGF	Factor de crescimento endotelial vascular
WIF	Wnt inhibitory factor
WISE	Proteína inibidora da via Wnt
Wnt	Sigla derivada da conjugação de Wingless, gene de <i>Drosophila melanogaster</i> e o homólogo em vertebrados, Integrase-1, pode referir-se à via Wnt ou aos respectivos ligandos

Resumo

O cancro do ovário representa o cancro ginecológico com maior taxa de mortalidade em Portugal. O mau prognóstico explica-se pelo estágio avançado em que a maioria dos tumores é diagnosticada. Os tratamentos atualmente à disposição são de eficácia limitada uma vez que induzem o desenvolvimento de resistência e o seu sucesso a longo prazo é questionável, com a maioria das pacientes a desenvolver recorrências. No sentido de ultrapassar estas barreiras, foram testados novos fármacos, como é o caso dos inibidores do proteossoma, um complexo enzimático que regula o proteoma celular por degradação de proteínas desnecessárias ou anómalas. Os inibidores dos proteossomas revelaram desde o início grande eficácia em tumores hematológicos, mas o mesmo não se verificou na generalidade dos cancros sólidos, como é o caso do cancro do ovário. Esta diferença não parece ser facilmente explicada, pelo que o conhecimento das vias que intercetam a função do proteossoma pode ajudar a desvendar os mecanismos envolvidos. Neste trabalho abordámos a via Wnt/ β -catenina, uma via de transdução de sinal particularmente envolvida no cancro do ovário, cujo funcionamento é influenciado pelo proteossoma. Especificamente, o proteossoma regula os níveis citoplasmáticos de β -catenina, limitando a sua transmigração nuclear e consequente ativação dos genes alvo.

Como modelo recorreremos à linha celular de cancro do ovário TOV-112D; o inibidor do proteossoma usado foi o MG262. Estudou-se o tipo de morte celular por citometria de fluxo com dupla marcação para a Anexina IV e iodeto de propídeo; avaliou-se o grau de inibição do proteossoma por citometria de fluxo após marcação celular com anticorpo dirigido a proteínas conjugadas com ubiquitina; analisou-se a ativação da via NF- κ B por citometria de fluxo após marcação com anticorpo específico para o NF- κ B livre, ativo; avaliou-se a ativação da via Wnt/ β -catenina quer por imunofluorescência, quantificando a transmigração nuclear da β -catenina, quer quantificando a expressão de um dos seus genes alvo, o gene da ciclina D1 (*CCND1*) por qRT-PCR; para avaliar a interferência da inibição do proteossoma com a agressividade tumoral, analisaram-se a expressão da subunidade catalítica da telomerase, hTERT e a expressão do gene *SNAIL*, associado ao fenótipo de transição epitélio-mesênquima, também por qRT-PCR, e a mobilidade celular, pelo teste *wound-healing* e teste de migração em câmaras *transwell*.

Após 48 horas de exposição ao inibidor do proteossoma MG262, houve uma diminuição da viabilidade celular dependente da concentração ($P < 0.05$). O IC_{50} para este composto foi obtido para a concentração de 14 nM ($R^2=0.9945$), uma concentração muito superior à registada para as doenças hematológicas. O tipo de morte celular preferencial foi a necrose e apoptose/tardia necrose. A inibição proteossoma ocorreu para a concentração de 5 nM ($P < 0.05$) e inesperadamente, verificou-se uma activação da via NF κ B ($P < 0.01$) desencadeada por esta inibição. Por sua vez, verificou-se um aumento da expressão da β -catenina ao nível do núcleo ($P < 0.01$). Contudo houve diminuição da expressão do gene alvo *CCND1* ($P < 0.05$), atribuída a uma sobreposição do efeito inibidor da viabilidade celular do MG262. Também a análise do gene *hTERT* refletiu a diminuição da proliferação celular ($P < 0.05$). Para o gene *SNAIL* não foram observadas variações significativas ($P < 0.05$). Ocorreu ainda uma diminuição estatisticamente significativa ($P < 0.001$) do potencial de migração celular por exposição ao MG262.

Em suma, foi verificada uma tendência para diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração do inibidor do proteossoma MG262. Também se constatou uma diminuição de expressão de genes relacionados com a proliferação celular, além de diminuição de capacidade migratória das células. No entanto, a inibição do proteossoma promoveu a ativação da via NF κ B e a transmigração nuclear da β -catenina, o que pode explicar as elevadas concentrações necessárias para obter perda de viabilidade celular, e o tipo de morte celular verificado. Conclui-se que os efeitos dos inibidores do proteossoma sobre as vias Wnt/ β -catenina e NF- κ B poderão constituir uma possível justificação para o seu fraco desempenho no cancro do ovário.

Palavras-chave: cancro; ovário; β -catenina; Wnt; inibidores do proteossoma.

Abstract

Ovarian cancer is the most deadly gynaecological cancer. Its elevated mortality is related to the advanced state of the disease at which it is diagnosed. Nowadays treatments are characterized by development of resistance and comprise long-term inefficacy as most patients end up relapsing. In order to surpass these barriers, new drugs were tested, such as proteasome inhibitors, which regulate cellular proteome by degradation of misfolded or unnecessary proteins.

Proteasome inhibitors have shown great results in treatment of haematological tumours. However, the same is not true for most solid tumours, such as ovarian cancer. This difference in response doesn't seem easy explainable and more knowledge of proteasome function associated pathways might lead to an answer. The work here stated, focused on Wnt/ β -catenin pathway, whose function comprises signal transduction. This pathway is closely related to ovarian cancer, being also influenced by the proteasome. Specifically, the proteasome regulates cytoplasmic levels of β -catenin and limits its nuclear transmigration and consequent activation of target genes.

As model for this study, we used TOV-112D ovarian cancer cell line and the proteasome inhibitor MG262. It was investigated the type of cellular death by flux cytometry using double labels such as Annexin V and Propidium Iodide; it was also measured the extent of proteasome inhibition by flux cytometry after cell labelling with an antibody directed against ubiquitin conjugated proteins; besides it was measured the activation of NF- κ B by flux cytometry after cell labelling with an antibody directed against free, active NF- κ B. It was also accessed the activation of Wnt/ β -catenin pathway, by immunofluorescence through quantification of β -catenin nuclear transmigration and by quantification of one of its target genes, cyclin D1 (encoded by *CCND1*) by qRT-PCR. The interference of proteasome inhibition with tumor aggressiveness was assessed by analysis of catalytic subunit of telomerase, *hTERT* and *SNAIL* gene expression, being the last one related to epithelial-mesenchymal transition phenotype. The expression of the mentioned genes was quantified by qRT-PCR. Cellular mobility was assessed by wound healing assay and migration assay in transwell chambers.

After 48 hours of proteasome inhibitor MG262 treatment, it was observed a decrease in cell viability ($P < 0.05$), also it was established an IC_{50} of 14 nM for MG262 ($R^2=0.9945$), which is clearly higher than for hematologic tumours. Necrosis and late apoptosis/necrosis were the most pronounced types of death. Inhibition of

proteasome was accomplished at 5 nM ($P < 0.05$). Unexpectedly, it occurred an activation of NF κ B pathway ($P < 0.01$) triggered by this inhibition. On the other hand, β -catenin was highly expressed in the nucleus ($p < 0.01$). Nevertheless, Wnt pathway target gene *CCND1* expression suffered a decrease ($P < 0.05$) in agreement with cell death induction by MG262. Also, analysis of *hTERT* expression was diminished ($P < 0.05$), while *SNAIL* expression did not experienced alterations ($P < 0.05$). There was also a statistically significant ($p < 0.001$) decrease in migrating potential caused by MG262.

In summary, cell viability was diminished in a MG262 concentration dependent fashion. It was also noted diminished expression of Wnt/ β -catenin pathway target genes as well as cell proliferation and EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) associated genes' expression, in addition to reduction in migratory ability of TOV-112D. Nonetheless, proteasome inhibition promoted NF κ B pathway activation and nuclear transmigration of β -catenin, which may explain the high doses necessary to reach loss of cell viability and the observed preponderant type of cellular death. In conclusion, the effects of proteasome inhibitors upon Wnt/ β -catenin and NF- κ B might constitute one possible explanation for the weak performance of proteasome inhibitors in ovarian cancer.

Keywords: cancer; ovarian; β -catenin; Wnt pathway, proteasome inhibitors.

Capítulo 1 - Introdução

O cancro é a segunda principal causa de morte em países industrializados (Seara.com, 2009). O termo engloba uma multiplicidade de doenças que têm em comum o crescimento descontrolado e a propagação de células anormais. Na sua génese está a acumulação celular de alterações genéticas e epigenéticas responsáveis por proliferação celular descontrolada e falha na indução de apoptose (Kazi, et al., 2009). As alterações moleculares envolvidas podem ser tantas quanto extensa é a multiplicidade de vias de sinalização numa célula. As células cancerígenas tendem a adquirir insensibilidade a sinais anti-proliferativos, auto-suficiência em estímulos de crescimento, potencial proliferativo ilimitado, capacidade de induzir angiogénese para assegurar o aporte de oxigénio e nutrientes e capacidade de invasão e metastização (Hanahan & Weinberg, 2000). Podem ter origem em fatores intrínsecos, como as mutações hereditárias, mutações espontâneas ou induzidas por tóxicos endógenos, ou fatores ambientais, como o uso do tabaco, má nutrição ou exposição excessiva a radiações ultra-violeta. Os fatores ambientais participam em cerca de 75-80% dos casos de cancro, dos quais 30% são relacionados com o uso do tabaco e 35% com a má nutrição, pouca atividade física e obesidade (American Cancer Society, 2011).

São inúmeros os genes e proteínas envolvidos na carcinogénese, muitos deles com funções essenciais durante o desenvolvimento embrionário e diferenciação celulares, como o controlo da proliferação, a apoptose, ou a adesividade, ou ainda necessários para a manutenção da integridade do genoma. De um modo simplista podemos classificá-los como oncogenes, quando a proteína favorece o processo da carcinogénese, ou como genes supressores tumorais, quando a função normal da proteína se opõe à carcinogénese. Nos primeiros, vamos encontrar mutações ou epimutações que aumentam a função da proteína, nos segundos, as alterações genéticas vão no sentido de inibir ou anular a função da proteína.

1.1. Cancro do ovário

1.1.1. Epidemiologia

A incidência de cancro do ovário é dependente da região geográfica e do grupo étnico considerados, sendo mais comum em países desenvolvidos como os países do norte e ocidente Europeus e nos Estados Unidos (Figura 1). A taxa de incidência deste cancro é mais baixa nos continentes Africano e Asiático. Em populações emigrantes, verificou-se que a incidência de cancro do ovário tende a aproximar-se das taxas dos países de adoção (Herrinton, et al., 1994), sugerindo a interferência de causas ambientais. Em Portugal, é o cancro ginecológico com maior mortalidade apesar de ser apenas o terceiro em incidência (Figura 2) (Ferlay, et al., 2010). A elevada taxa de mortalidade verificada justifica-se pelo estágio avançado em que a maioria dos tumores é detetada (estádio III ou IV) e portanto, com pior prognóstico, o que se deve à tendência destes tumores em se manterem assintomáticos ou apresentarem sintomas não específicos (Gatcliffe, et al., 2008). Conjuntamente, os métodos existentes de rastreio deste tipo de cancro não são, por norma, suficientemente sensíveis de modo a conseguir detetá-lo em estádios precoces.

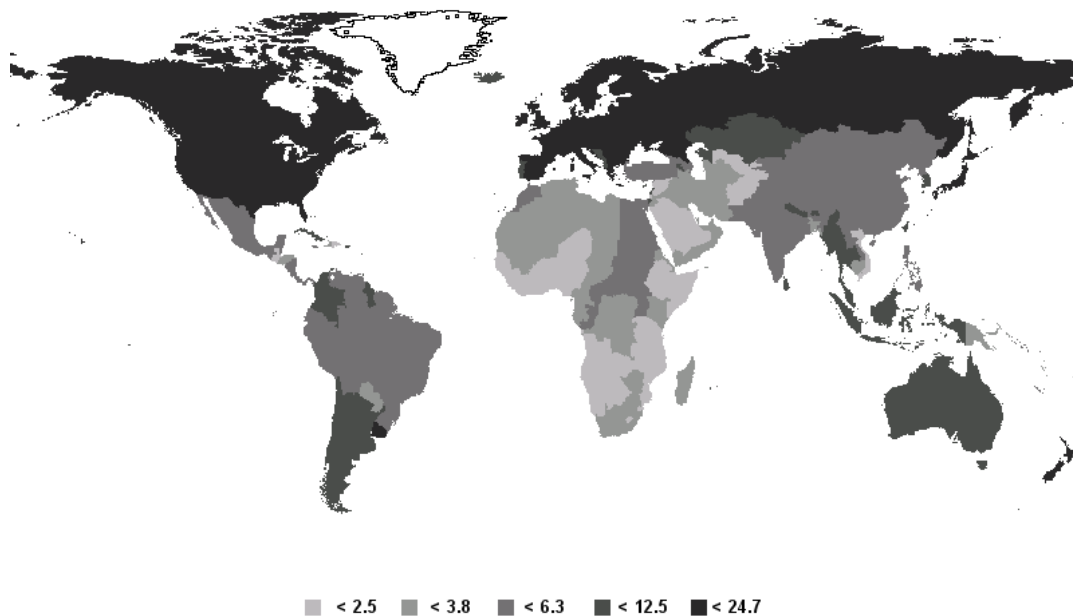


Figura 1 - Incidência de cancro de ovário estimada por 100 mil habitantes, por país. Note-se a existência de um maior número de casos nos países mais desenvolvidos, como os Estados Unidos da América e Rússia, bem como na maioria dos países do norte da Europa (Ferlay, et al., 2010).

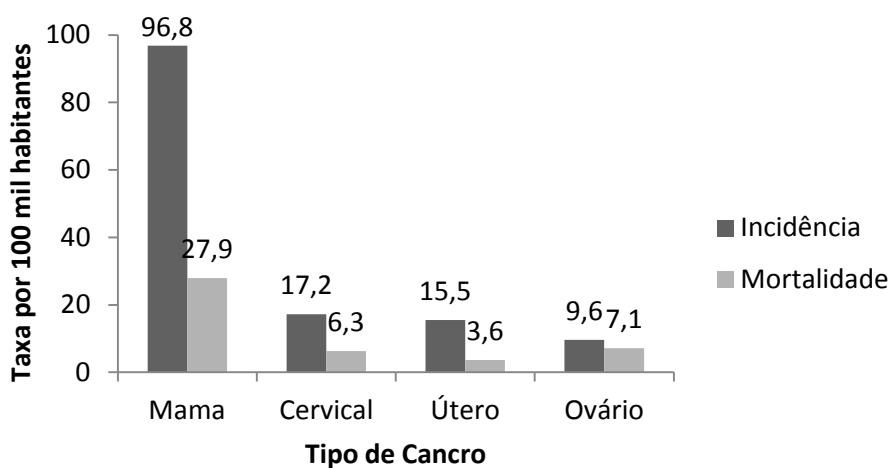


Figura 2 – Incidência e mortalidade dos cancros da mama, cervical, uterino e ovário em mulheres, em Portugal, por 100 mil habitantes (Adaptado de (Ferlay, et al., 2010)).

1.1.2. Fatores de risco

Em países industrializados, a probabilidade de contrair cancro do ovário é de aproximadamente 2% (Parkin, et al., 2002). No entanto, existem fatores que podem determinar um aumento de risco, como os antecedentes familiares de cancro do ovário ou de cancro da mama, particularmente nos casos de síndromas tumorais hereditárias.

Vários outros fatores não hereditários também podem condicionar o aparecimento desta doença. A ocorrência de uma menarca precoce ou menopausa tardia, bem como a nuliparidade e a exposição a tratamentos de fertilidade, todos eles associados a maior número de ovulações, têm sido referenciados como factores de risco, o que se poderá dever à contínua renovação de tecido e proliferação a nível do ovário (Byrom & Davies, 2003; Hennessy, et al., 2009). Similarmente, alguns estudos demonstram que um índice de massa corporal elevado está associado a um aumento moderado do risco deste cancro (Purdie, et al., 2001; Rodriguez, et al., 2002). Alguma patologia benigna como doença inflamatória pélvica, síndrome do ovário poliquístico e endometriose podem ser predisponentes (Holschneider & Berek, 2000).

Pelo contrário, existem fatores que podem ter um papel protetor como a multiparidade, que pode diminuir o risco de cancro do ovário em 40-60% (Hankinson, et al., 1995) ou o uso de contraceptivos orais.

1.1.3. Patologia molecular

Os tumores do ovário têm origem em três tipos de células: células epiteliais, células do estroma e células da linha germinativa. Nos países industrializados, mais de 90% dos tumores malignos do ovário são de origem epitelial (Permuth-Wey & Sellers, 2009). O cancro epitelial do ovário (EOC) inclui 8 subtipos histológicos: seroso, endometrióide, mucinoso, células claras, células pavimentosas ou espinocelulares, de

transição, misto e indiferenciado (Bell, 2005), sendo os 4 primeiros os mais frequentes. A incidência, o potencial maligno e a resposta a tratamentos variam entre os vários subtipos.

O cancro do ovário, tal como os outros cancros, tem origem genética e pode ocorrer no âmbito de síndromas tumorais hereditárias ou como cancro esporádico. Cerca de 10-15% dos cancros do ovário são hereditários, dos quais, cerca de 90% se associam a mutações dos genes *BRCA1* ou *BRCA2* (Christie & Oehler, 2006) e cerca de 10% ocorrem por mutações nos genes do sistema de reparação de erros de emparelhamento (MMR ou *mismatch repair*), como o *MLH1* ou o *MSH2*, na origem do síndrome de Lynch tipo 2 ou cancro colorretal hereditário não polipótico (HNPCC) (Catasús, et al., 2004). A mutação constitucional, herdada, existe em todas as células e os cancros surgem por expansão clonal da célula em que o 2º alelo sofre igualmente uma mutação ou epimutação, somática, conduzindo à perda completa da função da proteína.

Por sua vez, os cancros esporádicos do ovário compreendem cerca de 85% dos casos e não estão associados a mutações constitucionais em genes relacionados com a carcinogénese (Christie & Oehler, 2006). Estes tumores têm uma etiologia multifatorial, dependente de múltiplas variantes polimórficas que criam perfis de maior ou menor suscetibilidade ao cancro, e de fatores ambientais. Não havendo uma mutação constitucional, o cancro surge por expansão clonal de uma célula que, aleatoriamente, adquiriu um padrão de mutações somáticas que lhe confere potencial proliferativo ilimitado.

Tendo a origem sido numa mutação constitucional, como no caso do cancro hereditário, ou numa mutação somática, no caso do cancro multifatorial, de um alelo num gene envolvido na carcinogénese, é o padrão de mutações somáticas subsequentes que determina a evolução e o comportamento da célula maligna. Este perfil molecular

somático, diverge de cancro para cancro, e no mesmo cancro há também subclones distintos. Esta heterogeneidade molecular do cancro tem consequências importantes na resposta à quimioterapia.

As mutações e epimutações mais frequentes em oncogenes incluem os genes *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *ErbB2* e *CTNNB1*, e nos genes supressores tumorais os genes *PTEN*, *TP53*, *BRCA 1 e 2*.

As mutações no gene *KRAS* são tipicamente observadas em carcinomas mucinosos, sendo detetadas em 50% destes tumores (Gemignani, et al., 2003). Os carcinomas serosos de baixo grau também podem apresentar mutações neste gene, em cerca de 35% dos casos (Singer, et al., 2003), ou mutações do gene *BRAF*, em 30% dos casos, geralmente existindo apenas uma destas mutações (Singer, et al., 2003). O aumento de expressão do *ErbB2*, com ou sem amplificação do gene, ocorre em cerca de um terço dos casos e tem sido associado a pior prognóstico (Katsaros, et al., 1995; Ross, et al., 1999).

São também comumente observadas mutações no gene *CTNNB1*, responsável pela codificação da β -catenina, em carcinomas endometrióides (30%), embora pouco frequentes nos outros subtipos de cancro do ovário (Palacios & Gamallo, 1998). A β -catenina é uma proteína com 3 localizações principais na célula, relacionadas com diferentes funções: justa-membranar, importante para a adesão celular, citoplasmática e nuclear, ambas com funções na via de transdução de sinal Wnt, considerada uma das vias mais importantes no cancro do ovário. Falaremos com pormenor desta via mais à frente.

Outra via que interfere no desenvolvimento de cancro do ovário é a PI3K/PTEN/Akt/mTOR. Especificamente, foram observadas mutações pontuais ativadoras no gene *PIK3CA* em cerca de 20% dos carcinomas endometrióides e de

células claras e a existência de amplificação em 24% de todos os subtipos histológicos, sem sobreposição dos dois tipos de mutações (Campbell, et al., 2004). A ativação da via PI3K/PTEN/Akt/mTOR, pode também ocorrer por deleção do gene supressor tumoral *PTEN*, em cerca de 20% dos carcinomas endometrióides de baixo grau (Obata, et al., 1998).

O gene *TP53* está frequentemente mutado nos diversos tipos de cancro, entre eles o cancro do ovário. Os subtipos seroso e endometrióide de maior grau são os que mais comumente apresentam mutações, cerca de 45% dos casos (Willner, et al., 2007).

Apesar da incidência ser relativamente menor do que em cancros hereditários, também *BRCA 1* pode sofrer inativação somática em cancros esporádicos, especificamente, por deleção ou hipermetilação da região promotora (Esteller, et al., 2000).

Em cerca de 12% dos cancros do ovário esporádico deteta-se o fenómeno de instabilidade de microssatélites (MSI), por falência do sistema MMR, atribuída a mutações somáticas e hipermetilação da região reguladora dos genes correspondentes. Esta característica é mais vulgarmente observada nos subtipos endometrióide e de células claras (Pal, et al., 2008).

A manutenção do comprimento dos telómeros é necessária para que as células escapem à senescência replicativa e proliferem indefinidamente. Este fenómeno ocorre em cerca de 80% das células cancerígenas e está dependente da re-expressão do gene da subunidade catalítica da telomerase, *hTERT* (Kim, et al., 1994). Tal como noutros cancros, também no cancro do ovário se demonstrou o aumento dos níveis de expressão da *hTERT*, e a sua associação a um pior prognóstico (Widschwendter, et al., 2004), fenómeno que recentemente foi associado a metilação da região do promotor do gene *hTERT*, onde se pode ligar um fator inibidor de transcrição, o CTCF (Renaud, et al.,

2007; Renaud, et al., 2011). A inibição da expressão da telomerase nas células cancerígenas está descrita como um mecanismo terapêutico para ultrapassar a resistência à quimioterapia (Ward & Autexier, 2005).

1.1.4. Tratamento

O tratamento do cancro do ovário epitelial compreende duas opções: cirurgia e quimioterapia.

A cirurgia é reconhecida como uma componente importante da terapia primária, cujo objetivo é remover a maior quantidade possível de células tumorais. Esta pode permitir a cura quando o cancro se encontra ainda no estágio I – tumor confinado ao ovário, por remoção do total das células cancerígenas e, na maior parte das vezes, este procedimento permite que seja mantida a fertilidade por manutenção de um dos ovários e do útero. No entanto, como já foi anteriormente referido, quase sempre os tumores são detetados já em estádios avançados o que faz com que a cirurgia passe a ser encarada como um método não curativo (Sociedade Portuguesa de Ginecologia, 2010).

A quimioterapia, pré e pós-operatória é um componente essencial do tratamento do cancro do ovário. De facto, verifica-se que este cancro responde inicialmente a vários agentes citotóxicos. Atualmente, a terapia padrão inclui a carboplatina e o paclitaxel (Kim, et al., 2012), com bons resultados em 80% das doentes submetidas a cirurgia citoreduzora (McGuire, et al., 1996).

No entanto, 90% das pacientes acaba por apresentar recidivas e desenvolver resistência a estes fármacos (McGuire, et al., 1996), sem que seja possível travar o curso inexorável da doença. Existem outros agentes quimioterapêuticos em fase de ensaios clínicos que demonstram já algumas vantagens relativamente aos anteriores, como por

exemplo o doxetaxel, que por favorecer estados de neutropenia não constitui ainda uma alternativa (Kim, et al., 2012).

