



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**Desenvolvimento de uma nova estratégia terapêutica para cancro da mama, envolvendo a acção combinada de terapia génica e quimioterapia.**

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, realizada sob a orientação científica do Doutor Henrique Manuel dos Santos Faneca (Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra) e da Professora Doutora Maria da Conceição Pedroso de Lima (Universidade de Coimbra).

Gabriela de Jesus Leão Pereira dos Santos

---

2013

## **AGRADECIMENTOS**

### **Ao Dr. Henrique Faneca e à Professora Conceição Pedroso de Lima**

Gostaria de dedicar um agradecimento muito especial por me terem recebido no grupo de investigação e terem acreditado no projecto proposto. O apoio, incentivo e confiança com que me acompanharam ao longo do Mestrado contribuíram decisivamente para a minha formação científica e desenvolvimento pessoal. Por tudo, lhes estou muito grata.

### **Ao Dr. Paulo Oliveira**

Um agradecimento muito especial pela disponibilidade com que sempre me recebeu para esclarecer as mais diversas dúvidas e sabiamente contribuir com excelentes sugestões que em muito enriqueceram este trabalho; bem como pela prontidão com que disponibilizou elementos e recursos do seu grupo para a realização de alguns protocolos durante o meu percurso.

### **Ao Professor António Moreno**

Gostaria de dedicar um agradecimento muito especial pelo apoio generalizado que me prestou ao longo da minha Licenciatura e Mestrado e pela amizade que sempre demonstrou e a qual prezo muito.

### **À Professora Emília Duarte**

Muito obrigada por continuar a proporcionar um nível de excelência na formação dos alunos do Mestrado de Biologia Celular e Molecular.

### **Aos colegas do Grupo de Vectores e Terapia Génica**

Pela ajuda e por todos os momentos de boa disposição, partilhados ao longo deste período. Em especial, gostaria de agradecer à Marta Passadouro por me ter recebido e

introduzido à prática no laboratório e pelo seu carinho, à Ana Luísa Cardoso e ao Pedro Costa pelo auxílio e pelas interessantes discussões e sugestões que contribuíram bastante para este trabalho. São para mim uma referência como pessoas e jovens cientistas. Gostaria também de agradecer ao Clévio Nóbrega e à Isabel Onofre pelos sábios truques que me transmitiram sobre produção bacteriana. Ao Nuno Fonseca, estou muito grata por generosamente ter partilhado comigo a sua experiência com as linhas celulares que usei neste trabalho. Por fim, à Dina Farinha e à Mariana Magalhães, obrigada pelo companheirismo.

### **Aos amigos**

À Cátia Diogo, a amiga de sempre, um agradecimento grande pelo apoio e ajuda que sempre me dedicou durante o percurso académico e pela caminhada de mão dada comigo, como uma verdadeira irmã. À Lucie, estou grata pela amizade, companheirismo, apoio e carinho. Ana Maria Silva, Cláudia Pereira, Ana Carolina Moreira, Teresa Serafim, Susana Pereira e Vilma Sardão, pelo vosso apoio, carinho e ajuda profissional que me prestaram sempre que as procurei, muito obrigada.

### **À família**

Aos meus pais, Óscar e Rosa Maria, e ao meu irmão, Paulo, dedico um agradecimento profundo pelo apoio, retidão, educação, confiança e esforço com que sempre me orientaram. A pessoa que sou é obra do nosso amor incondicional presente todos os dias das nossas vidas. Ao Henrique Rocha, meu melhor amigo que partilha comigo a sua vida e o seu amor, um agradecimento muito especial pela compreensão, apoio e carinho. Obrigada pela partilha e por estares sempre presente.

Esta tese é-vos dedicada.

## ÍNDICE

RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	7
PALAVRAS-CHAVE .....	11
SECÇÃO 1 .....	13
Introdução.....	13
1.1    Cancro .....	15
1.1.1    Biologia do cancro .....	15
1.1.1.1    Danos e mutações do DNA conduzem a carcinogénese e o destino do cancro .	16
1.1.1.2    Vias gerais de desenvolvimento do cancro.....	17
1.1.2    Incidência e taxa de mortalidade mundiais associadas ao cancro .....	23
1.2    Cancro da mama.....	26
1.2.1    Incidência e alguns factores de risco .....	30
1.2.2    Alguns tratamentos comuns para cancro da mama .....	33
1.3    Terapia génica.....	36
1.3.1    Métodos em terapia génica .....	38
1.3.1.1    Lipossomas catiónicos e lipoplexos .....	41
1.3.1.2    Interacção lipoplexo/célula e mecanismos de internalização.....	44
1.3.1.3    A fuga do lipoplexo à via endocítica .....	47
1.3.1.4    Entrada do material genético no núcleo.....	48
1.3.2    Terapia génica e cancro da mama .....	48
1.4    Áreas emergentes na terapia do cancro da mama.....	51
1.4.1    MicroRNAs e cancro da mama .....	52
1.4.2    Conjugação de quimioterapia e terapia génica.....	56
1.5    Objectivos.....	59
1.6    Relevância científica do trabalho .....	60
SECÇÃO 2 .....	61
Materiais e Métodos.....	61
2.1    Linhas celulares e condições de cultura.....	63

2.2	Produção de plasmídeos .....	64
2.3	Preparação de lipossomas catiónicos.....	65
2.4	Determinação da concentração lipídica .....	66
2.5	Preparação de lipoplexos .....	67
2.6	Ensaio de viabilidade celular .....	68
2.7	Actividade Biológica da transfecção <i>in vitro</i> – ensaio de luciferase .....	68
2.8	Eficiência da transfecção <i>in vitro</i> – ensaio de citometria de fluxo.....	70
2.9	Actividade antitumoral .....	72
2.10	Transfecção celular para análise de RNA mensageiro e proteína .....	73
2.11	Extracção de RNA e síntese de cDNA .....	73
2.12	Quantificação da expressão de miRNA por qRT-PCR.....	74
2.13	Quantificação da expressão de mRNA por qRT-PCR.....	75
2.14	Análises por western blot.....	76
2.15	Análises estatísticas.....	77
SECÇÃO 3 .....		79
Resultados e Discussão .....		79
3.1	Efeito da vimblastina e do docetaxel na potenciação da actividade biológica e citotoxicidade dos lipoplexos HSA-EPOPC:Chol/DNA em células MDA-MB-231 e MCF-7.....	81
3.1.1	Avaliação da actividade biológica dos lipoplexos .....	81
3.1.2	Avaliação da citotoxicidade induzida pela estratégia combinada entre lipoplexos e fármacos.....	84
3.1.3	Avaliação da eficiência de transfecção através da quantificação da percentagem de células que expressam GFP em resultado da combinação de lipoplexos e fármacos .....	86
3.1.4	Discussão.....	88
3.2	Efeito da vimblastina e do docetaxel na potenciação da actividade antitumoral induzida pela expressão de p53 e miR-1 mediada por lipoplexos HSA-EPOPC:Chol/DNA em células MDA-MB-231 e MCF-7.....	90

3.2.1	Avaliação da viabilidade celular após aplicação da estratégia terapêutica envolvendo a combinação da expressão de p53 e miR-1 com os fármacos vimblastina ou docetaxel .....	91
3.2.2	Avaliação dos níveis de expressão de miR-1 e p53 obtidos após transfecção na presença de docetaxel .....	97
3.2.3	Discussão .....	104
SECCÃO 4	.....	115
Conclusões	.....	115
SECCÃO 5	.....	121
Prespectivas Futuras.....	.....	121
SECCÃO 6	.....	125
Referências	.....	125



## RESUMO

Excluindo o cancro da pele, o cancro da mama é o tipo de cancro mais frequentemente diagnosticado entre as mulheres, sendo a principal causa de morte por cancro neste género. Apesar dos recentes avanços nas estratégias terapêuticas convencionais para o cancro, a resistência a fármacos e os efeitos tóxicos secundários, frequentemente observados, têm limitado a sua aplicação clínica. Desta forma, urge o desenvolvimento de novas e eficientes estratégias anti-tumorais.

Neste sentido, a terapia génica constitui uma estratégia promissora, devido à descoberta de novos alvos moleculares associados a esta doença, o que promove a oportunidade de criar novas técnicas terapêuticas, incluindo as que envolvem a p53 e microRNAs. Por outro lado, a investigação em terapia génica tem também estado focada no desenvolvimento de sistemas de transporte e entrega de material genético eficientes, sendo os complexos de lipossomas catiónicos/DNA (“lipoplexos”) os mais promissores.

Neste contexto, o principal objectivo deste trabalho foi criar uma nova estratégia para o tratamento de cancro da mama, consistindo na combinação de terapia génica e quimioterapia, com o intuito de proporcionar uma actividade antitumoral efectiva, com menos efeitos adversos. Assim, investigou-se a acção combinada de vimblastina ou docetaxel com estratégias de terapia génica envolvendo a expressão de p53 e/ou miR-1, mediada por lipoplexos, em células de adenocarcinoma mamário (linhas celulares MDA-MB-231 e MCF-7).

Os resultados obtidos mostraram que a presença de vimblastina ou docetaxel durante a transfecção de células tumorais, com lipoplexos HSA-EPOPC:Chol/DNA (+/-) (4/1), resulta num aumento substancial da expressão dos transgenes luciferase e



GFP. A presença destes fármacos também promove um aumento significativo da percentagem de células transfectadas. Observou-se também que a nova estratégia terapêutica, que combina quimioterapia com terapia génica envolvendo elevados níveis de expressão de p53 e miR-1, resultou num efeito anti-tumoral significativo *in vitro*.

Por outro lado, iniciou-se o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na acção terapêutica das estratégias desenvolvidas. A correlação entre o efeito terapêutico e os níveis de alguns alvos do miR-1 e da p53, bem como stress oxidativo e vias de morte celular serão posteriormente investigadas, com o objectivo de contribuir para a clarificação dos mecanismos potencialmente envolvidos no efeito anti-tumoral induzido pela estratégia desenvolvida.

Estas estratégias combinadas de terapia génica e quimioterapia poderão assumir uma grande importância em aplicações clínicas futuras, permitindo melhorias substanciais no prognóstico de cancro da mama e constituir uma nova plataforma para o desenvolvimento de estratégias inovadoras contra o cancro.

## **ABSTRACT**

Excluding skin cancer, breast cancer is the most common type of cancer diagnosed among women, being the main cause of death in this gender. Despite recent advances in conventional therapeutic approaches for cancer, the frequently observed acquired drug resistance and toxic side effects have limited their clinical application. Therefore, the development of new and efficient antitumoral strategies is urgently required.

In this regard, gene therapy constitutes a promising strategy, due to the discovery of new molecular targets associated to this disease, which provided the opportunity to generate novel therapeutic approaches, including those involving p53 and MicroRNAs. On the other hand, research in gene therapy has also been focused on the development of efficient gene transport and delivery systems, cationic liposome/DNA complexes (“lipoplexes”) being one of the most promising.

In this context, the main goal of this work was to generate a novel strategy for treatment of breast cancer, consisting of a combination of gene therapy and chemotherapy in order to achieve an effective antitumoral activity, without causing significant side effects. For this purpose, we investigated the combined action of vinblastine or docetaxel with gene therapy strategy mediated by albumin (HSA)-associated lipoplexes, in breast adenocarcinoma cells (MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines).

The obtained results showed that the presence of docetaxel or vinblastine during transfection of tumor cells, with HSA-EPOPC:Chol/DNA (+/-) (4/1) lipoplexes, results in a substantially increase in the luciferase and GFP transgenes expression. The presence of these drugs also promotes a substantial increased in the percentage of

transfected cells. We also observed that our new therapeutic strategy, which combined chemotherapy and gene therapy involving high levels of p53 and miR-1 gene expression, resulted in a significant antitumoral effect *in vitro*.

On the other hand, we strat studies to clarify the mechanisms involved in the antitumoral activity of our therapeutic strategies. The correlation between the therapeutic effect and the levels of some molecular targets of miR-1 and p53 protein, as well as oxidative stress and cell death pathways will be further investigated, intending to elucidate the mechanisms potentially involved in the induced antitumoral effect.

Such combined strategies of gene therapy and chemotherapy could be of great importance for future clinical applications, allowing a significant improvement in prognosis of breast cancer and constituting a new platform to the development of novel therapeutic approaches to cancer.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABC - *Adenosine triphosphate binding cassette*

APC - *Adenomatous polyposis coli protein*

APAF1 - *Apoptotic protease-activating factor 1*

Bcl-2 - *B-cell lymphoma 2*

Bcl-xL - *B-cell lymphoma 2 extra large*

BCRP - *Breast cancer resistance protein*

BRCA 1 - Cancro da mama tipo 1

BSA - Albumina de soro bovino

CD - Citosina deaminase

CHOL - Colesterol

CMV - promotor de citomegalovirus

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

DCIS - Carcinoma ductal *in situ*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

Doc - Docetaxel

DOPE - 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine

DOTAP - 1,2-dioledil-3-(trimetilammonium) propano

DOTMA - N-[1-(2, 3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPOPC - 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-etilfosfolina

ER - Receptores de estrogénio

FSCN1 - Proteína homóloga da fascina 1

HBS - Tampão salino com HEPES

HEPES - Ácido N-(2-etano-sulfónico) N'-(2-hidroxietil) piperazina

HER-2 - Factor de crescimento epitelial 2

HSA - Albumina de soro humano

HSV-1- Vírus herpes simplex 1

IARC - Agência Internacional para pesquisa do cancro

IDC - Carcinoma ductal invasivo

IL 2 - Interleucina 2

ILC - Carcinoma lobular invasivo

LASP 1 - Proteína 1 constituída pelos domínios LIM e SH3

LB - Luria Broth

LCIS - Carcinoma lobular *in situ*

MDR - Multi-resistência a drogas

MLV - Lipossomas multilamelares

mRNA - RNA mensageiro

MRP1- *Multidrug resistance protein 1*

NaCl - Cloreto de sódio

NLS - Sinal de localização nuclear

P-gp - Transportador glicoproteína-P

PR - Receptores de progesterona

PVDF - Fluoreto de polivinilidene

RNA - Ácido ribonucleico

ROS - Espécies reactivas de oxigénio

SDS - Sodium dodecyl sulfate

SOC - *Super Optimal broth with Catabolite repression*

SUV - vesículas unilameares pequenas

TAGLN2 - Transgelina 2

UCP - *Uncoupling protyein*

VEGF - Factor de crescimento vascular endotelial

Vin - Vimblastina

## **PALAVRAS-CHAVE**

Cancro da mama

Terapia génica

Lipoplexos

Docetaxel

Vimblastina

p53

miR-1



---

SECÇÃO 1

Introdução

---





## **INTRODUÇÃO**

### **1.1 Cancro**

A divisão e diferenciação são características de células de tecidos e órgãos que requerem renovação, tais como a camada basal da pele, a camada epitelial do intestino ou a medula óssea. Estes processos são altamente regulados por diferentes mecanismos moleculares complexos que estão intrincadamente interligados. Estes mecanismos contrabalançam dois processos interdependentes, a proliferação e a morte celular. Quando surgem factores que afectam este equilíbrio, uma única célula, não sendo a anomalia corrigida, adquire a capacidade de alterar o comportamento de uma população alargada de células num tecido ou órgão [1]. O processo de carcinogénese decorre ao longo de várias gerações com progressiva acumulação de alterações genéticas e epigenéticas no comportamento de, não só células malignas, como também células vizinhas que interagem com o tumor, como células imunitárias, vasculares e do estroma. Isto resulta num desvio dos perfis de expressão genética das células progenitoras normais, gerando uma população heterogénea alargada, capaz de ser, então, clinicamente detectada como uma neoplasia [1-4].

#### **1.1.1 Biologia do cancro**

Existem várias abordagens para o tratamento do cancro, podendo as células cancerígenas ser removidas cirurgicamente ou destruídas por radiação ou agentes químicos. Ainda assim, a presença de células cancerígenas remanescentes tem uma probabilidade considerável de acontecer, podendo induzir o ressurgimento da doença e o desenvolvimento de resistência aos tratamentos usados. A carcinogénese tem sempre um carácter evolutivo e adaptativo, gerado pela complexa expressão genética,

dependente de múltiplos factores. Esta expressão genética fornece o material necessário para que uma população, no geral, possa ser alvo de uma selecção natural, onde as características metabólicas mais favoráveis conduzem ao desenvolvimento de um ritmo evolutivo mais acelerado para o tumor [1, 5]. Esta complexidade do sistema de regulação que controla os processos envolvidos na carcinogénese prende-se com a já detectada existência de *genome landscapes*, responsáveis pela alta diversidade populacional, quer entre tumores, quer intratumoralmente [5]. Segundo Vogelstein, Papadopoulos [6], já foram reconhecidos aproximadamente 140 genes que, quando têm a sua regulação alterada ou sofrem mutações intragénicas, podem promover a carcinogénese ou conduzir a sua evolução. *Genome landscapes* consistem de pequenos grupos de genes que estão normalmente alterados numa grande percentagem de tumores, e de grandes grupos de genes que não estão ubiquamente alterados, sendo característicos de cada população ou subpopulação tumoral [6]. Estes genes estão envolvidos em várias vias de sinalização que regulam o destino celular, sobrevivência e manutenção do genoma, fornecendo às células uma larga *landscape* genética que lhes permite tomar maior partido adaptativo [6]. Em células que desenvolvem características carcinogénicas, as alterações genéticas afectam principalmente dois tipos de genes: os oncogenes e os genes supressores de tumores [1, 7].

Deste modo, compreender as causas e consequências do processo carcinogénico é uma tarefa que está longe de ser plenamente conseguida, mas que é fulcral para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção, detecção e tratamento.

#### **1.1.1.1 Danos e mutações do DNA conduzem a carcinogénese e o destino do cancro**

De acordo com o que foi abordado na secção anterior, o cancro surge maioritariamente de mutações espontâneas como consequência de danos externos no DNA, mais do que mutações espontâneas, resultando na alteração de funções de genes

cruciais. No contexto carcinogénico podem considerar-se, numa versão ampla da sua definição, variações do genoma produzidas por: mutações pontuais que provocam substituições de aminoácidos; mutações *frame-shift* ou mutações *nonsense* que introduzem codões *stop* prematuros que bloqueiam a transcrição de um produto proteico ou alteram a sua sequência; instabilidade cromossómica que resulta na amplificação, sobre-expressão ou expressão inapropriada de gene particular; perda de um gene ou sua fusão com outro gene como resultado da ruptura ou rearranjo cromossómico; e ainda modificações epigenéticas do DNA que podem, por exemplo, conduzir ao silenciamento de genes [1]. Todavia, estas modificações/danos no DNA só assumem um carácter mutagénico na decorrência da proliferação celular que permite a actuação da selecção natural sobre essas modificações genéticas. Assim, a proliferação desempenha um papel fulcral na conversão dessas alterações em mutações herdáveis pelos clones dessas células em expansão [8]. A selecção natural das células cancerígenas tem uma tendência para o favorecimento de mutações de genes que activam oncogenes, ou mutações que inactivem a função de genes classificados como supressores de tumor. Deste modo, os oncogenes estão mais activos nas células tumorais, interferindo em vias de sinalização que estimulam a proliferação e inibem a apoptose, e os genes supressores de tumores estão inactivos, provocando a perda de funções normais da célula, tais como o controle sobre o ciclo celular ou sobre a morte celular [1, 7].

