

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU**

ALINE CARBONERA LUVIZON

**MECANISMO DE AÇÃO DO ESTRÓGENO NO GENE
AMPHIREGULIN EM CÉLULAS MCF7 E MDA-MB-231 VIA PI3K**

BOTUCATU - SP

2014

ALINE CARBONERA LUVIZON

**MECANISMO DE AÇÃO DO ESTRÓGENO NO GENE
AMPHIREGULIN EM CÉLULAS MCF7 E MDA-MB-231 VIA PI3K**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP para obtenção do título de Doutor em Patologia

Orientadora: Prof^ª. Dra. Denise Fecchio

Co-Orientadora: Prof^ª. Dra. Célia Regina Nogueira

BOTUCATU - SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Luvizon, Aline Carbonera.

Mecanismo de ação do estrógeno no gene Amphiregulin em células MCF7 e MDA-MB-231 via PI3K / Aline Carbonera Luvizon. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Denise Fecchio

Coorientador: Célia Regina Nogueira

Capes: 40105008

1. Mamas - Câncer. 2. Estrógenos. 3. Morfogênese. 4. Glândulas mamárias.

Palavras-chave: Amphiregulin; Câncer de mama; Estrógeno.

Ao meu esposo, Wanderley, por todo apoio e carinho.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo dom da vida.

A minha orientadora, Prof^ª. Dra. Denise Fecchio, pela oportunidade que me foi dada.

A minha co-orientadora, Prof^ª. Dra. Célia Regina Nogueira, por abrir as portas do seu laboratório para que eu realizasse parte do meu trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa e auxílios concedidos.

Ao Igor Minatel, meu colega de trabalho e amigo, por todas as ajudas.

Aos alunos e funcionários do laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Médica, em especial à Maria Teresa de Sábio e à Fernanda Fontes, que foram essenciais ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu e à secretária de Pós-Graduação em Patologia, Vânia Soler, pela gentileza, atenção e excelente trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, onde este trabalho foi realizado.

Aos meus colegas de trabalho da Faculdade Sudoeste Paulista – FSP, Adriana Piccinin, Luciene Patrici Papa, Flávia Quaresma, Edson Laino, David Polônio, Renata Carolina Piffer, Greicy Mara Mengue Feniman De Stefano e João Leandro Chaguri, pelo apoio e, principalmente, pelas risadas.

A toda minha família pelo apoio e compreensão. Agradeço principalmente à minha mãe, pelo carinho e cuidados e ao meu esposo, pelo apoio incondicional, amor e carinho.

Agradeço também a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

“O covarde nunca começa, o fracassado nunca termina, mas o vencedor nunca desiste.”

Norman Vincent Peale

RESUMO

A importância do estrógeno (E2) no desenvolvimento do câncer de mama é bem estabelecido na literatura. O uso de antagonistas de E2 para o tratamento de tumores positivos para o receptor de estrógeno mostra-se importante para a sobrevivência de pacientes acometidas pela doença. Amphiregulin (Areg), um fator de crescimento regulador multifuncional que pode ser induzido por estrógeno, possui papel central no desenvolvimento da glândula mamária e na morfogênese de órgãos e é expresso tanto em tecidos normais como cancerosos. Estudos clínicos sugerem que amphiregulin também desempenha papel importante na progressão do câncer da mama humano e a sua expressão aumentada tem sido associada com doença agressiva. Para investigar o mecanismo pelo qual o E2 induz a expressão de *AREG*, células MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas durante 10 minutos, 30 minutos, 1 hora e 4 horas com veículo (controle) ou E2 isoladamente ou em associação com Fulvestrant (ICI, inibidor do receptor de estrógeno), Actinomicina D (ACTD, inibidor da transcrição gênica), Ciclohexamida (CHX, inibidor da síntese proteica) ou LY (inibidor da via PI3K). Os inibidores também foram utilizados isoladamente. O RNAm foi extraído das células pelo método de trizol e a expressão de *AREG* foi analisada por qRT-PCR. O tratamento de ambas as células com E2 induziu aumento do RNAm de *AREG* em todos os tempos analisados. Esse aumento foi parcialmente dependente de ER nas células MCF-7 nos tempos de 10 minutos, 1 e 4 horas. Em 30 minutos não foi observado a ligação do E2 com o ER para que houvesse o aumento da expressão do gene alvo. Nas células MDA-MB-231 o estrógeno aumentou o RNAm de *AREG* por pelo menos duas vias distintas em todos os tempos analisados. Uma das vias ativa a via PI3K para que este efeito ocorra. Nossos resultados demonstram que o E2 é capaz de induzir a expressão de *AREG* em linhagens de células de câncer de mama de maneira dependente e independente de ER.

Palavras-chave: Amphiregulin, Câncer de Mama, Estrógeno

ABSTRACT

The relevance of estrogen in breast cancer development is well established in the literature. The use of E2 antagonists for ER-positive breast cancer treatment is shown to be important to patients' survival. Amphiregulin, a multifunctional growth regulator factor that may be induced by estrogen plays a central role in development of mammary glands and organ morphogenesis, is expressed in both normal and cancerous tissues. Clinical studies suggest that amphiregulin also is important in human breast cancer progression and its expression has been associated with aggressive disease. To investigate the mechanism whereby E2 induces *AREG* expression, MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated for 10 minutes, 30 minutes, 1 hour or 4 hours with vehicle (control) or estrogen (E2) isolated or in association with Fulvestrant (ICI, estrogen receptor inhibitor), Actinomycin D (ACTD, gene transcription inhibitor), Cycloheximide (CHX, protein synthesis inhibitor) or LY (PI3K inhibitor). The inhibitors were also used alone. mRNA was extracted from the cells by the Trizol method and *AREG* expression analyzed by qRT-PCR. Treatment of both cell types with E2 increased *AREG* mRNA expression at all moments. This increase was partially ER-dependent in MCF-7 cells at 10 minutes, 1 and 4 hours. At 30 min, no binding of E2 to ER was observed. In MDA-MB-231 cells, the estrogen-induced *AREG* mRNA was enhanced by two distinct pathways at the moments analyzed and PI3K pathways participated in one of them. Our results showed that E2 was able to induce the *AREG* expression in breast cancer cell lines in an ER-dependent and -independent manner.

KEY WORDS: Amphiregulin, Breast Cancer, Estrogen

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACT D:** Actinomicina D
- AMPc:** Adenosina monofosfato cíclico
- AREG:** Amphiregulin
- C:** controle
- CHX:** Ciclohexamida
- CRE:** Elemento Responsivo ao AMPc
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- E2:** Estrógeno
- EGF:** Fator de crescimento epidermal
- EGFR:** Receptor do fator de crescimento epidermal
- ER:** Receptor de estrógeno
- ERK:** Proteína quinase transdutora de sinal
- SFB:** Soro fetal bovino
- GAPDH:** Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- GPR30:** Proteína G acoplada ao receptor 30
- HB-EGF:** Fator de crescimento semelhante ao EGF
- HER:** Receptor do fator de crescimento epidermal humano
- HRE:** Elementos responsivos ao hormônio
- HSP:** Proteína de choque térmico
- ICI:** Fulvestrant
- IGFR:** Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina
- LY:** inibidor da via PI3K
- MAPK:** Proteína quinase ativada por mitógeno
- NFkB:** Fator nuclear kappa-B
- PI3K:** Fosfatidilinositol-3-Kinase
- PR:** Receptor de progesterona
- qRT-PCR:** Reação em cadeia da polimerase em tempo real
- RANKL:** Ligante do Receptor ativador do fator nuclear kappa-B
- RN:** Receptor nuclear

SR: Receptores de esteroides

SRS: Receptores de esteroides clássicos

TGF- α : Fator de crescimento tumoral α

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	10
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
REFERÊNCIAS.....	20
CAPÍTULO II	28
1. MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO.....	28
Resumo.....	29
Introdução.....	30
Materiais e Métodos.....	32
Resultados.....	34
Discussão.....	38
Conclusão.....	42
REFERÊNCIAS.....	43
2. CONCLUSÕES.....	46

CAPÍTULO I

1. REVISÃO DE LITERATURA

O câncer de mama é uma das doenças mais prevalentes em mulheres no mundo e representa um grande desafio para a saúde pública. Os altos índices de casos e de óbitos por câncer de mama na população feminina, somados aos elevados custos da assistência levaram à necessidade de se traçar estratégias que favoreçam o seu controle no futuro [1]. De forma geral, as recomendações mais enfatizadas pela Organização Mundial da Saúde para o aumento da sobrevivência associada a esse tipo de câncer são relativas à adoção de política que favoreça o diagnóstico precoce, aliado ao tratamento adequado em tempo hábil [2].

Sabe-se que o estrógeno (E2) e o *status* hormonal da paciente são importantes para a proliferação das células tumorais e para o tratamento do câncer de mama [3]. Além disso, o E2 determina a proliferação e a manutenção de células de carcinoma de mama humano [4, 5]. Cânceres de mama positivos para o receptor de estrógeno (ER) são os mais comuns [6]. O E2 é um hormônio esteroide tradicionalmente envolvido com o sexo feminino, que é principalmente sintetizado nos ovários e nos testículos, mas também pode advir da aromatização de andrógenos nos tecidos periféricos. A deleção do gene dos ERs revelou a importância do E2 para a função e o desenvolvimento normais dos órgãos no sexo feminino [7-9]. Tanto estudos *in vivo* quanto *in vitro* em mamíferos sugerem que o E2 tem ações significativas na preservação da densidade mineral óssea [10] e integridade do sistema arteriovenoso [11], assim como também contribui para a função cerebral [12] e modula a imunidade [13].

O E2 é o primeiro hormônio requerido para o desenvolvimento ductal durante a puberdade [14]. Foi demonstrado que o estrógeno facilita a proliferação epitelial e morfogênese por um mecanismo parácrino [15]. Estudos utilizando camundongos *knockout* para ER revelou que a sinalização do ER α é necessária para o alongamento ductal, que ocorre por meio da proliferação da extremidade terminal [16].

Vários candidatos a fatores parácrinos tem sido sugeridos para regular a proliferação e morfogênese induzida por hormônio, incluindo o Wnt-4 (*Wingless-type* 4), o ativador do ligante do receptor de NF κ B (RANKL), o hormônio de crescimento e o fator de crescimento semelhante à insulina II [17]. No que diz respeito à ação de E2, no entanto, amphiregulin (Areg) parece ser o principal mediador parácrino de morfogênese ductal [18].

O E2 também é importante clinicamente, sendo comumente utilizado como contraceptivos e na terapia de reposição hormonal, prevenindo e tratando os sintomas do climatério. Antagonistas do ER são usados no tratamento de câncer de mama hormônio-dependente e ocasionalmente no tratamento de adenocarcinoma de próstata [19]. Terapia antiestrogênica tem sido utilizada com sucesso para prolongar a sobrevivência livre de doença dos pacientes com câncer de mama ER positivo. No entanto, 50% dos pacientes com tumores positivos para ER não respondem a tal terapia ou eventualmente adquirirão resistência à terapia endócrina, resultando na progressão do tumor e mortalidade [20].

Os hormônios, em geral, necessitam dos seus receptores para mediar suas ações. Os receptores hormonais nucleares (RN) são proteínas regulatórias que interagem com o DNA em regiões específicas, modulando a transcrição gênica nas células-alvo [21]. A família dos RNs incluem os receptores para esteróides (entre eles o receptor de estrogênio – ER), vitamina D, retinóides, hormônios tireoideanos e prostaglandinas, além de outros receptores denominados órfãos, que não possuem ligantes conhecidos [22]. O estrogênio se liga ao ER para coordenar diversas funções biológicas, e o ER possui localizações subcelulares distintas, incluindo o núcleo, a membrana celular e as mitocôndrias. O ER realiza ambas as funções nuclear (clássica) e extranuclear (não clássica) com padrões de expressão gênica diferentes [23].