Na tentativa de encontrar fármacos com uma maior citotoxicidade dirigida às células tumorais, mas com toxicidade diminuta para os pacientes e de ultrapassar a resistência secundária à quimioterapia, têm-se testado novos fármacos, que se revelaram eficazes noutros tipos de cancro como os inibidores dos proteossomas (abordados mais à frente) ou fármacos dirigidos a alvos moleculares específicos. Como exemplos destes últimos, podem ser referidos os inibidores da atividade tirosina cinase do EGFR e os inibidores dos receptores do VEGF (Schmalfeldt, et al., 2009).

1.2. A via WNT

A via de sinalização Wnt (da junção de *Int*, de *Integration1*, com Wg, de *wingless*) é uma via de transdução de sinal altamente conservada. A sua descoberta e o seu nome devem-se a trabalhos desenvolvidos em *Drosophila* e no cancro da mama com o retrovírus MMTV (*mouse mammary tumour vírus*) (Gomperts, et al., 2009; Komiya & Habas, 2008). Mutações do gene *wingless* (*Wg*) na *Drosophila* dão origem a moscas sem asas e, nos cancros da mama provocados pelo MMTV, a integração do genoma do vírus leva à sobreexpressão do gene *Integration1* (*Int1*), o seu homólogo humano.

Esta via tem implicações na diferenciação, migração e polaridade celulares, bem como no estabelecimento do padrão neuronal e organogénese durante o desenvolvimento embrionário. Mais recentemente, descobriu-se uma ligação entre a via Wnt e a renovação de células estaminais (Komiya & Habas, 2008). A pluralidade de funções explica que a sua desregulação esteja associada a diferentes distúrbios, como

anomalias congénitas, cancro ou doenças degenerativas, (Logan & Nusse, 2004; MacDonald, et al., 2009; Moon, et al., 2004).

O facto de a via Wnt ter sido mais estudada em *Drosophila* do que em qualquer outro organismo, limita o conhecimento que se pode transpor para o estudo em humanos.

1.2.1. Componentes

As proteínas Wnt constituem um grupo de proteínas secretadas, de 350 a 400 aminoácidos, com um motivo conservado de 23 a 24 resíduos de cisteína, ocorrendo palmitoilação num resíduo de cisteína. Estas proteínas vão ligar-se a recetores da membrana de células alvo, desencadeando a ativação de cascatas de sinalização (Qiang, et al., 2008). As proteínas Wnt podem ativar 3 vias: a via canónica ou dependente de β -catenina e a via não canónica ou independente de β -catenina que se decompõe na via da polaridade celular e na via Wnt/ Ca^{2+} . Destas, a via canónica é a mais importante nos mamíferos e na carcinogénese e uma das suas funções primordiais consiste na regulação dos níveis de β -catenina no citoplasma e no núcleo.

Na ausência do ligando Wnt (Figura 3A), no citoplasma, há estabilização do complexo proteico formado pela β -catenina, pela APC (*Adenomatous Poliposis Coli*), pela axina e a enzima GSK3 β (glicogénio sintetase cinase 3 β), permitindo que a GSK3 β fosforile a β -catenina. Após fosforilada, a β -catenina é ubiquitinada pela proteína β -Trcp e é degradada no proteossoma (Gatcliffe, et al., 2008; Klaus & Birchmeier, 2008; MacDonald, et al., 2009).

A indução da via canónica faz-se pela ligação das proteínas Wnt ao recetor Frizzled-1 (FZD) e ao seu co-recetor, uma proteína relacionada com a lipoproteína de baixa densidade 5 ou 6 (LRP5/6), ambos localizados na membrana celular (Figura 3B)

Pensa-se que os dois recetores interajam quando na presença do ligando Wnt, uma vez que a ativação da via não é conseguida quando o co-recetor não é estimulado (He, et al., 2004). O genoma dos mamíferos engloba 10 genes *FZD*, que codificam recetores com capacidade variável de ativação da via da β -catenina, porém sempre dependentes da co-expressão do ligando Wnt e do co-recetor LRP5/6 (Binnerts, et al., 2007). Quando ocorre formação do complexo trimérico (FZD-Wnt-LRP5/6), é ativada a caseína-cinase-1 ($CK1\gamma$) que se liga e fosforila a proteína Dishevelled (DVL ou Dsh).

A proteína Dishevelled fosforilada, inativa a $GSK3\beta$, o que promove a decomposição do complexo estabilizador da β -catenina (Gatcliffe, et al., 2008; Klaus & Birchmeier, 2008; MacDonald, et al., 2009). A β -catenina ao deixar de ser fosforilada, não é ubiquitinada nem degradada pelo proteossoma. O aumento da concentração intracitoplasmática de β -catenina promove a sua translocação para o núcleo (Gomperts, et al., 2009; Komiyama & Habas, 2008). A forma como isso ocorre permanece desconhecida, uma vez que não está descrita nenhuma sequência de localização da β -catenina no núcleo e o transporte não parece ser dependente de importinas nem mediada pela proteína Ran (Komiyama & Habas, 2008).

Uma vez no núcleo, a β -catenina vai ligar-se ao fator de transcrição TCF/LEF, fazendo com que a proteína Goucho, repressora do complexo TCF/LEF, se desligue. Contudo, a ativação da transcrição dos genes alvo está ainda dependente da presença de co-ativadores como CREB, BCL-9, PYGOPUS e BRG1, CBP, p300, entre outros (Gatcliffe, et al., 2008; Komiyama & Habas, 2008; Curtin & Lorenzi, 2010).

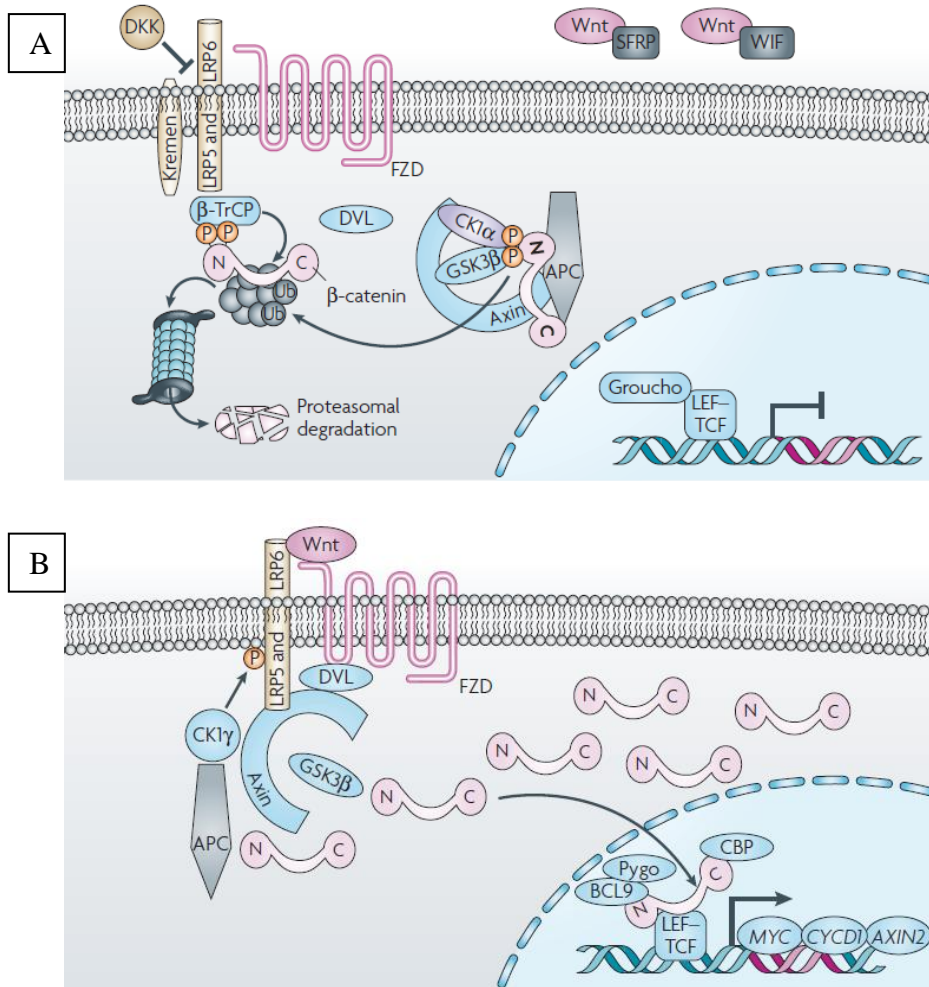


Figura 3 – Via de sinalização Wnt canónica. A) O complexo formado pela axina, APC, GSK-3β e CK1γ liga-se à β-catenina na ausência de estimulação da via, resultando na degradação da β-catenina pelo proteossoma 26S. WIF e SFRP têm função de inibidores endógenos da via Wnt. B) Quando o ligando Wnt se une ao recetor FZD e co-recetor LRP5/6, ocorre inibição do complexo estabilizador da β-catenina e da sua degradação pelo proteossoma. A β-catenina livre no citoplasma é translocada para o núcleo, onde em conjugação com os factores de transcrição (TCF/LEF) e outros co-factores, como CBP, vai ativar a transcrição de genes alvo (Klaus & Birchmeier, 2008).

1.2.2. Regulação da via Wnt

Devido á sua complexidade, a modelação da via Wnt pode ocorrer de variadas formas e a diferentes níveis, quer por inibição quer por estimulação.

De um modo geral, a inibição desta via pode ser desencadeada por proteínas que se ligam aos ligandos Wnt: sFRP – proteínas secretadas relacionadas com a proteína Frizzled – e WIF – proteína inibidora da via Wnt.

A via Wnt pode ainda sofrer inibição por proteínas que se ligam aos recetores Wnt das famílias Dickkopf (DKK1) e WISE/SOST. Estas proteínas são consideradas inibidoras específicas da via Wnt/ β -catenina (Curtin & Lorenzi, 2010; MacDonald, et al., 2009). Particularmente, a DKK1 é considerada um potente inibidor da via Wnt, que atua por ligação de alta afinidade à LRP (co-recetor da FZD) e a uma classe de moléculas transmembranares, as Kremens. A formação deste complexo promove a internalização de LRP, tornando-a indisponível para os ligandos Wnt (Logan & Nusse, 2004). Existem ainda proteínas como a Shisa, que por não permitirem a libertação da proteína Frizzled do retículo endoplasmático, impedem a sua chegada à membrana plasmática, impedindo a ativação pelos ligandos Wnt. A inibição por este meio é já algo rebuscada mas também parece modelar a atividade desta via (Zhu, et al., 2008).

A inibição da via Wnt pode também ocorrer ao nível do núcleo, através da proteína Chibby, que se liga ao terminal carboxílico da β -catenina (Takemaru, et al., 2003); ou ainda por interferência da proteína ICAT, que além de não permitir a ligação da β -catenina ao TCF (Tago, et al., 2000) pode também levar à dissociação dos complexos entre a β -catenina, LEF e CBP (Graham, et al., 2002).

Por seu lado, a estimulação da via Wnt ocorre tipicamente através de ligandos Wnt, havendo, no entanto, outros meios de ativação sobre alguns dos quais existe ainda alguma controvérsia. É o caso da ligação específica da proteína norrina ao recetor Frizzled durante a vascularização da retina que pode activar esta via (Xu, et al., 2004). Para outra proteína candidata, a espondina-R (Rspo) a controvérsia ainda é maior, havendo evidências em como se liga à FZD e à LRP6 (Nam, et al., 2006) ou que se liga

primariamente à LRP6 (Wei, et al., 2007) ou ainda, que não se liga a nenhuma delas (Kazanskaya, et al., 2004).

A complexidade dos mecanismos de estimulação e inibição da via Wnt favorece a flexibilidade necessária para a homeostasia e diferenciação celulares e atesta a importância da sua regulação.

1.2.3. A via Wnt e o cancro

Em 1993, Vogelstein, Kinzler e Polakis descobriram uma relação entre a proteína supressora tumoral APC e a β -catenina no cancro colorretal. Em meados dos anos 90, vários grupos desenvolveram trabalhos cuja conclusão revelava que a estabilização da β -catenina era crucial na via de sinalização Wnt (Klaus & Birchmeier, 2008). Posteriormente, a partir desta associação até antes nunca notada, a investigação começou a seguir outro rumo. Pela primeira vez, em 1999, foram observadas mutações em cancro do ovário, no gene da β -catenina, *CTNNB1*, especificamente no exão 3 (Gamallo, et al., 1999). Estas mutações são do tipo *missense* e afetam o domínio regulador do terminal amínico da β -catenina (codões 38 a 45), de extrema importância para a sua degradação na medida em que compreende o local de fosforilação da GSK3 β (Wu, et al., 2001). Quando mutada, a β -catenina não é fosforilada nem degradada e migra para o núcleo onde, integrada no complexo transcricional anteriormente descrito, vai ativar os genes alvo. O exão 3 constitui um *hot spot* para mutações noutros tipos de cancro como o colorretal, do endométrio, do pâncreas ou da próstata, entre outros (Thorstensen & Lothe, 2003).

Vários outros genes da via Wnt podem sofrer modificações tanto ao nível genético como epigenético. Estas alterações podem refletir-se em alterações da expressão de proteínas nucleares, citoplasmáticas, membranares e em componentes secretados. Na

maioria dos casos, estas modificações promovem a translocação da β -catenina para o núcleo e a transcrição de genes-alvo, correspondendo à ativação da via Wnt (Logan & Nusse, 2004).

Assim, a desregulação da via da β -catenina pode resultar de outros mecanismos que não a mutação do gene *CTNNB1*. Alguns dos mecanismos citoplasmáticos descritos que inibem diretamente a degradação da β -catenina por interferirem com o complexo estabilizador são mutações no gene *APC*, no gene *AXINA 1* e *AXINA 2* (Wu, et al., 2001). Concretamente, mutações no gene *APC* encontram-se frequentemente associadas à síndrome tumoral hereditária de transmissão autossômica dominante, Polipose Adenomatosa Familiar. Relativamente a mutações nos genes da *AXINA*, incluem-se alterações nos domínios de ligação às proteínas APC, β -catenina e GSK-3, bem como modificações nos locais de interação com ativadores posicionados a montante na via de transdução de sinal, como os DVL e Frat 1, que têm sido encontradas em adenocarcinomas e carcinomas do ovário e do cólon (Salahshor & Woodgett, 2005).

No que respeita a proteínas extra-membranares, estão descritas modificações nas proteínas sFRP, DKK1 e WIF1. A inativação do gene *sFRP* pode ocorrer por deleção, descrita no cancro da mama (Seitz, et al., 1997) ou por hipermetilação da região reguladora, descritos no cancro do ovário (Takada, et al., 2004; Veeck, et al., 2006) dos pulmões (Fukui, et al., 2005), da bexiga (Marsit, et al., 2005) e do cólon (Caldwel, et al., 2004). Os genes que codificam as DKK1 e WIF1 podem igualmente sofrer silenciamento por hipermetilação dos respetivos promotores (Ai, et al., 2006; Foltz, et al., 2010). O défice de expressão destas proteínas inibidoras da via Wnt, tem como consequência indireta a ativação dos genes alvo da β -catenina.

Também as proteínas membranares podem ser afetadas por mutações. Um dos casos mais evidentes é a E-caderina, que não fazendo parte da via Wnt, interage com a

β -catenina, sequestrando-a junto à membrana. Demonstrou-se que a introdução do gene *CDH1*, que codifica a E-caderina, em células que apresentavam ativação constitucional da via Wnt, induzia a localização da β -catenina junto à membrana e diminuía os níveis de expressão dos seus genes alvo (Thorstensen & Lothe, 2003). A diminuição dos níveis de expressão da E-caderina, por mutações do gene *CDH1*, hipermetilação ou repressão por fatores de transcrição do respetivo promotor, promove a ativação aberrante da via Wnt em diversos tipos de cancro (Mingchao, et al., 2001; Prasad, et al., 2008; Wheeler, et al., 2001). Muitos destes genes ainda não foram estudados no cancro do ovário, onde poderão ter um contributo relevante.

Não obstante as múltiplas evidências que associam a ativação da via Wnt/ β -catenina com o cancro do ovário, a sua correlação com o prognóstico deste cancro é controversa. Gamallo e colaboradores (1999) verificaram que a acumulação nuclear da β -catenina se associava a carcinomas do ovário de menor grau e com evolução favorável. A mesma correlação foi verificada por Zhai e colaboradores (2002) em adenocarcinomas do ovário e, inclusivamente, foi correlacionada com mutações no gene da β -catenina bem como com a expressão dos genes alvo, *CCND1* e *MMP7*. Estes achados não estão de acordo com a função destes genes na proliferação celular e degradação da matriz extracelular, e contraria resultados de estudos *in vitro* (Bourguignon, et al., 2007; Irving, et al., 2005). Outros artigos surgiram com resultados contraditórios. Se por um lado, Saegura & Okayasu (2001) descrevem que o aumento da expressão de β -catenina no núcleo está associado a diferenciação e uma maior sobrevivência de pacientes, por outro lado, Lee e colaboradores (2003) observaram que a sua localização nuclear é mais frequente em carcinomas de elevado grau, tipicamente com pior prognóstico. Sabe-se ainda, que o *knockout* de β -catenina provoca a diminuição de tumores do ovário em ratinhos (Wang, et al., 2011).

1.2.4. Genes-alvo da via Wnt/ β -catenina

A Via Wnt/ β -catenina está associada a uma variedade de processos celulares, o que implica a possibilidade de ativar múltiplos genes alvo. Atualmente estão descritos aproximadamente 100 genes que teriam uma expressão dependente da ativação desta via de transdução de sinal (Nusse & Lim, 2010). Contudo, alguns destes genes são também regulados por outras vias, o que dificulta uma correlação direta entre os seus níveis de expressão e o grau de ativação da via Wnt.

A via Wnt tem como genes-alvo alguns dos membros da própria via de transdução de sinal, o que permite a regulação da via por retrocontrole. É o caso do gene *DKK-1*, que codifica a proteína Dickkopf-1, inibidora da via Wnt, e que possui múltiplos locais de ligação do complexo β -catenina/TCF-4 no seu promotor (González-Sancho, et al., 2005). Outros componentes parecem também ser regulados positiva ou negativamente pelo complexo TCF/ β -catenina, concretamente, o gene *FZD* (Müller, et al., 1999), *LRP6* (Khan, et al., 2007), *Axina 2* (Jho, et al., 2002) e *TCF/LEF* (Hovanes, et al., 2001; Roose, et al., 1999). A regulação positiva dos genes *Axina 2* e negativa dos *FZD* e *LRP6* geram *feedback* negativo e consequente diminuição da atividade da via Wnt. Por sua vez, a indução do gene *TCF/LEF* desencadeia um *feedback* positivo que reforça a sinalização Wnt.

Por outro lado, a expressão génica resultante da ativação da via Wnt inclui genes que têm influência na proliferação celular e desenvolvimento embrionário bem como oncogenes.

De entre os genes-alvo, os primeiros a serem identificados foram o *c-MYC* e o *CCND1* cujos promotores possuem locais de ligação para os fatores de transcrição TCF e são controlados pelo complexo TCF/ β -catenina (He, et al., 1998). O *c-MYC* é um oncogene que se encontra sobreexpresso em vários cancros humanos como o melanoma,

leucemias, cancro da próstata, da mama e do cólon (Dang, 1999). Por seu lado, o gene *CCND1* codifica a ciclina D1, uma proteína reguladora do ciclo celular de extrema importância para a proliferação de células epiteliais (Sherr, 2002). Enquanto a sobreexpressão de c-MYC leva à repressão da P21, um inibidor de CDK (*cyclin-dependent kinases*), e assim estimula indiretamente a progressão do ciclo celular da fase G1 para a S (van de Wetering, et al., 2002); a ciclina D1 ativa diretamente as CDK na fase G1.

Vários estudos demonstraram que a ciclooxygenase 2 (COX-2) é regulada pela via Wnt (Nuñez, et al., 2011). O promotor do gene *COX-2* detém um local de ligação para o fator TCF-4 que responde diretamente à via Wnt/ β -catenina. A expressão de COX-2 foi implicada no carácter invasivo de diversos cancros de subtipo epitelial, concretamente no pulmão, mama, cólon (Soslow, et al., 2000) e ovário (Ferrandina, et al., 2002).

As metaloproteases medeiam a degradação da matriz extracelular pelo que desempenham um papel importante na progressão tumoral, metastização e angiogénese, estando frequentemente sobreexpressas em diversos cancros, associando-se a fenótipos mais agressivos e a pior prognóstico (Ii, et al., 2006). Uma destas proteínas, a matrilisina (MMP7) está sobreexpressa devido a ativação pelo complexo β -catenina/TCF (Li, et al., 2005), em tumores epiteliais e mesenquimatosos especificamente no cancro do ovário (Tanimoto, et al., 1999), esófago (Yamamoto, et al., 1999), colorrectal (Adachi, et al., 2001), fígado (Yamamoto, et al., 1997) e pâncreas (Yamamoto, et al., 2001).

1.2.5. Via Wnt/ β -catenina e transição epitélio-mesênquima

Uma característica adquirida pelas células cancerígenas que se correlaciona com maior agressividade e capacidade metastática é o fenótipo conhecido por transição

epitélio-mesênquima (TEM) (Kalluri & Weinberg, 2009), que tem sido relacionado com a ativação da via Wnt/ β -catenina.

O TEM é um processo de transdiferenciação das células epiteliais com alterações bioquímicas e morfológicas que resultam na aquisição de um fenótipo mesenquimal, caracterizado por um aumento da capacidade migratória e de invasão e resistência à apoptose. Molecularmente, este processo traduz-se na ativação de fatores de transcrição, expressão de determinadas proteínas membranares extracelulares, reorganização e expressão de proteínas do citoesqueleto e produção de proteínas que degradam a matriz extracelular. Algumas das alterações ao nível do transcriptoma e proteoma são úteis como marcadores da aquisição deste fenótipo como a expressão de P-caderina, SNAIL, vimentina, N-caderina, entre outros (Kalluri & Weinberg, 2009). O TEM pode ser fisiologicamente ativado durante a reparação de tecidos ou stresses patológicos, como inflamação.

Na carcinogénese, existem duas moléculas que parecem estar frequentemente relacionadas com a TEM, a E-caderina e a β -catenina. Ambas são de extrema importância no que concerne à adesão celular, nomeadamente na formação das junções aderentes, que permitem a ligação entre células adjacentes. Deste modo, não é de estranhar que a diminuição de β -catenina na membrana favoreça a perda de adesividade e promova a invasão e a metastatização (Rosen, et al., 2010). A localização nuclear da β -catenina aparece muitas vezes associada a um fenótipo mesenquimal, tendo sido correlacionada com a iniciação de TEM e a aquisição de fenótipo invasivo (Kim, et al., 2002; Thiery, 2002). Também a E-caderina tem um papel de destaque, uma vez que tanto a diminuição da sua localização membranares como da sua expressão foram já correlacionadas com a indução de TEM e com a promoção da ativação da via Wnt, bem como com o aumento dos níveis de SNAIL no núcleo (Blanco, et al., 2002).

No entanto, a função primordial da β -catenina consiste na transdução de sinal, com consequente ativação de genes alvo (descritos em 1.2.4). Alguns destes genes encontram-se também relacionados com a TEM mas a sua transcrição, por vezes, ocorre previamente à iniciação desse processo. Nestes casos, a indução de transcrição está relacionada com a perturbação da degradação da β -catenina, fazendo variar a localização sub-celular e os níveis de expressão.

1.3. A via ubiquitina-proteossoma

A síntese e degradação proteica são processos importantes que contribuem para a homeostase celular e asseguram a regulação dos níveis proteicos. A remoção de proteínas anómalas ou em excesso é de extremo interesse para as células uma vez que impede que ocorram eventos pouco favoráveis à sobrevivência celular como acumulação e interação entre proteínas aberrantes formando agregados intracelulares com propriedades citotóxicas (Mittal & Ganesh, 2010).

O processo de degradação de proteínas em aminoácidos é extremamente seletivo e altamente regulado. Nas células eucarióticas, existem dois sistemas principais que regulam o catabolismo de proteínas e organelos: a via ubiquitina-proteossoma e a via autofagia-lisossoma. O primeiro tem como função degradar proteínas de vida curta, permitindo um controlo fino dos níveis de proteínas reguladoras. O segundo sistema, por sua vez, é primariamente responsável pela degradação de proteínas de vida longa.