#### **1.1.1.2 Vias gerais de desenvolvimento do cancro**

##### **Proliferação independente de factores de crescimento externos**

No cancro, as vias de sinalização que medeiam as funções normais dos factores de crescimento estão comumente subvertidas. As células cancerígenas desenvolvem mecanismos que permitem a constante activação das vias de sinalização que conduzem

à proliferação celular. Em muitos casos, os oncogenes parecem actuar em focos críticos da sinalização mitogénica, substituindo as acções de um conjunto de factores de crescimento que participam na regulação da progressão do ciclo celular [1, 9].

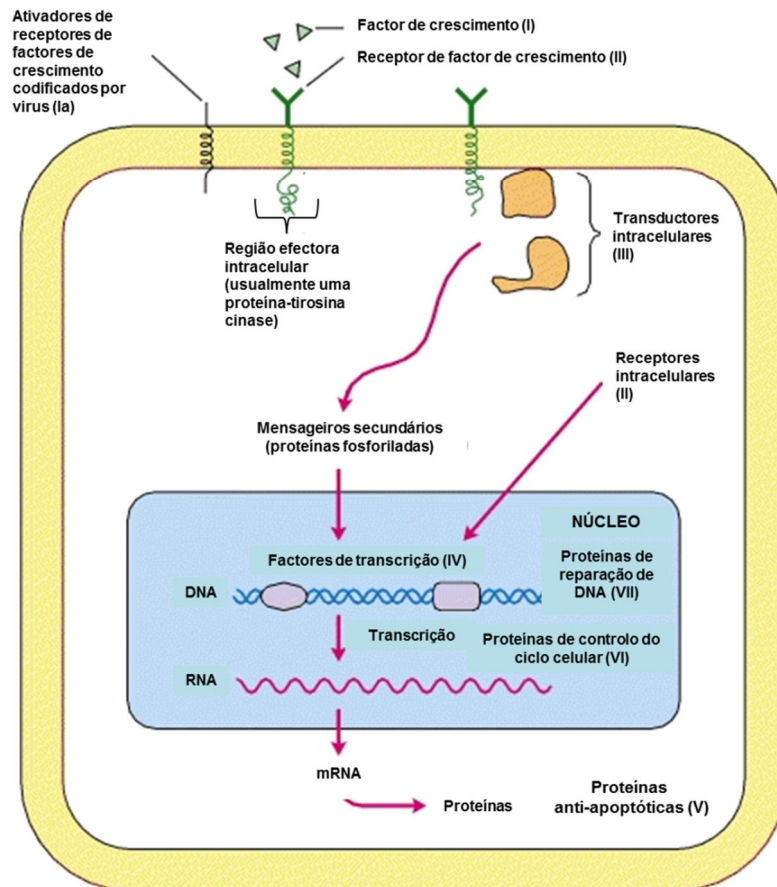
Esses mecanismos podem resultar da inapropriada síntese de factores de crescimento que podem estimular autocrinamente as células que os produzem [10]; inapropriada síntese de receptores de factores de crescimento [1, 11]; activação *downstream* de vias de transdução de sinal; e ainda activação inapropriada de factores de transcrição nuclear (Figura 1) [1].

### **Desenvolvimento de um estado refractário aos sinais inibitórios de crescimento – acção de genes supressores de tumor e proto-oncogenes**

O crescimento de células normais é controlado por inibidores de crescimento presentes no meio envolvente, na matriz extracelular e nas superfícies das células vizinhas, que regulam o progresso do ciclo celular, interrompendo a mitose. Porém, as células cancerígenas são geralmente resistentes a esses sinais de inibição de crescimento [1]. Os genes supressores de tumor (exemplo: *tumor protein 53* (p53) e *Adenomatous polyposis coli protein* (APC)), bem como os proto-oncogenes (exemplo: *ras*) desempenham um papel crítico neste tipo de controlo. Estes genes codificam diversos tipos de proteínas que ajudam a controlar o crescimento e proliferação celular (como as proteínas Rb e p16), que, quando mutados, conduzem ao desenvolvimento de cancro, que pode passar pela inibição da resposta aos factores de inibição de crescimento.

### **Desenvolvimento de resistência à morte celular programada – apoptose**

Embora outras formas de morte celular programada tenham vindo a ser descritas [12-14], a apoptose é um modo de morte celular programada amplamente reconhecido e aceite como um importante mecanismo que envolve a eliminação de células defeituosas.



**Figura 1** – Proteínas que participam no controlo do crescimento celular.

O cancro pode resultar da expressão de formas mutantes de proteínas como: factores de crescimento (I), receptores de factores de crescimentos (II), proteínas transdutoras de sinal (III), factores de transcrição (IV), proteínas pro ou anti-apoptóticas (V), proteínas de controlo do ciclo celular (VI), e proteínas reparadoras de DNA (VII). Mutações que alteram a estrutura ou expressão de proteínas referenciadas de I-IV geralmente originam oncogenes dominantemente activos. As proteínas do grupo VI actuam maioritariamente como supressoras de tumor; mutações nos genes que codificam essas proteínas actuam recessivamente para anular o controlo celular, aumentando a probabilidade de células mutantes se tornarem cancerígenas. Mutações em proteínas como as englobadas no grupo VII aumentam a probabilidade de ocorrerem mutações nas proteínas dos grupos I-VI. Virus codificando para proteínas que activam receptores de factores de crescimento (Ia) também podem induzir cancro. (Adaptado de: Lodish 2000 [15]).

A apoptose ocorre normalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento e apresenta-se como um mecanismo homeostático para manter as populações celulares nos tecidos. Este mecanismo pode também ocorrer como mecanismo de defesa, contra vários estímulos e condições que resultam, por exemplo, no dano do DNA, conduzindo ao desencadeamento da apoptose, onde as proteínas *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) e p53 desempenham um papel muito importante [1, 16, 17].

A apoptose pode ser activada por duas vias principais: intrínseca e extrínseca [18]. A apoptose por via extrínseca, também reconhecida como via dos receptores de morte, é mediada por receptores localizados na superfície celular [18, 19]. A via intrínseca é regulada pela mitocôndria. Este organelo controla a libertação de diferentes proteínas pro e anti-apoptóticas. Uma das proteínas mais importantes é o citocromo-c, que liga a uma proteína adaptadora citosólica, chamada *Apoptotic Protease Activating Factor 1* (APAF1), que conduz à activação da caspase 9 e conseqüente activação das caspases efectoras [18]. Independentemente do estímulo inicial, todos os caminhos de apoptose parecem convergir na mitocôndria, causando a perda da integridade da membrana e, então, a libertação do citocromo-c, que é um potente mediador da apoptose. O citocromo-c conduz à activação das pro-caspases iniciadoras que, por sua vez, activam a cascata de caspases, cuja função é degradar rapidamente organelos celulares e cromatina de modo a induzir a destruição das células [1, 18, 20, 21]. A proteína p53 também activa a transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas na regulação dos níveis de espécies reactivas de oxigénio (ROS) na célula, conduzindo, eventualmente, ao desencadeamento da apoptose. Tem sido sugerido que esta função resulta na acumulação de ROS, que danificam a mitocôndria. Este dano pode conduzir à libertação de citocromo-c, e a mitocôndria passa também a contribuir para a produção de ROS [22-26].

Para manter o balanço entre a apoptose e a função celular normal, existem também proteínas anti-apoptóticas na mitocôndria que protegem a célula deste processo. A família de proteínas Bcl-2, está envolvida no controlo da apoptose, uma vez que controla a libertação do citocromo-c, bem como outras proteínas que regulam a actividade das pro-caspases. Esta família inclui proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1 – inibem a libertação de citocromo-c) e proteínas pro-apoptóticas (Bax e Bak – induzem activamente a libertação de citocromo-c) [21, 27].

De certa forma, pode dizer-se que subjacentes à formação e progressão do cancro estão dois aspectos: mutações que dão origem a uma proliferação excessiva e, por outro lado, uma acção compensatória das vias de sinalização de sobrevivência que asseguram a sobrevivência dessas células hiper-proliferativas [28]. A título de exemplo, o gene que codifica para p53, que pode desencadear apoptose em resposta ao stress, está frequentemente mutado ou inibido em células cancerígenas, gerando células com uma distinta vantagem para a sobrevivência sobre as células normais. Porém, existem outros mecanismos independentes da proteína p53 que também são utilizados por muitos cancros como factores de sobrevivência [1].

Desta forma, possíveis tratamentos para o cancro poderão passar pelo *design* de estratégias que despromovam mecanismos promotores de sobrevivência de forma a que células cancerígenas com lesões que aceleram a proliferação sejam conduzidas a desencadear apoptose, ou de mecanismos que reintroduzam a capacidade de moléculas pro-apoptóticas desempenharem efectivamente as suas funções nos mecanismos de morte celular.

### **Desenvolvimento de capacidade proliferativa infinita**

Leonard Hayflick demonstrou que células humanas normais cultivadas têm uma capacidade limitada para se dividirem, após o qual se tornam senescentes. Ao longo dos



anos e à medida que o conhecimento sobre o tema foi evoluindo, algumas considerações foram ajustadas mas até hoje este fenómeno é conhecido com “limite de Hayflick” [29, 30]. A senescência pode ser evitada por algum tempo se os genes supressores de tumor p53 e Rb forem inactivados. No entanto, após gerações sucessivas, as células começam a apresentar anormalidades cromossómicas, acabando por morrer. Ao contrário disto, células tumorais no mesmo ambiente *in vitro* são capazes de, na sua maioria, apresentar tendência para uma capacidade proliferativa infinita [31]. O controlo da senescência pode também estar dependente dos telómeros. Estas estruturas protegem a extremidade dos cromossomas, activando respostas para protecção do DNA. Quando esta função é perdida, através do encurtamento dos telómeros ao longo das divisões celulares em cultura ou auto-renovação de tecidos, e é induzida uma resposta contra o dano no DNA, a proteína supressora de tumor p53 é activada. Esta proteína desempenha um papel importante na senescência e apoptose em resposta à disfunção dos telómeros. Com a perda da função da p53, como acontece em muitos tipos de cancro, é criado um ambiente permissivo no qual os telómeros são criticamente encurtados e há um escape à apoptose, resultando na iniciação carcinogénica [32-34]. Paradoxalmente, se os telómeros não forem mantidos, essas células cancerígenas podem acabar por sofrer senescência, antes de constituírem um problema clínico. Para superar esta questão, tem sido mostrado que a telomerase, em células cancerígenas pode ser reactivada, de forma a manter o tamanho dos telómeros [1]. Além disso, a amplitude de reactivação da telomerase, no sentido de manter o comprimento dos telómeros, parece estar positivamente relacionada com a agressividade da doença [35, 36].

### **Desenvolvimento de potencial angiogénico**

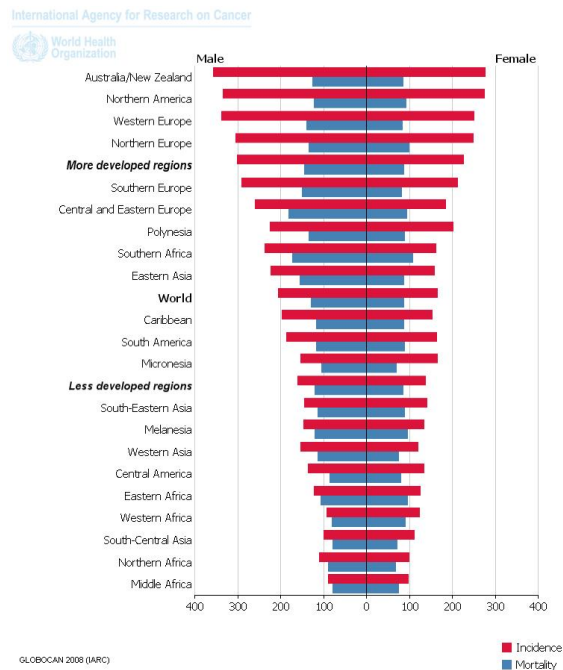
A angiogénese ocorre através da formação e invasão de células endoteliais a partir de vasos sanguíneos existentes, em resposta a vários sinais extracelulares. O

crescimento de uma nova rede vascular é importante uma vez que a proliferação e a disseminação metastática dependem do fornecimento adequado de oxigénio e nutrientes, bem como da remoção de produtos residuais [37]. A angiogénese é regulada por moléculas activadoras (como factor de crescimento endotelial, VEGF) e inibidoras (como a trombospondina). Porém, a sobre-regulação da actividade de factores angiogénicos por parte das células cancerígenas não é suficiente para a angiogénese em torno do tumor, pelo que as células cancerígenas têm encontrado meios para aumentar a expressão de factores pro-angiogénicos, bem como para suprimir reguladores negativos ou inibidores de crescimento [38, 39]. Além disso, os níveis de expressão de factores angiogénicos estão relacionados com a agressividade da doença [37]. Uma vez mais, a proteína p53 desempenha um papel no processo carcinogénico, no que respeita à angiogénese. Por exemplo, a expressão da trombospondina é positivamente regulada pela p53. Desta forma, a perda de função da p53 favorece a angiogénese [1].

### **1.1.2 Incidência e taxa de mortalidade mundiais associadas ao cancro**

O cancro é uma doença com largo espectro de incidência a nível mundial. De acordo com a GLOBOCAN 2008 [40], as estatísticas produzidas pela Agência Internacional para Pesquisa do Cancro (IARC) para 2008 sumarizam a estimativa de 12,7 milhões de novos casos de cancro e 7,6 milhões de mortes por cancro, só nesse ano. Num coopto mais restrito, o cancro é considerada a principal causa de morte em países economicamente desenvolvidos e ocupando o segundo lugar nos países em desenvolvimento, segundo as estatísticas mundiais realizadas até 2004. Dos valores referidos acima, 56% do número de casos e 63% de mortes ocorreram em países desenvolvidos, denotando a maior susceptibilidade dessas regiões para a ocorrência de cancro, como demonstra a Figura 1 [41].

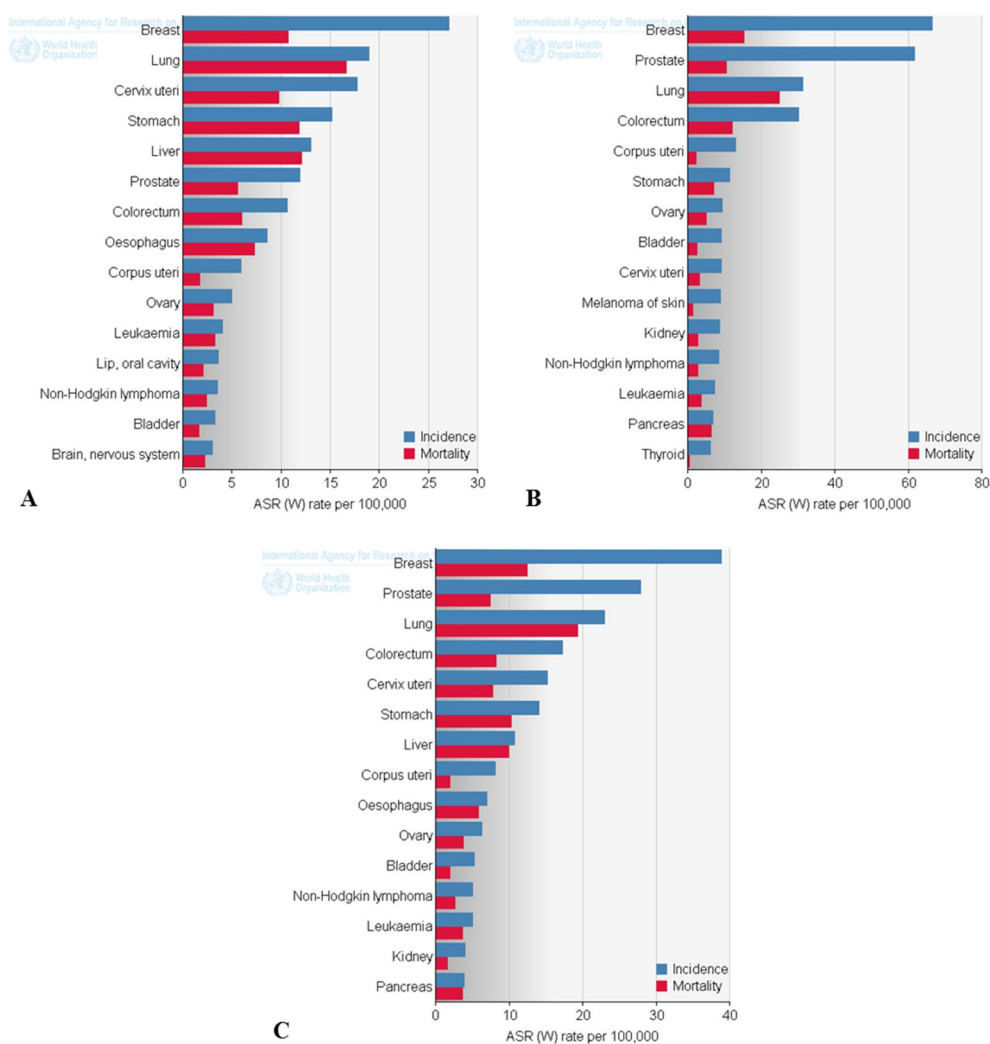
Considerando todos os grupos etários, 11,8% das pessoas do sexo feminino e 13,4% das pessoas do sexo masculino morrem anualmente devido a esta doença [42]. Além disso, segundo as estimativas produzidas, está previsto um aumento de 7,6 milhões (2008) para 13 milhões de mortes por cancro para 2030 [40].



**Figura 1** – Taxas padronizadas por idade, de incidência de cancro e mortalidade associada, estimadas para o Mundo (2008), por cada 100.000 pessoas (Fonte: GLOBOCAN 2008(IARC)).