Dois ERs distintos foram identificados em mamíferos, o ER α e o ER β , codificados por diferentes genes [24-26]. O gene do ER α se localiza no cromossomo 6 e o gene do ER β no 14 [27]. A descoberta do clone do ER β aumentou a complexidade da sinalização estrogênica. Ambas as isoformas de ER seguem a estrutura molecular característica da família de RN, no qual incluem os três domínios funcionais. As isoformas mostram homologia em seu domínio de ligação ao DNA, porém existe divergência na estrutura do domínio AF-1 (N-terminal) [28]. Há diferentes transcritos originados de *splicing* alternativo dos genes ER α e do β , gerando proteínas de tamanhos variados [29]. O ER α é o receptor predominante na maioria dos órgãos e o ER β é expresso principalmente nos ovários, na próstata, nos pulmões e no hipotálamo [30, 31]. Tanto o ER α quanto o ER β possuem afinidade similar ao 17 β -estradiol, porém com diferentes papéis na regulação da expressão gênica.

Os membros da família de RN são fatores de transcrição dependentes do ligante e atuam por se acoplarem a sequências específicas do DNA, denominadas elementos

responsivos ao hormônio (HRE). Os HRE geralmente estão localizados na região promotora dos genes alvos, são específicos para cada receptor e possuem duas cópias de um hexanucleotídeo, que podem estar arranjadas em diferentes orientações, com espaçamento e sequências flanqueadoras diferentes. Os RNs ligam-se aos HREs de diversas formas, podendo atuar como monômeros, homodímeros ou heterodímeros [22, 32, 33].

Os receptores para os hormônios esteroides formam uma subclasse da família de RNs [22, 34]. Na ausência de ligante, os receptores dos esteroides glicocorticoide, mineralocorticoide, androgênicos, estrogênicos e progesterona (PR) estão associados em um complexo com proteínas de choque térmico (HSPs) no citoplasma e, em alguns casos, no núcleo da célula. A ligação induz à formação de homodímeros que se dirigem ao núcleo, onde se ligam aos seus respectivos HREs, regulando a transcrição [33]. É sabido que a transcrição mediada pelos RNs é altamente complexa e envolve uma magnitude de fatores co-reguladores e um *cross-talk* entre distintas vias de sinalização [35]. De uma forma didática, eles são divididos em co-ativadores, os quais permitem a atividade dos receptores, e os co-repressores, os quais reprimem os efeitos mediados pelos receptores [36, 37].

A via de ação clássica (ou nuclear) é similar para a grande maioria dos RN, que consiste na ligação do hormônio com o seu receptor, através da homo ou heterodimerização, ligando-se aos respectivos HREs dos genes alvos, provocando mudanças conformacionais na estrutura do receptor [38], favorecendo a dissociação dos co-repressores [39], seguida de interação com os co-ativadores [40]. Estes recrutam outras proteínas, incluindo acetiltransferases, as quais alteram a estrutura da cromatina e facilitam a transcrição [41]. Além da via clássica de ativação transcricional descrita para todos os RN, o ER também possui uma via de modulação da expressão gênica alternativa, ligando-se a sequências reguladoras do DNA, tais como AP-1 (*activator protein 1*) e SP1 (*specificity protein 1*) [42, 43]. Nessa situação, o ER é um fator de transcrição secundário, fazendo parte do complexo de determinado promotor específico, por meio do qual existe a interação com o fator transcricional que está ligado ao DNA, tal como *c-jun* ou *c-fos*, ou com outro co-ativador. Dessa forma, o ER possui em si a função de co-ativador por ser capaz de estabilizar o complexo do fator transcricional ligado ao DNA ou por recrutar outros co-ativadores. A transcrição de vários genes importantes na transdução de sinais de fatores de crescimento é regulada por essa via [44-47]. As proteínas codificadas por esses genes incluem o receptor do fator de

crescimento semelhante à insulina 1 (IGFR-1), ciclina D1, *myc* e o fator de apoptose bcl-2. A importância dessa via para o crescimento tumoral *in vivo* ainda não está bem estabelecida [48]. Estudo sugere que pode haver um papel importante na manutenção e proliferação celular estrógeno-induzidas [49].

Novos locais de ligação do E2 foram identificados na membrana de células endometriais, os quais induziram a formação de Adenosina Monofosfato Cíclico (AMPC) [50]. Estudos posteriores também evidenciaram a presença de ER fora do núcleo celular, o qual medeia sinais rápidos originados da membrana ou do citoplasma [29, 51, 52]. Essa ação não clássica (extranuclear) do ER ou *membrane-initiated steroid signaling* (MISS) ocorre após minutos da adição do E2 [29, 53-55]. Esses receptores foram encontrados nos tecidos ósseos, neural, uterino, gorduroso, nas células endoteliais, células tumorais de mama e hipófise [56-58].

O hormônio esteroide E2 tem sido descrito como o principal mitógeno e fator etiológico de células epiteliais mamárias no desenvolvimento do câncer de mama humano [59]. Há evidências de que o E2 promove a proliferação celular das linhagens de câncer de mama MCF-7 e T47 [60] e esta proliferação foi reprimida pela co-administração de ICI, antagonista do receptor de E2 [61].

Há uma relação importante entre ER α , Areg, proliferação e câncer de mama. Areg é um fator parácrino que não só medeia a elongação ductal, mas também pode desempenhar um papel importante na auto-renovação e diferenciação de células mamárias. A elucidação dos mecanismos moleculares que regulam a sinalização da Areg na glândula mamária, incluindo a troca de eventos parácrinos mediados por E2 para uma via autócrina, é necessário para o entendimento completo dos eventos precoces na progressão do câncer da mama [62].

Amphiregulin atua em vários processos biológicos, incluindo a regeneração nervosa, a implantação de blastocistos e a formação óssea, na formação do ducto mamário, bem como no crescimento e ramificação de vários outros tecidos como o pulmão, rim e próstata. Estudos clínicos também sugerem que amphiregulin também desempenha um papel importante na progressão do câncer da mama humano e a sua expressão aumentada tem sido associada com doença agressiva. Portanto, amphiregulin pode ser um alvo novo e eficaz para o tratamento do câncer da mama e poderia representar um alvo alternativo para o EGFR [63].

Independentemente da influência hormonal, existem trabalhos mostrando a expressão aumentada de AREG em diversos tipos tumorais, tais como colorretais [64],

pulmonares [65] e mama [66-70]. Quando realizada a técnica de imunohistoquímica para AREG, observa-se maior positividade em tumores de mama invasivos, comparados com as lesões *in situ* [67, 69-71]. Dessa forma o AREG parece ser um gene importante para a modulação do E2 em células de câncer de mama MCF-7 pela via não clássica.

Estudos tem destacado o papel funcional de AREG em vários aspectos relacionados à tumorigênese, incluindo a auto-suficiência na geração de sinais de crescimento, potencial replicativo ilimitado, invasão tecidual e metástase, angiogênese e resistência à apoptose. A atividade oncogênica da AREG já foi descrita nas doenças malignas epiteliais humanas mais comuns, tais como o pulmão, mama, colorretal, carcinoma do ovário e da próstata, bem como em alguns cânceres hematológicos e mesenquimais. Além disso, AREG também está envolvido na resistência a diversos tratamentos contra o câncer [72]. Nos estudos *in vitro* realizados em linhagens celulares de tumores tratados com Areg ou com RNAs de interferência específicos (siRNAs) para silenciar a expressão gênica de AREG mostraram que a Areg desempenha um papel importante na proliferação e sobrevivência de células transformadas [73].

O potencial papel da amphiregulin no câncer de mama foi destacado pela constatação de que a frequência e os níveis de expressão da proteína areg são geralmente mais elevadas em carcinomas da mama invasivos do que em carcinoma ductal *in situ* ou normal, não envolvido com o epitélio mamário [71]. Além disso, amphiregulin é expresso no epitélio do tumor, mas não nas células estromais ou células inflamatórias e a expressão é mais comum nos linfonodos positivos [74]. Também existe uma correlação entre a expressão da proteína areg e agressividade em linhagens celulares de câncer de mama e a supressão da expressão de areg em células de câncer da mama diminui a formação de tumores *in vivo* [75, 76]. Também foi demonstrado o envolvimento da perda de função da proteína supressora tumoral BRCA 1, proteína essa responsável pela alta porcentagem de cânceres de mama familiar e esporádicos, e regulação aumentada de AREG [77].

AREG também participa na manutenção das propriedades oncogênicas e metastáticas de células cancerosas, bem como a sua resistência à quimioterapia [78]. O papel de AREG no desenvolvimento e progressão do câncer é também fundamentado pelos dados clínicos que mostram que a AREG pode servir como um marcador prognóstico e/ou preditivo [79, 80]. Duas décadas de investigações básicas e clínicas identificaram Areg como uma das poucas proteínas para entrar na clínica oncológica, tanto como um potencial alvo terapêutico para o tratamento do câncer, como um

biomarcador preditivo e prognóstico valioso. Areg vai certamente servir como um marcador de rotina em oncologia, uma vez que a avaliação precisa do subtipo histológico, herança genética e as características moleculares do tumor são cuidadosamente definidas, permitindo o tratamento personalizado adequado para cada paciente com câncer [72].

O E2 induz a expressão de amphiregulin via ER e necessita de Areg para induzir a proliferação do epitélio mamário [81]. Em trabalho do nosso grupo foi demonstrado por meio da técnica de *microarray* que o gene da *amphiregulin* é estimulado por E2 em células MCF-7. O gene da *AREG* está localizado no cromossomo 4q13-q21 e sua proteína é membro da família dos fatores de crescimento epidermais (EGF). É sabido que o E2 regula os ligantes da família EGFR [82].

Amphiregulin é inicialmente sintetizado como um precursor transmembrana de 252 aminoácidos que é subsequentemente clivado proteoliticamente no domínio N-terminal para se obter um peptídeo maduro de 78-84 aminoácidos. Várias isoformas diferentes da proteína solúvel ou na superfície celular podem ser formadas como resultado de modificações pós-traducionais. Algumas destas formas solúveis de Areg demonstraram possuir atividade biológica, embora não se sabe se todas estas isoformas partilham esta característica [83].

Amphiregulin é evolutivamente e estruturalmente relacionada com EGF e TGF- α : o segmento de 40 aminoácidos do C-terminal da proteína humana (resíduos 44-84) tem 38% e 32% de identidade de sequência com o EGF humano e TGF- α , respectivamente [82]. A região N-terminal contém um chamado domínio EGF, que é compartilhado por outros membros da família EGF e consiste de seis cisteínas conservadas espacialmente e vários outros resíduos semiconservados. A formação de pontes dissulfeto pelas cisteínas resulta na geração de uma estrutura tri-anelada. O domínio N-terminal também contém duas potenciais sequências alvo nuclear (resíduos 26-29 e 40-43) [84].

A Areg foi detectada tanto no núcleo como no citoplasma, tanto *in vitro*, como *in vivo* [85]. Assim como outros membros da família de ligantes de EGF, Areg medeia a sua ação ligando-se e, conseqüentemente, ativando o seu respectivo receptor na superfície da célula. Embora seja bem conhecido que se liga especificamente e ativa homodimericamente o receptor do fator de crescimento epidermal [82], também tem sido demonstrado ser capaz de ativar o ErbB2, ErbB3 e ErbB4 de uma forma dependente de EGFR, promovendo assim a heterodimerização do receptor [86-88].

Ao contrário dos outros ligantes de EGFR, *AREG* é regulada na glândula mamária durante o alongamento ductal, tornando este fator de crescimento um provável mediador da proliferação epitelial. Além disso, o crescimento ductal é severamente prejudicado em camundongos *AREG*^{-/-}, semelhante ao fenótipo exibido pelas glândulas mamárias *ERα* nulas. Foi demonstrado recentemente que os níveis de RNAm de *AREG* estão aumentados em resposta a estrogênios na glândula mamaria púbere e que este aumento é mediado por *ERα* [18]. O receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e o seu ligante amphiregulin estão expressos no câncer da mama [89].