A via ubiquitina-proteossoma (UP) é constituída por um sistema de conjugação de ubiquitina com proteínas e pelo proteossoma. Durante muito tempo o proteossoma foi apenas considerado um complexo promotor da destruição de proteínas cuja função já tinha sido exercida ou que estavam danificadas. Porém, na última década, o interesse pelo estudo desta via proteolítica tem-se acentuado, devido ao reconhecimento crescente

da sua importância em processos como a regulação do ciclo celular e da transcrição, a carcinogénese, o processamento de antígenos, a resposta inflamatória ou a angiogénese (Mani & Gelmann, 2005; Oikawa, et al., 1998; Spataro, et al., 1998).

A degradação de uma proteína por esta via envolve dois passos sucessivos: marcação do substrato por ligação covalente de múltiplas moléculas de ubiquitina e a degradação da proteína ubiquitinada pelo proteossoma (Hershko & Ciechanover, 1998). A marcação com ubiquitina (Ub) é complexa e envolve três enzimas: E1 (enzima ativadora da Ub), E2 (enzima de conjugação da Ub) e E3 (ligase da Ub) (Figura 4).

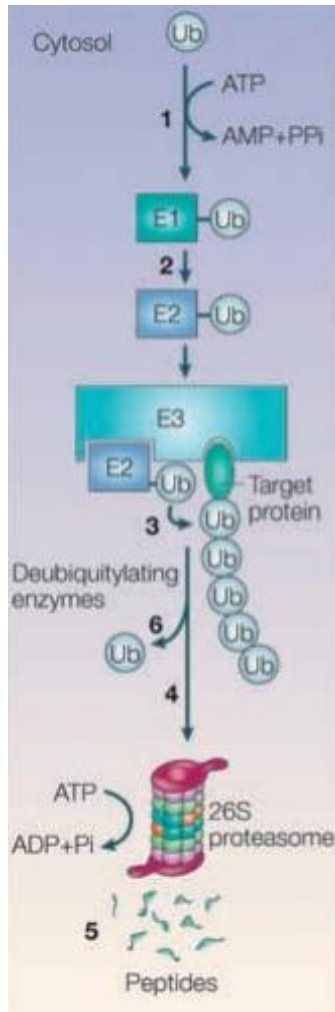


Figura 4 – A via proteolítica ubiquitina-proteossoma (UP). **(1)** Ativação da ubiquitina pela enzima E1. **(2)** Transporte da molécula de ubiquitina pela enzima transportadora, E2. O produto destas reacções é altamente energético, o que vai favorecer o passo seguinte. **(3)** Ligação da proteína-substrato à enzima E3, ligase de ubiquitina. Enzima E2 transfere a primeira molécula de ubiquitina activada para o substrato-alvo. A ocorrência de múltiplos ciclos de conjugação de ubiquitina ao substrato-alvo (especificamente à molécula de ubiquitina adicionada anteriormente) permite a consequente formação de cadeia de poliubiquitina. **(4)** Degradação do substrato poliubiquitinado pelo complexo proteossômico 26S. **(5)** Libertação de pequenos peptídeos. **(6)** Reciclagem da ubiquitina através da actividade de enzimas que cortam a cadeia de poliubiquitina em monómeros (DUBs) (Adaptado de (Ciechanover, 2005)).

O proteossoma é um complexo multiproteico essencial para a viabilidade celular eucariota. A sua importância é comprovada pelo facto de a maioria dos *knockouts* de subunidades do proteossoma resultarem em fenótipos letais (Heinemeyer, et al., 1991; Orłowski, 1999). Pode existir tanto no citosol como no núcleo e degrada não só as proteínas destes compartimentos como também as provenientes do retículo endoplasmático (Kisselev & Goldberg, 2001). O proteossoma 26S é constituído por 3 subunidades: duas subunidades 19S com função reguladora, que envolvem uma subunidade 20S, com atividade catalítica (Figura 5). A subunidade 20S pode existir isolada ou complexada com as subunidades 19S, mas como a atividade proteolítica da subunidade 20S por si só é bastante reduzida, necessita das subunidades 19S para funcionar em pleno (Pickart & Cohen, 2004). A sua estrutura é cilíndrica, com um núcleo constituído por 4 anéis sobrepostos que formam um canal central, o poro. Cada anel é constituído por 7 proteínas. Os dois anéis centrais são compostos por 7 subunidades β , que contêm, no lado interno, 3 a 7 locais com atividade proteolítica, pelo que a molécula alvo tem de entrar para o poro central para que seja degradada. Os anéis mais externos são constituídos por 7 subunidades α e pensa-se que controlam o acesso à cavidade central (Voorhees & Orłowski, 2006). A atividade proteolítica das subunidades β é de 3 tipos específicos: atividade triptíca (cliva após resíduos básicos), quimio-triptíca (cliva após resíduos hidrofóbicos) e hidrolítica ou caspásica (cliva após resíduos acídicos). Por sua vez, os anéis α envolvem os anéis β .

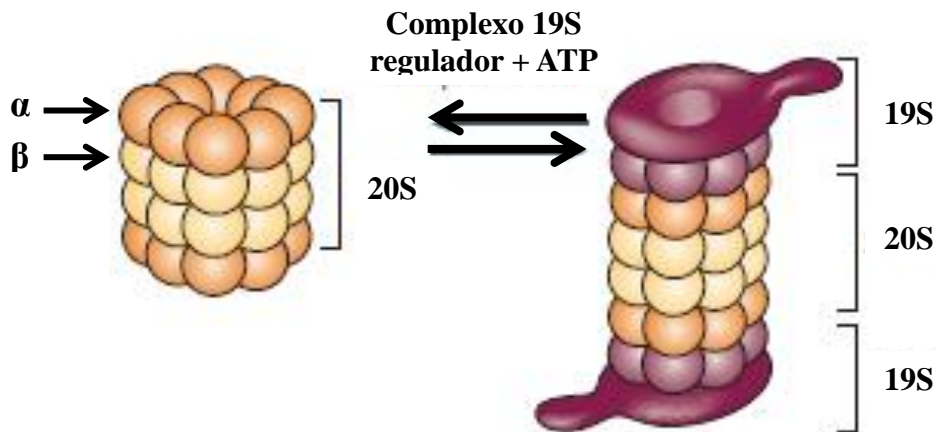


Figura 5 - Representação tridimensional do complexo proteossômico 26S. Este é composto por uma unidade 20S, que inclui dois anéis de subunidades α e dois anéis de subunidades β , além de duas unidades 19S reguladoras (Adaptado de (Adams, 2004)).

Cada unidade 19S é constituída por cerca de 17 subunidades, 6 das quais com atividade ATPase, essenciais ao processo de desnaturação da proteína-alvo. Esta funciona como componente de reconhecimento de cadeias poli-ubiquitina, ao contrário das proteases tradicionais que reconhecem e se ligam a substratos com base na afinidade dos locais ativos para aminoácidos específicos. Esta característica confere especificidade ao proteossoma 26S. É também nas subunidades 19S que ocorre a remoção da cadeia de ubiquitina, o que permite a reciclagem dos seus monómeros (Voorhees & Orłowski, 2006).

A degradação proteica ocorre de um modo progressivo, ou seja, até que a proteína que está inserida no proteossoma seja hidrolisada não é permitida a entrada de mais nenhum substrato. Os produtos da clivagem do proteossoma têm normalmente cerca de 6 a 10 aminoácidos e a sua eventual hidrólise a aminoácidos individuais ocorre no citosol.

A importância biológica deste organelo para a célula implica que esteja inevitavelmente associado a processos patológicos. A diminuição da sua atividade está associada a doenças auto-imunes, neurodegenerativas e reumatóides, formação de cataratas e infecções virais. Na sua origem têm sido descritas anomalias nas enzimas E2 e E3 ou alterações genómicas ou pós-tradução, que afetam a ubiquitinação e consequentemente a possibilidade de degradação pelo proteossoma (Dahlmann, 2007).

Por sua vez, o aumento da função do proteossoma tem sido associado a diversas patologias como a nefropatia crónica, *diabetes mellitus* tipo I, sépsis ou o cancro e deve-se ao aumento da transcrição dos genes que codificam as subunidades do proteossoma (Dahlmann, 2007), bem como das enzimas que participam no processo de ubiquitinação (Voorhees & Orłowski, 2006).

1.4. Inibidores do proteossoma

Os inibidores do proteossoma foram sintetizados, inicialmente, como ferramentas para investigar a função e especificidade da atividade proteolítica do proteossoma. Mais tarde, estudos empíricos começaram a revelar que o bloqueio do proteossoma tinha maior especificidade para células proliferativas malignas do que para células normais. Verificou-se que os inibidores do proteossoma induziam morte celular em linhas celulares de leucemia (Imajohohmi, et al., 1995; Shinohara, et al., 1996), incluindo células de leucemia linfocítica crónica resistentes a quimioterapia convencional e radioterapia (Delic, et al., 1998), o que desencadeou o interesse dos oncologistas.

Desde então foram desenvolvidos imensos inibidores do proteossoma com diferentes características físico-químicas e segundo a premissa de que apesar dos proteossomas possuírem diferentes locais ativos não é necessária a inibição de todos para que ocorra diminuição da sua função catabolisadora. Assim, os inibidores do

proteossoma podem dividir-se em vários grupos com base no farmacóforo que os compõe.

O primeiro grupo de inibidores do proteossoma a ser desenvolvido foi o dos aldeídos peptídicos. São inibidores reversíveis que se ligam às subunidades β com atividade quimiotriptica. Têm uma dissociação célere, são rapidamente oxidados a ácidos inativos e podem ser expelidos das células através de transportadores de resistência a múltiplos fármacos (MDR). Nos primeiros estudos foi usado o ALLN, que se viria a revelar um inibidor mais potente de proteases como a calpaína do que do proteossoma. Um dos inibidores aldeídicos mais usados é o MG132, que é muito mais potente e seletivo para o proteossoma que outros do mesmo tipo como ALLN, MG115 ou PSI (Kisselev & Goldberg, 2001).

Foram depois desenvolvidos inibidores não-aldeídicos, que tiram partido do ácido borónico como grupo funcional. Estes, os boronatos peptídicos, surgiram da tentativa de tornar os aldeídos peptídicos mais específicos (Adams, et al., 1998). Efetivamente, são inibidores do proteossoma muito mais eficientes do que os do grupo aldeídico devido à formação de adutos com a treonina ativa das subunidades β . As suas taxas de dissociação são de tal forma lentas que apesar de a inibição ser reversível, a sua reversibilidade está comprometida nas primeiras horas de exposição. Sabe-se ainda que são extremamente seletivos, tendendo apenas à inibição do proteossoma em detrimento de outras proteases, não sofrem oxidação nem são excretados pelo sistema MDR. Como exemplos deste grupo temos o PS-341 (Bortezomibe) (Figura 6A), o MG273 e o MG262 (Figura 6B).

O Bortezomibe foi o primeiro inibidor do proteossoma a ser testado em ensaios clínicos no mieloma múltiplo (Hideshima, et al., 2003; Richardson, et al., 2003) e em tumores sólidos (Aghajanian, et al., 2002; Papandreou, et al., 2004), tendo sido

aprovado para utilização na prática clínica em 2003 pela FDA (*Food and Drug Administration*) e em 2004 pela *European Medicines Agency* como tratamento de segunda linha para o mieloma múltiplo, para o qual se revelou particularmente eficaz. Atualmente encontra-se não só disponível para o tratamento de pacientes com mieloma múltiplo refratário (Bross, et al., 2004) mas também para uma forma rara de linfoma de Non-Hodgkin, o linfoma das células do manto (Suh & Goy, 2008).

O MG262, destaca-se como um dos mais potentes inibidores dos proteossomas, apresentando inclusivamente, uma potência cem vezes superior ao do análogo aldeídico MG132, mas até ao momento apenas tem sido utilizado em investigação.

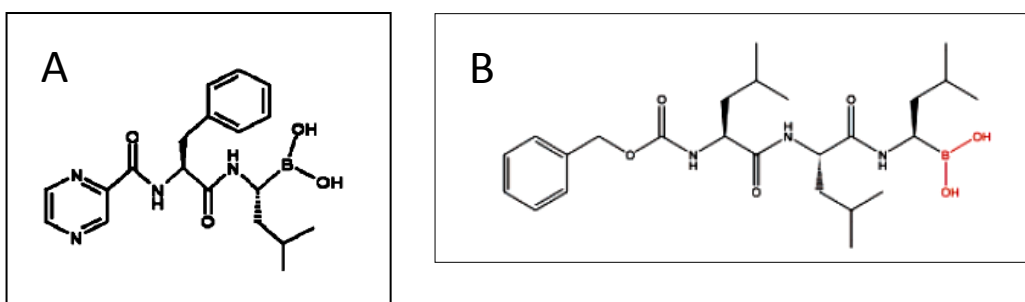


Figura 6 – Estruturas químicas dos boronato peptídico Bortezomibe (Crawford et al, 2011) e MG262 (Fraser, et al., 2006).

Em contraste com os inibidores sintéticos, surgiram os inibidores de proteossoma naturais que são frequentemente mais específicos mas que impõem o isolamento prévio, o que nem sempre é uma tarefa simples. O interesse por estes inibidores surge da necessidade de ultrapassar a resistência que se verificou após a utilização do Bortezomib em células de mieloma múltiplo (Moore, et al., 2008). Neste sentido, compostos como as β -lactonas ganharam notoriedade como fármacos de segunda geração, especificamente a lactacistina (que é convertida em omuralide), cujo análogo

PS-519 está atualmente em fase de ensaios clínicos para o enfarte do miocárdio (Moore, et al., 2008).

Mais recentemente, em 2003, foi identificado um novo inibidor do proteossoma – Salinosporamida A – com potência e seletividade aumentada para o mieloma múltiplo e para a leucemia linfocítica crônica, e que tem como vantagens a baixa toxicidade para as células do estroma da medula óssea comparativamente ao Bortezomide e a possibilidade de administração por via oral (Ruiz, et al., 2006).

1.4.1. Mecanismos de ação no cancro

Na sua função proteolítica, o proteossoma é um regulador-chave de várias vias moleculares em células eucariotas, pelo que não é de estranhar a sua participação na carcinogénese. Sabe-se que tem grande importância no controlo da abundância e atividade de oncogenes e produtos de genes supressores tumorais bem como na regulação de proteínas de vias da apoptose, entre outras.

Regra geral, nas células cancerígenas verifica-se maior atividade do proteossoma do que nas homólogas normais. Este facto predispõe as células malignas a uma maior sensibilidade para os inibidores do proteossoma, o que pode dever-se à interrupção das vias proliferativas e anti-apoptóticas controladas pelo proteossoma. O aumento do número de proteossomas e da sua atividade nas células com elevados índices proliferativos constituem, uma vulnerabilidade destas células e tornam o proteossoma num alvo terapêutico promissor. Em doenças oncológicas, este efeito foi verificado na leucemia linfocítica aguda, relativamente a linfócitos normais e traduzia-se num aumento de cerca de três vezes da atividade quimiotrípica do proteossoma (Masdehors, et al., 2000). Também em cancro do ovário, *in vitro* e *in vivo*, foi constatado um aumento da expressão dos níveis das subunidades do proteossoma (Bazzaro, et al.,

2006). O aumento da atividade dos proteossomas no cancro parece associar-se a um aumento da degradação de proteínas supressoras tumorais, como a P27, assim como de proteínas pró-apoptóticas como a BAX (Voorhees & Orłowski, 2006). Assim se percebe que o aumento de função do proteossoma tenha sido descrito em tumores com fenótipos mais agressivos e com pior prognóstico (Voorhees & Orłowski, 2006).

Vários estudos comprovam a eficiência dos inibidores do proteossoma em células com elevada taxa de proliferação. A sua inibição associa-se ao bloqueio do ciclo celular nas transições entre as fases G1/S e G2/M (Machiels, et al., 1997; Shah, et al., 2001). A sua função antitumoral foi demonstrada em vários tipos de cancros como linfoma de Hodgkin's (Pajonk & McBride, 2001) e linfoma de Non-Hodgkin's (Barr, et al., 2007); mieloma múltiplo (Martinelli, et al., 2001); leucemia (Almond, et al., 2001); cancros da próstata (Herrmann, et al., 1998), do pâncreas (Bold, et al., 2001), gástrico (Fan, et al., 2001), colorretal (Lind, et al., 2001), do ovário (Mimnaugh, et al., 2000) e do pulmão (Oyaizu, et al., 2001).

No entanto, a eficácia dos inibidores do proteossoma não é igual para todas as neoplasias, e na maioria dos tumores sólidos os resultados são pouco convincentes. A verdade é que os mecanismos da sua acção anti-cancerígena são complexos, controversos e mal explicados, variando com a constituição do proteoma de cada célula maligna. Vários mecanismos têm sido descritos, a maioria relacionados com o aumento dos níveis de proteínas supressoras tumorais ou pró-apoptóticas.

Um dos primeiros mecanismos de ação atribuído aos inibidores do proteossoma foi a inibição do fator de transcrição nuclear NF- κ B, através da estabilização dos níveis citoplasmáticos do seu inibidor, o I κ B. O NF- κ B tem um papel importante na tumorigénese através da regulação de genes associados a proliferação celular, angiogénese, metastização, inflamação e supressão da apoptose (Bassères & Baldwin,

2006; Silva & Srivastava, 2007). A via do NF- κ B está constitucionalmente ativa em muitos tumores, quer sólidos quer hematológicos e parece estar envolvida na resistência à quimioterapia e radioterapia (Motegi, et al., 2009). Os primeiros estudos nesta matéria revelaram que a inibição do proteossoma, impedia a degradação do I κ B, e por conseguinte a ativação e translocação para o núcleo do NF- κ B e o aumento de expressão dos genes alvo (Cusack, et al., 2001; Hideshima, et al., 2001; Traenckner, et al., 1994). No entanto, Dolcet e colaboradores (2006), num estudo em linhas celulares de carcinoma do endométrio, demonstraram que a inibição do proteossoma, apesar de induzir morte celular, não o fazia através da inibição do NF- κ B, que pelo contrário era ativado. Mais recentemente, no mieloma múltiplo, Hideshima e colaboradores (2009) verificaram que o Bortezomibe promovia a degradação não proteossomal do I κ B mas ativava duas cinases ativadoras do NF- κ B, favorecendo a sua ligação ao DNA. No mesmo estudo, foram analisadas células do estroma da medula óssea, também expostas a inibidor do proteossoma, cuja resposta foi a inativação da via NF- κ B. Estes resultados confirmam que os efeitos dos inibidores do proteossoma são complexos, difíceis de prever e dependem do tipo de célula que é exposta a este. Por outro lado, estes inibidores podem também influenciar as células que constituem o microambiente tumoral o que surtiria efeitos nas células tumorais.

Outro mecanismo descrito para a atuação dos inibidores do proteossoma é ao nível do ciclo celular, favorecendo a não degradação dos inibidores das ciclinas, como a P27. A P27 é uma proteína supressora tumoral que promove a regulação negativa das cliclinas D e E, limitando a progressão do ciclo celular na transição G1/S (Wander, et al., 2011). A diminuição da expressão da P27 foi observada em vários tumores como linfoma, cancro do pulmão, cólon, próstata ou ovário (Chu, et al., 2008).

Relativamente à apoptose, a inibição da atividade dos proteossomas atua por modulação dos níveis de fatores anti e pro-apoptóticos, resultando na sobreexpressão de fatores pro-apoptóticos como a P53, BAX e NOXA e, por outro lado, na diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas como a BCL-2 e a IAP. A proteína P53, é considerada uma das proteínas essenciais para o processo apoptótico (Frankland-Searby & Bhaumik, 2012), promovendo a expressão de genes alvo que codificam proteínas como a P21, o ligando Fas, a PUMA ou a BAX (Williams & McConkey, 2003). No entanto, em algumas células de leucemia, a indução da apoptose pelos inibidores dos proteossomas parece ocorrer sem a intervenção da P53 (An, et al., 2000; Crawford, et al., 2011). A indução da apoptose poderia ocorrer por mecanismos dependentes do retículo endoplasmático como resposta à acumulação excessiva de proteínas de conformação tridimensional deficiente (Breckenridge, et al., 2003). Este efeito tem sido descrito em diversos tumores como o mieloma múltiplo (Obeng, et al., 2006), cancro do pâncreas (Nawrocki ST, et al., 2005) e carcinoma do pulmão de não pequenas células (Morgillo, et al., 2011).

Os inibidores do proteossoma podem, além do efeito direto nas células, influenciar o microambiente do tumor, especificamente inibindo a angiogénese. Efetivamente, Roccaro e colaboradores (2006) verificaram a diminuição da expressão do VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), em células endoteliais de mieloma múltiplo. Este efeito foi também obtido numa linha celular de cancro do ovário (Wang, et al., 2008).

1.4.2. Inibidores do proteossoma e cancro do ovário

Para além da sua utilização no cancro hematológico, o Bortezomibe também tem sido alvo de investigações em modelos *in vitro* e *in vivo* em diversos tipos de cancro

sólido entre eles o do ovário, com alguns resultados promissores, sobretudo quando em associação com a quimioterapia convencional (Frankel, et al., 2000; Mimnaugh, et al., 2000; Taylor-Harding, et al., 2012).

No entanto, o mesmo não se tem verificado em ensaios clínicos. Aghajanian e colaboradores (2009), realizaram ensaios clínicos de fase II, em pacientes com cancro peritoneal primário ou cancro do ovário resistente ou persistente com resistência a compostos de platina. Nesse estudo verificaram que o Bortezomibe tinha um efeito anti-tumoral mínimo como agente terapêutico único apesar de ocorrer até 96% de inibição do proteossoma 20S. Além deste ensaio, não há registo de outros resultados.

É lícito interrogarmo-nos sobre os mecanismos subjacentes a esta ineficácia clínica, aliás comum à maioria dos cancros sólidos. Para além de efeitos imprevisíveis, como a ativação anteriormente descrita do NF κ B, o conhecimento das vias que são reguladas pelo proteossoma pode sugerir algumas explicações. É o caso da interferência com a regulação dos níveis citoplasmáticos da β -catenina: inibindo-se o proteossoma, estes níveis deveriam aumentar e favorecer a transmigração nuclear da β -catenina, e a consequente ativação dos genes alvo da via Wnt/ β -catenina, com um efeito carcinogénico comprovado no cancro do ovário. Este efeito indesejável dos inibidores do proteossoma poderá explicar a resistência à morte celular induzida por estes fármacos no cancro do ovário, e será explorado neste trabalho.

1.5. Objetivos

Este estudo teve como objetivo avaliar a interação entre a inibição do proteossoma e a via Wnt no cancro do ovário, utilizando uma linha celular de cancro do ovário, a TOV-112D e o inibidor do proteossoma MG262.

Mais concretamente, pretendeu-se:

- avaliar o grau de inibição do proteossoma induzido pelo MG262;
- avaliar os efeitos do MG262 ao nível da viabilidade celular e apoptose;
- verificar se o MG262 induz a transmigração nuclear da β -catenina e a ativação da transcrição dos genes alvo da via Wnt/ β -catenina ;
- determinar os efeitos do MG262 sobre a ativação da via NF κ B;
- determinar se o MG262 interfere com o fenótipo tumoral, avaliando a capacidade de migração celular, a expressão da hTERT e a expressão de um marcador da TEM.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2.1. Cultura de células

Utilizou-se a linha celular TOV-112D (CRL-11731), obtida da American Type Culture Collection (ATCC). Esta linha celular é originária de um adenocarcinoma endometrióide do ovário, tem uma mutação ativadora da β -catenina, uma mutação com perda de função da P53, é HER/neu positiva e tumorigénica. Foi cultivada num meio de cultura constituído por 1:1 de meio 199 e DMEM/F-12 suplementado com 15% de soro bovino fetal (SBF) e 1.5% de antibiótico (10000 U/mL de penicilina G, 10000 μ g/mL de estreptomicina e 25 μ g/mL anfotericina B). Todos os reagentes foram obtidos da Invitrogen™. A linha celular foi mantida numa câmara a 37°C e a 5% de CO₂.

2.2. Inibidor do proteossoma

Como inibidor do proteossoma utilizou-se o MG262 (Calbiochem®), um inibidor extremamente seletivo e potente. Foram feitas alíquotas de 50 μ M de MG262 em DMSO (Sigma®) e guardadas a -20°C, que foram descongeladas e diluídas apenas no momento que antecedeu o seu uso. As células foram expostas às seguintes concentrações de inibidor do proteossoma: 1 nM, 5 nM, 10 nM, 15 nM e 20 nM. O volume de solução do fármaco adicionado ao meio de cultura foi sempre de 0.25% do volume total. Para cada experiência, o mesmo volume do solvente, DMSO, foi utilizado como controlo negativo (0 nM de fármaco).