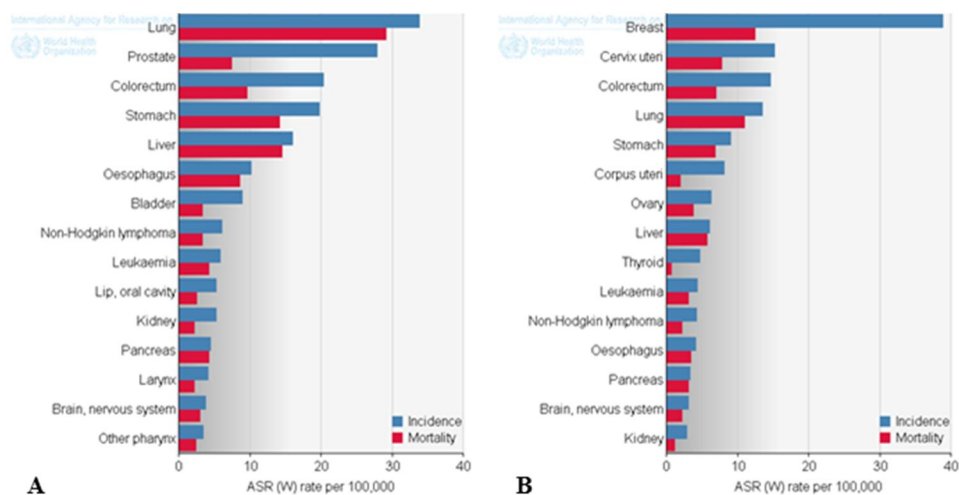
A prevalência de determinados tipos de cancro em países desenvolvidos estará associada aos razoáveis níveis de elevada sobrevivência (cancros da mama, próstata e colorectais), enquanto os cancros com pior prognóstico (cancros do pulmão, estômago e fígado) são mais comuns em regiões menos desenvolvidas [43]. Porém, o cancro da mama ocupa um lugar de destaque na incidência para ambas as regiões, mesmo quando consideradas conjuntamente e para os dois sexos (Figura 2).

O cancro da mama em mulheres e o cancro do pulmão em homens são os cancros mais frequentemente diagnosticados e a principal causa de morte por cancro para cada sexo, em ambos os países economicamente desenvolvidos e em desenvolvimento (Figura 3) [41]. Pensa-se que o aumento da esperança média de vida e



**Figura 2** – Taxas de incidência e mortalidade para ambos os sexos conjuntamente, padronizadas por idade, estimadas por cânceros principais (excluindo o cancro da pele) e por desenvolvimento económico: A) países em vias de desenvolvimento, B) países economicamente desenvolvidos e C) Mundo; por cada 100.000 pessoas (2008) (Fonte: GLOBOCAN 2008 (IARC)).

a adopção de comportamentos associados ao cancro, como o tabagismo, a inactividade física e dietas desadequadas, também estão intrinsecamente relacionados com o desenvolvimento de cancro e com o contínuo aumento de casos em todo o mundo. Estes indícios podem ainda estar na origem das variações encontradas entre diferentes regiões. Por exemplo, as taxas de incidência dos cânceros da próstata, coloproctal, mama e pulmão são 2 a 5 vezes superiores em países desenvolvidos comparando com países em desenvolvimento [41].



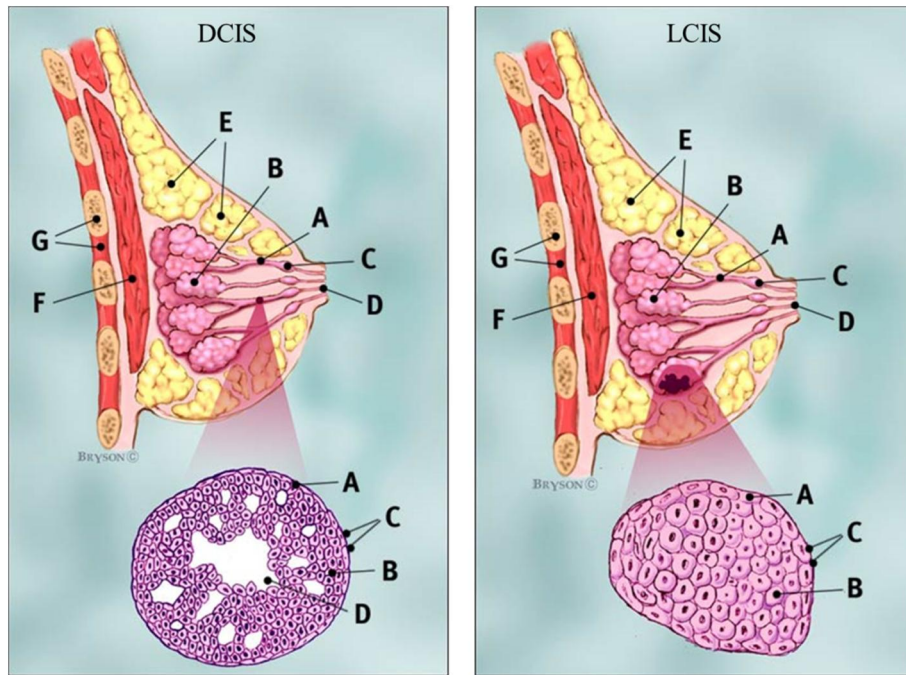
**Figura 3** – Taxas de incidência e mortalidade, padronizadas por idade, estimadas por câncros principais (excluindo o câncro da pele) e para cada sexo: A) homens e B) mulheres, em todo o Mundo; por cada 100.000 pessoas (2008) (Fonte: BLOBOCAN 2008 (IARC)).

## 1.2 Câncro da mama

O adenocarcinoma mamário é uma doença complexa, que inclui parâmetros morfológicos e moleculares muito distintos [44]. Desenvolve-se no tecido glandular mamário, sendo que mais de 80% das neoplasias da mama têm origem no epitélio ductal, enquanto uma minoria decorre do epitélio lobular [45]. Histopatologicamente, além dos tumores epiteliais, os tumores mamários podem classificar-se em tumores fibroepiteliais, tumores dos mamilos, linfomas malignos, ou em tumores decorrentes de lesões mioepiteliais ou mesenquimais. Além disso, estas classificações podem ainda ser sub-tipadas em *in situ*, invasivo ou metastático [46].

Tal como já foi referido, o câncro da mama pode ter origem nos ductos ou nos lóbulos mamários e pode ser invasivo ou não invasivo. Invasivo significa que as células cancerígenas invadiram os tecidos circundantes e estão aptas a disseminar pelo organismo, formando metástases. As células de um câncro não invasivo, ou *in situ*, estão confinadas a uma área bem delimitada e podem ser de dois tipos: carcinoma ductal

*in situ* (DCIS) e carcinoma lobular *in situ* (LCIS). O DCIS (Figura 4) é um cancro heterogéneo, que se caracteriza pela proliferação de células epiteliais malignas, circunscritas pela membrana basal das estruturas ductais mamárias, representando mais de 20% dos casos de cancro da mama (83% de casos *in situ* diagnosticados durante 2004-2008) [47-49].



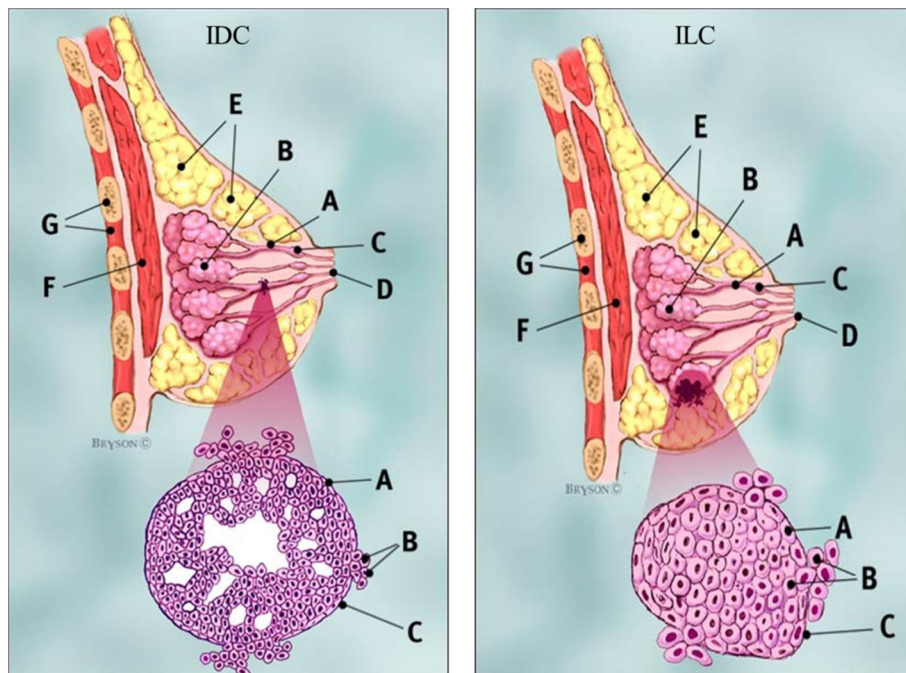
**Figura 4** – Mama normal com carcinoma ductal não invasivo (DCIS) de uma secção transversal ampliada do ducto (esquerda). Mama normal com carcinoma lobular não invasivo (LCIS) de uma secção transversal ampliada do lóbulo (direita). Perfil da mama: A) ductos, B) lóbulos, C) secção dilatada do ducto para contenção do leite, D) mamilo, E) adipócitos, F) músculo peitoral, G) parede torácica. Ampliação: A) células normais do ducto/lóbulo (esquerda/direita, respectivamente), B) células cancerígenas do ducto/lóbulo (esquerda/direita, respectivamente), C) membrana basal, D) lúmen. (Adaptado de: Breast Cancer Organization [50]).

Com base na heterogeneidade das lesões histopatológicas compreendidas neste tipo de cancro, o DCIS pode ser classificado em subtipos, segundo o padrão arquitectónico: micropapilar, papilar, sólido, cribiforme e comedo. O último subtipo referido parece ser o mais agressivo, com maior probabilidade de evoluir para

carcinoma ductal invasivo (IDC) [51]. O LCIS (Figura 4) é uma lesão neoplásica caracterizada pela proliferação de células malignas homogéneas, confinadas na zona terminal dos lóbulos [52]. Este tipo de lesão, normalmente, não tem manifestação clínica específica, sendo maioritariamente detectado acidentalmente, pelo que não é possível conhecer a verdadeira taxa de incidência desta tipologia [53], apesar de se vir a verificar um aparente aumento dessa ao longo dos anos, devido ao recurso a mamografias [54]. Este tipo de carcinoma é considerado um indicador e, em alguns casos, um factor de risco/percursor de cancro da mama invasivo bilateral, quer do tipo ductal (IDC), quer lobular (ILC) [54, 55]. A principal questão subjacente à detecção e tratamento de cancros *in situ* é, então, se estes são percursores directos de cancros da mama invasivos (Figura 5), uma vez que vários estudos mostram que mulheres com diagnóstico de DCIS, ou do menos comum LCIS, têm maior risco de desenvolver estados invasivos ou reincidência. Embora não existam estudos sobre a evolução natural dos carcinomas *in situ*, é consensual que DCIS e LCIS possam representar um passo intermédio entre o tecido mamário normal e o cancro invasivo [49, 56-59].

Porém, as características histopatológicas não são suficientes para caracterizar um tumor, não podendo com isso reconhecer-se o prognóstico mais acertado ou seleccionar-se a terapia mais adequada. Desta forma, os tumores podem ainda ser classificados segundo 1) o grau de diferenciação/desdiferenciação das células; 2) o estadio, que usa a classificação TNM (baseando-se no tamanho do tumor (T), invasão dos nódulos linfáticos (N) e grau de metastização (M)) [60]; 3) o estado de expressão/actividade de receptores, como os de estrogénio (ER), de progesterona (PR) e do factor de crescimento epitelial 2 (HER-2) [61-64]; 4) e segundo outras características genéticas, como mutações em genes de supressão tumoral (ex.: BRCA1, p53) [63, 65], activação de oncogenes (ex.: *c-myc*, p21) [63] e alteração dos padrões normais de

expressão proteica (ex.: E-cadherin) [66], entre outros. Informações fornecidas pela avaliação qualitativa de múltiplos genes é mais precisa no que respeita à caracterização biológica dos tumores. Estudos permitiram criar subtipos moleculares de cancro, os quais têm diferentes prognósticos associados: luminal (A e B), HER-2, *basal-like*, normal e claudina diminuída. Estes subtipos estão bem caracterizados na revisão feita por Eroles, Bosch [44].



**Figura 5** – Mama normal com carcinoma ductal invasivo (IDC) de uma secção transversal ampliada do ducto (esquerda). Mama normal com carcinoma lobular invasivo (ILC) de uma secção transversal ampliada do lóbulo (direita). Perfil da mama: A) ductos, B) lóbulos, C) secção dilatada do ducto para contenção do leite, D) mamilo, E) adipócitos, F) músculo peitoral, G) parede torácica. Ampliação: A) células normais do ducto/lóbulo (esquerda/direita, respectivamente), B) células cancerígenas do ducto/lóbulo (esquerda/direita, respectivamente) atravessando a membrana basal, C) membrana basal. (Adaptado de: Breast Cancer Organization [50]).

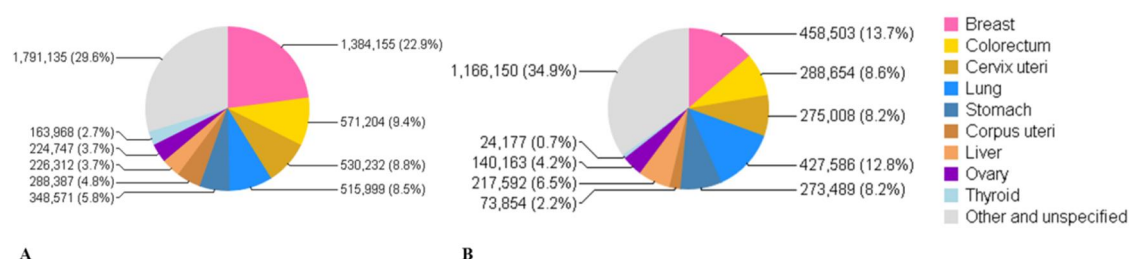
Os efeitos destas características são complexos devido ao elevado número de alterações em cada caso específico de cancro da mama e às interações das vias biológicas envolvidas, mas são estes estudos de expressão de genes que têm permitido a evolução da caracterização molecular emergente dos subtipos de cancros mamários,



começando a tornar-se possível identificar, por exemplo, fases pré-invasivas de neoplasias como o DCIS e LCIS [44, 47].

### 1.2.1 Incidência e alguns factores de risco

O cancro da mama é o tipo de cancro mais frequentemente diagnosticado nas mulheres (1,38 milhões, 10,9% do total de casos de cancro) e a principal causa de morte por cancro neste sexo, em todo o mundo (Figura 6) [43].



**Figura 6** – Taxas de A) incidência e B) mortalidade, padronizadas por idade, estimadas por cancros principais (excluindo o cancro da pele), em todo o Mundo; por cada 100.000 pessoas (2008) (Fonte: GLOBOCAN 2008 (IARC)).

A taxa de morte associada ao cancro da mama, apesar de ainda permanecer muito elevada, justificando-se pelo crescente grau de incidência, começa a apresentar uma tendência no sentido decrescente, segundo as estatísticas traçadas para o período entre 1975 e 2000, nos Estados Unidos, mas também em outros países economicamente desenvolvidos. Tal facto parece estar associado a melhorias nos tratamentos, bem como à detecção precoce do cancro da mama [67-69]. A crescente incidência de cancro da mama invasivo parece também correlacionar-se com alterações dos padrões reprodutivos [70], taxas crescentes de obesidade [71, 72], recurso a hormonas durante a menopausa [73], idade de ocorrência da menarca ou menopausa [74], e consumo de álcool [75].

Contudo, estes factores apresentam um risco relativamente moderado (<2), quando comparado com outros factores associados com casos prévios de doença

neoplásica ou hiperplasia atípica e com predisposição genética, com um risco que pode variar de 3 (para alguns casos de histórico familiar positivo) a 200 (para mulheres em pré-menopausa positivas para mutação no gene BRCA). O “risco relativo” denota o risco para um indivíduo que é positivo para um factor, versus o risco para um indivíduo que é negativo para esse mesmo factor. Isto é, um risco relativo de 1 indica que o risco não é aumentado, enquanto um risco relativo de 10 indica haver um risco 10 vezes aumentado [76]. A predisposição genética é um dos factores mais intrigantes e com maior risco associado. A predisposição genética está reflectida em aproximadamente 20% dos pacientes com cancro da mama que têm historial familiar positivo para este tipo de cancro. Esta predisposição é especialmente elevada nas famílias em que existem mutações no gene BRCA1 [77].

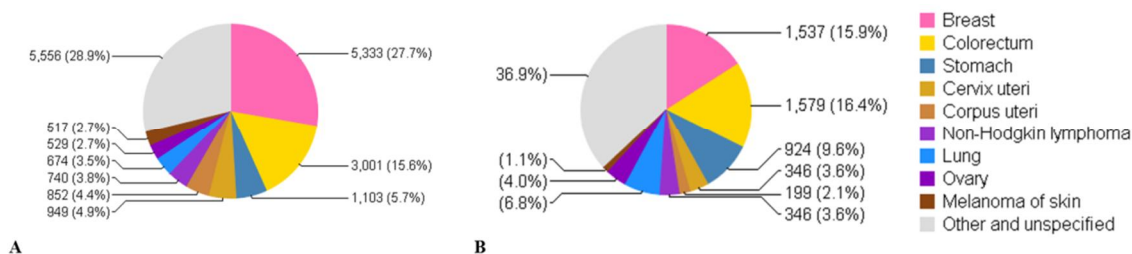
Os factores de risco para o desenvolvimento de cancro da mama não podem ser analisados de forma isolada, pois há interacções entre eles, como foi já referido em alguns casos acima citados. De certa forma, estas interacções sugerem que cada caso de cancro da mama pode derivar de uma via carcinogénica própria, dependendo dos factores de risco que estiveram envolvidos, indicando que cada caso de cancro pode ter características únicas, que o distingue de todos os outros [78].

A incidência de cancro da mama tem tendência para aumentar com a idade, duplicando a cada 10 anos até à menopausa, quando essa taxa de aumento abranda dramaticamente [70]. Por outro lado, em idades abaixo dos 40-50 anos há maior incidência de cancros agressivos, quando comparado com tumores menos agressivos, para os quais as taxas de incidência são superiores para idades superiores a esse intervalo [78]. Contudo, atendendo às interacções existentes entre os diversos factores, foi já identificado que, por exemplo, a nuliparidade e a obesidade diminuem o risco de cancro da mama em mulheres jovens, mas aumentam-no em mulheres mais velhas.

Outro exemplo, ensaios clínicos de mamografia, quimioprevenção e quimioterapia neoadjuvante têm efeitos opostos em mulheres jovens e mais velhas [78].

A variação geográfica indica que, além dos factores genéticos, factores ambientais têm uma grande importância. Por exemplo, estudos mostraram que pessoas Asiáticas deslocadas para os Estados Unidos têm maiores taxas de incidência [79], e, segundo McPherson, Steel [70], de uma forma mais ampla, a incidência é cerca de cinco vezes superior no Ocidente, em relação ao Extremo Oriente. Contudo, neste último caso, é necessário ter em atenção que nestas variações também devem entrar em conta as taxas de sobrevivência (que também podem variar com a distribuição geográfica). A correlação destas duas aponta para maiores taxas de mortalidade na zona Oriental, que também poderá estar relacionado com os meios disponíveis para o rastreio e tratamento do cancro da mama. Possivelmente, estas variações de mortalidade com base na geografia diminuirão à medida que a qualidade no rastreio e tratamento do cancro da mama se tornar mais padronizado para todas as regiões [80].