Os membros da família ErbB incluem o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) ou ErbB1, ErbB2 ou HER2, ErbB3 e ErbB4 [90]. Estes receptores tirosina-quinase existem como monômeros inativos na superfície da célula com um domínio extracelular de ligação, um único domínio transmembrana hidrófobico e um domínio de tirosina-quinase citoplasmática [91]. A ligação a estes receptores provoca uma mudança conformacional que permite que a homodimerização ou heterodimerização com outro receptor através do seu circuito de dimerização. Os ligantes de receptores de ErbB que se ligam a EGFR incluem exclusivamente fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento transformante-alfa (*TGF-α*) e amphiregulin.

Análise de citometria de fluxo mostrou que o EGFR permaneceu sobre a superfície celular após a estimulação com *AREG*, mas foi rapidamente internalizado após a estimulação com EGF [89]. Células MCF10A cultivadas na presença de EGF exibiram EGFR predominantemente intracelular, com localização pontuada. Em contraste, as células SUM149 e MCF10A que cresceram na presença de *AREG* expressaram EGFR predominantemente na membrana e nas junções celulares. Isso indica que *AREG* altera a internalização e degradação de EGFR em uma via que favorece acumulação de EGFR na superfície da célula e, por fim, leva a alterações na sinalização de EGFR [89]. *AREG* pode também ser regulada por EGFR por si só e a ativação do EGFR leva a expressão de *AREG* em vários tipos celulares [67, 92]. No entanto, a via específica que conduz da ativação do EGFR para a transcrição do AR ainda não foi elucidada.

Pouco se sabe sobre as vias de sinalização intracelular desencadeada pela atividade de Amphiregulin a jusante da ativação da família do receptor de EGF. Algumas evidências sugerem a ativação das vias RAS/MAPK e PI3-K/Akt por amphiregulin. Por exemplo, foi demonstrado que *AREG* tem um potente efeito

mitogênico em células de músculo liso vascular através da ativação de PI3-K/Akt, p42/p44-MAPK e a via de p38 MAPK, enquanto que ele pode estimular fortemente a fosforilação de Akt e p42 / p44-MAPK de uma forma dependente do EGFR em osteoblastos após estimulação do hormônio da paratireoide [93, 94]. Foi demonstrado que AREG ligado a EGFR pode ativar Akt, JNK e Erk [95-97].

Sabe-se que o promotor de AREG contém um elemento responsivo ao cAMP (CRE) e vários autores tem demonstrado que a sua expressão é regulada por cAMP [94, 98-100]. Em células de câncer de pâncreas, a formação do heterodímero mediada por HER3 foi relatado como estando envolvido na aquisição de comportamento agressivo destas células via sinalização de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/Akt [101].

O uso do fulvestrant, um inibidor do receptor de estrogênio, hiperregula HB-EGF (*Heparin-binding EGF-like growth factor*) para ativar a sinalização do EGFR. O aumento da expressão de HB-EGF foi mediada pela expressão de ER, sugerindo um papel específico para o fulvestrant na regulação da transcrição mediada por ER de ligantes da família EGF. O inibidor de ER induz a ativação de membros da família EGFR e a sinalização da MAPK, e a fosforilação de ER foi diminuída quando ER foi pouco expresso pelo fulvestrant. Em tratamento a curto prazo (10 minutos), o fulvestrant não induziu a ativação do receptor EGFR, enquanto que a exposição prolongada (24-48 h) resultou em fosforilação de EGFR, HER2, HER3. Não foram observadas mudanças significativas no nível pAKT, o que sugere que a via de sinalização PI3K não foi induzida por fulvestrant. Porém, os níveis de RNAm de AREG e PR foram substancialmente reduzidos 48 h após o tratamento com fulvestrant [102].

A via das Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) traduz uma ampla variedade de sinais externos, levando a respostas celulares, incluindo proliferação, diferenciação, inflamação e apoptose [103]. Vários estudos tem demonstrado *cross talk* entre a via da MAPK e ER. Por exemplo, ER ativa a via da MAPK por mecanismos não clássicos e a MAPKs pode mediar modificações pós-translacionais do ER e seus correguladores, influenciando a atividade e a sensibilidade do ER em células de câncer de mama ER+ na terapia endócrina [104]. Recentemente foi demonstrado que AREG regula a ativação de ERK e Akt através do receptor do fator de crescimento epidérmico e HER3 [105], demonstrando a participação de AREG na ativação da via da MAPK.

Diante do exposto, faz-se necessário um maior entendimento da ação do estrogênio via ativação da amphiregulin no câncer de mama para que possa haver uma contribuição com futuras alternativas aos tratamentos já existentes. Para isso, o objetivo desse

trabalho foi determinar a via pela qual o estrógeno induz a expressão gênica de amphiregulin em linhagens celulares de carcinoma de mama.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. *Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil*. Instituto Nacional de Câncer (INCA). 2003.
2. World Health Organization. *National cancer control programmes: policies and managerial guidelines*. 2002; 2th.
3. Jensen, E.V., et al., *Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; **98**(26): 15197-202.
4. Migliaccio, A., et al., *Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells*. Embo J. 1996; **15**(6): 1292-300.
5. Razandi, M., A. Pedram, and E.R. Levin, *Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer*. Mol Endocrinol. 2000; **14**(9): 1434-47.
6. Ravdin, P.M., et al., *The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States*. N Engl J Med. 2007; **356**(16): 1670-4.
7. Couse, J.F. and K.S. Korach, *Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?* Endocr Ver. 1999; **20**(3): 358-417.
8. Krege, J.H., et al., *Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998; **95**(26): 15677-82.
9. Lubahn, D.B., et al., *Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; **90**(23): 11162-6.
10. Srivastava, S., et al., *Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation*. J Biol Chem. 2001; **276**(12) 8836-40.
11. Mendelsohn, M.E. and R.H. Karas, *The protective effects of estrogen on the cardiovascular system*. N Engl J Med. 1999; **340**(23): 1801-11.
12. McEwen, B.S., *Clinical review 108: The molecular and neuroanatomical basis for estrogen effects in the central nervous system*. J Clin Endocrinol Metab. 1999; **84**(6): 1790-7.
13. Wilder, R.L., *Hormones, pregnancy, and autoimmune diseases*. Ann N Y Acad Sci. 1998; **840**: 45-50.
14. Howlin, J., J. McBryan, and F. Martin, *Pubertal mammary gland development: insights from mouse models*. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2006; **11**(3-4): 283-97.

15. Mallepell, S., et al., *Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; **103**(7): 2196-201.
16. Korach, K.S., et al., *Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes*. Recent Prog Horm Res. 1996; **51**: 159-86.
17. Sternlicht, M.D., *Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis*. Breast Cancer Res. 2006; **8**(1): 5.
18. Ciarloni, L., S. Mallepell, and C. Brisken, *Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; **104**(13): 5455-60.
19. Enmark, E. and J.A. Gustafsson, *Oestrogen receptors - an overview*. J Intern Med. 1999; **246**(2): 133-8.
20. Osborne, C.K. and S.A. Fuqua, *Mechanisms of tamoxifen resistance*. Breast Cancer Res Treat. 1994; **32**(1): 49-55.
21. Amero, S.A., et al., *The origin of nuclear receptor proteins: a single precursor distinct from other transcription factors*. Mol Endocrinol. 1992; **6**(1): 3-7.
22. Mangelsdorf, D.J. and R.M. Evans, *The RXR heterodimers and orphan receptors*. Cell. 1995; **83**(6): 841-50.
23. Levin, E.R., *Minireview: Extranuclear steroid receptors: roles in modulation of cell functions*. Mol Endocrinol. 2011; **25**(3): 377-84.
24. Green, S., et al., *Cloning of the human oestrogen receptor cDNA*. J Steroid Biochem. 1986; **24**(1): 77-83.
25. Kuiper, G.G., et al., *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; **93**(12): 5925-30.
26. Mosselman, S., J. Polman, and R. Dijkema, *ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor*. FEBS Lett. 1996; **392**(1): 49-53.
27. Enmark, E., et al., *Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern*. J Clin Endocrinol Metab. 1997; **82**(12): 4258-65.
28. Gustafsson, J.A., *Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action*. J Endocrinol. 1999; **163**(3): 379-83.
29. Levin, E.R., *Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors*. J Appl Physiol. 1985; **91**(4): 1860-7.

30. Couse, J.F., et al., *Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse*. *Endocrinol.* 1997; **138**(11): 4613-21.
31. Kuiper, G.G., et al., *Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta*. *Endocrinol.* 1997; **138**(3): 863-70.
32. Glass, C.K., *Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers*. *Endocr Ver.* 1994; **15**(3): 391-407.
33. Ribeiro, R.C., et al., *Mechanisms of thyroid hormone action: insights from X-ray crystallographic and functional studies*. *Recent Prog Horm Res.* 1998, **53**: 351-92.
34. Evans, R.M., *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily*. *Sci.* 1988; **240**(4854): 889-95.
35. Hall, J.M., J.F. Couse, and K.S. Korach, *The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling*. *J Biol Chem.* 2001; **276**(40): 36869-72.
36. McKenna, N.J. and B.W. O'Malley, *Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators*. *Cell.* 2002; **108**(4): 465-74.
37. Rosenfeld, M.G. and C.K. Glass, *Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors*. *J Biol Chem.* 2001; **276**(40): 36865-8.
38. Schiff, R. and C.K. Osborne, *Endocrinology and hormone therapy in breast cancer: new insight into estrogen receptor-alpha function and its implication for endocrine therapy resistance in breast cancer*. *Breast Cancer Res.* 2005; **7**(5): 205-11.
39. Makowski, A., et al., *Determination of nuclear receptor corepressor interactions with the thyroid hormone receptor*. *Mol Endocrinol.* 2003; **17**(2): 273-86.
40. Zhang, J. and M.A. Lazar, *The mechanism of action of thyroid hormones*. *Annu Rev Physiol.* 2000; **62**: p. 439-66.
41. McKenna, N.J., R.B. Lanz, and B.W. O'Malley, *Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology*. *Endocr Ver.* 1999; **20**(3): 321-44.
42. Kushner, P.J., et al., *Estrogen receptor pathways to AP-1*. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000; **74**(5): 311-7.
43. Safe, S., *Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions*. *Vitam Horm.* 2001; **62**: 231-52.

44. Altucci, L., et al., *17beta-Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells.* Oncogene. 1996; **12**(11): 2315-24.
45. Dong, L., et al., *Mechanisms of transcriptional activation of bcl-2 gene expression by 17beta-estradiol in breast cancer cells.* J Biol Chem. 1999; **274**(45): 32099-107.
46. Geum, D., et al., *Estrogen-induced cyclin D1 and D3 gene expressions during mouse uterine cell proliferation in vivo: differential induction mechanism of cyclin D1 and D3.* Mol Reprod Dev. 1997; **46**(4): 450-8.
47. Kushner, P.J., et al., *Oestrogen receptor function at classical and alternative response elements.* Novartis Found Symp. 2000; **230**: 20-6.
48. Osborne, C.K. and R. Schiff, *Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications.* J Clin Oncol. 2005; **23**(8): 1616-22.
49. Liu, Y., et al., *Inhibition of AP-1 transcription factor causes blockade of multiple signal transduction pathways and inhibits breast cancer growth.* Oncogene. 2002; **21**(50): 7680-9.
50. Pietras, R.J. and C.M. Szego, *Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells.* Nature. 1977; **265**(5589): 69-72.
51. Losel, R.M., et al., *Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers.* Physiol Rev. 2003; **83**(3): 965-1016.
52. Razandi, M., et al., *Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers.* Mol Endocrinol. 2004; **18**(12): 2854-65.
53. Jakacka, M., et al., *An estrogen receptor (ER)alpha deoxyribonucleic acid-binding domain knock-in mutation provides evidence for nonclassical ER pathway signaling in vivo.* Mol Endocrinol. 2002; **16**(10): 2188-201.
54. Kelly, M.J. and E.R. Levin, *Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors.* Trends Endocrinol Metab. 2001; **12**(4): 152-6.
55. Marino, M., et al., *Distinct nongenomic signal transduction pathways controlled by 17beta-estradiol regulate DNA synthesis and cyclin D(1) gene transcription in HepG2 cells.* Mol Biol Cell. 2002; **13**(10): 3720-9.
56. Chaban, V.V., A.J. Lakhter, and P. Micevych, *A membrane estrogen receptor mediates intracellular calcium release in astrocytes.* Endocrinol. 2004; **145**(8): 3788-95.
57. Ho, K.J. and J.K. Liao, *Nonnuclear actions of estrogen.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002; **22**(12): 1952-61.