2.3. Estudos do tipo de morte celular

Para avaliar o tipo de morte celular recorreu-se a dupla marcação com iodeto de propídeo (IP) (Molecular Probes, Invitrogen) e Anexina V (AV) conjugada com a sonda fluorescente FITC (Becton Dickinson Pharmingen). Esta técnica permite a distinção

entre as células viáveis e as não viáveis e, nas não viáveis, identifica o tipo de morte celular: apoptose inicial, apoptose tardia/necrose e necrose.

O IP é um corante fluorescente que entra nas células quando a membrana celular está comprometida e vai intercalar-se no DNA. Por sua vez, a AnexinaV, não penetra nas células, ligando-se, no entanto, à fosfatidilserina. Este fosfolípido membranar encontra-se comumente no folheto interno da membrana, sendo translocado para o exterior no início da apoptose, quando ainda há integridade da membrana. Assim, quando as células são expostas a estes dois fluorocromos, as células em apoptose inicial, com a membrana íntegra, coram com a Anexina V e não pelo IP; pelo contrário, as células em apoptose tardia e/ou necrose ficam coradas por ambos os fluorocromos (Anexina V e IP) enquanto a marcação só com iodeto de propídeo identifica as células em necrose (Figura 7).

As células foram colocadas em frascos de cultura numa concentração de 5×10^5 células/frasco. Após 24 horas, foram expostas a diferentes concentrações de inibidor do proteossoma MG262 (1 nM, 5 nM, 10 nM, 15 nM e 20 nM), correspondente a 0.25% do meio de cultura, durante 24 ou 48 horas. Posteriormente, as células foram destacadas com uma solução de 0.25% tripsina-EDTA (Life Technologies™), após o que se adicionou igual volume do meio de cultura e se centrifugou a suspensão obtida durante 5 minutos, a 300 x g (Centrifuga Refrigerada Sigma 3K10, Sigma®). Antes de se iniciar a tripsinização das células, verificou-se sempre se existiam células em suspensão; caso estivessem presentes, o meio de cultura era centrifugado e as células analisadas em conjunto com as tripsinizadas. Retirou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* em PBS 1x e centrifugou-se novamente para remover todos os vestígios de meio de cultura com soro, que poderiam interferir com a técnica de preparação das células para leitura por citometria.

Foram analisados três parâmetros a partir desta técnica: tipo de morte celular, níveis de conjugados de ubiquitina e ativação da via NF- κ B. Os processos acima descritos eram comuns a todos os parâmetros em estudo.

As células foram incubadas com 100 μ L de tampão de ligação (*Annexin V-binding buffer*), 5 μ L de AV e 2 μ L de IP, durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Depois procedeu-se à centrifugação (300 x g, 5 minutos) e ressuspensão das células em 400 μ L de tampão de ligação (*Annexin V-binding buffer*). Procedeu-se à leitura no citómetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson) com o programa *Cell Quest* (BD Biosciences) e à posterior análise com o programa *Paint-a-Gate* (BD Biosciences) (Figura 7). Para cada determinação realizaram-se três experiências diferentes (n=3) e para cada uma efetuaram-se duplicados. Para os cálculos, utilizaram-se as médias dos duplicados.

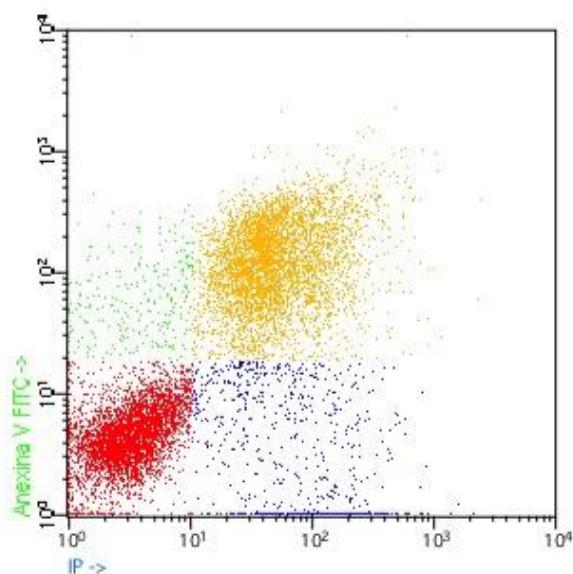


Figura 7 – Análise da viabilidade e tipo de morte celular por citometria de fluxo, através de marcação com Anexina V (AV) e Iodeto de Propídeo (IP). As diferentes distribuições estão marcadas da seguinte forma: vermelho para as células viáveis (AV-/IP-), verde para as células em apoptose inicial (AV+/IP-), amarelo para as células em apoptose tardia/necrose (AV+/IP+) e azul para as células em necrose (AV-/IP+).

2.4. Avaliação dos conjugados de ubiquitina e da ativação da via do NF- κ B

A quantificação da variação dos níveis citoplasmáticos dos conjugados de ubiquitina permitiu-nos uma avaliação indireta do grau de inibição dos proteossomas, com base no pressuposto de que a inibição deste complexo de degradação de proteínas é acompanhada da acumulação citoplasmática dos seus substratos, os conjugados de ubiquitina.

Um dos possíveis efeitos da inibição do proteossoma é a acumulação citoplasmática do inibidor do NF κ B, o I κ B, com consequente retenção citoplasmática e inativação do NF κ B. O anticorpo usado, Mouse anti-NF κ B p65 (BD Biosciences), marca a serina fosforilada na posição 529 da subunidade p65 da NF κ B, correspondente à proteína ativada, livre do seu inibidor, o I κ B. Consequentemente, em resposta à inibição do proteossoma, espera-se a diminuição dos níveis de fluorescência detetados.

Tal como para a técnica anterior, as células foram expostas a várias concentrações do inibidor do proteossoma MG262 (5 nM, 10 nM e 15 nM) e posteriormente, destacadas e lavadas. Adicionaram-se 100 μ L de solução de fixação (IntraCell Kit, Immunostep) e procedeu-se a incubação por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Depois, adicionaram-se 2 ml de PBS 1x e centrifugou-se a suspensão (300 \times g, 5 minutos) para remover os vestígios da solução anterior. Aspirou-se o sobrenadante deixando cerca de 50 μ L e ressuspendeu-se com a ajuda do vortex. Adicionaram-se 100 μ L de reagente de permeabilização (IntraCell Kit, Immunostep), 5 μ L do anticorpo Ub (P4D1) FITC (Santa Cruz Biotechnology) e 5 μ L do anticorpo PE - mouse anti-NF κ B p65 (BD Biosciences) e incubou-se a suspensão celular durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Adicionaram-se 2 ml de PBS 1 x, após o que se procedeu a nova centrifugação. Finalmente, foram adicionados 400 μ L de PBS 1x para resuspende as células. Procedeu-se à leitura no citómetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson)

com o programa *Cell Quest* (BD Biosciences) e posterior análise com o programa *Paint-a-Gate* (BD Biosciences) (Figuras 8 e 9).

Para cada determinação realizaram-se três experiências diferentes (n=3) e cada uma delas foi efectuada em duplicado. Para os cálculos, utilizaram-se as médias dos duplicados.

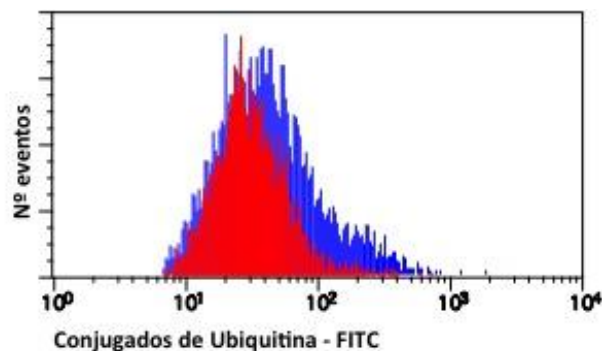


Figura 8 – Análise dos conjugados de ubiquitina por citometria de fluxo através de marcação com um anticorpo conjugado com FITC. A área a vermelho corresponde ao controlo (0 nM de MG262) e a área azul corresponde à condição com fármaco.

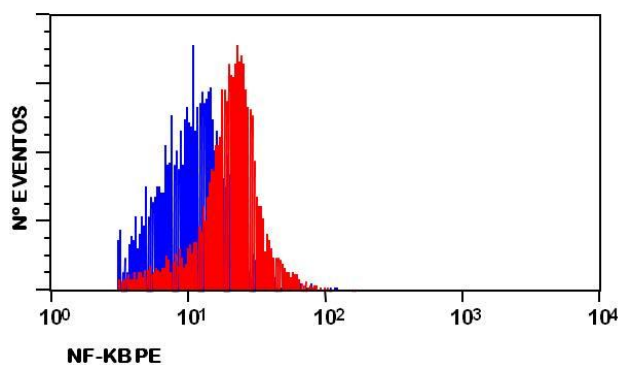


Figura 9 - Análise da activação de NF-kB por citometria de fluxo através de marcação com um anticorpo conjugado com PE. A área a vermelho corresponde ao controlo (0 nM de MG262) e a área azul corresponde à condição com fármaco.

2.5. Avaliação dos níveis de expressão gênica

Estudaram-se os níveis de expressão de 3 genes: do gene alvo da via da Wnt/ β catenina, *CCND1*, que codifica a ciclina D1, para avaliar a ativação desta via de sinalização; do gene da unidade catalítica da telomerase, *hTERT* e do gene *SNAIL*, que codifica uma proteína com um papel na aquisição do fenótipo de transição epitélio/mesênquima, para avaliar a agressividade do fenótipo das células cancerígenas. Recorreu-se, para isto, à técnica de RT-PCR em tempo real com SYBR Green.

2.5.1. Extração de RNA

Cultivaram-se 5×10^5 células em frascos de cultura e após 48 horas de exposição a três concentrações de fármaco (5, 10 e 15 nM), procedeu-se a extração do RNA total recorrendo ao kit QIAamp[®] RNA Blood Mini Kit (QIAGEN[®]). As células foram destacadas e lavadas seguindo os procedimentos já descritos. Após centrifugação para remoção do meio onde as células foram cultivadas, o *pellet* foi homogeneizado com 350 μ L de uma solução de tampão RLT e β -mercaptoetanol a 1% (Sigma[®]) que atuou por forma a lisar as membranas das células e deixar exposto o RNA sem que este esteja exposto a RNAses. Adicionou-se o mesmo volume (350 μ L) de etanol a 70%, que proporciona as condições necessárias à maximização da ligação entre o RNA e a matriz da coluna. Esta solução de lisado foi suavemente homogeneizada por pipetagem e transferida para a coluna *Rneasy spin* do kit. Centrifugou-se a ≥ 8000 x g durante 15 segundos. De seguida, adicionaram-se 700 μ L de tampão RW1 para remover todas as moléculas inespecificamente ligadas à membrana e centrifugou-se novamente a ≥ 8000 x g durante 15 segundos. Adicionaram-se 500 μ L de tampão RPE cuja função é remover qualquer sal que tenha ficado retido na membrana devido aos tampões utilizados anteriormente, após o que se procedeu a uma centrifugação de ≥ 8000 x g durante 15 segundos. Repetiu-se a lavagem com RPE com um volume de 500 μ L durante 2

minutos. Transferiu-se a coluna *Rneasy spin* para um microtubo de 1.5 mL e adicionaram-se 30-50 μL de água livre de RNases directamente na membrana da coluna. Centrifugou-se durante 1 minuto a $\geq 8.000\times g$ para eluir o RNA. Por fim, o RNA foi armazenado a -21°C para uso posterior.

2.5.2. Quantificação de RNA

Usaram-se 2 μL de solução de RNA para a quantificação por espectrofotometria num aparelho Nanodrop ND-1000. O grau de pureza das amostras foi considerado adequado (tabela I).

Tabela I – Concentrações e grau de pureza relativas às amostras de RNA extraído da linha celular TOV-112D, após exposição ao fármaco (concentrações de 5, 10 e 15 nM) e sem exposição ao fármaco (0 nM de MG262).

Ensaio	Amostra	[RNA] ng/ μL	A260/280
1	0 nM	706.6	2.03
	5 nM	703.5	2.03
	10 nM	100.6	1.84
	15 nM	146.0	1.92
2	0 nM	830.1	2.02
	5 nM	576.8	2.01
	10 nM	163.2	1.93
	15 nM	195.4	1.95
3	0 nM	658.3	2.02
	5 nM	745.8	2.01
	10 nM	701.2	2.04
	15 nM	280.2	1.96

2.5.3. Síntese de cDNA

Para converter o RNA em cDNA foi utilizado o kit *Omniscript*[™] Reverse Transcriptase (QIAGEN[®]). Para esta reação utilizou-se uma mistura aleatória de nucleótidos, pd(N)₆ (Amersham), que possibilita a síntese de todos os mRNAs presentes na célula. Com este método é possível estudar a expressão de diferentes transcritos a partir do mesmo cDNA. Para um volume final de 20 µL utilizaram-se os reagentes e as condições descritas na tabela II.

Tabela II – Condições utilizadas para a reação de transcrição reversa.

Componentes	Concentração final
Tampão	1x
dNTPs	0.5 mM de cada dNTP
Pd(N) ₆	1 µM
Inibidor de RNases*	10 unidades
Transcriptase reversa	4 unidades
RNA	Variável (correspondente a 1 µL de amostra, não ultrapassando 0.8 ng/µL)
Água livre de RNases	Até perfazer o volume final de 20 µL

* Rnasin (Invitrogen)

Adicionou-se o RNA de cada amostra à água sem RNases, e colocaram-se os tubos a 65°C, durante 5 minutos, para permitir a desnaturação das cadeias e de seguida colocaram-se imediatamente em gelo. Adicionaram-se 6.5 µL de *master mix* constituída por tampão, dNTPs, Pd(N)₆ e Rnasin a cada amostra de RNA anteriormente preparada. A reacção de transcrição processou-se durante 60 minutos a 37°C num termociclador My Cycler Thermal Cycler (Bio-rad). As amostras de cDNA foram posteriormente

guardadas a -20°C. Os controlos negativos foram constituídos por uma combinação de todos os reagentes da Tabela II, com exceção do RNA.

Todo o material de plástico foi previamente tratado com DEPC a 0.1%. O manuseamento do RNA foi realizado em câmara de fluxo laminar previamente exposta a UV. Usaram-se pipetas reservadas para este efeito e previamente expostas a UV.

2.5.4. PCR em tempo real

Os ensaios de PCR em tempo real foram realizados no CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-rad). Este é um método extremamente reprodutível, sensível e rápido, que permite o registo e quantificação da acumulação de *amplicons* ao longo da PCR. Como sonda utilizou-se o SYBR Green, uma sonda fluorescente que se liga inespecificamente ao DNA de dupla cadeia. A especificidade do produto de PCR pode ser efetuada por análise de curva de *melting* e a quantificação do alvo por comparação com os níveis de fluorescência obtidos a partir de um alvo controlo.

Foram realizados 3 ensaios independentes, cada um correspondente a distintas extrações de RNA efetuadas em simultâneo para as quatro concentrações de MG262 em estudo (0 nM, 5 nM, 10 nM e 15 nM).

Estudaram-se os níveis de expressão dos genes *CCND1*, *hTERT* e *SNAIL*. Para gene padrão utilizou-se o gene do RNA ribossómico 18s. Os *primers* foram desenhados no Beacon Designer 6.0 (Premier Biosoft), de modo a só amplificarem RNA (*primers* localizados em diferentes exões) (Tabela III). A especificidade dos *primers* foi verificada numa PCR convencional inicial. Para avaliar a eficiência dos protocolos das reações de PCR em tempo real criaram-se curvas padrão a partir de diluições das amostras de cDNA, tendo-se obtido um R^2 de 0.994 para o gene *18S* e para o gene *CCND1*, 0.951 para o gene *hTERT* e 0.939 para o gene *SNAIL*.

Tabela III – Sequências dos *primers* para cada gene em estudo por amplificação por PCR em tempo real.

Gene	Número de acesso do GenBank	Primer	Sequência
<i>18S</i>	NM_022551	Proximal Distal	5' – GCAGACATTGACCTCACC – 3' 5' – CTTCTTCAGTCGCTCCAG – 3'
<i>CCND1</i>	NM_053056	Proximal Distal	5' - ATCTACACCGACA ACTCCATC – 3' 5' - TGTTCTCCTCCGCCTCTG – 3'
<i>hTERT</i>	NM_198253	Proximal Distal	5' - GTTTGGTGGATGATTTCTTGTTG – 3' 5' - CACGCAGCCATACTCAGG – 3'
<i>SNAIL</i>	NM_005985	Proximal Distal	5' - AATCGGAAGCCTAACTACAG – 3' 5' – ACAGAGTCCCAGATGAGC – 3'

Os *primers* usados para o controlo endógeno foram obtidos da MWG-Biotech enquanto os usados para os genes alvo foram obtidos da STABVIDA,Lda. A supermix iQTM SYBR® Green foi obtida da BioRad.

Os protocolos de amplificação diferiram apenas na temperatura de emparelhamento, de 56°C para os genes *18S* e *CCND1* e de 58°C para os genes *hTERT* e *SNAIL*. A desnaturação das cadeias de cDNA decorreu a 95°C durante 5 minutos, após o que se seguiram 40 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos à temperatura de emparelhamento e 30 segundos a 72°C. Para todos os genes em estudo, foram preparadas reações nas condições descritas na tabela IV, para um volume final de 21 µL por reação.

Tabela IV – Condições utilizadas para a PCR em tempo real para os genes *18S*, *CCND1*, *hTERT* e *SNAIL*.

cDNA (µL)	iQ TM Supermix (µL)	Primer forward (10µM)	Primer reverse (10µM)	Água livre de RNAses (µL)
1	10	0.3	0.3	8.4

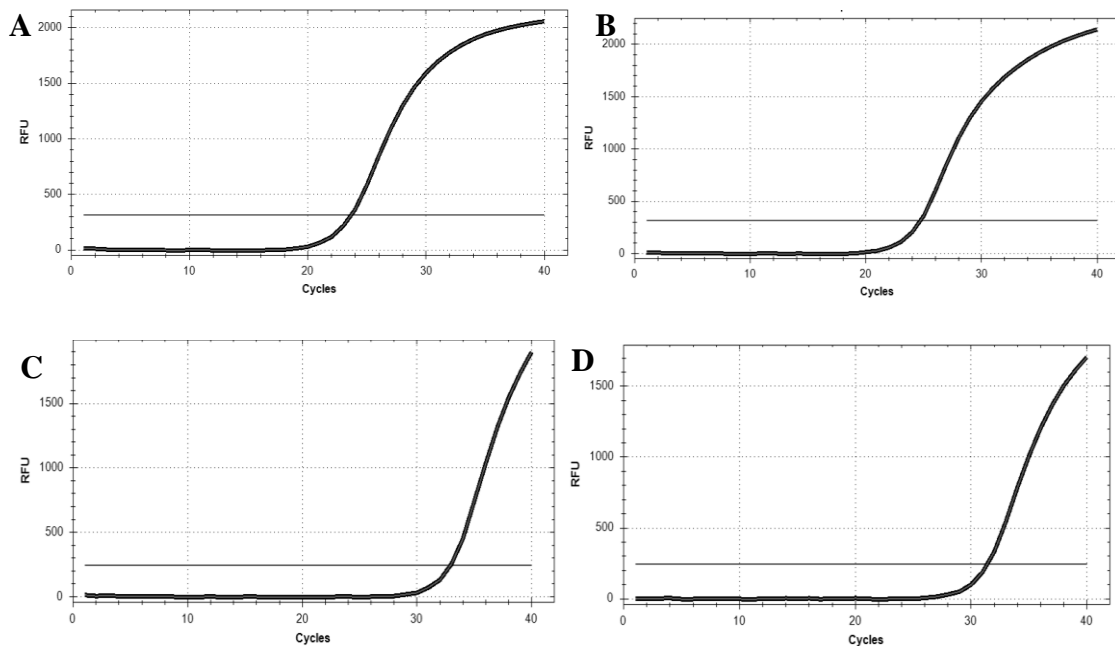


Figura 10 – Exemplos de curvas de amplificação para os genes em estudo (fluorescência versus número de ciclos). (A) *I8S*. (B) *ccND1*. (C) *hTERT*. (D) *Snail*. Cada curva resulta da colheita de dados de fluorescência durante a fase de extensão da PCR. Os valores de Ct são calculados pela determinação do ponto em que a fluorescência excede o limiar abaixo do qual é considerada apenas fluorescência de fundo. RFU – Unidades de fluorescência relativa

Os resultados foram obtidos a partir de três ensaios independentes, em que cada amostra foi processada em triplicado.

A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada através do programa REST 2009 (Axexo I). Como gene de controlo endógeno para normalização da expressão gênica utilizou-se o *I8S RNA*; as amostras expostas ao MG262 (tratadas) foram comparadas com as amostras expostas ao solvente DMSO (não tratadas).

2.6. Avaliação da transmigração nuclear da β -catenina

Quando a β -catenina citoplasmática não é degradada pelo proteossoma sofre transmigração para o núcleo onde vai ativar a transcrição dos genes alvo da via Wnt/ β -catenina. A quantificação da localização núcleo/citoplasma da β -catenina por imunofluorescência é por isso frequentemente utilizada para avaliar o grau de ativação desta via de sinalização e permitiu-nos verificar qual a influência do inibidor dos proteossomas MG262 neste processo.

O protocolo de imunofluorescência foi iniciado pela lavagem de lamelas circulares de 1 cm de diâmetro com álcool a 100%. Após secarem, foram cobertas com poli-lisina (Sigma[®]) à concentração de 0.1 mg/mL, por 5 minutos e de seguida foram lavadas com PBS 1x. A secagem das lamelas ocorreu durante cerca de 2 horas, após o que se colocaram 5×10^5 células suspensas em meio com 15% de SBF em cada poço de uma caixa *multiwell*, que foram permitidas crescer durante 24 horas. Posteriormente, as células foram expostas por 48 horas a diferentes concentrações de MG262 (0, 5, 10 e 15 nM).

Passado o tempo de exposição, foi removido o meio de cultura, após o que se seguiu uma lavagem com PBS 1x, por 3 vezes durante 5 minutos cada. As células foram depois fixadas à temperatura ambiente por 10 minutos em formalina 0.37% em PBS 1x, o que foi seguido de uma incubação com metanol a -20°C por um minuto. Posteriormente, lavaram-se durante 5 minutos com PBS 1x, por três vezes, após o que se procedeu à permeabilização, à temperatura ambiente, com Triton-X 0.4% (Sigma[®]) durante 10 minutos. Terminado este passo, as células foram de novo lavadas durante 5 minutos com PBS 1x, por três vezes, e incubadas durante 20 minutos com uma solução de bloqueio contendo 1% de SBF. Em seguida, procedeu-se à incubação com um anticorpo policlonal de coelho anti-humano para β -catenina (Abcam[®]) (40 μl por lamela de uma diluição 1:100) por uma hora à temperatura ambiente. Seguiram-se 3 lavagens

com PBS 1x durante 5 minutos. Seguidamente, executou-se a incubação com o anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 de cabra anti-coelho (Life Technologies™) (40 µl por lamela de uma diluição 1:200) durante uma hora, após a qual se lavaram as células com PBS 1x por três vezes durante 5 minutos cada. Para evitar que as células se destacassem, todas as lavagens foram efetuadas com suavidade e nunca diretamente sobre as lamelas. Durante as incubações evitou-se a evaporação e secagem das lamelas mantendo-as sempre em ambiente húmido.

A montagem das lamelas realizou-se recorrendo ao meio de montagem Vectashield® com DAPI (Vector Laboratoires) usando cerca de 5µL por lamela. As preparações foram seladas com verniz.

A captação das imagens foi realizada através do microscópio confocal LSM 710 (Zeiss) e o programa Zen 2009 (Zeiss). Cada imagem composta foi obtida por sobreposição de imagens adquiridas em separado por cada um dos dois canais utilizados (para a marcação da β -catenina e DAPI) e subsequentemente fundidas. A medição da fluorescência das imagens obtidas foi realizada através do programa de análise ImageJ (versão 1.45s), após conversão das imagens para escala de cinza. Foram feitas 6 medições por célula – 3 no núcleo e 3 no citoplasma, em 25 células de cada condição.