De acordo com a GLOBOCAN 2008 [40], em Portugal, o cancro mais comum entre os dois sexos é o cancro da mama, seguido do cancro da próstata (o mais comum no sexo masculino). Mas é nas mulheres que o cancro da mama mais se denota, com uma taxa de incidência muito elevada, quando comparado com outros tipos de cancro; detendo também a maior taxa de mortalidade para este sexo (Figura 7).



**Figura 7** – Taxas de A) incidência e B) mortalidade para o sexo feminino, padronizadas por idade, estimadas por cancros principais (excluindo o cancro da pele), em Portugal; por cada 100.000 pessoas (2008) (Fonte: GLOBOCAN 2008 (IARC)).

Segundo as estatísticas disponibilizadas pelo Instituto Nacional de Estatística Português para 2005, o cancro da mama atingiu 17% das mulheres com cancro e apresentou uma média de 7% de morte associada, contribuindo para a diminuição da média da taxa de mortalidade nacional por cancro da mama [81].

### **1.2.2 Alguns tratamentos comuns para cancro da mama**

A maioria dos tratamentos anti-cancerígenos depende de agentes que danificam o DNA e a maquinaria responsável por manter a integridade cromossomal, como fármacos e radiação ionizante [82]. Existem diferentes tratamentos disponíveis, de acordo com os tipos de cancro da mama. Existem já alguns tratamentos padronizados, mas outros são aplicados em ensaios clínicos, quando os pacientes assim o autorizam.

Inicialmente, o tratamento habitual para DCIS era a mastectomia [83]. Contudo, tendo em vista a preservação da mama, outros tratamentos começaram a surgir, como a remoção cirúrgica da massa localizada (DCIS), que poderia ser seguido ou não de terapia por radiação [84]. Os tratamentos descritos acima podem ainda ser combinados com terapia hormonal adjuvante. Por exemplo, o tamoxifeno é um fármaco de aplicação sistémica comportado pela terapia hormonal, que bloqueia os efeitos do estrogénio no organismo [85]. Este fármaco tem mostrado ser capaz de, em combinação com outras terapias, prevenir o cancro invasivo [86], bem como a reincidência e mortalidade durante a segunda década após o primeiro diagnóstico [87]. Contudo, estudos têm mostrado que o tamoxifeno só apresenta benefícios para mulheres com cancro da mama positivos para ER [88].

Em casos de LCIS, os tratamentos aplicáveis têm carácter profilático. Por exemplo, o uso de tamoxifeno diminui o risco de desenvolver cancro da mama em mulheres com LCIS e, como tal, o fármaco também pode ser usado de forma preventiva [89].

A radioterapia é regularmente utilizada como terapia preventiva após cirurgia conservadora da mama (lumpectomia) [90], mas também pode ser indicada para indivíduos que sofreram mastectomia [91]. O principal objectivo da terapia de radiação adjuvante é erradicar a doença residual reduzindo a reincidência local [92]. Contudo, a radioterapia pode apresentar efeitos tóxicos tardios a nível cardiopulmular [93, 94], pode provocar edema do baço [95], plexopatia braquial [96] e apresenta risco de indução de carcinogénese subsequente [97].

O recurso à quimioterapia tem sofrido grandes avanços ao longo dos últimos anos. Os avanços na compreensão das bases moleculares do cancro da mama tem fornecido informações sobre novos alvos, como também têm permitido personalizar os tratamentos, melhorando os benefícios deste tipo de terapia, bem como poupar doentes que eventualmente poderão não beneficiar dos efeitos da quimioterapia [98]. A quimioterapia pode ser usada como terapia adjuvante ou neoadjuvante. Esta última tem como principal benefício a sua capacidade para fazer regredir um tumor grande, com vista ao tratamento por cirurgia conservadora [99]. A quimioterapia adjuvante é aplicada após um tratamento de primeira linha, como a cirurgia, com o intuito de prevenir reincidências. Nestes casos, a quimioterapia é normalmente iniciada após a cirurgia, num prazo de seis meses, se indicado [98]. No entanto, a doença pode apresentar uma tipologia metastática. Embora geralmente seja incurável, o cancro da mama metastático é quimiosensível (salvo em casos de desenvolvimento de quimioresistência[100]), de tal modo que é possível, através da quimioterapia, controlar os sintomas do doente neoplásico bem como prolongar a sua sobrevivência [98]. Segundo os dados recolhidos pela “American Cancer Society” [101], os medicamentos mais comumente recomendados para serem utilizados em combinação no tratamento de cancro da mama em estadios não muito avançados são a ciclofosfamida, metotrexato,

fluorouracilo, doxorubicina (adriamicina), epirrubicina, o paclitaxel (Taxol) e docetaxel (Taxotere).

Contudo, a aplicação da quimioterapia apresenta várias limitações, nomeadamente no que respeita ao direccionamento da terapia. A aplicação sistémica da quimioterapia, implica, em muitos casos, grandes dosagens que acabam por afectar células de tecidos saudáveis, acarretando severos efeitos secundários [102]. Esses efeitos tóxicos são, comumente, náuseas e vômitos, mielossupressão, alopecia, e mucosite. Efeitos menos comuns, mas igualmente sérios, incluem insuficiência cardíaca, eventos tromboembólicos [103], rápida perda de massa óssea na coluna vertebral e risco elevado de desenvolvimento de osteoporose [104].

Além disso, a quimioterapia ainda tem de se debater com os fenótipos de múltipla resistência a fármacos (MDR – multi-resistência a fármacos) apresentados por vários tecidos neoplásicos da mama, que podem ser distinguidos em resistência farmacocinética e resistência celular. Alguns mecanismos envolvidos nesta resistência à quimioterapia estão relacionados, por exemplo, com a sobre-expressão de vários membros da super-família de transportadores ABC (*adenosine triphosphate binding cassette*), como o MRP1 ou BCRP, e do transportador P-glicoproteína (P-gp) [105].

A heterogeneidade das neoplasias da mama faz disso um fascinante desafio, no sentido de encontrar novas formas de diagnóstico e terapia sistémica com a escolha ideal dos agentes terapêuticos mais adequados a cada tipo de carcinoma mamário. Deste modo, aponta-se para que a melhor forma de combate ao cancro sejam as terapias biologicamente dirigidas, nomeadamente com recurso ao desenvolvimento de estratégias de entrega dos agentes quimioterapêuticos, de forma a aumentar a sua concentração no local do tumor, e à identificação de biomarcadores preditivos de sensibilidade a quimioterapia específica, ou de alvos moleculares em vias de sinalização

específicas [102, 106]. Um exemplo de terapias direccionadas é o estudo que mostrou que a sobre-expressão da proteína p53 em células da linha celular MCF-7 aumenta significativamente a eficácia do tratamento anticancerígeno com progesterona. A sobre-expressão da proteína p53 inibiu a proliferação celular e induziu apoptose, processo este que não decorre quando células com baixos níveis de expressão de p53 são tratadas com a mesma hormona [107].

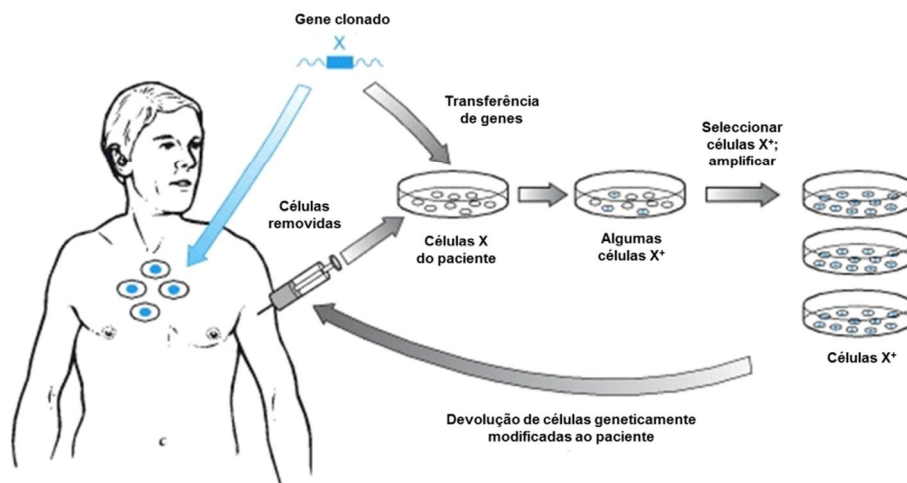
A terapia génica surge neste contexto como uma potencial estratégia capaz de atingir efectividade nos tratamentos biologicamente direccionados do cancro, tornando-os mais específicos e com menos efeitos colaterais, como os que estão associados às convencionais terapias.

### **1.3 Terapia génica**

O primeiro ensaio clínico de terapia génica foi realizado em 1991 e serviu para tratar uma doença do sistema imunitário, conhecida como adenosina deaminase (ou deficiência ADA) [108]. Esta doença enfraquece a resposta imunológica, mesmo quando se trata de pequenas infecções. Os dois pacientes mostraram melhorias, mostrando à comunidade científica que a terapia génica poderia funcionar [108]. Desde então, o número de doenças passíveis de serem tratadas com terapia génica tem aumentado, atingindo mais de 600 doenças em 2004 [108]. De forma muito genérica, a terapia génica consiste de várias abordagens para o tratamento de doenças humanas ou na correcção de qualquer disfunção do organismo, que dependem da transferência de material genético exógeno para as células de um indivíduo com o objectivo de corrigir ou eliminar as causas de patologias que envolvam factores genéticos, como doenças neoplásicas, hereditárias, degenerativas e infecciosas [109]. Corroborando esta perspectiva, até 2001, aproximadamente 50% dos protocolos de terapia génica

aprovados pelos *National Institutes of Health* (NIH), *Recombinant DNA Advisory Committee* (RAC) e *Food and Drug Administration* (FDA) tinham sido para a área do cancro [108, 110-112].

A entrega do material genético em terapia génica pode ser feita *in vivo*, através da administração directa no sangue, tecidos ou células, ou administração indirecta, através de técnicas laboratoriais *ex vivo* [111] (Figura 8). Esta administração indirecta é uma técnica recorrente em dois tipos básicos de terapia génica, que podem ser aplicados a seres humanos: terapia aplicada à linha germinal e terapia aplicada a células somáticas [113]. O objectivo da terapia génica da linha germinal consiste na introdução de células transgénicas na linha germinal, bem como na população de células somáticas [113]. Este tipo de terapia não só deve conseguir tratar uma pessoa, mas também corrigir o genótipo de alguns gâmetas [113]. A terapia génica somática incide sobre o corpo. A abordagem consiste em tentar corrigir um fenótipo de células somáticas, que é causado por genes que são expressos predominantemente num tecido [113].



**Figura 8** – Terapia génica *in vivo* (seta azul) implica a modificação genética das células de um paciente *in situ*. Terapia génica *ex vivo* (setas pretas) implica que células autólogas sejam removidas do paciente, cultivadas *in vitro* e transformadas, antes de serem implantadas no doente (Adaptado de: Capítulo 22 – Gene therapy and other molecular genetic-based therapeutic approaches em Strachan (1999) [114]).



A terapia génica pode ser aplicada sob diferentes vertentes no que respeita a estratégias anti-tumorais, como sejam a substituição de genes supressores de tumor mutados, a introdução de outros genes em falta, ou até estratégias com base na transferência de genes codificando citocinas ou outros mediadores imunitários (vacinas de DNA), genes que codificam enzimas virais para converter pro-fármacos em metabolitos tóxicos (terapia suicida), material genético que regula/altera com especificidade a expressão genética, como oligonucleótidos antisense, ribozimas, siRNAs e microRNAs [110, 111, 115, 116]. Uma parte muito desafiante da terapia génica incide, portanto, no desenvolvimento de vectores não tóxicos que sejam capazes de entregar esse material genético *in vivo*.

### **1.3.1 Métodos em terapia génica**

Existem numerosos métodos de aplicação de terapia génica com potencial para serem usados na transferência de genes exógenos ou RNA para células humanas. O tamanho dos fragmentos de material genético que podem ser transferidos é, na maioria dos casos, limitada e, muitas vezes, no caso de genes, estes não são genes convencionais. Nesses casos, recorre-se a genes artificiais que são compostos por uma sequência de cDNA contendo a sequência completa de DNA codificante, que é manipulada de forma a poder ser flanqueada por sequências reguladoras apropriadas, como fortes promotores virais (promotor de citomegalovirus – CMV), que asseguram elevados níveis de expressão do gene. Após a transferência genética, os genes inseridos podem integrar os cromossomas da célula, ou manter-se como elementos genéticos extracromossómicos (plasmídeos e episomas) [114].

As moléculas de DNA ou RNA, devido ao seu tamanho e natureza hidrofílica conferida pela carga negativa dos seus grupos fosfato (que dificulta a interacção com a

membrana celular, graças às repulsões electrostáticas), não conseguem, por si só, entrar eficientemente numa célula. Além disso, desprovido de protecção, o material genético fica muito susceptível à degradação promovida por nucleases [117]. Por esse motivo, é importante o desenvolvimento de vectores, ou métodos físicos, que facilitem a transferência do material genético para as células alvo, sem que haja degradação desse.

A escolha dos métodos para a transferência de material genético depende da natureza do material genético que se pretende usar, bem como da natureza do tecido ou das células alvo. Além disso, existem muitas outras implicações, não só ao nível da eficiência da transferência e expressão do material genético para o interior das células alvo de forma a conseguir-se o desejado efeito terapêutico, como também ao nível de segurança na aplicação. Actualmente, os métodos utilizados podem receber dois tipos de classificação: por um lado, podem classificar-se em virais ou não-virais [118] e, por outro lado, podem dividir-se em métodos físicos, químicos ou biológicos [117].

Os métodos físicos (não-virais) muitas vezes usados em culturas de células e tecidos *in vitro*, incluem metodologias como a microinjecção [119], bombardeamento de partículas (“*gene gun*”) [120], sonoporação [121] e electroporação [122]. Este tipo de métodos facilita a transferência de material genético extracelular, desprovido de qualquer protecção, para o núcleo, através da formação de poros/defeitos transientes das membranas provocada por forças físicas [117]. Tal como os vectores virais, os métodos físico são muito pouco específicos no que respeita à acção direccionada para células alvo *in vivo*.

Porém, os métodos mais comumente utilizados em terapia génica recorrem ao uso de vectores virais (métodos biológicos), que derivam de retrovírus, lentivírus, adenovírus, vírus adeno-associados, mas, embora menos utilizados, também existem os que derivam do vírus herpes simplex 1 (HSV-1), baculovírus e outros [110, 118, 123].

Actualmente, a maioria das experiências de terapia génica recorre a vectores que, após algumas modificações, resultam num vírus de replicação incompetente [114]. Contudo, este tipo de vectores, apesar da sua elevada eficiência de transdução e consequente expressão do material genético, acarreta inúmeros factores de risco, como a possibilidade de sofrerem recombinação dando origem a um vírus do tipo selvagem [114, 124]; inserirem material genético em locais do genoma não seguros, podendo despoletar a activação de oncogenes [125]; os vectores virais podem despoletar reacções imunológicas [114], que podem levar à destruição das partículas virais antes de estas atingirem as células alvo, ou à destruição das células que foram alvo dos vectores [126]. Além disso, apesar de alguns vírus infectarem maioritariamente células com capacidade de divisão, os vírus em geral não são passíveis de serem manipulados de forma a serem utilizados em terapias direccionadas para alvos específicos da superfície celular [127].

No que respeita aos métodos químicos (não virais), estes apresentam algumas vantagens em relação aos métodos biológicos (vectores virais), nomeadamente a facilidade de produção em massa; a ausência de problemas de segurança de aplicação, como o risco de activação de oncogenes, a imunogenicidade e a toxicidade [108, 128, 129]; reduzidas limitações ao nível do tamanho do vector, grande flexibilidade em relação ao tamanho do transgene transportado e elevada diversidade de componentes químicos para as suas multifacetadas construções, que podem, inclusivamente, aumentar a especificidade para tecidos e células específicas e facilitar a cedência intracelular do material genético [108, 110]. Estes métodos, que envolvem, por exemplo, o uso de lípidos catiónicos e polímeros catiónicos, têm como objectivo formar complexos condensados através de interacções electrostáticas com DNA carregado negativamente. Estes complexos, são denominados lipoplexos e poliplexos, respectivamente [130], e são capazes de proteger o DNA contra a acção das nucleases, bem como facilitar o

*uptake* celular e a entrega intracelular [117, 129]. Em comparação com outros sistemas de entrega não virais, incluindo lipossomas aniónicos que encapsulam os ácidos nucleicos, os lipoplexos e poliplexos tendem a mediar níveis de transfecção mais elevados [130]. Por estas razões, este tipo de vectores constitui a alternativa aos vectores virais mais promissora para a terapia génica. O desafio actual é a obtenção de um sistema para vectores não-virais que iguale ou supere a transfecção efectiva apresentada pelos vectores virais (transdução). Apesar de isso ainda não ter sido alcançado, defende-se que, num futuro próximo, a melhor maneira de atingir concentrações intratumorais razoáveis de um transgene será através de injeção intratumoral directa dos vectores disponíveis, com ou sem o auxílio de técnicas como a endoscopia ou tomografia [118].

#### **1.3.1.1 Lipossomas catiónicos e lipoplexos**

Os lipossomas são vesículas esféricas que mimetizam a estrutura biológica das membranas e podem ser produzidos através da interacção de uma larga gama de lípidos. Tipicamente, os lipossomas catiónicos contêm dois tipos de componentes: lípido catiónico e lípido neutro, também denominado lípido auxiliar ou co-lípido [130]. Os lípidos catiónicos são moléculas anfífilicas que contêm um grupo polar carregado positivamente, ligado a um domínio hidrofóbico. Este grupo carregado positivamente é necessário para a interacção electrostática com o grupo fosfato dos ácidos nucleicos, carregado negativamente [117, 130].

A eficiência da transfecção, isto é, a actividade biológica está dependente da estrutura dos lípidos catiónicos (exemplo: DOTAP e EPOPC), das propriedades do lípido auxiliar (exemplo: DOPE e Colesterol), da morfologia e tamanho dos lipoplexos, da densidade de carga superficial, da estabilidade coloidal e da capacidade de protecção

do material genético [131, 132]. Para a formação de lipoplexos eficientes, a estequiometria entre o lípido catiónico e o material genético, a estrutura do material genético, o modo de preparação e o meio em que os complexos são preparados têm também um papel preponderante [132, 133]. Regra geral, um lípido auxiliar que promova um elevado grau de fluidez membranar, favorece o processo de transfecção [130].

A dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) é um co-lípido usado recorrentemente devido à sua capacidade de destabilizar as membranas, favorecendo a eficiência de transfecção [130, 134, 135]. Este co-lípido também facilita o escape endossomal, através da destabilização da membrana do endossoma provocada pela transição deste lípido para uma configuração hexagonal, que ocorre a pH ácido [130, 132]. O colesterol (Chol) é também usado regularmente como lípido auxiliar, apesar de originar complexos menos eficientes do que aqueles que têm DOPE na sua composição [136]. Porém, a presença de colesterol em lipoplexos estabiliza as estruturas lipídicas catiónicas membranares em meio fisiológico, protegendo-os da acção destrutiva de componentes do soro e pode promover melhor actividade biológica dos complexos em transfecções *in vivo*, onde estão presentes os componentes do soro [117, 130, 137-140].

A estrutura dos lípidos catiónicos deve ser tida em conta quando se pondera a escolha de um determinado lípido. Sabe-se, por exemplo, que a condensação e protecção do material genético aumenta com o crescente número de cargas positivas do lípido catiónico. Contudo, uma interacção electrostática entre o material genético e o lípido catiónico muito forte pode prejudicar a sua necessária dissociação subsequente. Lípidos muito carregados positivamente têm também tendência a formar micelas, pelo que podem formar complexos menos estáveis. Além disso, sabe-se também que os níveis de transfecção são afectados, negativamente, pelo aumento do comprimento das

cadeias hidrocarbonadas dos lípidos catiónicos e, positivamente, pelo aumento da saturação dessas cadeias. Possivelmente, isto estará relacionado com a influência que estas características têm na fluidez das membranas [141-143]. O lípido 1,2-dioleoil-3-(trimetilammonium)propano (DOTAP) é um dos mais utilizados na produção de lipossomas catiónicos, tal como o cloreto de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilammonium (DOTMA). Estes lípidos são monovalentes [132], mas diferem, por exemplo, ao nível do *linker* group (que une o *headgroup* catiónico e a âncora hidrofóbica), que tem sido correlacionado com os níveis de transfecção e citotoxicidade dos lípidos catiónicos [144]. Enquanto o DOTMA possui ligações éter estáveis, que lhe conferem mais estabilidade, mas também mais citotoxicidade, não sendo biodegradável, o DOTAP possui ligações éster fracas, que lhe conferem menos estabilidade e menos citotoxicidade [130, 132, 142, 145]. Novos lípidos têm surgido com o propósito de tentar colmatar alguns dos problemas associados à eficiência de transfecção e aos níveis de citotoxicidade. Um deles é o 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (EPOPC), um lípido catiónico análogo da fosfatidilcolina (um constituinte natural das membranas biológicas), que se ligam através de ligações éster, exibindo, por isso, baixa toxicidade e mostrando-se adequados para aplicações clínicas [146, 147]. Estudos recentes revelaram que o EPOPC é um lípido capaz de produzir complexos com maior actividade biológica do que aqueles que têm DOTAP na sua constituição [140, 148].

Estudos levados a cabo pelo nosso grupo de investigação, mostraram que lipossomas catiónicos compostos por EPOPC e colesterol, numa razão molar de 1:1, constituem um sistema de transporte e entrega de material genético consideravelmente eficiente. Os lipoplexos preparados com estes lipossomas surtiram níveis de transfecção muito superiores aqueles obtidos com lipoplexos preparados com lipossomas constituídos por DOTAP e colesterol, na mesma razão molar [148].

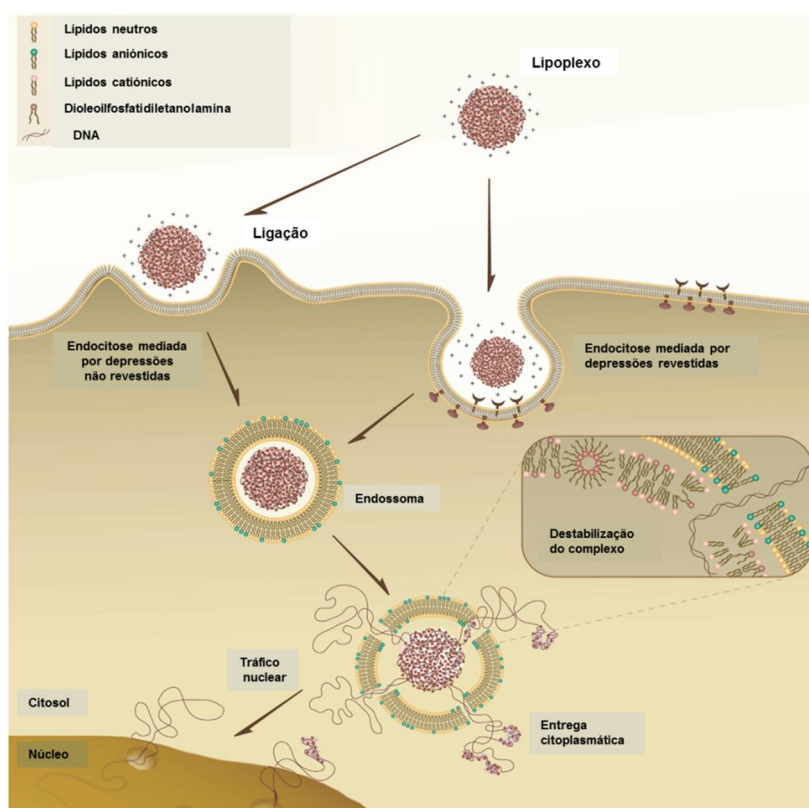
### 1.3.1.2 Interação lipoplexo/célula e mecanismos de internalização

Apesar da vasta aplicação dos sistemas de entrega de material genético como os lipossomas catiónicos, os mecanismos pelos quais ocorre todo o processo de transfecção são ainda pouco conhecidos (Figura 9).

Estruturalmente, o material genético dos lipoplexos está rodeado pelos lípidos que lhe garantem protecção contra nucleases extra e intracelulares. Além disso, os lipoplexos, devido à sua carga positiva, tendem a interagir electrostaticamente com as proteínas membranares carregadas negativamente, glicoproteínas e proteoglicanos [117, 132]. Alguns estudos têm revelado que, aparte de estarem envolvidos na ligação e internalização de vírus nas células [149], os proteoglicanos parecem desempenhar um papel importante na ligação dos lipoplexos às células [150, 151], mas também na sua internalização, por um mecanismo que conduz à activação da proteína cinase C e à ligação da actina ao domínio citoplasmático dos proteoglicanos que interagem com os lipoplexos, promovendo a submersão do complexo por um processo semelhante ao da endocitose bacteriana [152].

De facto, após a ligação dos lipoplexos à membrana celular, a endocitose tem sido reconhecida como a principal via de internalização destes sistemas de entrega de material genético [153, 154]. Felgner, Gadek [155] defendia que a internalização também poderia ocorrer através da fusão dos complexos com a membrana plasmática, através da acção cooperativa entre os lípidos catiónicos e os co-lípidos, como o DOPE. Embora estas duas vias de *uptake* celular possam coexistir em graus variáveis, dependendo do tipo de célula, da confluência e da idade da célula, é provável que a teoria da fusão dos lipoplexos com a membrana celular contribua pouco para a entrega intracelular do material genético, uma vez que esse processo, provavelmente, libertará o material genético para o meio extracelular antes de ele ser internalizado [144].

A endocitose pode ocorrer por vários mecanismos que, geralmente, são divididos em duas categorias principais: a fagocitose, um processo que é restrito a

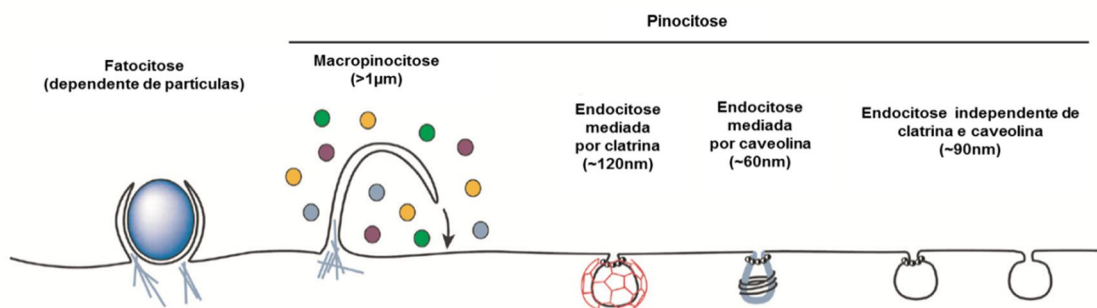


**Figura 9** – Visão global dos passos principais envolvidos na interação dos lipoplexos com as células: ligação à membrana e *uptake* celular dos complexos, libertação citoplasmática e tráfego nuclear do material genético (Adaptado de: Simoes, Filipe et al. (2005)).

algumas células de mamíferos especializadas, mas que pode ocorrer quando os lipoplexos apresentam determinadas características físico-químicas, como grande tamanho [156], e a pinocitose, que ocorre em todas as células de mamíferos e engloba a macropinocitose, endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina e endocitose independente de clatrina e caveolina (Figura 10) [157]. O tamanho dos lipoplexos parece também ser crítico para a determinação de qual das vias de pinocitose é activada, sendo que, na ausência de ligandos, parece ser o tamanho da partícula que, por si só, determina qual o percurso de internalização a seguir [132].



A associação de proteínas, ligandos peptídicos e anticorpos tem sido muito usada para direccionar especificamente os lipoplexos para células alvo, potenciando a sua internalização por endocitose e, conseqüentemente, melhorando a sua actividade



**Figura 10** – Representação esquemática das diferentes vias endocíticas.  
(Adaptado de: Conner (2003) [41]).

biológica [158], ou simplesmente, facilitar a transfecção generalizada. Neste sentido, estudos têm mostrado que algumas proteínas, como a albumina, quando associadas a lipoplexos, podem activar a internalização desses através de processos não específicos de endocitose, nomeadamente, a fagocitose [159]. Nos estudos levados a cabo pelo nosso grupo de investigação, constatou-se que a adição de albumina à constituição de lipoplexos preparados com lipossomas catiónicos compostos por EPOPC: Colesterol (1:1) aumenta substancialmente a actividade biológica dos complexos, conduzindo a uma maior expressão de transgenes em diferentes tipos de células, mesmo na presença de soro [140, 148]. Embora ainda não seja claro, duas das justificações apontadas para o aumento da eficiência de transfecção na presença de albumina são a possibilidade de, sendo a proteína mais abundante do soro, evitar interacções indesejadas entre os complexos lipossoma catiónico/DNA e os componentes do soro (evitando a agregação dos complexos) [160], e a possibilidade de ocorrerem ligações inespecíficas entre esta proteína e receptores da superfície celular análogos aos receptores *scavenger* que poderão mediar a endocitose dos lipoplexos, bem como a sua entrega intracelular [140, 159, 161].

### **1.3.1.3 A fuga do lipoplexo à via endocítica**

Um dos passos importantes para que a transfecção seja eficiente, é a libertação do material genético da via endocítica, para evitar a sua degradação ao nível do lisossoma. O mecanismo pelo qual esta fuga ocorre ainda não está bem esclarecido, contudo, o mais aceite é que a destabilização da membrana do endossoma ocorra pelo “flip-flop” dos lípidos aniónicos do folheto citoplasmático para o folheto luminal da membrana do endossoma, induzido pelos complexos internalizados. Posteriormente, a interacção entre os lípidos aniónicos do folheto luminal da membrana do endossoma com os lípidos catiónicos dos lipoplexos pode resultar na descondensação do material genético dos lipoplexos, ocorrendo a libertação desse para o citoplasma (Figura 9) [132, 162]. Neste ponto do processo de transfecção, os co-lípidos têm um papel preponderante. Por exemplo, o DOPE induz a destabilização da membrana do endossoma, devido às suas propriedades fusogénicas a pH ácido, como é o pH endossomal, permitindo, assim, a libertação do material genético para o citoplasma [163]. Outros estudos têm mostrado que a albumina pode também facilitar a fuga do material genético da via endocítica. Esta acção da albumina prende-se com o facto de esta proteína sofrer alterações conformacionais a pH ácido, adquirindo propriedades fusogénicas [164]. O pH endossomal provoca uma protonação parcial da albumina que pode, então interagir com a membrana do endossoma, destabilizando-a. Esta destabilização poderá provocar movimentos “flip-flop” de lípidos aniónicos da membrana que dissociam os lipoplexos [159]. Essa dissociação dos lipoplexos pode ser reforçada pela expansão reversível da albumina (derivada das alterações conformacionais geradas pelo pH ácido) [140].

#### **1.3.1.4 Entrada do material genético no núcleo**

Uma vez no citoplasma, o material genético tem de chegar ao núcleo e atravessar a membrana nuclear para que a transcrição ocorra. Em células que tenham uma divisão activa, o material genético exógeno beneficia da ruptura da membrana nuclear, durante a mitose. Aquando da reconstituição da membrana nuclear, o material exógeno é incluído no núcleo, tal como o endógeno, podendo, assim, ser transcrito [165]. Porém, na ausência de divisão celular, o mecanismo de entrada de material genético no núcleo permanece pouco claro. O mecanismo apontado como o mais provável é o que decorre da associação inespecífica do material genético a proteínas ou peptídeos que contenham o sinal de localização nuclear (NLS), ou aos seus receptores (karyopherin- $\alpha/\beta$ ), havendo assim a importação do material genético para o núcleo por um processo activo [132].

#### **1.3.2 Terapia génica e cancro da mama**

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidas estratégias de terapia génica para tratamento de tumores sólidos. Mas a entrega uniforme do material genético terapêutico às células cancerígenas *in situ* tem demonstrado ser um factor limitante para a eficiência do tratamento [112]. Apesar de haver relatos sobre respostas terapêuticas em alguns pacientes oncológicos, ainda não há prova inequívoca da eficácia clínica da maioria das abordagens de terapia génica, principalmente devido ao baixo nível de transdução e eficácia da expressão *in vivo* com os vectores actualmente disponíveis para a prática clínica [118].

A morte celular não tem de ser o único objectivo de um determinado tratamento. Os objectivos da terapia génica podem ser mais vastos, abrangendo a indução de alterações no crescimento e comportamento celular, tal como a inibição da proliferação

e da invasão ou capacidade metastática das células cancerígenas. De forma a induzir morte nas células tumorais e/ou controlar o processo metastático (proliferativo e invasivo), são necessárias novas estratégias para entregar genes terapêuticos sistemicamente, ou para induzir respostas anti-tumorais sistêmicas após terapia local. A investigação dos últimos anos, permite criar uma subdivisão das principais estratégias de terapia gênica usadas em cancro, nomeadamente cancro da mama, em cinco conceitos básicos: 1) supressão de oncogenes ou transferência de genes supressores de tumor, 2) reforço da resposta imunitária contra o tumor, 3) transferência de genes suicidas, 4) terapia pro-apoptótica, 5) protecção da medula óssea usando genes de resistência a fármacos e 6) inibição da angiogénese tumoral [118, 166, 167].

Presentemente, podem destacar-se algumas estratégias que envolvem a supressão de oncogenes ou transferência de genes supressores de tumor em cancro da mama. A maioria dos ensaios clínicos correntes envolvem a reposição do gene supressor de tumor mais comumente alterado em cancro, p53 [167]. A transferência de p53 foi testada usando vectores adenovirais e revelou ser capaz de reverter a resistência das células MCF-7/MDR (multi-resistência a fármacos) à adriamicina, possivelmente por um processo associado à inibição da expressão de P-gp (glicoproteína de permeabilidade) e à indução de apoptose [168]. A introdução de p53 *wildtype* (wt) através de vectores virais e lipossomas em células de cancro da mama humano também se tem revelado suficiente para restaurar o equilíbrio normal da proliferação e da morte celular das células de cancro da mama, podendo conduzir à diminuição do tumor. Além disso, a inserção de p53 também parece estar associada a um *bystander effect*, o que significa que não só as células transduzidas com p53 morrem, mas também as células circundantes não transduzidas, possivelmente através de efeitos angiogénicos [169-171]. Alguns ensaios pré-clínicos também revelaram que a

combinação da inserção de p53 wt nas células cancerígenas com cisplatina e doxorrubicina inibiu a proliferação celular mais eficazmente do que a quimioterapia por si só. Contudo os autores defendem que é importante o estudo das possíveis interações entre a p53 e os fármacos quimioterapêuticos em modelos pré-clínicos [172]. Ainda dentro deste tipo de estratégia, também já se realizaram estudos (fase I de ensaio clínico) no sentido de inibir a expressão do gene ErbB2/HER-2, que resultou na diminuição da proliferação do tumor, indução de apoptose e aumentou a sensibilidade do tumor à quimioterapia *in vitro* e *in vivo* [173, 174]. O RNA de interferência (RNAi) tem demonstrado estar envolvido num potente mecanismo intracelular de silenciamento pós-transcricional específico de genes. Neste sentido, a supressão de c-myc e c-fos tem também sido testada através da transdução com vectores retrovirais para expressar RNA antisense. Não só esta estratégia impediu a formação de tumor em animais modelo injectados com uma linhas celulares de cancro da mama [175, 176], como também foi proposta para aplicação em ensaios clínicos, recorrendo a doentes em que as terapias convencionais não produziram qualquer efeito [177].

Em relação às estratégias usadas para aumentar a resposta imunológica contra as células cancerígenas, já foi usada a transferência de genes que codificam citocinas. O gene da interleucina 2 (IL-2) foi feito expressar em células de cancro da mama através de vectores adenovirais, num ensaio clínico de fase I, tendo despoletado resposta imunológica na maioria dos doentes e até a regressão dos tumores numa pequena minoria desses [178].

A terapia génica suicida está dividida em duas categorias: terapia com toxinas e terapia com pro-fármacos activados por enzimas [167]. A transferência de genes que codificam enzimas de activação de drogas em células cancerígenas e o tratamento com pro-fármacos de agentes quimioterapêuticos provoca uma elevada concentração do

fármaco activado no tecido tumoral. Não só as células transduzidas/transfectadas mas igualmente células circunferenciais podem morrer com a aplicação deste tipo de terapia génica (“*bystander effect*”). O primeiro ensaio clínico de activação genética de pro-fármacos direccionada para cancro da mama data de 1999. Foi um estudo clínico de fase I para testar a segurança e eficácia de uma terapia genética baseada na activação de um pro-fármaco e direccionada especificamente para células de cancro da mama, através do uso do promotor do gene humano erbB-2. O ensaio mostrou que a técnica é segura e resultou na expressão do gene citosina deaminase (CD) (que activa o pro-fármaco fluorocitosina) em 90% dos casos, conduzindo à redução do tumor em 4 de 12 casos [179].

No que respeita à terapia génica pro-apoptótica, a supressão de membros da família Bcl-2, como as proteínas Bcl-2 e a Bcl-xl (inibidores apoptóticos), parece desempenhar um papel importante no cancro da mama. Por exemplo, terapia génica usando Bcl-xs, um inibidor de Bcl-2 e Bcl-xl, tem mostrado ser capaz de induzir apoptose em células humanas de cancro da mama [180, 181].