58. Watson, C.S., et al., *Signaling from the membrane via membrane estrogen receptor-alpha: estrogens, xenoestrogens, and phytoestrogens*. Steroids. 2005; **70**(5-7): 364-71.
59. Maemura, M., et al., *Mitogen-activated protein kinase cascade in breast cancer*. Oncol. 1999; **2**: 37-44.
60. Hall, L.C., et al., *Effects of thyroid hormones on human breast cancer cell proliferation*. J Steroid Biochem Mol Biol. 2008; **109**(1-2): 57-66.
61. Conde, S.J., et al., *Tamoxifen inhibits transforming growth factor-alpha gene expression in human breast carcinoma samples treated with triiodothyronine*. J Endocrinol Invest. 2008; **31**(12): 1047-51.
62. LaMarca, H.L. and J.M. Rosen, *Estrogen regulation of mammary gland development and breast cancer: amphiregulin takes center stage*. Breast Cancer Res. 2007; **9**(4): 304.
63. Willmarth, N.E. and S.P. Ethier, *Amphiregulin as a novel target for breast cancer therapy*. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2008; **13**(2): 171-9.
64. Saeki, T., et al., *Differential immunohistochemical detection of amphiregulin and cripto in human normal colon and colorectal tumors*. Cancer Res. 1992; **52**(12): 3467-73.
65. Ciardiello, F. and G. Tortora, *Interactions between the epidermal growth factor receptor and type I protein kinase A: biological significance and therapeutic implications*. Clin Cancer Res. 1998; **4**(4): 821-8.
66. Kenney, N.J., et al., *Detection of amphiregulin and Cripto-1 in mammary tumors from transgenic mice*. Mol Carcinog. 1996; **15**(1): 44-56.
67. Normanno, N., et al., *Epidermal growth factor-related peptides in the pathogenesis of human breast cancer*. Breast Cancer Res Treat. 1994; **29**(1): 11-27.
68. Normanno, N., et al., *Expression of messenger RNA for amphiregulin, heregulin, and cripto-1, three new members of the epidermal growth factor family, in human breast carcinomas*. Breast Cancer Res Treat. 1995; **35**(3): 293-7.
69. Panico, L., et al., *Differential immunohistochemical detection of transforming growth factor alpha, amphiregulin and CRIPTO in human normal and malignant breast tissues*. Int J Cancer. 1996; **65**(1): 51-6.
70. Qi, C.F., et al., *Expression of transforming growth factor alpha, amphiregulin and cripto-1 in human breast carcinomas*. Br J Cancer. 1994; **69**(5): 903-10.
71. Salomon, D.S., et al., *The role of amphiregulin in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat. 1995; **33**(2): 103-14.

72. Busser, B., et al., *The multiple roles of amphiregulin in human cancer*. *Biochim Biophys Acta*. 2011; **1816**(2): 119-31.
73. McBryan, J., et al., *Amphiregulin: role in mammary gland development and breast cancer*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2008; **13**(2): 159-69.
74. LeJeune, S., et al., *Amphiregulin, epidermal growth factor receptor, and estrogen receptor expression in human primary breast cancer*. *Cancer Res*. 1993; **53**(15): 3597-602.
75. Ma, L., et al., *Role of epidermal-growth-factor receptor in tumor progression in transformed human mammary epithelial cells*. *Int J Cancer*. 1998; **78**(1): 112-9.
76. Ma, L., et al., *Antisense expression for amphiregulin suppresses tumorigenicity of a transformed human breast epithelial cell line*. *Oncogene*. 1999; **18**(47): 6513-20.
77. Lamber, E.P., A.A. Horwitz, and J.D. Parvin, *BRCA1 represses amphiregulin gene expression*. *Cancer Res*. 2010; **70**(3): 996-1005.
78. Eckstein, N., et al., *Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells*. *J Biol Chem*. 2008; **283**(2): 739-50.
79. Addison, C.L., et al., *Plasma transforming growth factor alpha and amphiregulin protein levels in NCIC Clinical Trials Group BR.21*. *J Clin Oncol*. 2010; **28**(36): 5247-56.
80. Ishikawa, N., et al., *Increases of amphiregulin and transforming growth factor-alpha in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers*. *Cancer Res*. 2005; **65**(20): 9176-84.
81. Troyer, K.L. and D.C. Lee, *Regulation of mouse mammary gland development and tumorigenesis by the ERBB signaling network*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2001; **6**(1): 7-21.
82. Shoyab, M., et al., *Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; **85**(17): 6528-32.
83. Brown, C.L., et al., *Cell surface ectodomain cleavage of human amphiregulin precursor is sensitive to a metalloprotease inhibitor. Release of a predominant N-glycosylated 43-kDa soluble form*. *J Biol Chem*. 1998; **273**(27): 17258-68.
84. Plowman, G.D., et al., *The amphiregulin gene encodes a novel epidermal growth factor-related protein with tumor-inhibitory activity*. *Mol Cell Biol*. 1990; **10**(5): 1969-81.

85. Johnson, G.R., et al., *Response to and expression of amphiregulin by ovarian carcinoma and normal ovarian surface epithelial cells: nuclear localization of endogenous amphiregulin*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; **180**(2): 481-8.
86. Beerli, R.R. and N.E. Hynes, *Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities*. *J Biol Chem*. 1996; **271**(11): 6071-6.
87. Johnson, G.R., et al., *Characterization of high and low molecular weight forms of amphiregulin that differ in glycosylation and peptide core length. Evidence that the NH₂-terminal region is not critical for bioactivity*. *J Biol Chem*. 1993; **268**(25): 18835-43.
88. Riese, D.J., et al., *The epidermal growth factor receptor couples transforming growth factor- α , heparin-binding epidermal growth factor-like factor, and amphiregulin to Neu, ErbB-3, and ErbB-4*. *J Biol Chem*. 1996; **271**(33): 20047-52.
89. Willmarth, N.E., et al., *Altered EGFR localization and degradation in human breast cancer cells with an amphiregulin/EGFR autocrine loop*. *Cell Signal*. 2009; **21**(2): 212-9.
90. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; **2**(2): 127-37.
91. Normanno, N., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer*. *Gene*. 2006; **366**(1): 2-16.
92. Kansra, S., et al., *Src family kinase inhibitors block amphiregulin-mediated autocrine ErbB signaling in normal human keratinocytes*. *Mol Pharmacol*. 2005; **67**(4): 1145-57.
93. Kato, M., et al., *Amphiregulin is a potent mitogen for the vascular smooth muscle cell line, A7r5*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; **301**(4): 1109-15.
94. Qin, L. and N.C. Partridge, *Stimulation of amphiregulin expression in osteoblastic cells by parathyroid hormone requires the protein kinase A and cAMP response element-binding protein signaling pathway*. *J Cell Biochem*. 2005; **96**(3): 632-40.
95. Brunelli, E., et al., *8-Prenylnaringenin inhibits epidermal growth factor-induced MCF-7 breast cancer cell proliferation by targeting phosphatidylinositol-3-OH kinase activity*. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009; **113**(3-5): 163-70.
96. Cui, X., et al., *Epidermal growth factor induces insulin receptor substrate-2 in breast cancer cells via c-Jun NH₂-terminal kinase/activator protein-1 signaling to regulate cell migration*. *Cancer Res*. 2006; **66**(10): 5304-13.

97. Lange, C.A., et al., *Convergence of progesterone and epidermal growth factor signaling in breast cancer. Potentiation of mitogen-activated protein kinase pathways.* J Biol Chem. 1998; **273**(47): 31308-16.
98. Freimann, S., et al., *EGF-like factor epiregulin and amphiregulin expression is regulated by gonadotropins/cAMP in human ovarian follicular cells.* Biochem Biophys Res Commun. 2004; **324**(2): 829-34.
99. Johansson, C.C., et al., *The epidermal growth factor-like growth factor amphiregulin is strongly induced by the adenosine 3',5'-monophosphate pathway in various cell types.* Endocrinol. 2004; **145**(11): 5177-84.
100. Shao, J., et al., *Prostaglandin E2 stimulates the growth of colon cancer cells via induction of amphiregulin.* Cancer Res. 2003; **63**(17): 5218-23.
101. Sergina, N.V., et al., *Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3.* Nature. 2007; **445**(7126): 437-41.
102. Zhang, X., M.R. Diaz, and D. Yee, *Fulvestrant regulates epidermal growth factor (EGF) family ligands to activate EGF receptor (EGFR) signaling in breast cancer cells.* Breast Cancer Res Treat. 2013; **139**(2): 351-60.
103. Seger, R. and E.G. Krebs, *The MAPK signaling cascade.* Faseb J. 1995; **9**(9): 726-35.
104. Schiff, R., et al., *Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance.* Clin Cancer Res. 2004; **10**(1 Pt 2): 331S-6S.
105. Yotsumoto, F., et al., *Amphiregulin regulates the activation of ERK and Akt through epidermal growth factor receptor and HER3 signals involved in the progression of pancreatic cancer.* Cancer Sci. 2010; **101**(11): 2351-60.

CAPÍTULO II

MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO

Estrógeno induz a expressão gênica de AREG em células de carcinoma mamário de maneira dependente e independente de ER

Aline Carbonera Luvizon¹; Maria Teresa de Sibio²; Fernanda Cristina Fontes Moretto²; Regiane Marques de Castro Olimpio²; Miriane de Oliveira²; Sandro José Conde²; Célia Regina Nogueira²; Denise Fecchio^{1*}

¹Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Brasil.

²Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Brasil.

*Autor correspondente. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Resumo

Introdução

A importância do estrógeno no desenvolvimento do câncer de mama é bem estabelecido na literatura. Apesar do uso de antagonistas de estrógeno para o tratamento de cânceres positivos para o receptor de estrógeno ser importante para a sobrevivência de pacientes, muitos pacientes não respondem adequadamente a esta terapia. Amphiregulin, um fator de crescimento multifuncional que pode ser induzido por estrógeno, participa no desenvolvimento da glândula mamária e é expresso tanto em tecidos normais como cancerosos. Estudos sugerem que amphiregulin desempenha um papel importante na progressão do câncer da mama humano e a sua expressão tem sido associada com agressividade da doença.

Métodos

Para investigar o mecanismo pelo qual o estrógeno induz a expressão de amphiregulin, células MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas durante 10 e 30 minutos, 1 hora e 4 horas com Estrógeno, Fulvestrant (inibidor do receptor de estrógeno), Actinomicina D (inibidor da transcrição gênica), Ciclohexamida (inibidor da síntese proteica) ou LY (inibidor da via PI3K), isoladamente ou em associação. O RNAm foi extraído das células pelo método de trizol e a expressão de amphiregulin foi analisada por qRT-PCR.