2.7. Ensaio de migração celular

Para avaliar a interferência do MG262 numa das principais características fenotípicas das células cancerosas, a sua capacidade de migração, utilizaram-se duas técnicas diferentes: a invasão em câmara *transwell* e o *wound-healing*.

2.7.1. Migração em câmara *transwell*

Para este ensaio de migração recorreu-se a sistemas de câmaras com *transwell* – *inserts* com membranas de 6.5 mm de diâmetro contendo poros de 8 μm (COSTAR®). Adicionaram-se ao *insert* 100 μL de uma suspensão 5×10^5 células/mL em meio com 5% de SBF e na câmara inferior colocaram-se 600 μL de meio com 15% de SBF. Permitiu-se a migração das células por 96 horas a 37°C. O meio do *insert* foi substituído às 48 horas. O inibidor do proteossoma MG262 foi adicionado ao meio do insert em concentrações de 0 nM (controlo, com o solvente DMSO) e 5 nM, no início do ensaio e às 48 horas. Para cada condição foram realizadas 6 réplicas.

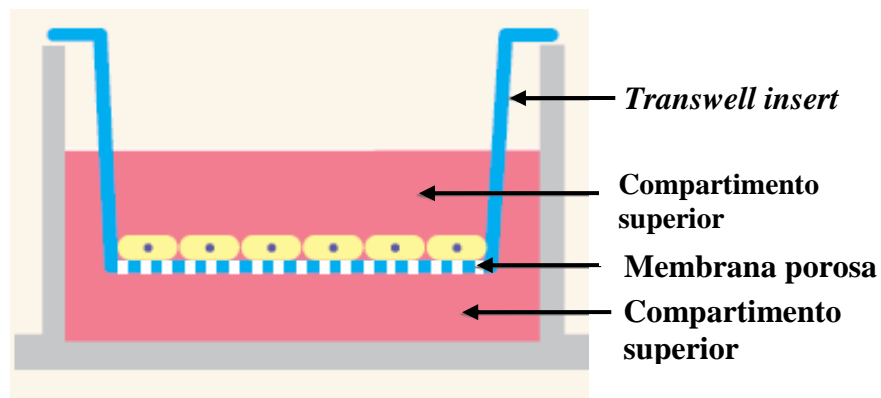


Figura 11 - Câmara *transwell* utilizada no ensaio de migração celular. As células TOV-112D foram colocadas no compartimento superior do *insert*. Este delimita a câmara superior, cuja única forma de contacto com a câmara inferior são os poros da membrana do *insert*.

A concentração de 5% de SBF para o meio de cultura das células foi otimizada de modo a permitir uma menor variabilidade de resultados, mantendo a viabilidade celular com uma proliferação mínima. A concentração de 15% de SBF na câmara inferior tem uma função quimiotática.

Ao fim de 96 horas, aspirou-se a suspensão celular da câmara superior e limpou-se a superfície superior da membrana com um cotonete de modo a retirar todas as

células. Apenas ficaram na membrana as células que migraram e ficaram aderentes à superfície inferior. De seguida, o *insert* e o poço foram lavados com PBS 1x e, por duas vezes, foram adicionados 700 µL de metanol frio (-20°C) a cada poço, permitindo que a membrana aí ficasse mergulhada durante 5 minutos. Aspirou-se o metanol, colocaram-se 700 µL de violeta de cristal 0.5% e deixou-se atuar por 5 minutos para corar as células aderentes à superfície inferior da membrana. O corante foi aspirado e as membranas lavadas em água tépida, agitando suavemente, após o que se deixaram a secar. Em câmaras limpas e secas adicionaram-se 600 µL de ácido acético a 10% e colocaram-se os *inserts* de modo a que as membranas ficassem mergulhadas e o corante das células se diluísse no ácido acético. Finalmente procedeu-se à quantificação do corante diluído por espectrofotometria com leitura a 550 nm (SLT.spectra, SLT).

2.7.2. Ensaio de wound-healing

O ensaio *wound healing* é um método simples de avaliação de uma das principais características fenotípicas das células cancerígenas, a capacidade de migração em superfície, em grande parte dependente da interação célula-célula e célula-matriz (Liang, et al., 2007).

Numa primeira fase, as TOV-112D foram expostas durante 48 horas a MG262 a 5 nM e a igual volume de solvente DMSO (controlo, 0 nM de MG262) em frascos de cultura. Posteriormente, as células foram tripsinizadas, resuspensas em meio com 5% de SBF e 1×10^6 células foram colocadas em poços, 3 por cada condição, em caixas *multiwell* de 6 poços. O meio (com 5% de SBF) foi mudado a cada dois dias até as células atingirem confluência, o que ocorreu em média após 8 dias. A concentração de SBF a 5% foi otimizada de modo a permitir a viabilidade celular com uma proliferação

mínima, para garantir uma menor variabilidade dos resultados. As células não voltaram a ser expostas ao inibidor de proteossoma após a cultura inicial para este ensaio.

Com a ponta de uma micropipeta de 10 µL estéril fez-se um sulco na base de cada poço, de forma a obter-se uma lesão (*wound*) uniforme linear sem qualquer célula aderente. Três dos poços de cultura de células foram fixados com metanol frio (a -20°C), corados com violeta de cristal a 0,5%. e fotografados para imagens iniciais de controlo. Os restantes 6 poços, 3 por cada concentração (0 nM e 5 nM de MG262), mantiveram-se em cultura até 48 horas, após o que foram igualmente fixados, corados e fotografados. As fotos digitais foram obtidas a partir de um microscópio invertido Motic AE31 e da câmara Moticom 5000 cooled (Jed Pella, Inc.) e analisadas através do programa Motic Images Advanced 3.2 (Jed Pella, Inc.). A migração celular para a zona de deteção foi medida com o auxílio da ferramenta de contagem de células do programa de análise ImageJ (versão 1.45s).

Com base nas imagens iniciais do sulco sem células, para cada poço, determinaram-se 3 áreas quadrangulares, dentro das quais se contaram as células migradas.

2.8. Estatística

Os resultados obtidos para os estudos de morte celular, avaliação dos níveis de conjugados de ubiquitina e activação da via NFκB, transmigração nuclear da β-catenina e ensaios de migração foram tratados estatisticamente através da função teste t do programa Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft). Os dados referentes à PCR em tempo real foram realizados recorrendo ao programa REST 2009 v2.0.13 (QIAGEN®). Um valor de $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

O cancro do ovário é uma doença quase sempre detetada em estádios avançados e com recidivas e resistência secundária à quimioterapia frequentes, responsáveis pelo seu mau prognóstico. Na tentativa de ultrapassar a quimiorresistência têm sido experimentados novos fármacos, dirigidos a alvos terapêuticos, como é o caso dos inibidores dos proteossomas. Ao inibirem este complexo proteico proteolítico, estes fármacos exercem um efeito anticancerígeno, supostamente por impedirem a degradação de proteínas supressoras tumorais e anti-apoptóticas. Contudo, no cancro do ovário, os inibidores dos proteossomas não se têm revelado clinicamente eficazes. Neste trabalho, tentámos esclarecer os mecanismos de ação dos inibidores dos proteossomas e verificar se a razão do seu insucesso estaria relacionada com os efeitos dos inibidores dos proteossomas sobre a via de transdução de sinal Wnt/ β -catenina, frequentemente ativada no cancro do ovário. A verdade é que, teoricamente, a inibição dos proteossomas pode aumentar a concentração plasmática de β -catenina, e se esta sofrer transmigração nuclear, irá ativar a transcrição de genes alvo, efeito semelhante ao da ativação da via carcinogénica Wnt/ β -catenina. Como modelo utilizámos a linha celular de cancro do ovário TOV-112D, que tem uma mutação ativadora da β -catenina, e o inibidor dos proteossomas, MG262.

3.1. Avaliação do tipo de morte celular

Para analisar a influência do MG262 sobre a viabilidade e o tipo de morte celulares, recorreu-se a citometria de fluxo após marcação das células com Anexina V e Iodeto de propídeo, como previamente descrito.

Foram feitas avaliações às 24 horas e às 48 horas, após exposição a diversas concentrações de MG262 (1 nM, 5 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM). Às 24 horas de exposição, verificou-se uma diminuição da viabilidade celular, estatisticamente

significativa quando se compararam os resultados para 1nM com os obtidos com 10 nM, 15 nM e 20 nM ($P < 0.05$), ou entre os resultados obtidos com 5 nM e 10 nM ($P < 0.05$), ou ainda entre 5 nM e 20 nM ($P < 0.05$). Apesar da diferença ser significativa entre algumas concentrações, ela não foi marcada e não se verificou uma tendência de decréscimo constante e consistente (Figura 12).

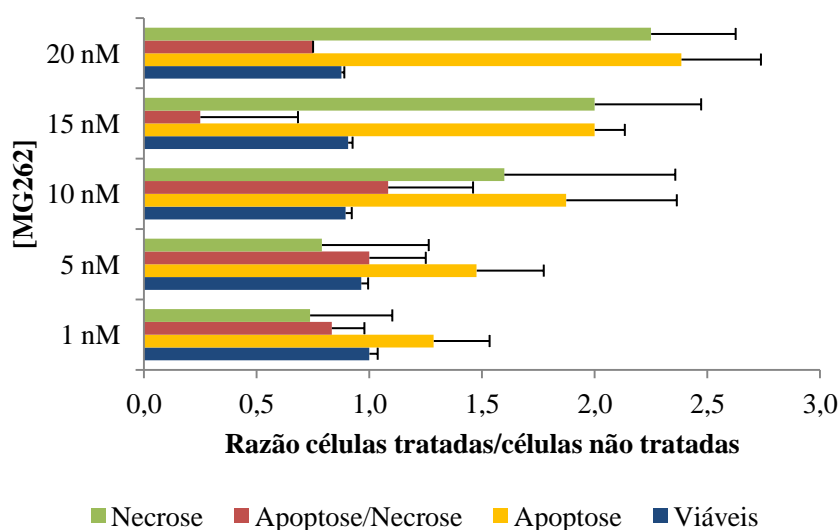


Figura 12 – Análise dos mecanismos de morte celular. Após 24 horas de exposição ao fármaco, as células foram marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídeo e analisadas por citometria de fluxo. Para cada concentração, os dados correspondem à razão entre células tratadas e não tratadas e foram obtidos a partir da média de três ensaios independentes

Os tipos predominantes de morte celular foram a apoptose e a necrose. Foi verificado um aumento significativo para a apoptose quando comparada a concentrações de 1 nM com 10 nM, 15 nM e 20 nM ($P < 0.05$) ou ainda entre 5 nM e 20 nM ($P < 0.05$) bem como para a necrose quando comparados os dados obtidos para 1 nM com 15 nM e 20 nM ($P < 0.05$) ou ainda 5 nM com 15 nM e 20 nM ($P < 0.05$). Não se verificou existir diferença estatisticamente significativa para a apoptose tardia/necrose em nenhuma das concentrações de MG262.

Uma vez que os efeitos citotóxicos eram escassos no ensaio de 24 horas, procedeu-se a um ensaio às 48 horas de exposição. A exposição mais prolongada ao inibidor do proteossoma permitiu obter diferenças mais relevantes entre as diferentes concentrações (Figura 13). O número de células viáveis diminuiu de uma forma mais nítida e dependente da concentração do MG262. Verificou-se um padrão decrescente, com diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$ entre 5 nM e 10 nM e $P < 0.01$ entre as restantes concentrações).

Quanto às células apoptóticas, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa no que respeita a todas as concentrações de MG262, quando comparadas com concentrações de 1 nM ($P < 0.01$) ou de 20 nM ($P < 0.01$). O mesmo se verificou para a quase totalidade das células em apoptose tardia/necrose ($P < 0.05$), com exceção da comparação entre 15 nM e 20 nM, que não tinham significância estatística. Para a necrose, as diferenças foram estatisticamente significativas entre todas as condições ($P < 0.05$).

Estes resultados são parcialmente corroborados por um outro trabalho com a linha celular de cancro do ovário SKOV-3, no qual se encontraram diferenças significativas para a diminuição da viabilidade celular após uma exposição ao inibidor do proteossoma de 48 horas, mas não às 24 horas (Wang, et al., 2008). No entanto, os autores não obtiveram uma diminuição tão acentuada da viabilidade celular como no estudo presente, o que poderá dever-se às diferenças intrínsecas entre as duas linhas celulares.

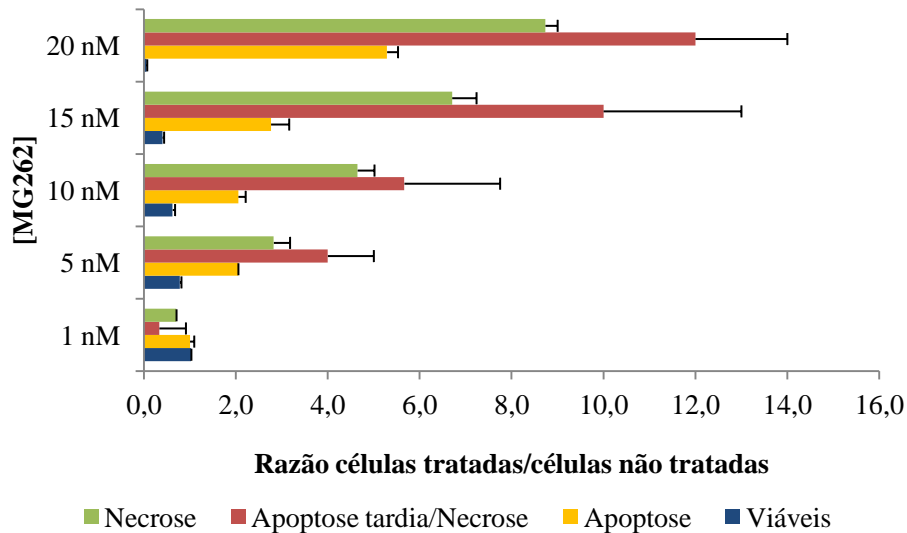


Figura 13 – Análise dos mecanismos de morte celular por citometria de fluxo às 48 horas de exposição ao fármaco. Para cada concentração, os dados correspondem à razão entre células tratadas e não tratadas e foram obtidos a partir da média de três ensaios independentes.

O IC_{50} para 48 horas de tratamento com o MG262 foi de 14 nM ($R^2=0.9945$). Constata-se ainda que a apoptose continuou a não ser o tipo preferencial de morte celular induzida pelo MG262 na linha celular TOV-112D. Este facto poderá estar relacionado com a presença de uma mutação da P53 nesta linha celular, dado o papel fulcral desta proteína supressora tumoral na apoptose. No entanto, estudos em cancro da próstata com défice de P53, revelaram que os níveis de apoptose após exposição a Bortezomibe se mantinham, sendo independentes da P53 (Adams, et al., 1999), o que realça a diversidade da resposta de diferentes cancros.

3.2. Avaliação da inibição do proteossoma

Tendo em consideração os resultados anteriores, foram realizados ensaios para averiguar o grau de inibição do proteossoma nas condições previamente referidas mas apenas para exposição de 48 horas, com a qual se tinham obtido resultados mais

significativos. Recorreu-se a um método indireto, a quantificação dos níveis citoplasmáticos de ubiquitina conjugada, por citometria de fluxo.

Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas quando se compararam os resultados obtidos entre as diferentes concentrações e a menor concentração de 1 nM de MG262, especialmente com as concentrações de 10 nM e 15 nM ($P < 0.01$). Comparando-se as concentrações de 1 nM e 5 nM, verificou-se que a percentagem de células com marcação duplicou ($P < 0.05$) e que houve um aumento de 2.5 vezes na intensidade média de fluorescência ($P < 0.01$). Para concentrações de MG262 superiores a 5 nM, os níveis de conjugados de ubiquitina não aumentaram significativamente (Figura 14).

Com base nestes resultados, verificamos que as concentrações de MG262 necessárias para obter perda significativa de viabilidade celular são superiores às necessárias para inibir o proteossoma, o que sugere o envolvimento de outros mecanismos, direta ou indiretamente induzidos pelo fármaco.

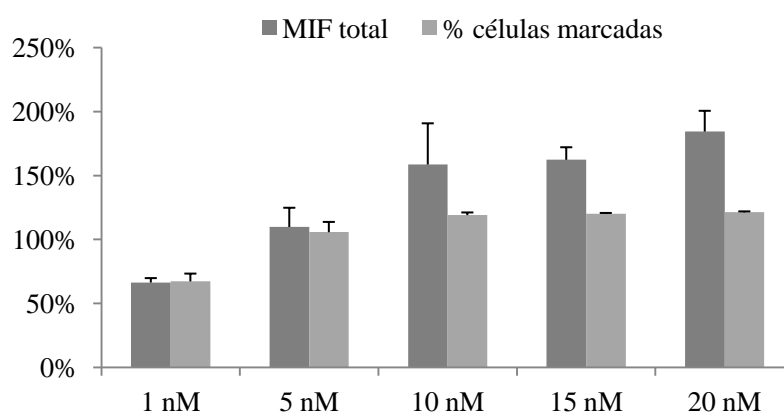


Figura 14 – Análise da inibição do proteossoma avaliada pela variação dos níveis citoplasmáticos de conjugados de ubiquitina. Os dados correspondem à razão entre células tratadas e não tratadas e foram obtidos a partir da média de três ensaios independentes. MIF - média de intensidade de fluorescência

3.3. Avaliação da activação da via NF- κ B

A via NF- κ B encontra-se tipicamente associada ao desenvolvimento e progressão tumorais, regulando a ativação de genes anti-apoptóticos e de genes envolvidos na progressão do ciclo celular, no crescimento celular e na angiogénese (Alvero, 2010).

Esta via foi extensivamente estudada no mieloma múltiplo, tendo a sua inativação sido proposta como o mecanismo de ação responsável pelo sucesso dos inibidores do proteossoma nesta patologia. Como anteriormente referido, o proteossoma degrada o I κ B, o inibidor citoplasmático do NF- κ B, pelo que seria de esperar que a inibição do proteossoma impedisse os efeitos carcinogénicos da ativação do NF- κ B. Este efeito, inicialmente descrito no mieloma múltiplo, não foi posteriormente confirmado quando se estudaram, *in vitro*, células malignas isoladas (Hideshima, et al., 2009). Aliás, verificou-se que, pelo contrário, ocorria ativação do NF- κ B nas células malignas e que a inativação só se verificava para as células do estroma da medula óssea.

Para verificar qual seria o efeito sobre a ativação do NF- κ B da exposição das células TOV-112D ao MG262, recorreu-se a citometria de fluxo e a marcação com um anticorpo que se liga à subunidade p65 da molécula de NF- κ B livre, ativada, constituinte da via NF- κ B canónica. Na Figura 15, está representado o efeito, às 48 horas de tratamento, de duas concentrações de MG262 (5 nM e 10 nM), para as quais se tinham anteriormente verificado inibições significativas do proteossoma, sem perdas excessivas da viabilidade celular. Pôde observar-se um aumento estatisticamente significativo do NF- κ B ativado, que ocorre de um modo dependente da concentração do inibidor do proteossoma ($P < 0.01$).

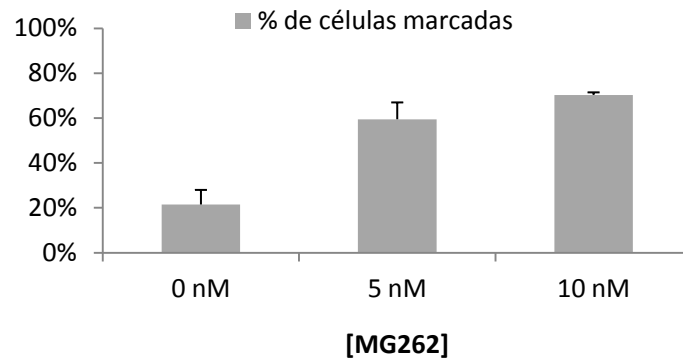


Figura 15 - Análise da ativação da via NF- κ B 48 h após exposição a diferentes concentrações de MG262. Os dados correspondem à média de três ensaios independentes; $P < 0.01$ em comparação com o controlo (0 nM).

Os resultados obtidos, tal como nas células do mieloma múltiplo, determinam um padrão de ativação da via NF- κ B, pelo que a morte celular induzida pelo MG262 aparentemente não é explicada pela inibição desta via de sinalização.

Foram descritos resultados semelhantes em outros tumores sólidos, nomeadamente no carcinoma endometrióide (Dolcet, et al., 2006) em que por exposição de linhas celulares e explantes primários a quatro inibidores do proteossoma (MG-132, ALLN, Epoxomicina e Bortezomibe) se verificou não só a ativação da via NF- κ B após fosforilação da subunidade p65 como também um aumento da transcrição de genes alvo da via.

Uma das consequências lógicas da inibição do proteossoma é a acumulação de proteínas oriundas de diversos processos celulares. No cancro do ovário verificou-se uma tendência para acumulação de proteínas ubiquitinadas, intrínseca à condição patológica (Bazzaro, et al., 2006). Esta acumulação de proteínas sobrecarrega o sistema ubiquitina-proteossoma, não obstante as células cancerígenas aumentarem o número de proteossomas funcionais como medida de compensação, e expõe as células a variações

das condições microambientais. Este estado de stresse e de dependência das células relativamente à função deste organelo pode explicar a indução da morte celular aquando da exposição a inibidores do proteossoma (Bazzaro, et al., 2006). O mecanismo de atuação destes fármacos seria inespecífico, o que explica a diversidade de alterações moleculares e de respostas celulares descritas.

Por outro lado, a interferência do inibidor do proteossoma com outras vias como a da família Bcl-2, pode também resultar em morte celular. Algumas das proteínas da família Bcl-2 são pro-apoptóticas e a sua degradação pelo proteossoma é usual em células cancerígenas, pelo que a inibição do proteossoma pode resultar na sua acumulação e conseqüente morte celular por apoptose. Efetivamente, Zhu e colaboradores (2005), num estudo de linhas celulares de cancro colorretal e de cancro do ovário, verificaram a acumulação de Bik/NBK, inibidor da proteína Bcl-2 e da Bcl-x_L com função pró-apoptótica. Contudo, nos nossos resultados, o tipo de morte celular predominante não é a apoptose, pelo que o mecanismo defendido por Bazzaro e colaboradores (2006), por falência inespecífica do sistema de proteólise celular, é mais provável.

3.4. Avaliação da ativação da via Wnt/ β -catenina

Um dos efeitos possíveis da inibição do proteossoma é a acumulação citoplasmática da β -catenina seguida da sua transmigração nuclear e ativação da transcrição dos genes alvo da via Wnt/ β -catenina. Para avaliar a ativação da β -catenina recorreremos a dois métodos: a quantificação da localização núcleo/citoplasma da β -catenina por imunofluorescência confocal e a quantificação da expressão de um dos genes alvo desta via, o CCND1, por qRT-PCR em tempo real.

Nas células não tratadas (apenas com exposição ao solvente DMSO) a β -catenina tinha uma localização preferencial no citoplasma e justa-membranar (Figura 16A). Após exposição ao MG262 o padrão alterou-se (Figura 16B).

Verificou-se um aumento progressivo da localização nuclear da β -catenina com a exposição a concentrações crescentes do fármaco (0 nM, 5 nM, 10 nM e 15 nM) durante 48 horas. Este aumento era estatisticamente significativo ($P < 0.001$) para as várias concentrações comparadas com o controlo e $P < 0.01$ quando se comparam os resultados obtidos com os 5 nM com os obtidos com as restantes concentrações) (Figura 17).