Mais exemplos de estratégias de terapia génica aplicada a cancro da mama estão bem sintetizados nas revisões de Stoff-Khalili, Dall [167] e Simoes, Slepushkin [159].

#### **1.4 Áreas emergentes na terapia do cancro da mama**

Novas áreas emergentes, como a manipulação dos níveis de expressão de micro-RNAs parecem ser promissoras no sentido de colmatar as falhas terapêuticas que se prendem com a heterogeneidade geno e fenotípica do cancro. A descoberta dos micro-RNAs introduziu uma nova forma de regulação genética, contribuindo para o melhor entendimento das vias moleculares oncogénicas. A desregulação dos microRNAs começa a ser entendida como um aspecto fundamental para a patogenezidade de muitos

cancros, dado o seu envolvimento em funções celulares básicas. Além disso, a sua capacidade de inibir dezenas a centenas de genes simultaneamente torna-os fortes candidatos como biomarcadores de prognóstico e alvos terapêuticos no cancro [182]. Deste modo, o design de estratégias que se destinem concomitantemente a diferentes vias reguladoras é mais provável de ser eficaz quando combinado com tratamentos convencionais, passando, por exemplo, pela activação de caminhos pro-apoptóticos [183].

Apesar dos recentes avanços nas abordagens terapêuticas convencionais, a frequente aquisição de resistência aos fármacos observada e os efeitos secundários tóxicos têm limitado a sua aplicação clínica. Já no que respeita à terapia génica, um dos maiores desafios reside em ultrapassar as limitações associadas à ineficiente entrega de material genético terapêutico às células alvo [133, 144]. A quimioterapia pode, aqui, desempenhar um papel muito importante, na medida em que já tem sido mostrado que, a sua habilidade para afectar o estado de polimerização/despolimerização dos microtúbulos pode ser usada para aumentar a capacidade de transfecção dos lipossomas, colaborando no escape endossomal e, conseqüentemente, diminuindo o nível de degradação do material genético pelo lisossoma [184-186]. Neste sentido uma nova área emergente é também a combinação das duas estratégias terapêuticas: terapia génica e quimioterapia, com o objectivo de, não só potenciar a terapia génica, como também reduzir as concentrações de fármaco usado, possivelmente acarretando menos efeitos secundários.

#### **1.4.1 MicroRNAs e cancro da mama**

Os microRNAs, de forma abreviada, miRNAs, são pequenas sequências de RNA não codificantes, com cerca de 22 nucleótidos. Os miRNAs diferem dos RNAs

mensageiros (mRNAs) porque funcionam como moléculas reguladoras transcricionais, regulando a expressão genética, isto é, controlando os produtos de transcrição dos genes (mRNAs). Geralmente, os miRNAs são codificados a partir de intrões ou de outros genes conhecidos, mas alguns têm o seu próprio promotor. A informação do gene de um miRNA codifica um precursor desse, primiRNA, que forma um longo *hairpin loop*. A endonuclease Droscha cliva este precursor, ainda dentro do núcleo, que é então exportado para o citoplasma, onde a Dicer o transforma na sua forma madura e uma helicase faz com que o miRNA fique em cadeia simples. A função reguladora destes miRNAs maduros é exercida, normalmente, através da sua ligação à região 3'UTR dos mRNAs, suprimindo a sua tradução (ou por clivagem dos mRNAs ou prevenindo a sua tradução pelos ribossomas) [187]. Trabalhos recentes têm revelado que os miRNAs desempenham funções cruciais ao nível de vários processos biológicos, tendo a capacidade de ter como alvos dezenas a centenas de genes simultaneamente, o que os tornam fortes candidatos como biomarcadores de prognóstico e alvos terapêuticos no cancro. De acordo com isto está o facto de diferentes cancros apresentarem padrões de expressão de miRNAs diferentes das células normais e relativamente específicos, permitindo classificar tumores pouco diferenciados. O restabelecimento dos níveis funcionais dos miRNAs pode permitir o restabelecimento da ordem mitogénica, tendo o potencial necessário para inibir oncogenes ou proteínas que indirectamente regulem o estado tumorigénico [187-191].

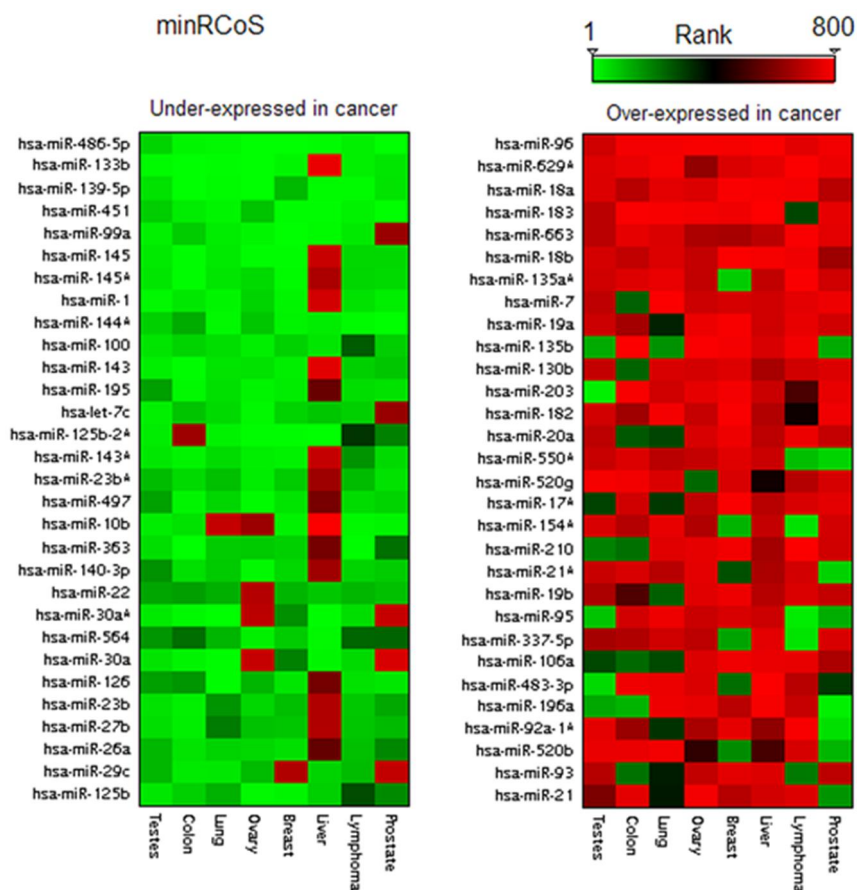
Estudos em células de cancro da mama têm revelado a forte regulação de vias de sinalização por parte de microRNAs, que podem desempenhar, assim, um papel importante na progressão do tumor. Desregulações na expressão ou polimorfismos destes componentes genéticos têm vindo a ser correlacionadas com o crescimento do tumor, metástases angiogénese e resistência a fármacos [192].



Segundo Iorio, Ferracin [190], os miRNAs mais significativamente desregulados em cancro da mama são miR-125b, miR-145, miR-21 e miR-155. Contudo, é possível que outros miRNAs não tão desregulados e, portanto, não tão estudados, desempenhem funções tais que, se, por exemplo, forem sobre-expressos, possam despoletar eventos reguladores capazes de controlar o processo carcinogénico. Por exemplo, sabe-se que os miR-1 e miR-133, codificados pelo mesmo pri-mRNA [193, 194], e tal como o miR-206, são também dos miRNAs mais frequentemente sub-expressos em tumores humanos sólidos (Figura 11) [190, 191, 193, 195-198], nomeadamente em cancro da mama [195, 196, 199]. Actualmente já se encontram validados alguns alvos destes miRNAs para cancro, nomeadamente a proteína homóloga da fascina 1 (FSCN1) (aos níveis do mRNA e proteína) [197, 199, 200]. FSCN1 é uma proteína ligadora de actina, requerida para a formação de protrusões na superfície celular e feixes de microfilamentos citoplasmáticos [201], que é expressa em elevados níveis em células capazes de migrar activamente, enquanto é quase indetectável na maioria das células epiteliais normais [202]. A sobre-expressão de FSCN1 ocorre, então, em vários tumores, nomeadamente cancro da mama, estando usualmente correlacionado com elevado grau, invasões extensas, metástases distantes e, portanto, pobre prognóstico [203]. Porém, ainda não existem estudos realizados para indagar sobre qual o efeito da sobre-expressão do miR-1 ao nível da expressão da FSCN1 em cancro da mama, ou até mesmo da sobre-expressão conjunta dos miR-1 e miR-133, já que, estando codificados no mesmo pri-mRNA (cluster), poderão exercer funções complementares e, assim, revelarem uma acção mais relevante sobre este alvo. Outras proteína como a LIM e SH3 1 (LASP1) e transgelina 2 (TAGLN2) também estão descritas como sendo alvo dos miR-1 e miR-133 [194, 198, 204, 205]. A LASP1 é uma proteína ligadora dos filamentos de actina e parece localizar-se nos mesmos complexos ligados à superfície

interna das membranas celulares onde se co-localiza a FSCN1 [205], estando envolvida na formação de filopódios favoráveis à migração e invasão celular [194]. A expressão aumentada da proteína LASP1 em cancro da mama está correlacionada com elevadas taxas de metástases nos nódulos, sendo apontada como um possível relevante marcador de prognóstico [206]. Além disso, estudos já mostraram que esta proteína pode ser reprimida transcripcionalmente pela p53, sugerindo que a p53 pode, além dos microRNAs, desempenhar um papel importante no controlo do processo metastático mediado por LASP1 [207]. A TAGLN2 é um membro da família calponina, constituída por proteínas ligadoras de actina, e parece desempenhar funções oncogénicas, mediando processos de migração e invasão celular [198, 208].

Também Bcl-2 é um alvo do miR-1, segundo estudos feitos em cardiomiócitos, onde foi verificada uma correlação inversa entre a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e o miR-1 [209, 210]. Embora se admita a existência de algumas possíveis diferenças na regulação efectuada pelos miRNAs entre diferentes tipos de células, a Bcl-2 será, muito provavelmente, um alvo do miR-1 também em células cancerígenas. Além disso, foi mostrado que existe uma correlação inversa entre os níveis de expressão das proteínas Bcl-2 e p53 em cancro da mama, sendo que os valores de expressão de Bcl-2 disparam quando os valores da p53 normal ou mutada são baixos, sendo que, no caso da p53 mutada, esta parece substituir a Bcl-2 nas suas funções [211]. Se este mecanismo for realmente válido, a sobre-expressão de p53 normal poderá constituir uma estratégia para reduzir os níveis de expressão de Bcl-2, que actua como inibidor da apoptose e está sobre-expressa na maioria de casos de cancro da mama [212]. Assim, uma abordagem terapêutica interessante seria conjugar a inibição de Bcl-2 em cancro da mama, por sobre-expressão do miR-1, com a sobre-expressão da p53 normal.



**Figura 11** – Um *heatmap* do topo do *ranking* dos miRNAs, segundo análises minRCoS, onde as colunas representam os tipos de cancro e as linhas os diferentes miRNAs. A verde estão representados os miRNAs com muito baixo *ranking*, isto é, aqueles que estão sub-expressos num tumor específico em relação a amostras de tecido normais. A vermelho estão indicados os miRNAs sobre-expressos nas amostras de tumor. O painel da esquerda mostra os 30 primeiros miRNAs universalmente sub-expressos em tumores e o painel da direita mostra os primeiros 30 miRNAs universalmente sobre-expressos em tumores, de acordo com o *ranking* realizado por análises minRCoS (Fonte: Navon, Wang [196]).

#### 1.4.2 Conjugação de quimioterapia e terapia génica

O tráfego dos transgenes complexados com os vectores lipídicos tem sido objecto de grande estudo, de forma a compreender quais as barreiras celulares e extracelulares que dificultam a entrega do material genético, como discutido ao longo da secção 1.3.1, bem como quais as possíveis soluções para a aplicação terapêutica.

Estas barreiras físicas e metabólicas envolvidas na transfecção e subsequente translocação do transgene para o núcleo das células parecem estar, em grande parte, dependentes da via endocítica. Após a internalização dos lipoplexos, uma grande fração destes é direccionada para compartimentos lisossómicos, fazendo com que possa haver degradação do material genético e que apenas uma pequena parte desse que é internalizado penetre no citoplasma, pelo que este modo de entrada na célula constitui simultaneamente uma resistência à transferência eficiente dos transgenes [132, 213, 214]. Actualmente, reconhece-se que agentes estabilizadores dos mitrotúbulos, como a colchicina, vimblastina, vincristina (que têm um papel preponderante, não só na mitose, como também na dinâmica intracelular, incluindo o transporte dos endossomas, que contêm os lipoplexos, até aos lisossomas, ao longo da via endocítica), aumentam dramaticamente a transfecção de lipoplexos [184, 185]. Embora num estudo de Wang and MacDonald [184], com taxanos, não tenha sido gerada a mesma potenciação da transfecção em culturas de células musculares lisas, esses fármacos não devem deixar de ser testados noutros tipos de células, já que são amplamente aplicados no tratamento de cancros, nomeadamente o docetaxel. Este fármaco é comumente usado, em combinação com outros fármacos, no tratamento de cancro da mama avançado *in locu* ou com metástases, ou cancro da mama nódulo positivo e que pode ser removido por cirurgia [215-218].

Tendo em conta o dinamismo que os microtúbulos têm no fuso mitótico, estão entre os alvos de maior sucesso para a terapia antineoplásica, os fármacos que interfiram nesse equilíbrio dinâmico são potenciais candidatos a aplicações quimioterapêuticas. Fármacos como os alcaloides da vinca (ex.: vimblastina) e taxanos (ex.: docetaxel) têm sido aplicados em prática clínica, dado que promovem a diminuição ou o aumento dos microtúbulos dentro das gamas de concentrações quimioterapêuticas. Contudo,

actualmente sabe-se que, mesmo a concentrações baixas, estes fármacos são capazes de suprimir a dinâmica dos microtúbulos, sem, contudo, alterar a massa dos mesmos [219]. Desta acção decorre o bloqueio mitótico e indução de apoptose, ou a já referida potenciação de transfecção [184, 185, 219].

A vimblastina provoca a despolimerização a elevadas concentrações, ligando-se na extremidade positiva dos microtúbulos; no entanto, a baixas concentrações, mas clinicamente relevantes, este fármaco não é capaz de induzir a despolimerização dos microtúbulos; resultando igualmente em bloqueio da mitose que conduz à morte por apoptose [219]. O docetaxel, contrariamente aos alcaloides da vinca, estimula a polimerização dos microtúbulos. Eles ligam fracamente a tubulina solúvel por si só, tendo maior afinidade com a subunidade beta da tubulina ao longo do interior dos microtúbulos, estabilizando-os e/ou aumentando a sua polimerização, dependendo da sua concentração. Os principais efeitos secundários de ambos são a neurotoxicidade e a mielosupressão [219].

Para além da sua acção ao nível dos microtúbulos, o docetaxel é ainda capaz de induzir morte apoptótica por via mitocôndrial, que implica uma forte indução da produção de espécies reactivas de oxigénio, mesmo a baixas concentrações [220, 221]. Não obstante, também já foi demonstrado em ensaios clínicos que o docetaxel actua melhor em tumores com baixos níveis de Bcl-2, estando os elevados níveis de expressão desta proteína relacionados com a resistência à quimioterapia com docetaxel [222-224]. Deste modo, vários são os factores que apontam para uma nova estratégia terapêutica que passa pela regulação da expressão da Bcl-2 para baixos níveis, quer por que se poderá activar ou intensificar a apoptose, quer por que se poderá aumentar a sensibilidade das células a fármacos quimioterapêuticos. Um outro estudo sugere que a resposta inicial de células de cancro do pulmão ao tratamento com docetaxel envolve a

p53, que parece regular a transcrição da beta-tubulina [225]. Assim, a sobre-expressão de p53 em células cancerígenas também poderá ser uma boa estratégia para maximizar o efeito terapêutico do docetaxel.

Um estudo recente levado a cabo pelo nosso grupo de investigação [148] mostrou que a acção combinada entre vimblastina e terapia génica mediada por lipoplexos com albumina associada resultou num efeito sinérgico da terapia anti-tumoral. Este efeito permitiu o uso de doses de fármaco muito reduzidas, dando provas de que este tipo de estratégia poderá vir a ter grande impacto em termos clínicos, uma vez que puderam ser alcançados elevados níveis de transfecção que conduziram a uma forte actividade terapêutica, com a potencialidade de reduzir os efeitos colaterais do fármaco.

## **1.5 Objectivos**

Com este trabalho pretendeu-se desenvolver uma nova estratégia antitumoral, envolvendo a combinação de estratégias de terapia génica com agentes anti-mitóticos, por forma a obter um maior efeito terapêutico, com menos efeitos potencialmente adversos. Para isso, usámos a formulação de lipoplexos HSA-EPOPC:Chol/DNA (+/-) (4/1), desenvolvida pelo nosso grupo de investigação [140, 226], como sistema de transporte e entrega de material genético, em combinação com pequenas doses dos agentes quimioterapêuticos, docetaxel e vimblastina.

Assim, um dos objectivos deste trabalho consistiu em desenvolver uma estratégia que resultasse numa entrega eficiente de material genético a um elevado número de células alvo, ou seja, que originasse uma elevada expressão do transgene numa alta percentagem de células, através da acção combinada de vectores de terapia génica e de agentes de quimioterapia. Pretendeu-se também desenvolver uma nova

estratégia terapêutica, envolvendo a sobreexpressão de p53 e miR-1, que produzisse uma acção antitumoral elevada e que induzisse um efeito anticancerígeno sinérgico como resultado da combinação da estratégia de terapia génica com baixas quantidades de docetaxel ou vimblastina, identificando/comprendendo também alguns dos potenciais mecanismos subjacentes a esse efeito.

## **1.6 Relevância científica do trabalho**

Tal como já foi referido, o cancro da mama é uma doença de grande incidência a nível mundial, afectando principalmente o sexo feminino, e com taxas de morte associadas consideráveis em relação a outros tipos de cancro. As actuais opções de tratamento apresentam múltiplas limitações ao nível da especificidade para o alvo, da resistência às terapias e dos efeitos secundários tóxicos, que podem passar pela indução de danos genéticos também eles potencialmente cancerígenos. Desta forma, urge o desenvolvimento de novas terapias, onde as estratégias moleculares começam a desempenhar um papel importante e altamente promissor. A terapia génica apresenta-se como uma estratégia auspiciosa para o tratamento do cancro, por isso, é importante continuar a estudar novas formas para o direccionamento específico das terapias, bem como para a potenciação dos efeitos terapêuticos. A complexidade desta doença leva a caminhos terapêuticos que, cada vez mais visam a integração de estratégias multifactoriais, como a combinação de diferentes fármacos com terapias moleculares, sendo importante que todas as consequências destas interacções terapêuticas sejam bem exploradas antes de se passar à prática clínica.