Resultados

O tratamento de ambas as células com estrógeno induziu um aumento do mRNA de amphiregulin em todos os tempos analisados. Esse aumento foi parcialmente dependente do receptor de estrógeno nas células MCF-7 nos tempos de 10 minutos, 1 e 4 horas. Em 30 minutos não foi observada a ligação do estrógeno com seu receptor. Nas células MDA-MB-231 o estrógeno aumentou o RNAm de amphiregulin independentemente da ligação com o ER e esse efeito ocorre com a participação da via PI3K.

Conclusão

O estrógeno induz a expressão de amphiregulin em linhagens de células de câncer de mama de maneira dependente e independente do receptor de estrógeno. Em células positivas para este receptor, o tratamento rápido foi capaz de induzir a expressão de amphiregulin pela via nuclear e extranuclear, enquanto que em tratamentos mais longos somente a via extranuclear foi evidenciada. Em células negativas para o ER, houve aumento da expressão gênica de amphiregulin de maneira semelhante em todos os tempos analisados, evidenciando-se uma via extranuclear de ação, com ativação da via de sinalização PI3K.

Palavras-chave: Amphiregulin, Câncer de Mama, Estrógeno, PI3K

Introdução

Sabe-se que o estrógeno (E2) e os níveis hormonais da paciente são importantes para a proliferação das células tumorais e para o tratamento do câncer de mama [1]. Cânceres de mama positivos para o receptor de estrógeno (ER) são os mais comuns [2] e antagonistas do ER são usados no tratamento de câncer de mama hormônio-dependente [3]. A terapia antiestrogênica mostra sucesso para prolongar a sobrevida livre de doença dos pacientes com câncer de mama ER positivo. No entanto, 50% dos pacientes com tumores positivos para ER não respondem a tal terapia ou eventualmente adquirirão resistência à terapia endócrina, resultando na progressão do tumor e mortalidade [4].

Há evidências de que o E2 promove a proliferação celular das linhagens de câncer de mama MCF-7 e T47 [5] e esta proliferação é supressa pela co-administração de ICI,

antagonista do receptor de E2 [6]. O E2 induz a expressão de AREG via ER e necessita de Areg para induzir a proliferação do epitélio mamário [7]. A proteína Areg é membro da família dos fatores de crescimento epidermais (EGF) e é sabido que o E2 regula os ligantes da família EGFR. A Areg possui um papel central no desenvolvimento da glândula mamária e morfogênese de órgãos e é expresso tanto em tecidos normais como neoplásicos [8]. Portanto, a elucidação dos mecanismos moleculares que regulam a sinalização da Areg na glândula mamária é necessária para um maior entendimento dos eventos na progressão do câncer da mama [9].

Independentemente da influência hormonal, trabalhos demonstram a expressão aumentada de AREG em diversos tipos tumorais, tais como colorretais [10], pulmonares [11] e mama [12,13,14,15,16]. Estudos tem destacado o papel funcional de AREG em vários aspectos relacionados à tumorigênese, incluindo a auto-suficiência na geração de sinais de crescimento, potencial replicativo ilimitado, invasão tecidual e metástase, angiogênese e resistência à apoptose. Além disso, AREG também participa na manutenção das propriedades oncogênicas e metastáticas de células cancerosas e está envolvida na resistência a diversos tratamentos contra o câncer [8], bem como a sua resistência à quimioterapia [17]. Portanto, amphiregulin pode ser um alvo novo e eficaz para o tratamento do câncer da mama e poderia representar um alvo alternativo para o EGFR [18]. O papel de AREG no desenvolvimento e progressão do câncer é também suportado por dados clínicos que mostram que a AREG pode servir como marcador prognóstico e/ou preditivo [19,20].

Existe uma correlação entre a expressão da proteína areg e agressividade em linhagens celulares de câncer de mama e a supressão da expressão de areg diminui a formação de tumores *in vivo* [21,22]. O potencial papel da amphiregulin no câncer de mama também foi destacado pela constatação de que a frequência e os níveis de expressão da proteína areg são geralmente mais elevadas em carcinomas da mama invasivos do que em carcinoma ductal *in situ* [23]. Estudos *in vitro* realizados em linhagens celulares de tumores tratados com Areg ou com RNAs de interferência específicos (siRNAs), para silenciar a expressão gênica de AREG, mostraram um papel importante na proliferação e sobrevivência das células transformadas [24]. Quando realizada a técnica de imunohistoquímica para AREG, observou-se maior positividade em tumores de mama invasivos, quando comparados com tumores *in situ* [13,15,16,23]. Recentemente foi demonstrado o envolvimento da perda de função da proteína

supressora tumoral BRCA 1, proteína essa responsável pela alta porcentagem de cânceres de mama familiar e esporádicos, e regulação aumentada de AREG [25].

Duas décadas de investigações básicas e clínicas identificaram Areg como uma das poucas proteínas para entrar na clínica oncológica, tanto como um potencial alvo terapêutico para o tratamento do câncer, como um biomarcador preditivo e prognóstico valioso. Areg vai provavelmente servir como um marcador de rotina em oncologia, uma vez que a avaliação precisa do subtipo histológico, herança genética e as características moleculares do tumor são cuidadosamente definidas, permitindo o tratamento personalizado adequado para cada paciente com câncer [8].

Pouco se sabe sobre as vias de sinalização intracelular desencadeada pela atividade de Amphiregulin *downstream* da ativação da família do receptor de EGF. Algumas evidências sugerem a ativação das vias RAS/MAPK e PI3-K/Akt por amphiregulin [26,27,28,29,30]. Diante do exposto, faz-se necessário um maior entendimento da ação do estrógeno via ativação da amphiregulin no câncer de mama para que possa haver uma contribuição com futuras alternativas aos tratamentos já existentes. Para isso, o objetivo desse trabalho foi determinar a via pela qual o estrógeno induz a expressão gênica de amphiregulin em linhagens celulares de carcinoma de mama.

Materiais e Métodos

Reagentes

Meio de cultura RPMI 1640, soro fetal bovino (FBS) e solução de antibiótico - 100X foram adquiridos da Gibco BRL (Grand Island, NY, EUA). Actinomicina D (ACT D); ciclohexamida (CHX), Fulvestrant (ICI 182,780), triiodotironina (T3), LY294002 (LY), dimetilsulfóxido (DMSO), hidróxido de sódio (NaOH) e Charcoal Stripped FBS foram adquiridos da Sigma Aldrich (St Louis, MO, EUA).

Delineamento Experimental

Células MCF-7 e MDA-MB-231, que expressam ou não ER, respectivamente, foram cultivadas em meio RPMI 1640, pH 7,4, suplementado com NaHCO₃ (1,2 g / L), HEPES (10 nM) e 10 % de FBS, e mantidas a 37 °C em 5% de CO₂. Antes de iniciar os tratamentos, o meio de cultura foi substituído por meio isento de vermelho de fenol e

com 10% de Charcoal Stripped FBS, para eliminar todas as fontes hormonais existentes no meio. Após incubação por 18 horas, as células foram tratadas com E2 (10^{-7} M) durante 10 e 30 minutos, 1 e 4 horas, na ausência ou presença dos inibidores ICI (1 μ M), ACTD (5,0 pg / ml), CHX (50 μ M) ou LY294002 (50 μ M). O grupo controle (C) não tratado recebeu apenas quantidades equivalentes do diluente (NaOH) utilizado, nos mesmos tempos utilizados para os tratamentos. Os inibidores LY294002 e CHX foram adicionados ao meio 1 h antes do tratamento com E2. Os experimentos foram realizados em triplicata.

O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (n° CEP 3367-2009-C).

Análise da Expressão Gênica

O RNA total foi extraído a partir de células MCF- 7 e de células MDA-MB-231 pelo método de Trizol (Invitrogen, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. O kit High Capacity cDNA de transcrição reversa para qRT-PCR® (Applied, Life Technologies) foi utilizado para a síntese de 20 μ l de DNA complementar (cDNA) a partir de 1000 ng de RNA total. Os níveis de *AREG* (Hs 00950669_m1, Applied Biosystems) foram determinados por qRT-PCR. As medições quantitativas foram realizadas no sistema de detecção "Applied Biosystems StepOne Plus" utilizando o kit comercial TaqMan para qPCR (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. As condições de amplificação foram como se segue: ativação da enzima a 50 °C durante 2 min, desnaturação a 95 °C durante 10 minutos, os produtos de cDNA foram amplificadas durante 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 15s e a extensão a 60 °C durante 1 min. Os experimentos foram realizados em duplicata. A expressão gênica foi quantificada em relação aos valores do grupo C, após normalização por um controle interno, o GAPDH (Hs02758991_g1), pelo método $^{-\Delta\Delta C_t}$, como descrito anteriormente.

Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado ANOVA complementado com teste de Tukey e adotado significância mínima de 5%. Os dados foram expressos em média e desvio padrão.

Resultados

Células de carcinoma de mama MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com E2 aumentaram significativamente a expressão gênica de *AREG* em todos os tempos de tratamento (figura 1).

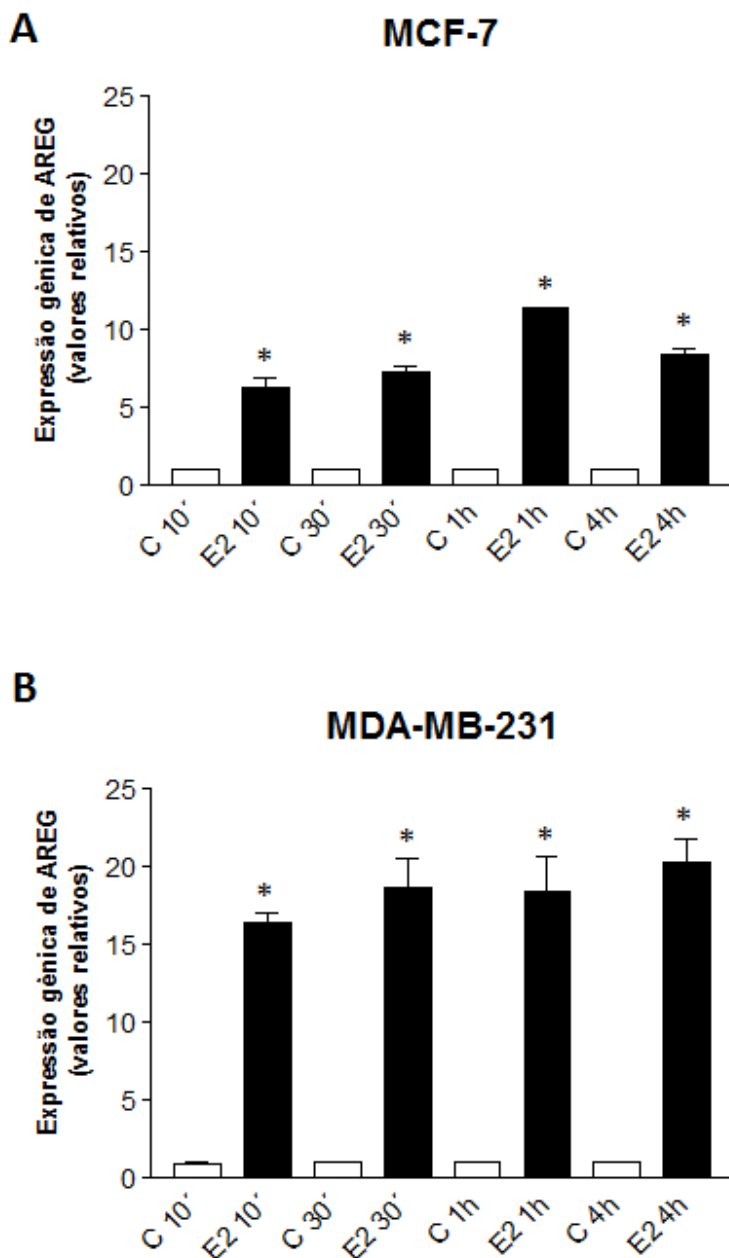


Figura 1. Efeito do estrógeno sobre a expressão gênica de RNAm de amphiregulin em células MCF-7 e MDA-MB-231. As células foram tratadas com veículo (C, Controle) ou Estrógeno (E2) durante 10 minutos (A), 30 minutos (B), 1 hora (C) e 4 horas (D). O RNAm total das células foi extraído pelo método de Trizol e a análise do RNAm de *AREG* foi realizada através de qRT-PCR. Os dados foram expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizado ANOVA complementado por teste de Tukey. * $p < 0,01$ em relação ao controle.