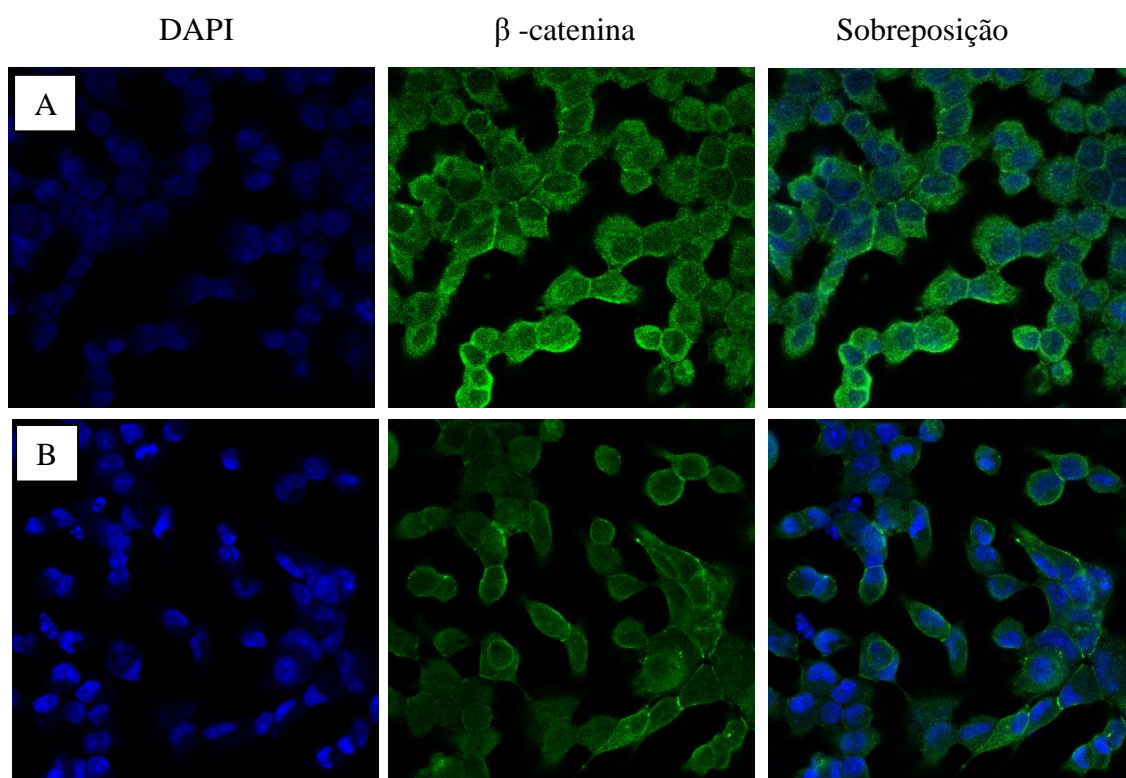


Figura 16 – Imunofluorescência confocal: localização celular da β -catenina; a fluorescência verde corresponde à β -catenina; o DAPI, com fluorescência azul, marca os núcleos (A) Controlo (0 nM de MG262). (B) 5 nM de MG262. Amplificação de 400x.

Quando comparada com outras linhas celulares de cancro do ovário, a linha TOV-112D, com uma mutação ativadora da β -catenina, apresenta desde logo um aumento basal da localização nuclear desta proteína (Wu, et al., 2001) que, segundo os nossos resultados, é potenciado pela exposição ao inibidor do proteossoma MG262.

O aumento da localização nuclear da β -catenina tem sido associado à ativação da via Wnt/ β -catenina em vários cancros. É o caso dos carcinomas endometrióides do ovário, por mutações do gene da β -catenina ou do cancro colorretal, por mutações da proteína APC ou da Axina. Nos dois casos, as proteínas mutadas impedem a estabilização citoplasmática do complexo β -catenina/APC/Axina/GSK3 β e a consequente degradação da β -catenina pelo proteossoma, favorecendo a sua transmigração nuclear (Moreno-Bueno, et al., 2001; van Veelen, et al., 2011).

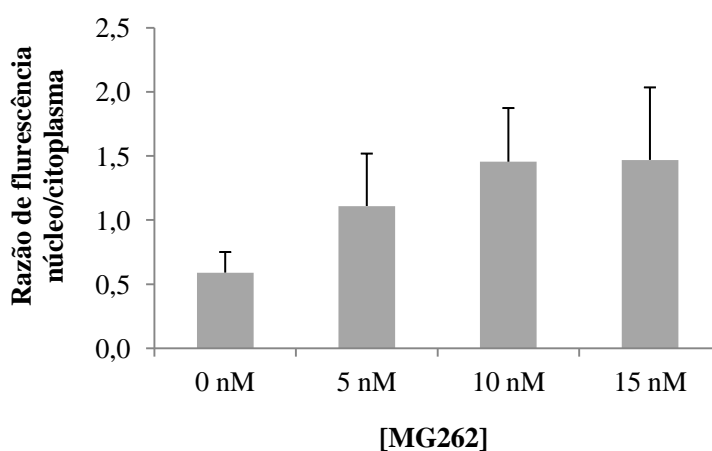


Figura 17 – Variação da localização núcleo/citoplasma da β -catenina. Os resultados correspondem à razão entre a fluorescência no núcleo e a fluorescência no citoplasma e estão representados como a média e desvio padrão obtidos da quantificação de 25 células para cada condição, com 3 medições por célula. As células foram expostas durante 48 horas a concentrações de MG262 de 0, 5, 10 e 15 nM.

Para verificar se a acumulação nuclear da β -catenina se associava a ativação da transcrição de genes alvo da via Wnt/ β -catenina, fomos estudar os níveis de expressão do gene *CCND1*, que codifica a ciclina D1, uma proteína essencial à progressão do ciclo celular. Estes dados foram obtidos por qRT-PCR em tempo real. O aumento dos níveis de expressão da ciclina D1 foi descrito no cancro do ovário e relacionados com a agressividade tumoral (Barbieri, et al., 1997; Barbieri, et al., 2004).

Os resultados obtidos após termos exposto as células durante 48 horas a diferentes concentrações de MG262, mostraram uma diminuição da expressão do gene da ciclina D1 (Figura 18), estatisticamente significativa para as concentrações de 10 e 15 nM ($P < 0.05$).

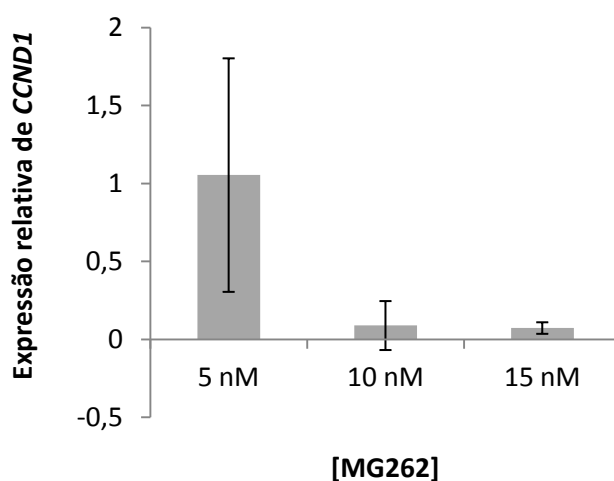


Figura 18 – Expressão relativa do mRNA do gene *CCND1*, após tratamento de 48 horas com diferentes concentrações de MG262. Os dados correspondem à média e erro padrão de valores obtidos em três experiências diferentes (3 réplicas por experiência). Como gene controlo usou-se o gene do RNA 18S. Os dados estão normalizados ao gene controlo e à condição 0 nM de MG262. A expressão do *CCND1* não sofreu alterações com a concentração de 5 nM. Para as concentrações de 10 nM e 15 nM ocorre uma diminuição estatisticamente significativa relativamente às células controlo (0 nM de MG262) ($P < 0.05$).

Estes resultados estão de acordo com os dados da viabilidade celular, mas mostram que a regulação da transcrição deste gene não depende só da presença nuclear da β -catenina. Pode haver um défice de outros fatores de transcrição, cuja ativação seja dependente da integridade funcional dos proteossomas, à semelhança do que ocorre por exemplo com o NF- κ B.

Outra explicação, prende-se com o facto conhecido de que a ativação dos genes alvo da via Wnt/ β -catenina exige que a β -catenina se ligue ao fator de transcrição TCF/LEF. A formação do complexo β -catenina/TCF/LEF pode ser impedida se ocorrer um aumento da expressão de ICAT, um conhecido inibidor da β -catenina e do TCF que bloqueia a ligação entre estas moléculas (Tago, et al., 2000) e pode promover a dissociação de complexos já formados (Daniels & Weis, 2002). De qualquer modo, o MG262, embora promova a transmigração nuclear da β -catenina, não induz a transcrição de um dos seus genes alvo, o *CCND1*.

3.5. Expressão dos genes *hTERT* e *SNAIL*

A ativação da telomerase é característica das células germinativas, de tecidos em constante renovação e de tumores malignos. Esta ativação é considerada crucial para o crescimento contínuo e progressão de células cancerígenas uma vez que lhes permite ultrapassar o limite de Hayflick (Wu, et al., 1999). A ativação da telomerase tem sido encontrada em tumores tão diferentes como os tumores de pele (Ueda, et al., 1997), da mama (Kirkpatrick, et al., 2003) e do ovário (Tantbirojn, et al., 2009). Está também associada à agressividade tumoral e à quimiorresistência (Ward & Autexier, 2005; Widschwendter, et al., 2004). A reativação da telomerase nas células cancerígenas está dependente da expressão do gene que codifica a sua subunidade catalítica, o gene

hTERT (Kim, et al., 1994). Para avaliar o efeito do MG262 sobre a expressão da *hTERT* nas células TOV-112D recorremos à técnica de qRT-PCR em tempo real.

A exposição a MG262 durante 48 horas não alterou a expressão da *hTERT* (Figura 19), exceto para a concentração mais elevada de 15 nM, para a qual se verificou uma significativa diminuição da expressão ($P < 0.05$). Pode concluir-se que o MG262 só altera a expressão da *hTERT* em concentrações muito elevadas, e que a transmigração nuclear da β -catenina não é suficiente para induzir a sua expressão.

A diminuição da expressão da ciclina D1 e da *hTERT* foi anteriormente observada num estudo de células de leucemia mielóide aguda tratadas com um inibidor das desacetilases das histonas (ácido valpróico) e o inibidor do proteossoma, o Bortezomibe (Nie, et al., 2012), e pode apenas ser um epifenómeno, secundário à perda da viabilidade celular.

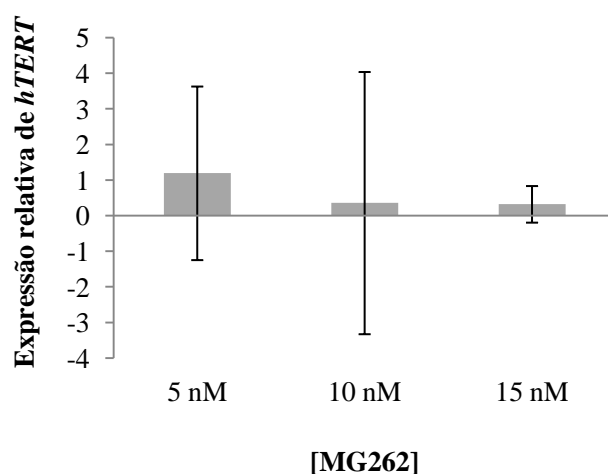


Figura 19 - Expressão relativa do mRNA do gene *hTERT*, após tratamento de 48 h com diferentes concentrações de MG262. Os dados correspondem à média e erro padrão de valores obtidos em três experiências diferentes (3 réplicas por experiência). Como gene controlo usou-se o gene do RNA18S. Os dados estão normalizados ao gene controlo e à condição 0 nM de MG262. A expressão do *hTERT* não sofreu alterações para as concentrações de 5 nM e 10 nM. Para a concentração de 15 nM ocorreu uma diminuição estatisticamente significativa relativamente às células não tratadas (0 nM de MG262) ($P < 0.05$).

O aumento de expressão do gene *SNAIL* associa-se ao fenótipo de transição epitélio-mesênquima (TEM), uma característica de células tumorais de maior agressividade e potencial metastático (Elloul, et al., 2005). A proteína SNAIL pertence a uma família de fatores de transcrição “em dedos de zinco” com um importante papel durante o desenvolvimento embrionário e que parece induzir o fenómeno de TEM em células tumorais. Durante a TEM, a expressão deste gene associa-se a perda de marcadores epiteliais, como a E-caderina, modificação da morfologia celular e expressão de marcadores mesenquimatosos, que conferem às células maior capacidade de invasão local e de metastização assim como resistência à apoptose (Vega, et al., 2004).

A quantificação da expressão do gene *SNAIL* foi realizada pela técnica de qRT-PCR em tempo real. A exposição a diferentes concentrações de MG262 durante 48 horas, não induziu qualquer diferença estatisticamente significativa na expressão do gene *SNAIL* (Figura 20).

No cancro da próstata, a exposição ao inibidor do proteossoma NPI-0052, associou-se a uma diminuição da expressão do *SNAIL* (Baritaki, et al., 2009). Os resultados que obtivemos podem dever-se a diferenças entre os dois tipos de células cancerígenas, mas também podem estar relacionados com os efeitos antagónicos induzidos pela ativação, que evidenciámos, quer da via do NF-kB quer da β -catenina, visto que ambas foram já associadas ao aumento da expressão do gene *SNAIL* (Baritaki, et al., 2009; Kim, et al., 2002; Thiery, 2002).

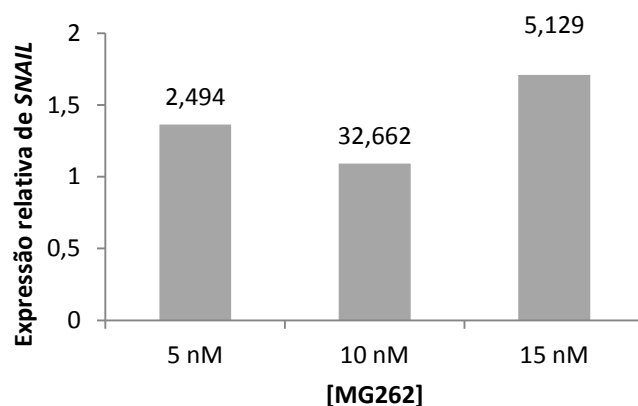


Figura 20 - Expressão relativa do mRNA do gene *SNAIL*, após tratamento de 48 horas com diferentes concentrações de MG262. Os dados correspondem à média e erro padrão de valores obtidos em três experiências diferentes (3 réplicas por experiência). Os valores do erro padrão para cada concentração estão representados sobre cada coluna, respectivamente. Como gene controlo usou-se o gene do RNA18S. Os dados estão normalizados ao gene controlo e à condição 0 nM de MG262. Não se verificaram alterações estatisticamente significativas.

3.6. Avaliação da migração celular

A perda de adesão celular e o aumento da capacidade de migração são características-chave das células cancerígenas. Para além das suas funções nas vias de transdução de sinal, a β -catenina participa ativamente na adesão celular. Ambas as funções estão frequentemente desreguladas no cancro. Em células embrionárias, a transmigração nuclear da β -catenina parece interferir com a adesividade celular (Howard, et al., 2011). Por outro lado, os inibidores dos proteossomas, ao alterarem quer o proteoma quer o transcriptoma celulares, podem, por interferência com outras vias, interferir com a mobilidade celular.

Para avaliar se o MG262 influenciava a mobilidade das células TOV-112D, realizámos dois tipos de ensaios: um ensaio *wound-healing* e um ensaio de migração em câmaras *transwell*.

O ensaio *wound-healing* avalia a capacidade das células se mobilizarem em superfície, precisamente uma característica das células de cancro de ovário que se verifica durante a sua disseminação peritoneal. Verificámos que a exposição da linha celular TOV-112D a 5 nM de MG262 induziu uma diminuição significativa da mobilidade celular ($P < 0.001$) (Figura 21).

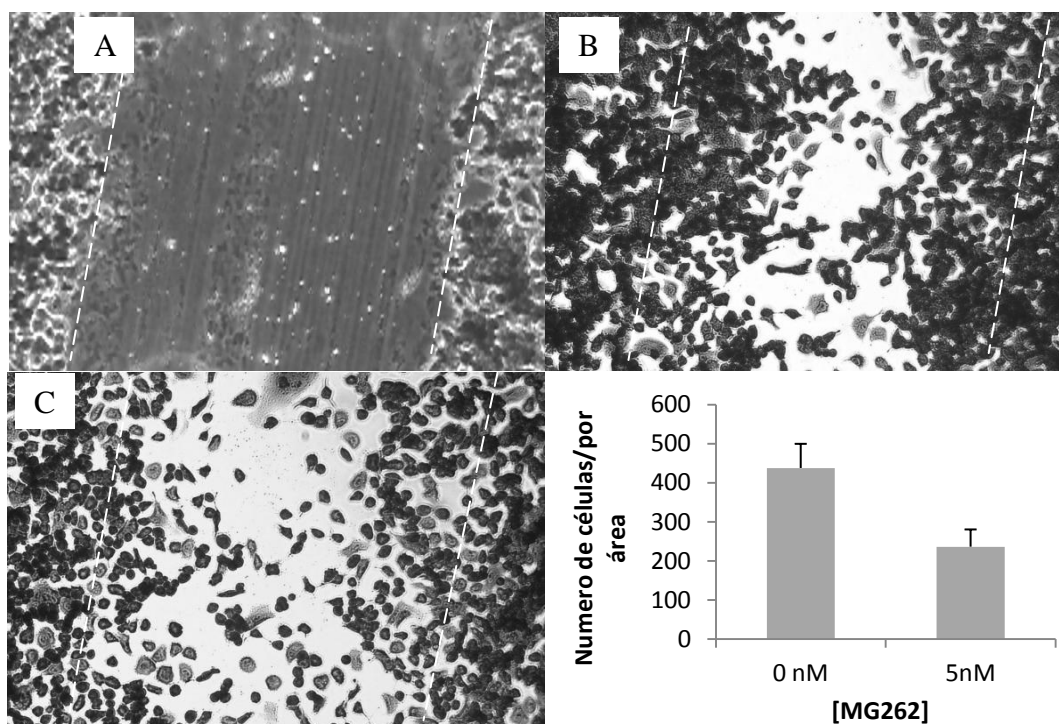


Figura 21 – Teste *wound-healing* para avaliar os efeitos do MG262 sobre a capacidade de migração da linha celular TOV-112D. As células foram expostas a 5 nM de MG262 durante 48 horas (A) Lesão inicial. (B) Controlo (0 nM de MG262). (C) 5 nM de MG262. Imagens de microscópio ótico invertido com ampliação de 100 x; as células foram fixadas e coradas com violeta de cristal (D) Número de células que migraram para a área considerada. Os resultados constituem a média \pm desvio padrão de 3 experiências diferentes para cada condição, com a contagem de 9 campos por experiência.

Utilizou-se a concentração mais baixa, de 5 nM, durante 48 horas, porque para esta concentração confirmou-se existirem níveis significativos de inibição do proteossoma e de perda da viabilidade celulares. Para concentrações mais elevadas, a diminuição excessiva da viabilidade celular impossibilitava a realização do teste. Por outro lado, concentrações mais elevadas correspondem a dosagens impossíveis de usar na prática clínica, devido aos efeitos secundários. Com um outro inibidor do proteossoma, o Bortezomibe, Lorch e colaboradores (2007), obtiveram resultados semelhantes com células de carcinoma espinhocelular.

Foi ainda avaliada a capacidade de migração através de câmaras *transwell*, correspondendo à migração vertical através de uma membrana porosa, facilitada por um gradiente de quimiotaxia, obtido pelo recurso a diferentes concentrações de SBF, menor na câmara de cultura e maior na câmara para onde as células migravam. Neste ensaio, verificou-se uma ligeira diminuição, não significativa, da migração das células expostas a 5 nM de MG262 (Figura 22).

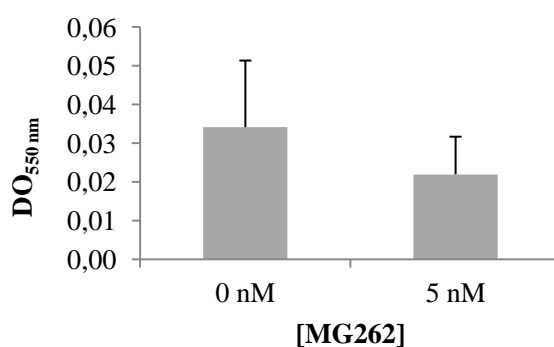


Figura 22 - Teste de migração em câmara *transwell* para avaliar os efeitos do MG262 sobre a capacidade de migração vertical da linha celular TOV-112D. As células foram expostas a 5 nM de MG262 durante 48 horas. Os resultados constituem a média \pm desvio padrão de 6 réplicas para cada condição, em que o valor de cada réplica constitui a média de duas medições. DO_{550nm} – Densidade óptica a 550 nM.

Foi ainda realizado um ensaio de invasão celular, também numa câmara *transwell*, mas em que a membrana através da qual as células migram foi coberta com uma camada de Matrigel, mimetizando a membrana basal. Curiosamente as células mostraram baixo potencial invasivo, mesmo sem exposição ao inibidor do proteossoma, impossibilitando a realização do ensaio. Esta característica de migração em superfície, mais do que em profundidade, é típica da disseminação peritoneal do cancro do ovário, e distingue-a de outros carcinomas, como o colorretal, que se caracteriza por uma metastização peritoneal que invade em profundidade a parede dos órgãos abdominais.

Conclui-se, assim, que em baixas concentrações, o MG262 pode diminuir a mobilidade de células do cancro do ovário, o que poderá ser uma mais valia em protocolos terapêuticos combinados.

Os resultados mostraram que num modelo celular de cancro do ovário com uma mutação inativadora da P53 e activação intrínseca da via Wnt/ β -catenina, o MG262 tem efeitos estatisticamente significativos sobre a redução da viabilidade e mobilidade celulares, mas de uma amplitude modesta para concentrações clinicamente úteis. O tipo de morte celular predominante não foi a apoptose, mas a necrose/apoptose tardia, menos vantajosa por estar frequentemente associada a maior reação inflamatória local. Contrariamente ao teoricamente esperado, a via do NF- κ B foi ativada e não inibida. Embora a linha celular já tivesse ativação intrínseca da via Wnt/ β -catenina, a exposição ao MG262 potenciou a transmigração nuclear celular da β -catenina. A ativação destas duas vias poderá estar relacionada com a deficiente indução da apoptose. A exposição ao inibidor do proteossoma não alterou os níveis de expressão da hTERT nem da proteína SNAIL. Embora se tenha verificado um aumento da localização nuclear da β -catenina, esta não foi acompanhada do aumento da expressão de um dos seus genes alvo, o gene da ciclina D1, o que poderá estar relacionado com a perda da viabilidade celular induzida pelo fármaco.

Verificou-se também que a inibição do proteossoma ocorria para uma baixa concentração do fármaco, atingindo-se um plateau, e que as respostas mais significativas em termos de perda da viabilidade celular exigiam concentrações superiores, sugerindo a dependência de outros mecanismos para além da inibição do proteossoma.

A relativa resistência da linha celular aos efeitos citotóxicos do MG262 poderá dever-se à interferência aleatória e inespecífica que a inibição do proteossoma tem sobre o metabolismo celular, mas outros mecanismos poderão estar envolvidos. Recentemente, a resistência secundária do mieloma múltiplo e de células leucémicas ao Bortezomibe foi atribuída a mutações no gene que codifica a subunidade β 5 do

proteossoma (Lü, et al., 2008; Oerlemans, et al., 2008). Faltam estudos sobre a frequência destas mutações noutros tumores, como os tumores sólidos, a maioria resistentes aos inibidores dos proteossomas.

Futuramente iremos verificar se em células de cancro do ovário sem ativação intrínseca da via Wnt/ β -catenina, a resposta aos inibidores dos proteossomas é diferente. Tentaremos também esclarecer qual o mecanismo subjacente à ativação da via do NF- κ B, e qual a consequência funcional da transmigração nuclear da β -catenina.