---

SECÇÃO 2

Materiais e Métodos

---





## MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Linhas celulares e condições de cultura

As linhas celulares MDA-MB-231 (HTB-26) e MCF-7 (HTB-22) foram obtidas pela primeira vez a partir de tecido de um local metastático da glândula mamária de mulheres caucasianas, de 51 e de 69 anos de idade, respectivamente. As linhas celulares foram adquiridas na American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA).

Estas linhas celulares têm morfologia de células epiteliais, apresentando, no entanto, características distintas. A linha MDA-MB-231 apresenta níveis de expressão negativos para os receptores ER, PR e HER-2, o que normalmente se relaciona com os piores prognósticos e menores taxas de sobrevivência [227, 228], ao passo que a linha celular MCF-7 expressa esses três tipos de receptores [228]. Além disso, as células MDA-MB-231 expressam p53 mutante [229], enquanto as células MCF-7 expressam a p53 *wild-type* [230]. Comparativamente e considerando os valores totais de expressão de p53 mutante e *wild-type*, as células MDA-MB-231 expressam níveis muito elevados de p53 relativamente às células MCF-7 [231].

As linhas celulares foram cultivadas em DMEM-HG (Dulbecco's modified Eagle's medium – high glucose) (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA), suplementado com 10mM de HEPES, 12mM de bicarbonato de sódio, 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS) (Gibco, Paisley, Scotland) inativado por calor, 100U/ml de penicilina (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA) e 100µg/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA), em frascos de cultura de tecidos de 75 cm<sup>2</sup>, numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Estas células, crescendo em monocamada, foram subcultivadas sempre que atingiam uma confluência de, aproximadamente 80%, tipicamente 2 vezes por semana, para garantir que mantinham na fase exponencial de

crescimento. O protocolo de sub-cultura seguiu as indicações dadas pelo fornecedor, tendo sido as células destacadas com solução de tripsina (0,25%) (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA) e foram, habitualmente, efectuadas diluições de 1:4 e 1:6 para as células MDA-MB-231 e MCF-7, respectivamente.

## 2.2 Produção de plasmídeos

Foram usados clones de cDNA *full-length* ORF (*open reading frame*) (pDNA) de tamanho semelhante ( $\approx$ 5-6 kb), providos do mesmo promotor de citomegalovírus (CMV). Os plasmídeos usados foram: pCMV-Luciferase (VR-1216; gentilmente cedido pelo Dr. P. Felgner, Vical, San Diego, CA, USA), pCMV-GFP (Clontech, Mountain View, CA, USA), pCMV-p53/GFP (proteína 53 fundida com GFP) (cedido pelo Dr. G. Wahl, La Jolla, San Diego, CA, USA a AddGene, Cambridge, MA, USA, onde foi adquirido) e pCMV-miRNA-1, com o gene da proteína verde fluorescente (GFP) para monitorização (*tag*) (adquirido em Genecopoeia, Rockville, MD, USA). Ao longo do texto, os plasmídeos serão referidos da seguinte forma: pLuc (pCMV-Luciferase), pGFP (pCMV-GFP), pp53/GFP (pCMV-p53/GFP) e pmiR-1 (pCMV-microRNA1). Os plasmídeos foram amplificados em *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguido as indicações fornecidas pelos fabricantes. Resumidamente, foi apenas feita a transformação de *E. Coli* DH5- $\alpha$  com pmiR-1, recorrendo ao método de choque térmico. Adicionou-se 200ng de plasmídeo a 100 $\mu$ l de células competentes. Depois de agitado, submeteu-se a mistura a 4°C, durante 30 minutos (com agitação), seguido de uma submersão num banho a 42°C, durante 45 segundos (sem agitação). Novamente a 4°C, seguiu-se uma incubação durante 5 minutos, seguida da adição de 500 $\mu$ l de meio SOC (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) pré-aquecido, seguindo-se uma incubação de 1h, a 37°C, com agitação de 200rpm. Os restantes plasmídeos foram fornecidos em

bactérias já transformadas. Para amplificação de cada plasmídeo, células transformadas foram inoculadas isoladamente em placas com meio Luria Broth-Agar (LB-Agar; Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA) estéril e antibiótico (30µg/ml de canamicina para pLuc, pGFP e pp53/GFP e 100µg/ml de ampicilina para pmiR-1; Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA), durante 12-16h, a 37°C. A partir de uma colónia isolada, foi preparado o pré-inóculo em tubos de Falcon de 15ml com 3ml de meio LB (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA) suplementado com os respectivos antibióticos e cultivado a 37°C sob 200rpm, durante 8h. Em seguida, 1ml dessa cultura foi transferido para um *Erlenmeyer* (1000ml) contendo 650ml de meio LB com o respectivo antibiótico e cultivado a 37°C sob 225rpm, durante 16h (inóculo). Foram controladas as densidades ópticas a 600nm ( $DO_{600}$ ) dos pré-inóculos e inóculos para garantir máxima eficiência na amplificação, extracção e purificação. Os plasmídeos foram isolados e purificados usando QIAGEN Plasmid Giga Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) (pLuc e pGFP), ou Macherey-Nagel NucleoBond Xtra Maxi Kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Alemanha) (pp53/GFP e pmiR-1), seguindo minuciosamente os protocolos aconselhados pelos fornecedores.

A pureza e integridade dos plasmídeos foi confirmada por electroforese em gel de 1% de agarose. As concentrações das soluções de plasmídeo foram obtidas por espectrometria a 260nm, e a pureza foi avaliada segundo os rácios 260/230 e 260/280nm, usando o NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

### **2.3 Preparação de lipossomas catiónicos**

As vesículas unilameares pequenas (SUV) foram preparadas por extrusão de lipossomas multilamelares (MLV) compostos por uma mistura de 1:1 (rácio molar) de

1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (EPOPC) e colesterol (Col) (EPOPC:Col). Os lípidos (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) dissolvidos em  $\text{CHCl}_3$  foram misturados segundo o rácio molar desejado e, seguidamente, foi evaporado o solvente sob um fluxo de azoto, com o tubo mantido numa rotação contínua e à temperatura ambiente. O filme lipídico seco foi hidratado com água desionizada de forma a obter uma concentração lipídica final de aproximadamente 10-50mM e as MLV resultantes foram depois sonicadas durante 3 minutos e passadas 21 vezes através de dois filtros de policarbonato com poros de 50nm de diâmetro, usando o extrusor Liposofast (Avestin, Toronto, Canada), de forma a redimensionar as vesículas e obter uma distribuição uniforme de tamanhos. A suspensão de lipossomas (SUV) resultantes foram diluídos 3-5 vezes com água desionizada e esterilizados por filtração, usando filtros com poros de 0,22 $\mu\text{m}$  de diâmetro (Schleicher & Schuell BioScience, Alemanha). Os lipossomas foram preservados a 4°C e foram usados até 2 semanas após preparação.

#### **2.4 Determinação da concentração lipídica**

Ao processo de extrusão para formar SUVs está associada a perda de lípidos que ficam retidos nas membranas de policarbonato, pelo que a concentração final dos lípidos é geralmente diferente da inicial. Assim, é necessário proceder-se à quantificação da concentração lipídica após preparação dos lipossomas. Este procedimento baseou-se na determinação da concentração de colesterol, tratando-se de um método rápido, simples e específico. Como os lipossomas são preparados numa razão molar de 1:1, a concentração de colesterol é igual à concentração de EPOPC. Por sua vez, sendo o colesterol um lípido neutro, a concentração de cargas positivas pode ser conhecida directamente a partir da concentração de EPOPC, uma vez que cada

molécula de EPOPC possui apenas uma carga positiva. A quantificação de colesterol foi feita através do método colorimétrico de Liebermann-Burchard. A curva de calibração (0; 0,125; 0,250; 0,5; 1; 2 mg/ml) foi feita a partir de um stock líquido de 3mg/ml de colesterol (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL). Numa placa de 98 poços, fez-se reagir com 200µl de reagente de colesterol (ácido acético glacial, anidrido acético e ácido sulfúrico na razão 35:55:10 (v/v) e 1g/100ml de sulfato de sódio), 6,6µl de cada solução de colesterol de concentração conhecida e da amostra de lipossomas preparados, em duplicados. Após suave agitação e incubação de 20 minutos a 37°C, foram lidas as absorvâncias a 625nm, usando um espectrofotómetro SPECTRAMax PLUS 384 (Molecular Devices, Union City, CA, USA). A relação linear entre a concentração de colesterol e a absorvância a 625nm permitiu determinar a concentração de colesterol presente na amostra de lipossomas.

## **2.5 Preparação de lipoplexos**

Os lipoplexos foram preparados segundo o protocolo descrito por Faneca, Faustino [148], com algumas modificações, para uma razão de carga de 4/1 (+/-). Misturou-se sequencialmente tampão salino com HEPES (HBS; 100mM de NaCl, 20mM de HEPES, pH 7,4) (volume ajustável, dependendo do volume total de suspensão de lipoplexos a usar na transfecção) com suspensão de lipossomas EPOPC:Col (1:1) (num volume correspondendo a  $1,212 \times 10^{-8}$  mol de EPOPC/µg pDNA) e com 32µg de albumina de soro humano/µg de pDNA (HSA; Sigma, St. Lois, MO, USA) em HBS. Este rácio foi seleccionado com base em estudos prévios que mostraram que estas condições conduzem a maiores níveis de transfecção [159]. Depois de suave agitação, procedeu-se a uma incubação de 15 minutos, à temperatura ambiente. Findo esse tempo, adicionou-se solução de HBS contendo pDNA, gota a gota e sob

agitação lenta, seguindo-se nova incubação de 15 minutos, à temperatura ambiente, após suave agitação. Os lipoplexos foram usados imediatamente depois da sua preparação.

## **2.6 Ensaio de viabilidade celular**

Após os processos de transfecção das diferentes condições experimentais, a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de Alamar Blue modificado [232]. O ensaio mede a capacidade redox das células através da avaliação da redução da resazurina (forma oxidada) a resorufina (cor rosa), mediada pelo ambiente redutor da célula como resultado do crescimento celular, permitindo a determinação da viabilidade durante um determinado período, sem que ocorra o destacamento das células aderentes. Resumidamente, foi adicionado a cada poço resazurina (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA) a 0,01mg/ml em DMEM-HG sem vermelho de fenol (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA), suplementado tal como descrito na secção 2.1. Depois do desenvolvimento de coloração rosa nos poços de células controlo, aproximadamente após 1-3h de incubação a 37°C, foram colhidos 200µl de sobrenadante de cada poço e transferidos para placas de 96 poços. A absorbância a 570 (forma reduzida) e 600 nm (forma oxidada) foi medida num espectrofotómetro SPECTRAmax PLUS 384 (Molecular Devices, Union City, CA, USA). A viabilidade celular (como percentagem das células controlo) foi calculada de acordo com a fórmula  $(A_{570} - A_{600})$  das células controlo  $\times 100 / (A_{570} - A_{600})$  das células controlo.

## **2.7 Actividade Biológica da transfecção *in vitro* – ensaio de luciferase**

Para os estudos de transfecção efectuados com complexos contendo o plasmídeo pLuc, foi usada uma densidade de  $0,75 \times 10^5$  de células MDA-MB-231 e  $0,4 \times 10^5$  de células MCF-7 por poço, em placas de cultura de 48 poços ( $0,75 \times 10^5 / \text{cm}^2$  e  $0,4 \times 10^5$

/cm<sup>2</sup>, respectivamente). A transfecção foi iniciada apenas 24h após o *seeding*, garantindo uma confluência de 50-70%. Para a transfecção, foi adicionado a cada poço 300µl de meio de cultura, seguido da adição de lipoplexos num volume total de ≈200µl por poço (50µl de HBS; 1-3µl de suspensão de lipossomas, dependendo da concentração obtida na produção; 50µl de HSA a 640µg/ml; 100µl de solução de pLuc a 10µg/ml; preparados segundo o procedimento descrito na secção 2.5), correspondendo a um total de 1µg de pDNA por cm<sup>2</sup> de área de poço. O processo de transfecção foi realizado na ausência e presença de diferentes concentrações de docetaxel (Doc) ou vimblastina (Vin) (ambos adquiridos a Sigma) (0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 2,5 µM). Depois de 4h de incubação (5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C), trocou-se o meio de transfecção por 1ml de DMEM-HG completo e as células foram incubadas durante as 48h seguintes (5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C). Findo esse período, foi avaliada a viabilidade celular segundo o procedimento descrito na secção 2.6.

Para a avaliação do nível de expressão do gene, e como descrito anteriormente por Faneca, Simoes [140], as mesmas células foram seguidamente lavadas duas vezes com solução salina tampão com fosfato (PBS) e foi adicionado a cada poço 100µl de tampão de lise (1mM de DTT; 1mM de EDTA; 25mM de Tris-fosfato (pH 7,8); 8mM MgCl<sub>2</sub>; 15% de Glicerol; 1% de Triton X-100 (v/v)). Depois de as células destacarem, as placas foram submetidas a -80°C, durante, pelo menos, 15 minutos, de forma a facilitar o processo de lise celular. De seguida, em gelo, o conteúdo de cada poço das placas descongeladas foi transferido para *eppendorfs*, posteriormente centrifugados (10000rpm, durante 5 minutos, a 4°C), usando uma centrífuga ScanSpeed 1730MR. Do sobrenadante de cada amostra centrifugada, foram transferidos 50µl para poços de placas de 96 poços. O nível de expressão do gene nos lisados foi avaliado através da leitura da produção de luz pela luciferase, a 37°C, recorrendo a um luminómetro Lmax



II 384 (Molecular Devices, Union City, CA, USA), programado para injectar, em cada poço, 100µl de solução de luciferina a 167µM (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA), seguido de 100µl de tampão de leitura (1mM de DTT; 1mM de EDTA; 25mM de Tris-fosfato (pH 7,8); 8mM MgCl<sub>2</sub>; 15% de Glicerol (v/v)) contendo 2mM de ATP (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA), imediatamente antes da leitura de cada poço, que decorreu durante 10 segundos.

O teor de proteína dos lisados celulares foi analisado através do *kit* de Dc Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), usando albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA) como padrão (0; 0,125; 0,250; 0,5; 1; 2 mg/ml). A quantificação decorreu segundo o protocolo recomendado pelo fabricante. Resumidamente, 5µl do sobrenadante de cada amostra, bem como de cada amostra padrão, foram colocados em poços de uma placa de 96 poços, aos quais se adicionou 25µl de reagente A' (20µl de reagente S por cada ml de reagente A), seguido da adição de 200µl do reagente B. Após 15 minutos de incubação, à temperatura ambiente, a absorvância foi lida a 750nm, num espectrofotómetro SPECTRAMax PLUS 384 (Molecular Devices, Union City, CA, USA). Verificou-se uma relação linear entre a concentração de proteína e a absorvância lida a 750nm, tendo sido possível, a partir da curva padrão, equacionar a concentração de proteína de acordo com as absorvâncias obtidas.

Os resultados foram expressos como unidades relativas de luz emitida pela luciferase por mg de proteína celular total (Luciferase (RLU)/mg de proteína).

## **2.8 Eficiência da transfecção *in vitro* – ensaio de citometria de fluxo**

Para os estudos citometria, foi usada uma densidade de  $3 \times 10^5$  de células MDA-MB-231 e  $1,6 \times 10^5$  de células MCF-7 por poço, em placas de cultura de 12 poços

( $0,75 \times 10^5/\text{cm}^2$  e  $0,4 \times 10^5/\text{cm}^2$ , respectivamente). Todas as condições experimentais de tratamento foram realizadas em duplicado e usando pLuc ou pGFP. A transfecção foi iniciada apenas 24h após o *seeding*, garantindo uma confluência de 50-70%. Para a transfecção, foi adicionado a cada poço 1000 $\mu\text{l}$  de meio de cultura, seguido da adição de lipoplexos num volume total de  $\approx 700\mu\text{l}$  por poço (100 $\mu\text{l}$  de HBS; 4-8 $\mu\text{l}$  de suspensão de lipossomas, dependendo da concentração obtida na produção; 200 $\mu\text{l}$  de HSA a 640 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 400 $\mu\text{l}$  de solução de pGFP ou pLuc a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; preparados segundo o procedimento descrito na secção 2.5), correspondendo a um total de 1 $\mu\text{g}$  de pDNA por  $\text{cm}^2$  de área de poço. O processo de transfecção foi realizado na ausência e presença de diferentes concentrações de docetaxel (Doc) ou vimblastina (Vin) (0,05; 0,1 e 0,25  $\mu\text{M}$ ). Depois de 4h de incubação (5% de  $\text{CO}_2$ , a 37°C), trocou-se o meio de transfecção por 3ml DMEM-HG completo e as células foram incubadas durante as 48h seguintes (5% de  $\text{CO}_2$ , a 37°C).

Terminadas as 48h de incubação, as células foram lavadas com PBS e destacadas por acção de uma solução de tripsina (0,25%) (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA). A suspensão celular de cada condição experimental, com a tripsina já inibida pelos componentes do soro FBS, foi transferida para tubos de citometria, que foram centrifugados a 950rpm, durante 5 minutos, a 4°C, numa centrífuga Centrifuge 5810R (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Os *pellets* foram lavados duas vezes com PBS, em 2 ciclos de centrifugação, nas condições descritas acima. Por fim, as células foram ressuspensas em PBS e mantidas a 4°C para imediata leitura no citómetro de fluxo BD FACSCalibur<sup>TM</sup> (BD Biosciences, Qume Dr San Jose, CA, USA).

Cada condição experimental de transfecção com pLuc constituiu um controlo individual da respectiva condição experimental de transfecção com pGFP, permitindo uma normalização directa dos níveis de fluorescência. Os níveis de auto-fluorescência

variam com o tipo de tratamento, pelo que a subtração da auto-fluorescência das células transfectadas com pLuc permitiu diminuir o erro associado ao sinal cruzado entre auto-fluorescência das células e fluorescência da GFP.