Para analisar a participação do ER na indução da expressão gênica de *AREG* por E2, as células MCF-7 foram tratadas com inibidor de ER (ICI). Também foram utilizados inibidores de transcrição (ACTD), de síntese proteica (CHX) e inibidor da via PI3K (LY). A expressão gênica de *AREG* induzida por E2 após 10 minutos de tratamento foi parcialmente bloqueada por ICI (figura 2A). Esse efeito foi parcialmente dependente da síntese de RNAm e totalmente dependente de síntese proteica prévia, pois o uso de CHX bloqueou totalmente o efeito do E2 sobre a expressão de *AREG*. Em relação à via PI3K, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão gênica de *AREG* quando esta via foi bloqueada pelo LY por 10 minutos.

Quando as células MCF-7 foram tratadas durante 30 minutos com E2 associado ao ICI, a expressão gênica de *AREG* foi muito semelhante à expressão do gene induzido por E2 (figura 2B). O uso do ACTD concomitantemente ao E2 bloqueou parcialmente a expressão gênica de *AREG*, enquanto que o uso do CHX associado ao E2 bloqueou totalmente a expressão do gene alvo. Após 30 minutos de tratamento, a associação do LY ao E2 não promoveu alteração significativa em relação aos níveis de expressão de *AREG* nas células MCF-7 (figura 2B).

A partir de 1 hora de tratamento, o uso do ICI bloqueou parcialmente a expressão de *AREG* induzida por E2 (figuras 2C e 2D). Além disso, em ambos os tempos mais longos de tratamento (1 e 4 h) não houve inibição da expressão do gene alvo induzido por E2, quando este hormônio foi associado ao ACTD. Entretanto, conforme também observado nos tempos mais curtos (10 e 30 minutos), a associação de CHX com E2 bloqueou completamente a expressão de *AREG* induzida por E2 após 1 e 4 horas de tratamento (figuras 2C e 2D). Surpreendentemente, a ação do E2 sobre a expressão gênica de *AREG* foi inibida parcialmente quando utilizou-se concomitantemente o LY (figuras 2C e 2D).

O uso dos inibidores isoladamente não mostrou diferença estatisticamente significativa na expressão gênica de *AREG* em relação aos controles não tratados em nenhum dos tempos estudados (dados não mostrados).

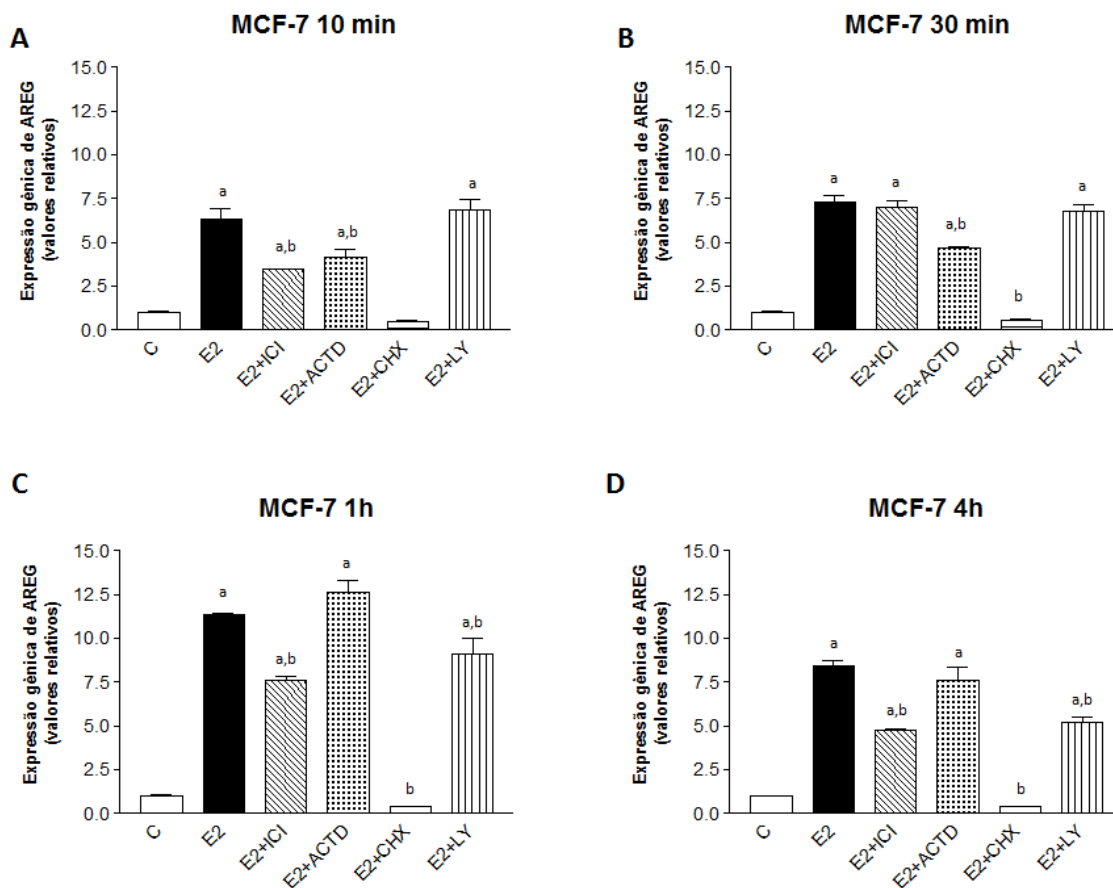


Figura 2. Efeito do estrogênio sobre a indução de RNAm de AREG via ER em células MCF-7. Células MCF-7 foram tratadas com veículo (C, Controle) ou Estrógeno (E2) isoladamente ou em associação com Fulvestrant (ICI), Actinomicina D (ACTD), Ciclohexamida (CHX) ou LY (inibidor da via PI3K) durante 10 ou 30 minutos, 1 ou 4 horas. O RNAm total foi extraído das células pelo método de trizol e a expressão de AREG foi analisada por qRT-PCR. Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizado ANOVA complementado por teste de Tukey. ^a $p < 0,05$, em relação ao controle (C); ^b $p < 0,05$, em relação ao E2.

Buscando avaliar a importância da participação do ER no mecanismo de ação do E2 sobre a expressão gênica de *AREG*, utilizamos as células MDA-MB-231, que não apresentam o ER. Estas células foram tratadas concomitantemente ao E2 com inibidor de ER (ICI), inibidor de transcrição (ACTD), inibidor de síntese proteica (CHX) e inibidor da via PI3K (LY) durante 10 ou 30 minutos, 1 ou 4 horas.

Foram observados, em todos os tempos utilizados, efeitos similares sobre o mecanismo de ação do E2 na expressão gênica de *AREG* em células MDA-MB-231 (figura 3). Houve um aumento da expressão de *AREG* em todos os tempos (figura 1B) e, conforme esperado, o uso do inibidor de ER (ICI) associado ao E2 não induziu alteração

significativa na expressão do gene alvo, já que as células MDA-MB-231 não apresentam tal receptor (ER-).

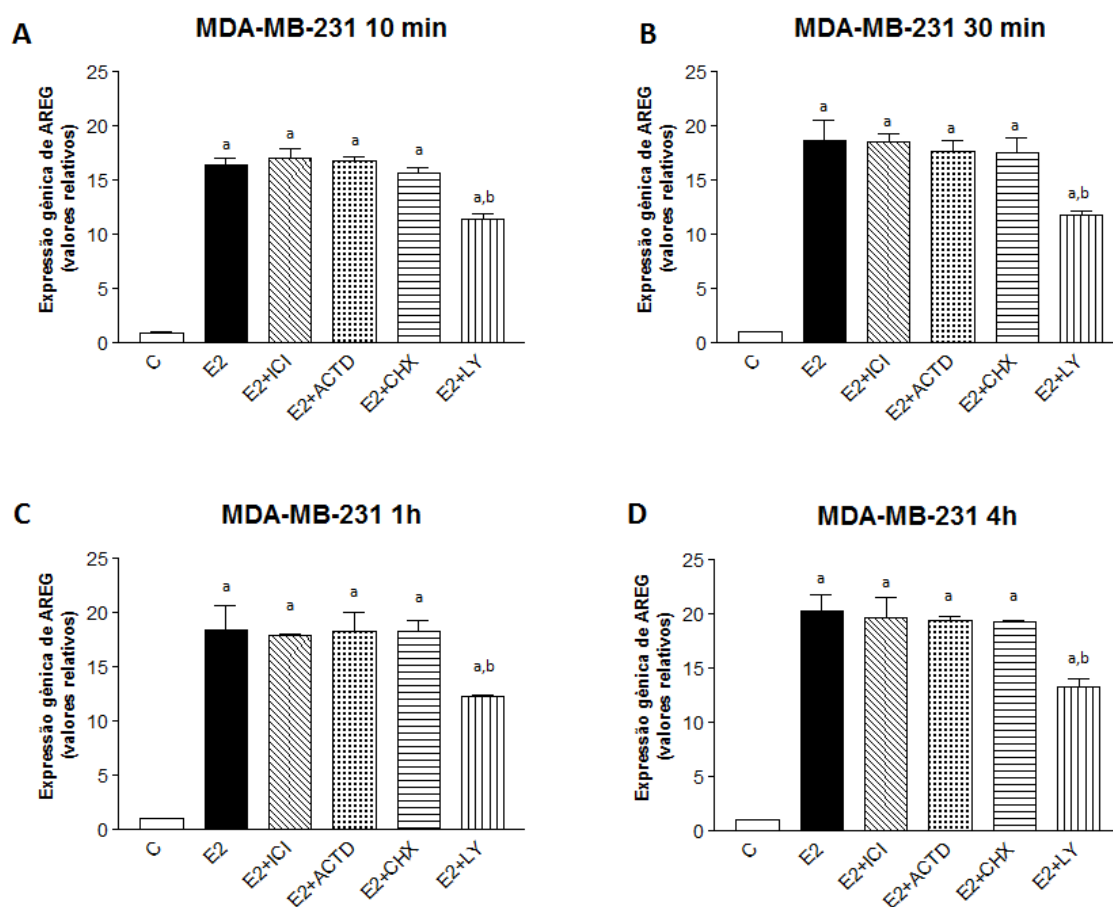


Figura 3. Efeito do estrógeno sobre a expressão gênica de AREG em células MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 foram tratadas com veículo (C, Controle) ou Estrógeno (E2) isoladamente ou em associação com Fulvestrant (ICI), Actinomicina D (ACTD), Ciclohexamida (CHX) ou LY (inibidor da via PI3K) durante 10 ou 30 minutos, 1 ou 4 horas. O RNAm total foi extraído das células pelo método de trizol e a expressão de AREG foi analisada por qRT-PCR. Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizado ANOVA complementado por teste de Tukey. ^a $p < 0,05$, em relação ao controle (C); ^b $p < 0,05$, em relação ao E2.

O uso do ACTD associado ao E2 não inibiu o aumento da expressão de *AREG* induzido por E2 em nenhum dos tempos analisados. Também não foi observada inibição de *AREG* mediante uso do CHX concomitantemente ao E2 em todos os tempos (figura 3). Diferentemente do ocorrido nas células MCF-7, nas células MDA-MB-231, a associação do LY ao E2 bloqueou parcialmente a expressão de *AREG* em todos os tempos analisados (figura 3).

Assim como nas células MCF-7, o uso dos inibidores isoladamente em células MDA-MB-231 não mostrou diferença estatisticamente significativa na expressão gênica de *AREG* em relação aos controles não tratados (dados não mostrados).