Referências Bibliográficas

- Adachi Y., Yamamoto H., Itoh F., Arimura Y., Nishi M., Endo T. & K. Imai (2001). Clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression at the invasive front in human colorectal cancers. *International Journal of Cancer*, 95(5): 290-294.
- Adams J., Behnke M., Chen S., Cruickshank A.A., Dick L.R., Grenier L., Klunder J.M., Ma Y.T., Plamondon L. & R.L. Stein. (1998). Potent and selective inhibitors of the proteasome: Dipeptidyl boronic acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 8(4): 333-338.
- Adams J., Palombella V.J., Sausville E.A., Johnson J., Destree A., Lazarus D.D., Maas J., Pien C.S., Prakash S. & P. J. Elliott (1999). Proteasome Inhibitors: A Novel Class of Potent and Effective Antitumor Agents. *Cancer Research*, 59: 2615-2622.
- Aghajanian C., Blessing J.A., Darcy K.M., Reid G., DeGeest K., Rubin S.C., Mannel R.S., Rotmensch J., Schilder R.J., Riordan W. & Gynecologic Oncology Group (2009). A phase II evaluation of bortezomib in the treatment of recurrent platinum-sensitive ovarian or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic Oncology*, 115(2): 215-20.
- Aghajanian C., Soignet S., Dizon D.S., Pien C.S., Adams J., Elliott P.J., Sabbatini P., Miller V., Hensley M.L., Pezzulli S., Canales C., Daud A. & D.R. Spriggs (2002). A Phase I Trial of the Novel Proteasome Inhibitor PS341 in Advanced Solid Tumor Malignancies. *Clinical Cancer Research*, 8: 2505–2511.
- Ai L., Tao Q., Zhong S., Fields C.R., Kim W.J., Lee M.W., Cui Y., Brown K.D. & R.D. Robertson (2006). Inactivation of Wnt inhibitory factor-1 (WIF1) expression by epigenetic silencing is a common event in breast cancer. *Carcinogenesis*, 27(7): 1341–1348.
- Almond J.B., Snowden R.T., Hunter A., Dinsdale D., Cain K. & G.M. Cohen (2001). Proteasome inhibitor-induced apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells involves cytochrome c release and caspase activation, accompanied by formation of an approximately 700 kDa Apaf-1 containing apoptosome complex. *Leukemia*, 15(9): 1388-1397.
- Alvero, A. (2010). Recent insights into the role of NF- κ B in ovarian carcinogenesis. *Genome Medicine*, 2(56).
- American Cancer Society (2011). *Cancer Facts & Figures 2011*, Atlanta: American Cancer Society.

- An W., Hwang S., Trepel J. & M. Blagosklonny (2000). Protease inhibitor-induced apoptosis: accumulation of wt p53, p21WAF1/CIP1, and induction of apoptosis are independent markers of proteasome inhibition. *Leukemia*, 14(7): 1276-1283.
- Barbieri F., Cagnoli M., Ragni N., Pedullà F., Foglia G. & A. Alama (1997). Expression of cyclin D1 correlates with malignancy in human ovarian tumours. *British Journal of Cancer*, 75(9): 1263-1268.
- Barbieri F., Lorenzi P., Ragni N., Schettini G., Bruzzo C., Pedullà F. & A. Alama (2004). Overexpression of cyclin D1 is associated with poor survival in epithelial ovarian cancer. *Oncology*, 66(4): 310-315.
- Baritaki S., Yeung K., Palladino M., Berenson J. & B. Bonavida (2009). Pivotal roles of snail inhibition and RKIP induction by the proteasome inhibitor NPI-0052 in tumor cell chemoimmunosensitization. *Cancer Research*, 69(21): 8376-8385.
- Barr P., Fisher R. & J. Friedberg (2007). The role of bortezomib in the treatment of lymphoma. *Cancer Investigation*, 25(8): 766-775.
- Bassères D. & A. Baldwin (2006) Nuclear factor- κ B and inhibitor of κ B kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene*, 25: 6817–6830.
- Bazzaro M., Lee M.K., Zoso A., Stirling W.L., Santillan A., Shih IeM. & R.B. Roden (2006). Ubiquitin-Proteasome System Stress Sensitizes Ovarian Cancer to Proteasome Inhibitor-Induced Apoptosis. *Cancer Research*, 66(7).
- Binnerts M.E., Kim K.A., Bright J.M., Patel S.M., Tran K., Zhou M., Leung J.M., Liu Y., Lomas W.E. 3rd, Dixon M., Hazell S.A., Wagle M., Nie W.S., Tomasevic N., Williams J., Zhan X., Levy M.D., Funk W.D. & a. Abo (2007). R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 104: 14700–14705.
- Blanco M.J., Moreno-Bueno G., Sarrío D., Locascio A., Cano A., Palacios J. & M.A. Nieto (2002). Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene*, 9 Maio, 21(20), pp. 3241-3246.
- Bold R., Virudachalam S. & D. McConkey (2001). Chemosensitization of Pancreatic Cancer by Inhibition of the 26S Proteasome. *Journal of Surgical Research*, 100: 11-17.
- Bourguignon L., Peyrollier K., Gilad E. & A. Brightman (2007). Hyaluronan-CD44 interaction with neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) promotes

- actin polymerization and ErbB2 activation leading to beta-catenin nuclear translocation, transcriptional up-regulation, and cell migration in ovarian tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(2): 1265-1280.
- Breckenridge D.G., Germain M., Mathai J.P., Nguyen M., Shore G.C. (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*, 22: 8608–8618.
- Bross P.F., Kane R., Farrell A.T., Abraham S., Benson K., Brower M.E., Bradley S., Gobburu J.V., Goheer A., Lee S.L., Leighton J., Liang C.Y., Lostritto R.T., McGuinn W.D., Morse D.E., Rahman A., Rosario L.A., Verbois S.L., Williams G., Wang Y.C. & R. Pazdur (2004). Approval Summary for Bortezomib for Injection in the Treatment of Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research*, 10: 3954 –3964.
- Byrom J. & Davies Q. (2003). Cancer of the ovary. *Current Obstetrics & Gynaecology*, 13: 88-94.
- Caldwell G.M., Jones C., Gensberg K., Jan S., Hardy R.G., Byrd P., Chughtai S., Wallis Y., Matthews G.M. & D.G. Morton (2004). The Wnt Antagonist sFRP1 in Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Research*, 64(3): 883-888.
- Campbell I.G., Russell S.E., Choong D.Y., Montgomery K.G., Ciavarella M.L., Hooi C.S., Cristiano B.E., Pearson R.B. & W.A. Phillips (2004). Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Research*, 64(21).
- Catasús L., Bussaglia E., Rodriguez I., Gallardo A., Pons C., Irving J.A. & Prat J. (2004). Molecular genetic alterations in endometrioid carcinomas of the ovary: similar frequency of beta-catenin abnormalities but lower rate of microsatellite instability and PTEN alterations than in uterine endometrioid carcinomas. *Human Pathology*, 35(11): 1360-1368.
- Christie M. & M. Oehler (2006). Molecular pathology of epithelial ovarian cancer. *Journal of the British Menopause Society*, 12(2): 57-63.
- Chu I., Hengst L. & J. Slingerland (2008). The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 8(4): 253-267.
- Ciechanover, A. (2005). Intracellular Protein Degradation: From a Vague Idea, through the Lysosome and the Ubiquitin–Proteasome System, and onto Human Diseases and Drug Targeting (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 44: 5944 – 5967.

- Crawford L., Walker B. & A. Irvine (2011). Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 5(2): 101–110.
- Curtin J. C. & M.V. Lorenzi (2010). Drug discovery approaches to target Wnt signaling in cancer stem cells. *Oncotarget*, 1: 563-566.
- Cusack J.C. Jr, Liu R., Houston M., Abendroth K., Elliott P.J., Adams J. & A.S. Baldwin Jr (2001). Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition. *Cancer Research*, 61(9): 3535-3540.
- Dahlmann, B. (2007). Role of proteasomes in disease. *BMC Biochemistry*, 8.
- Dang, C. (1999). c-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, 19(1): 1-11.
- Daniels, D. & W. Weis (2002). ICAT inhibits beta-catenin binding to Tcf/Lef-family transcription factors and the general coactivator p300 using independent structural modules. *Molecular Cell*, 3: 573-584.
- Delic J., Masdehors P., Omura S., Cosset J.M., Dumont J., Binet J.L. & H. Magdelénat (1998). The proteasome inhibitor lactacystin induces apoptosis and sensitizes chemo- and radioresistant human chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes to TNF-alpha-initiated apoptosis. *British Journal of Cancer*, 77(7): 1103-1007.
- Dolcet X., Llobet D., Encinas M., Pallares J., Cabero A., Schoenenberger J.A., Comella J.X. & X. Matias-Guiu (2006). Proteasome inhibitors induce death but activate NF-kappaB on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(31): 22118-22130.
- Elloul S., Elstrand M.B., Nesland J.M., Tropé C.G., Kvalheim G., Goldberg I., Reich R., Davidson B. (2005). Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer*, 103(8): 1631-1643.
- Esteller M., Silva J.M., Dominguez G., Bonilla F., Matias-Guiu X., Lerma E., Bussaglia E., Prat J., Harkes I.C., Repasky E.A., Gabrielson E., Schutte M., Baylin S.B. & J.G.Herman (2000). Promoter Hypermethylation and BRCA1 Inactivation in Sporadic Breast and Ovarian Tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(7): 564-569.
- Fan X.M., Wong B.C., Wang W.P., Zhou X.M., Cho C.H., Yuen S.T., Leung S.Y., Lin M.C., Kung H.F., Lam S.K. (2001). Inhibition of proteasome function induced apoptosis in gastric cancer. *International Journal of Cancer*, 93: 481–488.

- Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C. & D.M. Parkin (2010). GLOBOCAN 2008. [Online] Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp> [Acedido em 31 Janeiro 2012].
- Ferrandina G., Lauriola L., Zannoni G.F., Fagotti A., Fanfani F., Legge F., Maggiano N., Gessi M., Mancuso S., Ranelletti F.O. & G. Scambia (2002). Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is associated with chemotherapy resistance and outcome in ovarian cancer patients. *Annals of Oncology*, 8: 1205-1211.
- Foltz G., Yoon J.G., Lee H., Ma L., Tian Q., Hood L. & A. Madan (2010). Epigenetic Regulation of Wnt Pathway Antagonists in Human Glioblastoma Multiforme. *Genes & Cancer*, 1(1): 81-90.
- Frankel A., Man S., Elliott P., Adams J. & R.S. Kerbel (2000). Lack of Multicellular Drug Resistance Observed in Human Ovarian and Prostate Carcinoma Treated with the Proteasome Inhibitor PS-341. *Clinical Cancer Research*, 6: 3719–3728.
- Frankland-Searby S. & S. Bhaumik (2012). The 26S proteasome complex: An attractive target for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, Volume 1825, pp. 64-76.
- Frase H., Hudak J. & I. Lee (2006). Identification of the Proteasome Inhibitor MG262 as a Potent ATP-Dependent Inhibitor of the Salmonella enterica serovar Typhimurium Lon Protease. *Biochemistry*, 45(27): 8264-8274.
- Fukui T., Kondo M., Ito G., Maeda O., Sato N., Yoshioka H., Yokoi K., Ueda Y., Shimokata K. & Y. Sekido (2005). Transcriptional silencing of secreted frizzled related protein 1 (SFRP 1) by promoter hypermethylation in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, 24(41): 6323-6327.
- Gamallo C., Palacios J., Moreno G., Calvo de Mora J., Suárez A. & A. Armas (1999). Beta-Catenin Expression Pattern in Stage I and II Ovarian Carcinomas. *American Journal of Pathology*, 155(2).
- Gatcliffe T., Monk B., Planutis K. & R. Holcombe (2008). Wnt signaling in ovarian tumorigenesis. *International Journal of Gynecological Cancer*, 18(5): 954-962.
- Gemignani M.L., Schlaerth A.C., Bogomolny F., Barakat R.R., Lin O., Soslow R., Venkatraman E. & J. Boyd (2003). Role of KRAS and BRAF gene mutations in mucinous ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 90(2): 378-381.
- Gomperts B. D., Kramer I. M. & P.E. Tatham (2009). *Signal Transduction*. 2^a ed. Academic Press.

- Graham T., Clements W., Kimelman D. & W. Xu (2002). The crystal structure of beta-catenin/ICAT complex reveals the inhibitory mechanism of ICAT. *Molecular Cell*, 10: 563-571.
- Hanahan D. & R. Weinberg (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100: 57–70.
- Hankinson, S. et al., 1995. A prospective study of reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer. 15 Julho, 76(2), p. 284–290.
- Hankinson S.E., Colditz G.A., Hunter D.J., Willett W.C., Stampfer M.J., Rosner B., Hennekens C.H. & F.E. Speizer (1991). Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *The EMBO Journal*, 10: 555–562.
- Hennessy B. T., Coleman R. L. & M. Markman (2009). Ovarian cancer. *Lancet*, 374: 1371–1382.
- Herrinton L.J., Stanford J.L., Schwartz S.M. & N.S. Weiss (1994). Ovarian cancer incidence among Asian migrants to the United States and their descendants. *Journal of the National Cancer Institute*, 86(17): 1336-1339.
- Herrmann J.L., Briones F. Jr, Brisbay S., Logothetis C.J. & T.J. McDonnell (1998). Prostate carcinoma cell death resulting from inhibition of proteasome activity is independent of functional Bcl-2 and p53. *Oncogene*, 17: 2889-2899.
- Hershko A. & A. Ciechanover (1998). The Ubiquitin System. *Annual Review of Biochemistry*, 67: 425–479.
- He T.C., Sparks A.B., Rago C., Hermeking H., Zawel L., da Costa L.T., Morin P.J., Vogelstein B. & K.W. Kinzler (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, 281: 1509-1512.
- He X., Semenov M., Tamai K. & X. Zeng (2004). LDL receptor-related proteins 5 e 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*, 131: 1663-1677.
- Hideshima T., Chauhan D., Podar K., Schlossman R.L., Richardson P.& K.C. Anderson (2001). Novel therapies targeting the myeloma cell and its bone marrow microenvironment. *Seminars in Oncology*, 28(6): 607-612.
- Hideshima T., Ikeda H., Chauhan D., Okawa Y., Raje N., Podar K., Mitsiades C., Munshi N.C., Richardson P.G., Carrasco R.D.& K.C. Anderson (2009). Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood*, 114(5), pp. 1046-1052.

- Hideshima T., Mitsiades C., Akiyama M., Hayashi T., Chauhan D., Richardson P., Schlossman R., Podar K., Munshi N.C., Mitsiades N. & K.C. Anderson (2003). Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood*, 101(4): 1530-1534.
- Hideshima T., Richardson P., Chauhan D., Palombella V.J., Elliott P.J., Adams J. & K.C. Anderson (2001). The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Research*, 61(7): 3071-3076.
- Holschneider C. & J. Berek (2000). Ovarian Cancer: Epidemiology, Biology, and Prognostic Factors. *Seminars in Surgical Oncology*, 19: 3-10.
- Hovanes K., Li T.W., Munguia J.E., Truong T., Milovanovic T., Lawrence Marsh J., Holcombe R.F. & M.L. Waterman (2001). Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nature Genetics*, 28(1): 53-57.
- Howard S., Deroo T., Fujita Y. & N. Itasaki (2011). A Positive Role of Cadherin in Wnt/b-Catenin Signalling during Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE*, 6(8), p. e23899.
- Ii M., Yamamoto H., Adachi Y., Maruyama Y. & Y. Shinomura (2006). Role of Matrix Metalloproteinase-7 (Matrilysin) in Human Cancer Invasion, Apoptosis, Growth, and Angiogenesis. *Experimental Biology and Medicine*, 231(1): 20-27.
- Imajoh-Ohmi S., Kawaguchi T., Sugiyama S., Tanaka K., Omura S. & H. Kikuchi (1995). Lactacystin, a Specific Inhibitor of the Proteasome, Induces Apoptosis in Human Monoblast U937 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 207(3): 1070-1077.
- Irving J.A., Catasús L., Gallardo A., Bussaglia E., Romero M., Matias-Guiu X. & J. Prat (2005). Synchronous endometrioid carcinomas of the uterine corpus and ovary: alterations in the beta-catenin (CTNNB1) pathway are associated with independent primary tumors and favorable prognosis. *Human Pathology*, 36(6): 605-619.
- Jho E.H., Zhang T., Domon C., Joo C.K., Freund J.N. & F. Costantini (2002). Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 22(4): 1172-1183.
- Kalluri R. & R.A. Weinberg (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6): 1420–1428.

- Katsaros D., Theillet C., Zola P., Louason G., Sanfilippo B., Isaia E., Arisio R., Giardina G. & P. Sismondi (1995). Concurrent abnormal expression of erbB-2, myc and ras genes is associated with poor outcome of ovarian cancer patients. *Anticancer Research*, 15(4): 1501-1510.
- Kazanskaya O., Glinka A., del Barco Barrantes I., Stannek P., Niehrs C. & W. Wu (2004). R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Developmental Cell*, 7: 525-534.
- Kazi A., Lawrence H., Guida W.C., McLaughlin M.L., Springett G.M., Berndt N., Yip R.M. & S.M. Sebt (2009). Discovery of a novel proteasome inhibitor selective for cancer cells over non-transformed cells. *Cell Cycle*, 8(12): 1940-1951.
- Khan Z., Vijayakumar S., de la Torre T.V., Rotolo S. & A. Bafico (2007). Analysis of Endogenous LRP6 Function Reveals a Novel Feedback Mechanism by Which Wnt Negatively Regulates Its Receptor. *Molecular and Cellular Biology*, 27(20): 7291-7301.
- Kim A., Ueda Y., Naka T. & T. Enomoto (2012). Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 31(14).
- Kim K., Lu Z. & E. Hay (2002). Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biology International*, 26(5): 463-476.
- Kim, N. et al., 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 266(5193): 2011-2015.
- Kirkpatrick K.L., Clark G., Ghilchick M., Newbold R.F. & K. Mokbel (2003). hTERT mRNA expression correlates with telomerase activity in human breast cancer. *European Journal of Surgical Oncology*, 29(4): 321-326.
- Kisselev A. & A. Goldberg (2001). Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chemistry & Biology*, 8: 739-758.
- Klaus A. & W. Birchmeier (2008). Wnt signalling and its impact on developmental and cancer. *Nature Reviews*, Maio, 8: 387-398.
- Komiya K. & R. Habas (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2): 68-75.
- Lee C.M., Shvartsman H., Deavers M.T., Wang S.C., Xia W., Schmandt R., Bodurka D.C., Atkinson E.N., Malpica A., Gershenson D.M., Hung M.C. & K.H. Lu (2003) Wnt-signalling pathway in ovarian epithelial tumours: increased expression of β -catenin and GSK3 β . *Gynecologic Oncology*, 88(3): 363-368

- Liang C., Park A. & J. Guan (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2: 329 - 333.
- Lind D.S., Hochwald S.N., Malaty J., Rekkas S., Hebig P., Mishra G., Moldauer L.L., Copeland E.M. 3rd & S. Mackay (2001). Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. *Surger*, 130(2): 363-369.
- Li Y., Wei Z., Meng Y. & X. Ji (2005). β -catenin up-regulates the expression of cyclinD1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: Relationships with carcinogenesis and metastasis. *World Journal of Gastroenterology*, 11(14): 2117-2123.
- Logan C. & R. Nusse (2004). The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20: 781-810.
- Lü S., Yang J., Song X., Gong S., Zhou H., Guo L., Song N., Bao X., Chen P. & J. Wang (2008). Point mutation of the proteasome beta5 subunit gene is an important mechanism of bortezomib resistance in bortezomib-selected variants of Jurkat T cell lymphoblastic lymphoma/leukemia line. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326(2): 423-431.
- MacDonald B. T., Tamai K. & X. He (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms and diseases. *Developmental Cell*, 17.
- Machiels B.M., Henfling M.E., Gerards W.L., Broers J.L., Bloemendal H., Ramaekers F.C. & B. Schutte (1997). Detailed analysis of cell cycle kinetics upon proteasome inhibition. *Cytometry*, 28: 243–252.
- Mani A. & E.P. Gelmann (2005). The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Its Role in Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23(21).
- Marsit C.J., Karagas M.R., Andrew A., Liu M., Danaee H., Schned A.R., Nelson H.H. & K.T. Kelsey (2005). Epigenetic Inactivation of SFRP Genes and TP53 Alteration Act Jointly as Markers of Invasive Bladder Cancer. *Cancer Research*, 65(16): 7081-7085.
- Martinelli G., Tosi P., Ottaviani E., Soverini S. & S. Tura. 2001. Molecular therapy for multiple myeloma. *Haematologica*, 86(9).
- Masdehors P., Merle-Béral H., Maloum K., Omura S., Magdelénat H. & J. Delic (2000). Deregulation of the ubiquitin system and p53 proteolysis modify the apoptotic response in B-CLL lymphocytes. *Blood*, 96(1): 269-274.

- McGuire W.P., Hoskins W.J., Brady M.F., Kucera P.R., Partridge E.E., Look K.Y., Clarke-Pearson D.L. & M. Davidson (1996). Cyclophosphamide and Cisplatin Compared with Paclitaxel and Cisplatin in Patients with Stage III and Stage IV Ovarian Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 334: 1-6.
- Mimnaugh E.G., Yunmbam M.K., Li Q., Bonvini P., Hwang S.G., Trepel J., Reed E. & L. Neckers (2000). Prevention of cisplatin–DNA adduct repair and potentiation of cisplatin-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells by proteasome inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 60(9): 1343–1354.
- Mingchao, Devereux T.R., Stockton P., Sun K., Sills R.C., Clayton N., Portier M., Flake G. (2001). Loss of E-cadherin expression in gastric intestinal metaplasia and later stage p53 altered expression in gastric carcinogenesis. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 53(4): 237-246.
- Mittal S. & S. Ganesh (2010). Protein quality control mechanisms and neurodegenerative disorders: Checks, balances and deadlocks. *Neuroscience Research*, 68: 159-166.
- Moon R., Kohn A., De Ferrari D. & A. Kaykas (2004). Wnt and β -catenin Signalling: Diseases and Therapies. *Nature Reviews*, 5: 689-699.
- Moore B., Eustáquio A. & R. McGlinchey (2008). Advances in and applications of proteasome inhibitors. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12: 434-440.
- Moreno-Bueno G., Gamallo C., Pérez-Gallego L., de Mora J.C., Suárez A. & J. Palacios (2001). beta-Catenin expression pattern, beta-catenin gene mutations, and microsatellite instability in endometrioid ovarian carcinomas and synchronous endometrial carcinomas. *Diagnostic Molecular Pathology*, 10(2): 116-122.
- Morgillo F., D'Aiuto E., Troiani T., Martinelli E., Cascone T., De Palma R., Orditura M., De Vita F. & F. Ciardiello (2011). Antitumor activity of bortezomib in human cancer cells with acquired resistance to anti-epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Lung cancer*, 71(3): 283-290.
- Motegi A., Murakawa Y. & S. Takeda (2009). The vital link between the ubiquitin–proteasome pathway and DNA repair: Impact on cancer therapy. *Cancer Letters*, 283: 1-9.
- Müller H., Samanta R. & E. Wieschaus (1999). Wingless signaling in the *Drosophila* embryo: zygotic requirements and the role of the frizzled genes. *Development*, 126(3): 577-586.

- Nam J.S., Turcotte T.J., Smith P.F., Choi S. & J.K. Yoon (2006). Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 13247-13257.
- Nawrocki S.T., Carew J.S., Pino M.S., Highshaw R.A., Dunner K. Jr, Huang P., Abbruzzese J.L. & D.J. McConkey (2005). Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Cancer research*, 65(24): 11658-11666.
- Nie D., Huang K., Yin S., Li Y., Xie S., Ma L., Wang X., Wu Y. & J. Xiao (2012). Synergistic/additive interaction of valproic acid with bortezomib on proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Leukemia & Lymphoma*.
- Núñez F., Bravo S., Cruzat F., Montecino M. & G.V. De Ferrari (2011). Wnt/ β -catenin signaling enhances cyclooxygenase-2 (COX2) transcriptional activity in gastric cancer cells. *PLoS ONE*, 6(4).
- Nusse R. & X. Lim (2010). Wnt Target Genes. [Online] Disponível em: <http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/> [Acedido em 10 Março 2012].
- Obata K., Morland S.J., Watson R.H., Hitchcock A., Chenevix-Trench G., Thomas E.J. & I.G. Campbell. (1998). Frequent PTEN/MMAC Mutations in Endometrioid but not Serous or Mucinous Epithelial Ovarian Tumors. *Cancer Research*, 58: 2095-2097.
- Obeng E.A., Carlson L.M., Gutman D.M., Harrington W.J. Jr, Lee K.P. & L.H. Boise (2006). Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*, 107(12): 4907-4916.
- Oerlemans R., Franke N.E., Assaraf Y.G., Cloos J., van Zantwijk I., Berkers C.R., Scheffer G.L., Debipersad K., Vojtekova K., Lemos C., van der Heijden J.W., Ylstra B., Peters G.J., Kaspers G.L., Dijkmans B.A., Scheper R.J. & G. Jansen (2008). Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit β 5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood*, 112(6): 2489-2499.
- Oikawa T., Sasaki T., Nakamura M., Shimamura M., Tanahashi N., Omura S. & T. Tanaka (1998). The proteasome is involved in angiogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 246: 443-448.