Discussão

O tratamento de células de câncer de mama positivas (MCF-7, ER+) [31,32] ou negativas (MDA-MB-231, ER-) [32] para o ER induziu a expressão gênica de *AREG* independentemente da ligação do E2 com seu receptor. Já foi demonstrado que o E2 é capaz de induzir a expressão de *AREG* [33], e esse aumento ocorre tanto nos níveis de RNAm, como da proteína [34]. Dados da literatura confirmam a capacidade do E2 em induzir a expressão de *AREG* via ER [7,34], porém, em nosso trabalho foi possível observar que mesmo em células que não apresentam o receptor de estrogênio houve aumento de *AREG*, sendo esse aumento superior nestas células ER- (em torno de 10 vezes) em relação às células que possuem o ER. Além disso, mesmo nas células positivas para ER, quando este receptor foi inibido não houve um bloqueio completo da expressão gênica de *AREG* induzida por E2, demonstrando que, apesar de ser importante para este efeito nas células MCF-7, a ligação do E2 com o ER não é o único mecanismo existente para esse aumento de expressão. Estudos têm evidenciado que o hormônio estrogênio pode atuar por vias alternativas àquelas dependentes dos receptores nucleares clássicos [35,36,37,38,39].

Essa indução da expressão gênica de *AREG* foi observada nos dois tipos celulares e em todos os tempos utilizados. Nas células MDA-MB-231 (ER-) houve um comportamento semelhante em todos os tempos, sendo que o uso associado do E2 com os inibidores ACTD ou CHX não induziu nenhuma mudança significativa nos níveis de expressão de *AREG* induzido por E2. Isso mostra que o E2 mantém estável o RNAm de *AREG* presente antes do tratamento quando há a inibição da transcrição. Esse efeito indica que essa expressão observada é independente da síntese prévia de RNAm, já que o ACTD é um inibidor da síntese gênica, e que essa expressão de *AREG* também é independente da síntese proteica prévia, pois o uso do CHX, um inibidor de síntese proteica, não provocou mudanças significativas na expressão do gene alvo. Portanto, a ação do E2 nas células MDA-MB-231 ocorre pela via não clássica de sinalização e de maneira direta, ou seja, sem a necessidade de síntese proteica para que o hormônio exerça seu efeito.

Nas células MCF-7 (ER+), o aumento da expressão gênica de *AREG* induzido por E2 foi parcialmente bloqueado pelo uso concomitante do ICI em todos os tempos de tratamento, com exceção do tempo de 30 minutos, tempo este que parece ser um momento de transição na sinalização celular nas condições observadas. Dados da literatura demonstram que o ER realiza ambas as funções: clássica (nuclear) e não clássica (extranuclear), com padrões diferentes de expressão gênica [40]. O bloqueio parcial observado no nosso trabalho sugere que o E2 age não somente pela ligação do hormônio com seu receptor (ação clássica), mas também através da via não clássica. Portanto, em curto período de tempo (10 minutos), o estrógeno induziu a expressão gênica de *AREG* por, pelo menos, duas vias de sinalização diferentes, sendo todas diretas, pois dependem da síntese proteica prévia, como pode ser observado pela inibição completa da expressão de *AREG* pelo uso conjunto do CHX e E2. Estudos recentes têm indicado que a rápida sinalização extranuclear de ER em células de câncer de mama promove reorganização do citoesqueleto e migração celular [41]. Já foi demonstrado que o ER pode agir também independentemente de ação nuclear, elucidando que o pool de receptores localizados na membrana plasmática, e não o receptor de esteroides nuclear, inicia uma via de sinalização rápida [42].

Para ER, vários receptores foram descritos em células neurais, incluindo um que está presente no camundongo *knockout* ER α /ER β combinado (KO) [43,44]. Estas proteínas não foram isoladas, de modo que a natureza destes receptores não é clara. Uma proteína, GPR30, tem sido proposta como receptor de estrogênio (ER) [45,46]. GPR30 foi localizado na membrana plasmática de células [45] ou no retículo endoplasmático [46], onde tem sido relatado para mediar a sinalização via PI3K e de cálcio, e tem sido proposto para mediar a ação do estrogênio como um receptor de esteroides. Em algumas circunstâncias, o GPR30 poderia contribuir para a sinalização rápida global de E2/ER na membrana plasmática, como parte de um grande complexo de sinalização [47]. Muitos trabalhos têm sido publicados sobre esta proteína, com o consenso que GPR30 colabora com ER α clássico localizado na membrana e muitas outras proteínas para efeito de transdução de sinal em alguns tipos de células. No entanto, não há muitas evidências de que esta proteína age como um ER sozinha [48]. Além disso, estudos evidenciaram que E2 mostra mínima ligação ao GPR30 e a transdução de sinal é bastante modesta [49]. Estudos em células de camundongos KO ER α /ER β negativas não apresentaram resposta ao E2, apesar da presença de GPR30.

Assim, a maioria das funções biológicas não foi influenciada pela perda de função de GPR30.

Uma das vias induzida por E2 para a expressão de *AREG* nas células MCF-7 tratadas por curto período não depende da expressão gênica prévia, já que o uso do inibidor de transcrição (ACTD) inibiu parcialmente a expressão de amphiregulin, mas não totalmente. Dados da literatura demonstram que a sinalização por receptores de esteroides extranucleares tem sido cada vez mais mostrada, resultando em ambas as ações transcrição-dependente e independente [50]. É importante ressaltar que muitos conceitos e caminhos descritos neste sistema de sinalização esteroide independente de transcrição implicam em sistemas mais complexos, onde a sinalização esteroide clássica e não clássica ocorrem simultaneamente [50]. Respostas rápidas aos hormônios esteroides são conhecidas há 60 anos, mas a natureza dos receptores que medeiam estas respostas só foi identificada mais recentemente, como os grupos de receptores localizados na membrana plasmática [48]. Em adição aos receptores esteroides clássicos (REs) identificados em células alvo, novos candidatos de proteínas têm sido propostos como REs em uma ampla variedade de modelos [40]. Assim, o sinal na membrana plasmática das várias células-alvo para a ação do hormônio esteroide compreende variadas e múltiplas proteínas, por vezes incluindo GPCRs (proteínas G acopladas a receptores) típicos, receptores do fator de crescimento e receptores clássicos de esteroides [40].

Nos tempos mais longos de tratamento (1 e 4 horas) ainda há pelo menos duas vias de sinalização que são ativadas para que ocorra o aumento da expressão de *AREG*, já que a inibição do ER não é suficiente para bloquear totalmente os efeitos do E2 sobre a expressão do gene alvo. Isso indica que o E2 continua agindo de duas formas, uma com a ligação do ER e a outra independentemente desta ligação. Portanto, a partir de uma hora de tratamento, o ER volta a ser importante para a expressão gênica de *AREG* em células ER+. Dados da literatura evidenciam que o ICI possui a capacidade de diminuir a fosforilação de ER, diminuindo, portanto, sua ação [51]. Diferentemente de outros fármacos que possuem como alvo o ER, o ICI age como um antagonista puro do estrógeno em seus receptores intracelulares, sem apresentar qualquer efeito agonista sobre esses receptores [52].

Vários estudos tem demonstrado *cross talk* entre a via da MAPK e ER, como por exemplo, quando ER ativa a via da MAPK por mecanismos não clássicos e a MAPK pode mediar modificações pós-translacionais do ER e seus correguladores,

influenciando a atividade e a sensibilidade do ER em células de câncer de mama ER+ na terapia endócrina [53]. Também está bem documentada a existência de *cross talk* entre o EGFR e ER de uma maneira bidirecional em células de câncer de mama via funções nucleares e não nucleares de ER, de uma forma dependente ou independente de E2 [54,55].

Uma das grandes diferenças entre os tempos mais curtos (10 e 30 minutos) e os mais longos (1 e 4 horas) de tratamento com E2, é que contatos prolongados das células MCF-7 com o E2 induzem vias de sinalização que são independentes de ação nuclear, pois o uso de ACTD não modifica os níveis de expressão de *AREG*.

Outra diferença encontrada foi que, a partir de 1 hora de tratamento, a via PI3K torna-se necessária para uma parcela da expressão gênica de *AREG*, pois o tratamento de células MCF-7 com LY associado ao E2 diminui a expressão atingida pelo hormônio E2, embora ainda mantenha seus níveis elevados em relação ao controle. Entretanto, esta não é a única via de ativação que leva à expressão do gene alvo, já que o uso do LY não bloqueou totalmente a expressão de *AREG*. Sua ativação observada somente a partir de 1 hora pode ser explicada pela complexa cascata de sinalização que a via PI3K dispara ao ser acionada pelo hormônio estrogênio, podendo ativar tanto a cascata de sinalização por PI3K/AKT como PI3K/JNK, ou ainda depender da interação com outras vias de sinalização, como a própria MAPK/MEK ou receptores de fatores de crescimento [56], no entanto a sinalização por MAPK através do E2 já foi demonstrada a partir de 5 minutos de tratamento [57], inclusive com aumento de expressão gênica em apenas 15 minutos [58]. Também já foi demonstrado na literatura que *AREG* regula a ativação de ERK e Akt através do receptor do fator de crescimento epidérmico e HER3 em células de câncer de pâncreas [59], demonstrando a participação de *AREG* na ativação da via da MAPK. Além disso, foi demonstrado que o E2 induz a atividade da phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) em células de câncer de mama MCF-7 [60,61].

No câncer de mama, frequentemente ocorre aumento da expressão ou mutação da família do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e ER, que são capazes de ativar a via PI3K/Akt/mTOR, a qual está associada clinicamente a cânceres de pior prognóstico [62,63]. Também foi observada a formação de heterodímero mediada por HER3, e isso foi relatado como estando envolvido na aquisição de comportamento agressivo de células de câncer de pâncreas pela via de sinalização do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) / Akt [64].

É bem estabelecida na literatura a importância da *AREG* no câncer de mama. Portanto, esclarecer os mecanismos envolvidos na invasão e migração celular induzida pela *AREG* é crítico, já que a sinalização desregulada desse gene pode desempenhar um papel essencial na progressão do câncer [18].

Conclusões

O tratamento de linhagens de células tumorais mamárias com estrógeno é capaz de induzir a expressão de *AREG* em linhagens de células de câncer de mama de maneira dependente e independente de ER. Essa indução de expressão ocorre de maneira diferente nos diferentes tipos celulares e, em células MCF-7 (ER+), esse mecanismo também depende do tempo de contato com o E2.

Em células positivas para o receptor de estrógeno, o tratamento rápido com E2 foi capaz de induzir a expressão de *AREG* pela via nuclear e extranuclear, enquanto que em tratamentos mais longos (após 1 hora), somente a via extranuclear foi evidenciada. Também foi evidenciado que a via PI3K passa a ser ativada após 1 hora de tratamento com estrógeno.

Apesar da ausência do ER nas células MDA-MB-231, o estrógeno também induziu a expressão de *AREG* nestas células. Essa indução ocorreu pelo mesmo mecanismo em todos os tempos analisados, onde foi evidenciada uma via extranuclear de ação, com ativação da via de sinalização PI3K.

Estudos posteriores são necessários para elucidar melhor o mecanismo de ação ER-dependente e ER-independente do E2 na expressão gênica de *AREG*.