- Orlowski R. (1999). The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 6: 303–313.
- Oyaizu H., Adachi Y., Okumura T., Okigaki M., Oyaizu N., Taketani S., Ikebukuro K., Fukuhara S. & S. Ikehara (2001). Proteasome inhibitor 1 enhances paclitaxel-induced apoptosis in human lung adenocarcinoma cell line. *Oncology Reports*, 8(4): 825-829.
- Pajonk F. & W. McBride (2001). The Proteasome in Cancer Biology and Treatment. *Radiation Research*, 156(5): 447-459.
- Palacios J. & C. Gamallo (1998). Mutations in the β -Catenin Gene (CTNNB1) in Endometrioid Ovarian Carcinomas. *Cancer Research*, 58(7): 1344-1347.
- Pal T., Permuth-Wey J. & T. Sellers (2008). A review of the clinical relevance of mismatch-repair deficiency in ovarian cancer. *Cancer*, 113(4): 733-742.
- Papandreou C.N., Daliani D.D., Nix D., Yang H., Madden T., Wang X., Pien C.S., Millikan R.E., Tu S.M., Pagliaro L., Kim J., Adams J., Elliott P., Esseltine D., Petrusich A., Dieringer P., Perez C. & C.J. Logothetis (2004). Phase I Trial of the Proteasome Inhibitor Bortezomib in Patients With Advanced Solid Tumors With Observations in Androgen-Independent Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22(11), 2108-2121.
- Parkin D.M., Whelan S.L., Ferlay J., Teppo L. & D.B. Thomas (2002). *Cancer incidence in five continents*. Lyon: IARC Press.
- Permuth-Wey J. & T.A. Sellers (2009). Epidemiology of Ovarian Cancer. *Methods in Molecular Biology*, 472(II): 413-437.
- Pickart C. & R. Cohen (2004). Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5: 177–187.
- Prasad C.P., Mirza S., Sharma G., Prashad R., DattaGupta S., Rath G. & R. Ralhan (2008). Epigenetic alterations of CDH1 and APC genes: relationship with activation of Wnt/beta-catenin pathway in invasive ductal carcinoma of breast. *Life Sciences*, 83(9-10): 318-325.
- Purdie D.M., Bain C.J., Webb P.M., Whiteman D.C., Pirozzo S. & A.C. Green (2001). Body size and ovarian cancer: case-control study and systematic review (Australia). *Cancer Causes & Control*, 12: 855-863.
- Qiang Y.W., Shaughnessy J. D. & S. Yaccoby (2008). Wnt3a signaling within bone inhibits multiple myeloma bone disease and tumor growth. *Blood*, 112(2).

- Renaud S., Loukinov D., Abdullaev Z., Guilleret I., Bosman F.T., Lobanenkov V. & J. Benhattar (2007). Dual role of DNA methylation inside and outside of CTCF-binding regions in the transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene. *Nucleic Acids Research*, 35(4): 1245-1256.
- Richardson P.G., Barlogie B., Berenson J., Singhal S., Jagannath S., Irwin D., Rajkumar S.V., Srkalovic G., Alsina M., Alexanian R., Siegel D., Orłowski R.Z., Kuter D., Limentani S.A., Lee S., Hideshima T., Esseltine D.L., Kauffman M., Adams J., Schenkein D.P. & K.C. Anderson (2003). A Phase 2 Study of Bortezomib in Relapsed, Refractory Myeloma. *The New England Journal of Medicine*, 348(26).
- Roccaro A.M., Hideshima T., Raje N., Kumar S., Ishitsuka K., Yasui H., Shiraishi N., Ribatti D., Nico B., Vacca A., Dammacco F., Richardson P.G. & K.C. Anderson (2006). Bortezomib Mediates Antiangiogenesis in Multiple Myeloma via Direct and Indirect Effects on Endothelial Cells. *Cancer Research*, 66(1): 184-191.
- Rodriguez C., Calle E.E., Fakhrabadi-Shokoochi D., Jacobs E.J. & M.J. Thun (2002). Body mass index, height, and the risk of ovarian cancer mortality in a prospective cohort of postmenopausal women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 11(9): 822-828.
- Roose J., Huls G., van Beest M., Moerer P., van der Horn K., Goldschmeding R., Logtenberg T. & H. Clevers (1999). Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science*, 285(5435): 1923-1926.
- Rosen D.G., Zhang Z., Chang B., Wang X., Lin E. & J. Liu (2010). Low membranous expression of beta-catenin and high mitotic count predict poor prognosis in endometrioid carcinoma of the ovary. *Modern Pathology*, 23(1): 113-122.
- Ross J.S., Yang F., Kallakury B.V., Sheehan C.E., Ambros R.A. & P.J. Muraca (1999). HER-2/neu oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization in epithelial tumors of the ovary. *American Journal of Clinical Pathology*, 111(3): 311-316.
- Ruiz S., Krupnik Y., Keating M., Chandra J., Palladino M. & D. McConkey (2006). The proteasome inhibitor NPI-0052 is a more effective inducer of apoptosis than bortezomib in lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(7): 1836-1843.

- Saegusa M. & I. Okayasu (2001). Frequent nuclear β -catenin accumulation and associated mutations in endometrioid-type endometrial and ovarian carcinomas with squamous differentiation. *Journal of Pathology*, 194: 59–67.
- Salahshor S. & J. Woodgett (2005). The links between axin and carcinogenesis. *Journal of Clinical Pathology*, 58: 225–236.
- Schmalfeldt B., Burges A. & P. Harter (2009). "Targeted therapy" des Ovariakarzinoms. *Der Gynäkologe*, 42(3): 179–184.
- Seara.com, 2009. [Online] Disponível em: <http://www.ligacontracancro.pt> [Acedido em 9 Janeiro 2011].
- Seitz S., Rohde K., Bender E., Nothnagel A., Kölbl K., Schlag P.M. & S. Scherneck (1997). Strong indication for a breast cancer susceptibility gene on chromosome 8p12-p22: linkage analysis in German breast cancer families. *Oncogene*, 14(6): 741-743.
- Shah S.A., Potter M.W., McDade T.P., Ricciardi R., Perugini R.A., Elliott P.J., Adams J. & M.P. Callery (2001). 26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, Volume 82, p. 110–122.
- Sherr C. (2002). D1 in G2. *Cell Cycle*, 1: 36-38.
- Shinohara K., Tomioka M., Nakano H., Toné S., Ito H. & S. Kawashima (1996). Apoptosis induction resulting from proteasome inhibition. *The Biochemical Journal*, 317: 285-288.
- Silva D. & R. Srivastava (2007). Regulation of NF-kB Function - Target for Drug Development. In: R. Srivastava, ed. *Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases: Molecular Mechanisms*. Totowa(New Jersey): Humana Press Inc. : 239-261.
- Singer G., Oldt R. 3rd, Cohen Y., Wang B.G., Sidransky D., Kurman R.J. & IeM. Shih (2003). Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(6): 484-486.
- Sociedade Portuguesa de Ginecologia, 2010. *Cancro ginecológico - Consensos Nacionais 2011*. Coimbra : 24-37.
- Soslow R.A., Dannenberg A.J., Rush D., Woerner B.M., Khan K.N., Masferrer J. & A.T. Koki (2000). COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer*, 89(12): 2637-2645.

- Spataro V., Norbury C. & A. Harris (1998). The ubiquitin-proteasome pathway in cancer. *British Journal of Cancer*, 77(3): 448-455.
- Suh K. & A. Goy (2008). Bortezomib in mantle cell lymphoma. *Future Oncology*, 4(2): 149-168.
- Su L., Voglestein B. & K. Kinzler (1993). Association of the APC Tumor Suppressor Protein with Catenins. *Science*, 262: 1734-1737.
- Tago K., Nakamura T., Nishita M., Hyodo J., Nagai S., Murata Y., Adachi S., Ohwada S., Morishita Y., Shibuya H. & T. Akiyama (2000). Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. *Genes & Development*, 14: 1741-1749.
- Takada T., Yagi Y., Maekita T., Imura M., Nakagawa S., Tsao S.W., Miyamoto K., Yoshino O., Yasugi T., Taketani Y. & T. Ushijima (2004). Methylation-associated silencing of the Wnt antagonist SFRP1 gene in human ovarian cancers. *Cancer Science*, 95(9): 741-744.
- Takemaru K., Yamaguchi S., Lee Y.S., Zhang Y., Carthew R.W. & R.T. Moon (2003). Chibby, a nuclear beta-catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway. *Nature*, 422: 905-909.
- Tanimoto H., Underwood L.J., Shigemasa K., Parmley T.H., Wang Y., Yan Y., Clarke J. & T.J. O'Brien (1999). The matrix metalloprotease pump-1 (MMP-7, Matrilysin): A candidate marker/target for ovarian cancer detection and treatment. *Tumor Biology*, 20(2): 88-98.
- Tantbirojn P., Triratanachat S., Trivijitsilp P. & S. Niruthisard (2009). Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Expression in Borderline Ovarian Tumors: An Immunohistochemical Study. *Journal of The Medical Association of Thailand*, 92(3): 308-314.
- Taylor-Harding B., Agadjanian H., Nassanian H., Kwon S., Guo X., Miller C., Karlan B.Y., Orsulic S. & C.S. Walsh (2012). Indole-3-carbinol synergistically sensitises ovarian cancer cells to bortezomib treatment. *British Journal of Cancer*, 106: 333 – 343.
- Thiery J. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6): 442-454.
- Thorstensen L. & Lothe R. (2003). The WNT Signaling Pathway and Its Role in Human Solid Tumors. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 7(2): 146-161.

- Traenckner E., Wilk S. & P. Baeuerle (1994). A proteasome inhibitor prevents activation of NF- κ B and stabilizes a newly phosphorylated form of I κ B-alpha that is still bound to NF- κ B. *The EMBO Journal*, 3(22): 5433-5441.
- Ueda M., Ouhtit A., Bito T., Nakazawa K., Lübbe J., Ichihashi M., Yamasaki H. & H. Nakazawa (1997). Evidence for UV-associated activation of telomerase in human skin. *Cancer Research*, 57(3): 370-374.
- van de Wetering M., Sancho E., Verweij C., de Lau W., Oving I., Hurlstone A., van der Horn K., Batlle E., Coudreuse D., Haramis A.P., Tjon-Pon-Fong M., Moerer P., van den Born M., Soete G., Pals S., Eilers M., Medema R. & H. Clevers (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*, 111(2): 241-250.
- van Veelen W., Le N.H., Helvensteijn W., Blonden L., Theeuwes M., Bakker E.R., Franken P.F., van Gorp L., Meijlink F., van der Valk M.A., Kuipers E.J., Fodde R. & R. Smits (2011). Beta-catenin tyrosine 654 phosphorylation increases Wnt signalling and intestinal tumorigenesis. *Gut*, 60(9): 1204-1212.
- Veeck J., Niederacher D., An H., Klopocki E., Wiesmann F., Betz B., Galm O., Camara O., Dürst M., Kristiansen G., Huszka C., Knüchel R. & E. Dahl (2006). Aberrant methylation of the Wnt antagonist SFRP1 in breast cancer is associated with unfavourable prognosis. *Oncogene*, 25: 3479–348.
- Vega S., Morales A.V., Ocaña O.H., Valdés F., Fabregat I. & M.A. Nieto (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes & Development*, 18(10): 1131-1143.
- Voorhees P. & R. Orłowski (2006). The proteasome and the proteasome inhibitors in cancer therapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46: 189–213.
- Wander S., Zhao D. & J. Slingerland (2011). p27: A Barometer of Signaling Deregulation and Potential Predictor. *Clinical Cancer Research*, 17: 12-18.
- Wang J., Zhou D., He X., Wang Y., Hu W., Jiang L. & J. Dou (2011). Effect of downregulated β -catenin on cell proliferative activity, the sensitivity to chemotherapy drug and tumorigenicity of ovarian cancer cells. *Cellular and molecular biology*, 57.
- Wang W.X., Kong B.H., Li P., Song K., Qu X., Cui B.X., Jiang J., Zhang Y.Z. & X.S. Yang (2008). Effect of extracellular signal regulated kinase signal pathway

- on apoptosis induced by MG262 in ovarian cancer cells. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi - Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 43(9): 690-694.
- Ward R. & C. Autexier (2005). Pharmacological Telomerase Inhibition Can Sensitize Drug-Resistant and Drug-Sensitive Cells to Chemotherapeutic Treatment. *Molecular Pharmacology*, 68: 779-786.
- Wei Q., Yokota C., Semenov M.V., Doble B., Woodgett J. & X. He (2007). R-spondin1 is a high affinity ligand for LRP6 and induces LRP6 phosphosphorylation and beta-catenin signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 15903-15911.
- Wheeler J.M., Kim H.C., Efstathiou J.A., Ilyas M., Mortensen N.J. & W.F. Bodmer (2001). Hypermethylation of the promoter region of the E-cadherin gene (CDH1) in sporadic and ulcerative colitis associated colorectal cancer. *Gut*, Março, 48(3), pp. 367-371.
- Widschwendter A., Müller H.M., Hubalek M.M., Wiedemair A., Fiegl H., Goebel G., Mueller-Holzner E., Marth C. & M. Widschwendter (2004). Methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase in ovarian and cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 93(2): 407-416.
- Williams S. & D. McConkey (2003). The proteasome inhibitor bortezomib stabilizes a novel active form of p53 in human LNCaP-Pro5 prostate cancer cells. *Cancer Research*, 63(21): 7338 –7344.
- Willner J., Wurz K., Allison K.H., Galic V., Garcia R.L., Goff B.A. & E.M. Swisher (2007). Alternate molecular genetic pathways in ovarian carcinomas of common histological types. *Human Pathology*, 38(4): 607-613.
- Wu A., Ichihashi M. & M. Ueda (1999). Correlation of the Expression of Human Telomerase Subunits with Telomerase Activity in Normal Skin and Skin Tumors. *Cancer*, 86(10): 2038-2044.
- Wu R., Zhai Y., Fearon E. & K.Cho (2001). Diverse Mechanisms of b-Catenin Deregulation in Ovarian Endometrioid Adenocarcinomas. *Cancer Research*, 61: 8247–8255.
- Xu Q., Wang Y., Dabdoub A., Smallwood P.M., Williams J., Woods C., Kelley M.W., Jiang L., Tasman W., Zhang K. & J. Nathans (2004). Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell*, 116: 883-895.
- Yamamoto H., Adachi Y., Itoh F., Iku S., Matsuno K., Kusano M., Arimura Y., Endo T., Hinoda Y., Hosokawa M. & K. Imai (1999). Association of Matrilysin

- Expression with Recurrence and Poor Prognosis in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research*, 59(14).
- Yamamoto H., Itoh F., Adachi Y., Sakamoto H., Adachi M., Hinoda Y. & K. Imai (1997). Relation of enhanced secretion of active matrix metalloproteinases with tumor spread in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 114(4): 1290-1296.
- Yamamoto H., Itoh F., Iku S., Adachi Y., Fukushima H., Sasaki S., Mukaiya M., Hirata K. & K. Imai (2001). Expression of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Human Pancreatic Adenocarcinomas: Clinicopathologic and Prognostic Significance of Matrilysin Expression. *Journal of Clinical Oncology*, 19(4): 1118-1127.
- Zhai Y., Wu R., Schwartz D.R., Darrah D., Reed H., Kolligs F.T., Nieman M.T., Fearon E.R. & K.R. Cho (2002). Role of beta-Catenin/T-Cell Factor-Regulated Genes in Ovarian Endometrioid Adenocarcinomas. *American Journal of Pathology*, 160(4): 1229-1238.
- Zhu H., Zhang L., Dong F., Guo W., Wu S., Teraishi F., Davis J.J., Chiao P.J. & B. Fang (2005). Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by bortezomib (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors. *Oncogene*, 24(31): 4993-4999.
- Zhu W., Shiojima I., Ito Y., Li Z., Ikeda H., Yoshida M., Naito A.T., Nishi J., Ueno H., Umezawa A., Minamino T., Nagai T., Kikuchi A., Asashima M. & I. Komuro (2008). IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature*, 454: 245-249.

Anexo I – Relatórios gerados pelo programa REST 2009 para comparação das diferenças entre a exposição a várias concentrações de MG262 para os genes *CCND1*, *hTERT*, *SNAIL*

Relatório REST para comparação entre concentração 0 nM e 5 nM de MG262

Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
18S	REF	0,916	1,000				
CCND1	TRG	1,0	1,054	0,763 - 1,512	0,615 - 1,974	0,651	
hTERT	TRG	0,974	1,195	0,462 - 2,900	0,228 - 5,683	0,546	
SNAIL	TRG	1,0	1,363	0,405 - 2,899	0,314 - 5,636	0,333	

Legend:

P(H1) - Probability of alternate hypothesis that difference between sample and control groups is due only to chance.

TRG - Target

REF - Reference

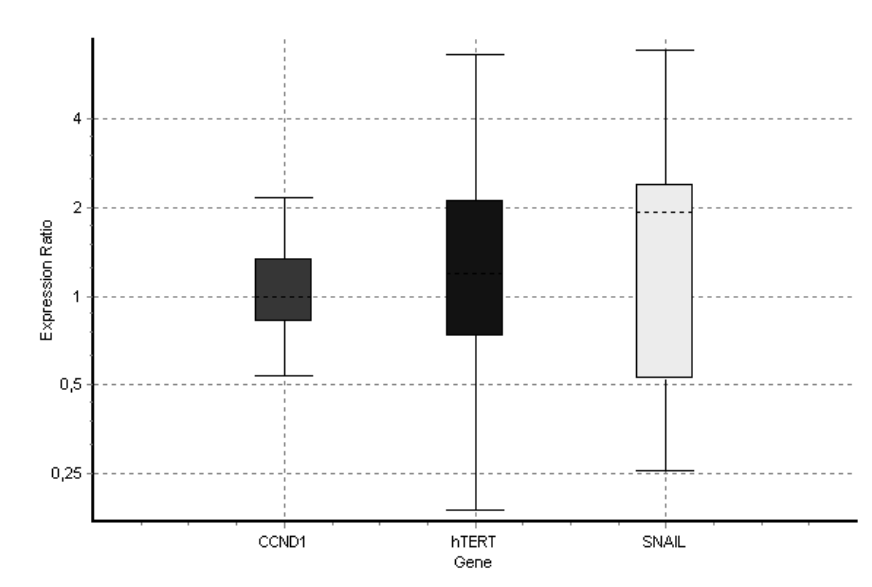
Interpretation

CCND1 sample group is not different to control group. $P(H1)=0,651$

hTERT sample group is not different to control group. $P(H1)=0,546$

SNAIL sample group is not different to control group. $P(H1)=0,333$

Boxplot



Boxes represent the interquartile range, or the middle 50% of observations. The dotted line represents the median gene expression. Whiskers represent the minimum and maximum observations.

Relatório REST para comparação entre concentração 0 nM e 10 nM de MG262

Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
18S	REF	0,916	1,000				
CCND1	TRG	1,0	0,089	0,028 - 0,185	0,022 - 0,243	0,000	DOWN
hTERT	TRG	0,974	0,358	0,067 - 3,750	0,038 - 4,734	0,077	
SNAIL	TRG	1,0	1,091	0,126 - 32,788	0,040 - 48,839	0,902	

Legend:

P(H1) - Probability of alternate hypothesis that difference between sample and control groups is due only to chance.

TRG - Target

REF - Reference

Interpretation

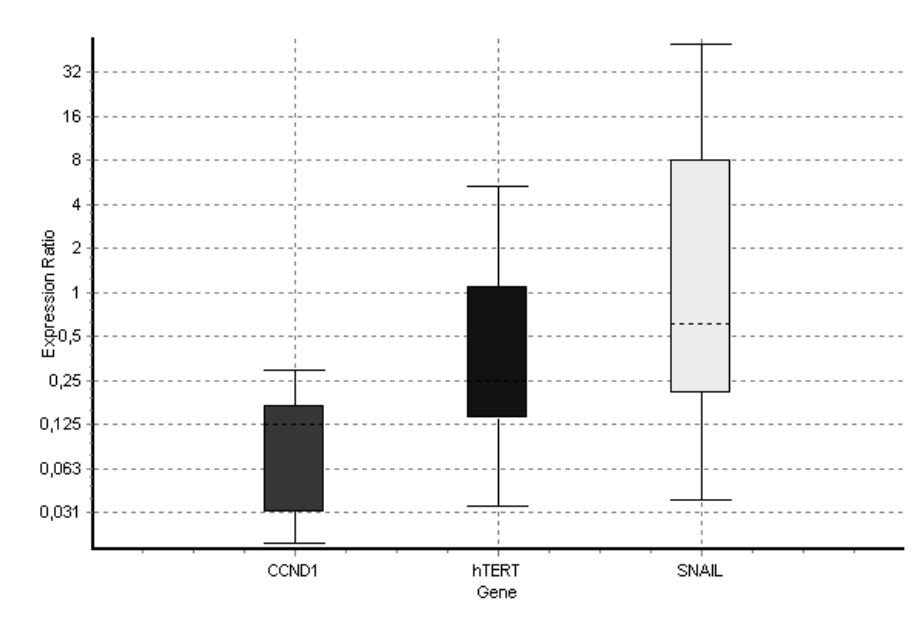
CCND1 is DOWN-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 0,089 (S.E. range is 0,028 - 0,185).

CCND1 sample group is different to control group. $P(H1)=0,000$

hTERT sample group is not different to control group. $P(H1)=0,077$

SNAIL sample group is not different to control group. $P(H1)=0,902$

Boxplot



Boxes represent the interquartile range, or the middle 50% of observations. The dotted line represents the median gene expression. Whiskers represent the minimum and maximum observations.

Relatório REST para comparação entre concentração 0 nM e 15 nM de MG262

Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
18S	REF	0,916	1,000				
CCND1	TRG	1,0	0,073	0,056 - 0,093	0,048 - 0,118	0,000	DOWN
hTERT	TRG	0,974	0,323	0,132 - 0,646	0,090 - 0,760	0,000	DOWN
SNAIL	TRG	1,0	1,709	0,532 - 5,661	0,237 - 8,568	0,159	

Legend:

P(H1) - Probability of alternate hypothesis that difference between sample and control groups is due only to chance.

TRG - Target

REF - Reference

Interpretation

CCND1 is DOWN-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 0,073 (S.E. range is 0,056 - 0,093).

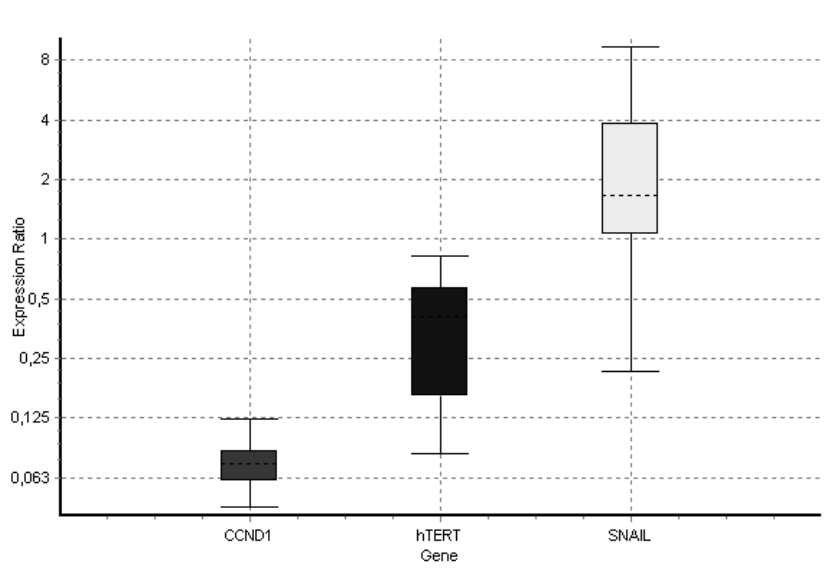
CCND1 sample group is different to control group. P(H1)=0,000

hTERT is DOWN-regulated in sample group (in comparison to control group) by a mean factor of 0,323 (S.E. range is 0,132 - 0,646).

hTERT sample group is different to control group. P(H1)=0,000

SNAIL sample group is not different to control group. P(H1)=0,159

Boxplot



Boxes represent the interquartile range, or the middle 50% of observations. The dotted line represents the median gene expression. Whiskers represent the minimum and maximum observations.