REFERÊNCIAS

1. Jensen EV, Cheng G, Palmieri C, Saji S, Makela S, et al. (2001) Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15197-15202.
2. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, et al. (2007) The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med* 356: 1670-1674.
3. Enmark E, Gustafsson JA (1999) Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med* 246: 133-138.
4. Osborne CK, Fuqua SA (1994) Mechanisms of tamoxifen resistance. *Breast Cancer Res Treat* 32: 49-55.
5. Hall LC, Salazar EP, Kane SR, Liu N (2008) Effects of thyroid hormones on human breast cancer cell proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109: 57-66.
6. Conde SJ, Luvizotto RA, Sibio MT, Katayama ML, Brentani MM, et al. (2008) Tamoxifen inhibits transforming growth factor-alpha gene expression in human breast carcinoma samples treated with triiodothyronine. *J Endocrinol Invest* 31: 1047-1051.
7. Troyer KL, Lee DC (2001) Regulation of mouse mammary gland development and tumorigenesis by the ERBB signaling network. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6: 7-21.
8. Busser B, Sancey L, Brambilla E, Coll JL, Hurbin A (2011) The multiple roles of amphiregulin in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1816: 119-131.
9. LaMarca HL, Rosen JM (2007) Estrogen regulation of mammary gland development and breast cancer: amphiregulin takes center stage. *Breast Cancer Res* 9: 304.
10. Saeki T, Stromberg K, Qi CF, Gullick WJ, Tahara E, et al. (1992) Differential immunohistochemical detection of amphiregulin and cripto in human normal colon and colorectal tumors. *Cancer Res* 52: 3467-3473.
11. Ciardiello F, Tortora G (1998) Interactions between the epidermal growth factor receptor and type I protein kinase A: biological significance and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 4: 821-828.
12. Kenney NJ, Smith GH, Maroulakou IG, Green JH, Muller WJ, et al. (1996) Detection of amphiregulin and Cripto-1 in mammary tumors from transgenic mice. *Mol Carcinog* 15: 44-56.
13. Normanno N, Ciardiello F, Brandt R, Salomon DS (1994) Epidermal growth factor-related peptides in the pathogenesis of human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 29: 11-27.
14. Normanno N, Kim N, Wen D, Smith K, Harris AL, et al. (1995) Expression of messenger RNA for amphiregulin, heregulin, and cripto-1, three new members of the epidermal growth factor family, in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 35: 293-297.
15. Panico L, D'Antonio A, Salvatore G, Mezza E, Tortora G, et al. (1996) Differential immunohistochemical detection of transforming growth factor alpha, amphiregulin and CRIPTO in human normal and malignant breast tissues. *Int J Cancer* 65: 51-56.
16. Qi CF, Liscia DS, Normanno N, Merlo G, Johnson GR, et al. (1994) Expression of transforming growth factor alpha, amphiregulin and cripto-1 in human breast carcinomas. *Br J Cancer* 69: 903-910.
17. Eckstein N, Servan K, Girard L, Cai D, von Jonquieres G, et al. (2008) Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells. *J Biol Chem* 283: 739-750.
18. Willmarth NE, Ethier SP (2008) Amphiregulin as a novel target for breast cancer therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13: 171-179.
19. Addison CL, Ding K, Zhao H, Le Maitre A, Goss GD, et al. (2010) Plasma transforming growth factor alpha and amphiregulin protein levels in NCIC Clinical Trials Group BR.21. *J Clin Oncol* 28: 5247-5256.
20. Ishikawa N, Daigo Y, Takano A, Taniwaki M, Kato T, et al. (2005) Increases of amphiregulin and transforming growth factor-alpha in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 65: 9176-9184.
21. Ma L, Gauville C, Berthois Y, Degeorges A, Millot G, et al. (1998) Role of epidermal-growth-factor receptor in tumor progression in transformed human mammary epithelial cells. *Int J Cancer* 78: 112-119.
22. Ma L, Gauville C, Berthois Y, Millot G, Johnson GR, et al. (1999) Antisense expression for amphiregulin suppresses tumorigenicity of a transformed human breast epithelial cell line. *Oncogene* 18: 6513-6520.
23. Salomon DS, Normanno N, Ciardiello F, Brandt R, Shoyab M, et al. (1995) The role of amphiregulin in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 33: 103-114.

24. McBryan J, Howlin J, Napoletano S, Martin F (2008) Amphiregulin: role in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13: 159-169.
25. Lamber EP, Horwitz AA, Parvin JD (2010) BRCA1 represses amphiregulin gene expression. *Cancer Res* 70: 996-1005.
26. Brunelli E, Pinton G, Chianale F, Graziani A, Appendino G, et al. (2009) 8-Prenylnaringenin inhibits epidermal growth factor-induced MCF-7 breast cancer cell proliferation by targeting phosphatidylinositol-3-OH kinase activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 113: 163-170.
27. Cui X, Kim HJ, Kuitatse I, Kim H, Brown PH, et al. (2006) Epidermal growth factor induces insulin receptor substrate-2 in breast cancer cells via c-Jun NH(2)-terminal kinase/activator protein-1 signaling to regulate cell migration. *Cancer Res* 66: 5304-5313.
28. Kato M, Inazu T, Kawai Y, Masamura K, Yoshida M, et al. (2003) Amphiregulin is a potent mitogen for the vascular smooth muscle cell line, A7r5. *Biochem Biophys Res Commun* 301: 1109-1115.
29. Lange CA, Richer JK, Shen T, Horwitz KB (1998) Convergence of progesterone and epidermal growth factor signaling in breast cancer. Potentiation of mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 273: 31308-31316.
30. Qin L, Partridge NC (2005) Stimulation of amphiregulin expression in osteoblastic cells by parathyroid hormone requires the protein kinase A and cAMP response element-binding protein signaling pathway. *J Cell Biochem* 96: 632-640.
31. Brandes LJ, Hermonat MW (1983) Receptor status and subsequent sensitivity of subclones of MCF-7 human breast cancer cells surviving exposure to diethylstilbestrol. *Cancer Res* 43: 2831-2835.
32. Engel LW, Young NA (1978) Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review. *Cancer Res* 38: 4327-4339.
33. Aupperlee MD, Leipprandt JR, Bennett JM, Schwartz RC, Haslam SZ (2013) Amphiregulin mediates progesterone-induced mammary ductal development during puberty. *Breast Cancer Res* 15.
34. Martinez-Lacaci I, Saceda M, Plowman GD, Johnson GR, Normanno N, et al. (1995) Estrogen and phorbol esters regulate amphiregulin expression by two separate mechanisms in human breast cancer cell lines. *Endocrinology* 136: 3983-3992.
35. Chambliss KL, Simon L, Yuhanna IS, Mineo C, Shaul PW (2005) Dissecting the basis of nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estradiol: role of ERalpha domains with known nuclear functions. *Mol Endocrinol* 19: 277-289.
36. Filardo EJ, Thomas P (2005) GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrinol Metab* 16: 362-367.
37. Lu Q, Pallas DC, Surks HK, Baur WE, Mendelsohn ME, et al. (2004) Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 17126-17131.
38. Russell KS, Haynes MP, Sinha D, Clerisme E, Bender JR (2000) Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5930-5935.
39. Schlegel A, Wang C, Pestell RG, Lisanti MP (2001) Ligand-independent activation of oestrogen receptor alpha by caveolin-1. *Biochem J* 359: 203-210.
40. Levin ER (2011) Minireview: Extranuclear steroid receptors: roles in modulation of cell functions. *Mol Endocrinol* 25: 377-384.
41. Chakravarty D, Nair SS, Santhamma B, Nair BC, Wang L, et al. (2010) Extranuclear functions of ER impact invasive migration and metastasis by breast cancer cells. *Cancer Res* 70: 4092-4101.
42. Razandi M, Alton G, Pedram A, Ghonshani S, Webb P, et al. (2003) Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Mol Cell Biol* 23: 1633-1646.
43. Qiu J, Bosch MA, Tobias SC, Grandy DK, Scanlan TS, et al. (2003) Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C. *J Neurosci* 23: 9529-9540.
44. Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, et al. (2002) ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J Neurosci* 22: 8391-8401.
45. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR, Jr. (2000) Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* 14: 1649-1660.
46. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307: 1625-1630.

47. Sukocheva O, Wadham C, Holmes A, Albanese N, Verrier E, et al. (2006) Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1. *J Cell Biol* 173: 301-310.
48. Levin ER (2009) Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 20: 477-482.
49. Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J (2005) Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146: 624-632.
50. Hammes SR, Levin ER (2011) Minireview: Recent advances in extranuclear steroid receptor actions. *Endocrinology* 152: 4489-4495.
51. Zhang X, Diaz MR, Yee D (2013) Fulvestrant regulates epidermal growth factor (EGF) family ligands to activate EGF receptor (EGFR) signaling in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 139: 351-360.
52. Wakeling AE, Dukes M, Bowler J (1991) A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res* 51: 3867-3873.
53. Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK, et al. (2004) Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clin Cancer Res* 10: 331S-336S.
54. Schiff R, Osborne CK (2005) Endocrinology and hormone therapy in breast cancer: new insight into estrogen receptor-alpha function and its implication for endocrine therapy resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res* 7: 205-211.
55. Arpino G, Wiechmann L, Osborne CK, Schiff R (2008) Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocr Rev* 29: 217-233.
56. Dos Santos EG, Dieudonne MN, Pecquery R, Le Moal V, Giudicelli Y, et al. (2002) Rapid nongenomic E2 effects on p42/p44 MAPK, activator protein-1, and cAMP response element binding protein in rat white adipocytes. *Endocrinology* 143: 930-940.
57. Zhang Z, Wang L, Mei M, Zhu Y, Du X, et al. (2010) Both nongenomic and genomic effects are involved in estradiol's enhancing the phenotype of smooth muscle cells in cultured prostate stromal cells. *Prostate* 70: 317-332.
58. de Jager T, Pelzer T, Muller-Botz S, Imam A, Muck J, et al. (2001) Mechanisms of estrogen receptor action in the myocardium. Rapid gene activation via the ERK1/2 pathway and serum response elements. *J Biol Chem* 276: 27873-27880.
59. Yotsumoto F, Fukami T, Yagi H, Funakoshi A, Yoshizato T, et al. (2010) Amphiregulin regulates the activation of ERK and Akt through epidermal growth factor receptor and HER3 signals involved in the progression of pancreatic cancer. *Cancer Sci* 101: 2351-2360.
60. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, et al. (2000) Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407: 538-541.
61. Sun M, Paciga JE, Feldman RI, Yuan Z, Coppola D, et al. (2001) Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and PI3K. *Cancer Res* 61: 5985-5991.
62. Boulay A, Rudloff J, Ye J, Zumstein-Mecker S, O'Reilly T, et al. (2005) Dual inhibition of mTOR and estrogen receptor signaling in vitro induces cell death in models of breast cancer. *Clin Cancer Res* 11: 5319-5328.
63. Yu K, Toral-Barza L, Discafani C, Zhang WG, Skotnicki J, et al. (2001) mTOR, a novel target in breast cancer: the effect of CCI-779, an mTOR inhibitor, in preclinical models of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 8: 249-258.
64. Sergina NV, Rausch M, Wang D, Blair J, Hann B, et al. (2007) Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* 445: 437-441.

2. CONCLUSÕES

O tratamento de linhagens de células tumorais mamárias com estrógeno é capaz de induzir a expressão de AREG em linhagens de células de câncer de mama de maneira dependente e independente de ER. Essa indução de expressão ocorre de maneira diferente nos diferentes tipos celulares e, em células MCF-7 (ER+), esse mecanismo também depende do tempo de contato com o E2.

Em células positivas para o receptor de estrógeno, o tratamento rápido com E2 foi capaz de induzir a expressão de AREG pela via nuclear e extranuclear, enquanto que em tratamentos mais longos (após 1 hora), somente a via extranuclear foi evidenciada. Também foi evidenciado que a via PI3K passa a ser ativada após 1 hora de tratamento com estrógeno.

Apesar da ausência do ER nas células MDA-MB-231, o estrógeno também induziu a expressão de AREG nestas células. Essa indução ocorreu pelo mesmo mecanismo em todos os tempos analisados, onde foi evidenciada uma via extranuclear de ação, com ativação da via de sinalização PI3K.

Estudos posteriores são necessários para elucidar melhor o mecanismo de ação ER-dependente e ER-independente do E2 na expressão gênica de AREG.