## 2.9 Actividade antitumoral

Para os estudos de actividade antitumoral, foi usada uma densidade de  $0,75 \times 10^5$  de células MDA-MB-231 e  $0,4 \times 10^5$  de células MCF-7 por poço, em placas de cultura de 48 poços ( $0,75 \times 10^5 / \text{cm}^2$  e  $0,4 \times 10^5 / \text{cm}^2$ , respectivamente). A transfecção foi iniciada apenas 24h após o *seeding*, garantindo uma confluência de 50-70%. Para a transfecção, foi adicionado a cada poço 300 $\mu$ l de meio de cultura, seguido da adição de lipoplexos num volume total de  $\approx 200 \mu$ l por poço (50 $\mu$ l de HBS; 1-3 $\mu$ l de suspensão de lipossomas, dependendo da concentração obtida na produção; 50 $\mu$ l de HSA a 1280 $\mu$ g/ml; 50 $\mu$ l de solução de pLuc e 50 $\mu$ l de solução de pGFP, ou 50 $\mu$ l de solução de pLuc e 50 $\mu$ l de solução de pp53/GFP, ou 50 $\mu$ l de solução de pLuc e 50 $\mu$ l de solução de pmiR-1, ou 100 $\mu$ l de solução de pp53/GFP, ou 100 $\mu$ l de solução de pmiR-1, a partir de *stocks* a 20 $\mu$ g/ml – lipossomas foram preparados segundo o procedimento descrito na secção 2.5), correspondendo a um total de 2 $\mu$ g de pDNA por  $\text{cm}^2$  de área de poço. O processo de transfecção foi realizado na ausência e presença de diferentes concentrações de docetaxel (Doc) ou vimblastina (Vin) (0,05; 0,1; 0,25 $\mu$ M). Depois de 4h de incubação (5% de  $\text{CO}_2$ , a 37°C), trocou-se o meio de transfecção por 1ml DMEM-HG completo e as células foram incubadas a 37°C, numa atmosfera humidificada com 5% de  $\text{CO}_2$ . A viabilidade celular foi avaliada ao fim de 24, 48 e 72h, segundo o procedimento descrito na secção 2.6.

## 2.10 Transfecção celular para análise de RNA mensageiro e proteína

Para estudar a efectividade da transcrição dos genes terapêuticos (TP53, gene da proteína tumoral 53; MIR1, gene do microRNA 1), foi usada uma densidade de  $6 \times 10^5$  de células MDA-MB-231 e  $3,2 \times 10^5$  de células MCF-7 por poço, em placas de cultura de 6 poços ( $0,75 \times 10^5 / \text{cm}^2$  e  $0,4 \times 10^5 / \text{cm}^2$ , respectivamente). A transfecção foi iniciada apenas 24h após o *seeding*, garantindo uma confluência de 50-70%. Para a transfecção, foi adicionado a cada poço 2000 $\mu\text{l}$  de meio de cultura, seguido da adição de lipoplexos num volume total de  $\approx 1400 \mu\text{l}$  por poço (600 $\mu\text{l}$  de HBS; 4-8 $\mu\text{l}$  de suspensão de lipossomas, dependendo da concentração obtida na produção; 400 $\mu\text{l}$  de HSA a 1280 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 200 $\mu\text{l}$  de solução de pLuc e 200 $\mu\text{l}$  de solução de pGFP, ou 200 $\mu\text{l}$  de solução de pLuc e 200 $\mu\text{l}$  de solução de pp53/GFP, ou 200 $\mu\text{l}$  de solução de pLuc e 200 $\mu\text{l}$  de solução de pmiR-1, ou 400 $\mu\text{l}$  de solução de pp53/GFP, ou 400 $\mu\text{l}$  de solução de pmiR-1, a partir de *stocks* a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$  – lipossomas preparados segundo o procedimento descrito na secção 2.5), correspondendo a um total de 2 $\mu\text{g}$  de pDNA por  $\text{cm}^2$  de área de poço. O processo de transfecção foi realizado na ausência e presença de 0,1 $\mu\text{M}$  de docetaxel. Depois de 4h de incubação (5% de  $\text{CO}_2$ , a 37°C), trocou-se o meio de transfecção por 5ml DMEM-HG completo e as células foram incubadas durante as 48 ou 72h seguintes, a 37°C, numa atmosfera humidificada, com 5% de  $\text{CO}_2$ .

## 2.11 Extracção de RNA e síntese de cDNA

O RNA total das células tratadas segundo as condições de estudo detalhadas na secção 2.10 foi extraído usando o *kit* miRCURY RNA extraction (Exiqon Woburn, MA, USA), ao fim de 48h de incubação após o período de 4h de transfecção. Depois da quantificação de RNA, diferentes protocolos de transcrição foram usados, dependendo do tipo de RNA a ser determinado por qPCR.

Para quantificação de miRNA, a conversão para cDNA foi realizada usando o *kit* Universal cDNA synthesis (Exiqon Woburn, MA, USA). Para cada amostra, o cDNA foi produzido a partir de 20 ng de RNA total, num termociclador iQ5 (BioRad), usando o seguinte protocolo: 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C e 5 minutos a 95°C. O cDNA foi posteriormente diluído em água livre de RNase, num rácio de 1:40, antes da quantificação por qPCR.

Para quantificação de mRNA, a conversão para cDNA foi realizada usando o *kit* NZY First-Strand cDNA Synthesis (NZYTech, Lisboa, Portugal). Para cada amostra, o cDNA foi produzido a partir de 0,9µg do RNA total, num termociclador iQ5 (BioRad), usando o seguinte protocolo: 5 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C. O cDNA foi posteriormente diluído em água livre de RNase, num rácio de 1:500, antes da quantificação por qRT-PCR.

Os ensaios foram realizados sob estrita aplicação dos protocolos de cada *kit*, aconselhados pelos fornecedores.

## **2.12 Quantificação da expressão de miRNA por qRT-PCR**

A quantificação de miRNA nas células tratadas segundo as condições de estudo detalhadas na secção **2.10** foi realizada num termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems), usando placas *microtiter* de 96 poços e a SYBR® Green Master Mix (Exiqon, Woburn, MA, USA). Os *primers* para o miR-1 e miRNA de referência (snord44) foram também adquiridos na Exiqon. Para cada conjunto de *primers*, foi preparada uma *master mix* contendo um volume fixo de SYBR® Green Master Mix e a quantidade apropriada de cada primer, de forma a obter-se uma concentração final de 150nM. Para cada reacção, realizada em duplicado, foram adicionados 6µl de *master mix* a 4µl de cDNA *template*. As condições de reacção consistiram da activação da

enzima a 95°C durante 10 minutos, seguida por 45 ciclos a 95°C durante 10 segundos (desnaturação) e 60 segundos a 60°C (*annealing* e alongamento). O protocolo para determinação da curva de *melting* iniciou-se imediatamente depois, consistindo de 1 minuto de aquecimento a 55°C, seguido de 80 passos de 10 segundos com um aumento de 0,5°C a cada passo. Os valores de *threshold* para determinação do ciclo *threshold* (Ct) foi gerado automaticamente pelo *software* StepOne™. Os níveis relativos de miRNA foram determinados seguindo o método de Pfaffl para a quantificação relativa de miRNA na presença dos genes alvo (miR-1) e de referência (snord44) com diferentes eficiências de amplificação [233]. A eficiência de amplificação para cada gene foi determinado pelo *software* StepOne™, de acordo com a fórmula  $E=10^{(-1/S)}$ , onde S é o declive da curva padrão obtida para cada gene.

### 2.13 Quantificação da expressão de mRNA por qRT-PCR

A quantificação de mRNA nas células tratadas segundo as condições de estudo detalhadas na secção 2.10 foi realizada num termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems), usando placas microtiter de 96 poços e a iTaq™ Fast SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). Os *primers* para p53 e gene de referência (HPRT1) foram pré-desenhados pela Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha). Para cada conjunto de *primers*, foi preparada uma *master mix* contendo um volume fixo de iTaq™ Fast SYBR® Green Supermix, água e a quantidade apropriada de cada *primer*, de forma a obter-se uma concentração final de 150nM. Para cada reacção, realizada em duplicado, foram adicionados 6µl de *master mix* a 4µl de cDNA *template*. As condições de reacção consistiram da activação da enzima a 95°C durante 1 minuto, seguida por 45 ciclos a 95°C durante 3 segundos (desnaturação) e 30 segundos a 55°C (*annealing* e

alongamento). A determinação da curva de *melting*, do ciclo *threshold* (Ct) e dos níveis relativos de mRNA foram determinados de forma idêntica à indicada na secção 2.12.

#### **2.14 Análises por western blot**

Os extractos de proteína total foram preparados a partir das células tratadas segundo as condições de estudo detalhadas na secção 2.10, ao fim de 72h de incubação após o período de 4h de transfecção. As células foram homogeneizadas a 4°C em tampão de lise (50mM de Tris a pH7,5; 150mM de NaCl; 1% de Triton; 0,1% de SDS; 1 % de desoxicolato de sódio), contendo inibidores de protease (P8340, Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA) e fosfatase (P5726, Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA). As amostras foram incubadas em gelo, durante 20 minutos e centrifugadas a 14000g, durante 20 minutos, a 4°C, de forma a remover os fragmentos celulares insolúveis. A concentração de proteína foi determinada através do método de Bradford [234], usando uma curva padrão de BSA. Depois da desnaturação a 95°C, durante 5 minutos em tampão de Laemmli (Bio-Rad, Alfred Nobel Dr. Hercules, CA, USA), as proteínas (25µg), bem como o padrão de pesos moleculares Dual Color (Bio-Rad, Alfred Nobel Dr. Hercules, CA, USA), foram separados electroforeticamente em géis de 10% de SDS-poliacrilamida (Bio-Rad, Alfred Nobel Dr. Hercules, CA, USA) e transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad, Alfred Nobel Dr. Hercules, CA, USA), de acordo com os protocolos padrão. As membranas foram bloqueadas usando leite sem gordura (Bio-Rad, Alfred Nobel Dr. Hercules, CA, USA) ou BSA a 5% (de acordo com as indicações dos fornecedores dos anticorpos) em TBST (10mM de Tris-HCl, a pH 7,5 e 0,1% de Tween 20), durante 1h, à temperatura ambiente. Depois do bloqueio, as membranas foram incubadas durante uma noite, a 4°C, com anticorpo primário directamente contra p53 (1:1000). As membranas foram depois incubadas com

anticorpos secundários anti-mouse (1:5000) conjugados com peroxidase de rábano (HRP), durante 1h, à temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas com o substrato ECF da fosfatase alcalina (GE Healthcare GmbH, Freiburg, Alemanha), à temperatura ambiente, e depois submetidas à detecção de fluorescência a 570nm, usando um VersaDoc Imaging System Model 3000 (Bio-Rad, Alfred Nobel Dr. Hercules, CA, USA). As densidades de banda foram avaliadas usando o *software* Image J (NIH, Bethesda, MD, USA). Para confirmar a presença de proteína, as membranas foram incubadas com Ponceau antes do bloqueio. Os anticorpos usados foram fornecidos pela Cell Signaling, Danvers, MA, USA.

### **2.15 Análises estatísticas**

Todos os resultados são apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão de, pelo menos, três ensaios independentes, cada um realizado em triplicado, salvo indicação em contrário. Para comparações múltiplas entre condições experimentais, foram aplicadas análises de variância de uma via (ANOVA de 1 via) em combinação com o teste *post-hoc* de Tukey, ou análises de variância de duas vias (ANOVA de 2 vias) em combinação com o teste *post-hoc* de Bonferroni, tendo sido consideradas significantes para  $p < 0,05$ . As diferenças estatísticas são apresentadas em níveis de probabilidade de  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ . Os cálculos foram realizados no *software* de estatística Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA).





---

SECÇÃO 3

Resultados e Discussão

---



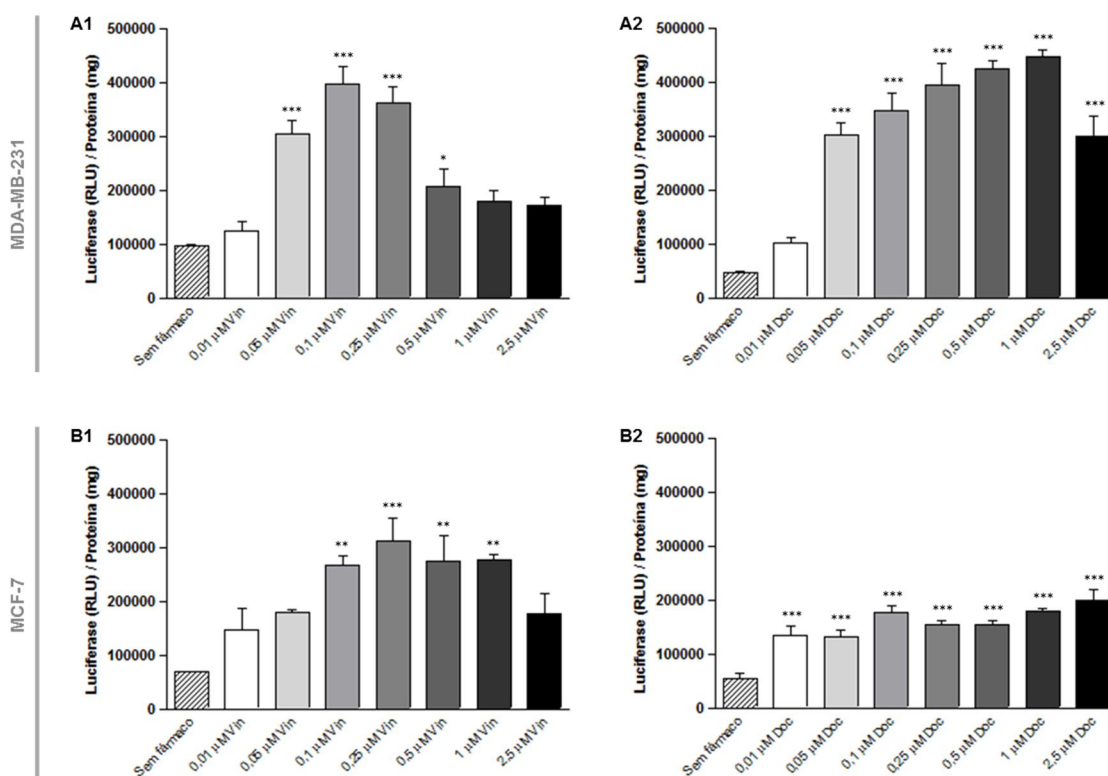
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Efeito da vimblastina e do docetaxel na potenciação da actividade biológica e citotoxicidade dos lipoplexos HSA-EPOPC:Chol/DNA em células MDA-MB-231 e MCF-7

#### 3.1.1 Avaliação da actividade biológica dos lipoplexos

Existem vários parâmetros que afectam as propriedades físico-químicas finais dos lipoplexos e, conseqüentemente, os níveis de transfecção mediados por este tipo de transportadores não virais de genes [133, 144, 235, 236]. A natureza dos lípidos catiónicos e dos lípidos auxiliares, bem como a proporção relativa entre lípido e DNA, são dois exemplos de parâmetros cruciais que devem ser considerados na preparação dos lipoplexos. Neste sentido, optou-se pela utilização da formulação HSA-EPOPC:Chol/DNA 4/1 (+/-). Em estudos realizados anteriormente pelo nosso grupo de investigação, os lipoplexos preparados na razão de carga de 4/1 (+/-) foram bem caracterizados, tendo apresentado boa protecção do DNA, bem como os tamanhos mais pequenos de entre as diferentes formulações testadas, um facto que é atribuído ao estabelecimento de forças repulsivas entre as cargas positivas superficiais dos lipoplexos, prevenindo a sua agregação [140]. A associação de HSA, apesar de resultar no aumento da média dos diâmetros dos complexos, provavelmente devido ao efeito de neutralização das cargas positivas dos complexos (conferidas pelo lípido EPOPC) mediado pela HSA (que exhibe carga negativa *net*) [65, 159], demonstrou ser altamente efectiva no aumento da actividade de transfecção, mesmo na presença de soro. Isto constitui uma grande vantagem em relação a grande parte dos sistemas lipídicos catiónicos de entrega de material genético, cuja eficiência tende a diminuir drasticamente na presença de soro [140, 148, 226]. Estudos anteriores indiciam que a

HSA parece actuar ao nível de duas fases distintas da via endocítica, levando ao aumento da expressão de transgenes: por um lado, promove a ligação dos lipoplexos à membrana citoplasmática e a sua internalização por endocitose, e, por outro lado, facilita o escape do DNA dos endossomas [148, 161, 237, 238].



**Figura 12 – Efeito da vimblastina e do docetaxel na actividade biológica dos lipoplexos HSA-EPOPC:Chol/DNA em células MDA-MB-231 e MCF-7.** Na presença ou ausência de diferentes concentrações de docetaxel (Doc) ou de vimblastina (Vin), células MDA-MB-231 e MCF-7, que foram cultivadas em placas de 48 poços ( $0,75 \times 10^5$  e  $0,4 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>, respectivamente), foram transfectadas com pLuc, perfazendo um total de 1 μg de plasmídeos por cada cm<sup>2</sup> de área de poço, durante 4h, como descrito nos materiais e métodos (2.7). A expressão de luciferase foi determinada 48h após o período de transfecção, através do ensaio de luciferase, como descrito nos materiais e métodos (2.7). Para cada gráfico, os resultados (média ± desvio padrão) são apresentados como unidades relativas de luz de luciferase por mg de proteína total (Luciferase RLU/proteína mg), de 1 ensaio representativo de, pelo menos 5 ensaios independentes (realizados em triplicado). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de 1 via, combinada com o teste *post-hoc* de Tukey. Os asteriscos (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ) correspondem à comparação dos valores de Luciferase (RLU)/proteína (mg) das células transfectadas na presença de diferentes concentrações de fármacos com os das células controlo (células transfectadas na ausência de fármaco).

Uma vez que um dos principais objectivos deste trabalho consistiu em avaliar a morte de células tumorais resultante da combinação de pequenas quantidades de vimblastina ou docetaxel com estratégias de terapia génica envolvendo a expressão de p53 e miR-1, investigou-se se estes fármacos anti-tumorais podem produzir algum aumento da actividade de transfecção mediada pelos lipoplexos. Para tal propósito, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de vimblastina e docetaxel na expressão de luciferase em células MDA-MB-231 e MCF-7, mediada por complexos HSA-EPOPC:Chol/DNA preparados na razão de carga de 4/1 (+/-), recorrendo ao ensaio de luciferase (como descrito na secção 2.7), 48h após o período de transfecção de 4h. Como observado na Figura 12, a presença dos agentes quimioterapêuticos resultou num aumento substancial da actividade biológica dos complexos. Este efeito potenciador foi dependente da concentração, sendo significativo ( $p < 0,001$ ) para a gama de concentrações 0,05-0,25 $\mu$ M, mas sempre com valores de transfecção mais elevados para 0,1 $\mu$ M de vimblastina nas células MDA-MB-231 (Figura 12–A1); enquanto para as células MCF-7 o efeito potenciador foi máximo para 0,25 $\mu$ M de vimblastina ( $p < 0,001$ ) (Figura 12–B1). Notavelmente, a estas concentrações, a vimblastina é capaz de induzir um aumento da actividade de transfecção de pelo menos 4 vezes para as células MDA-MB-231 e MCF-7. Relativamente ao docetaxel, o perfil da potenciação da actividade de transfecção, embora dependente da concentração, demonstra uma efectividade na potenciação da actividade biológica ( $p < 0,001$ ) a partir da concentração de 0,05 $\mu$ M, com o pico de expressão de luciferase a ocorrer com 1 $\mu$ M de docetaxel nas células MDA-MB-231 (Figura 12–A2). Por outro lado, nas células MFC-7, verificou-se que, apesar de a potenciação da actividade de transfecção começar a ser significativa ( $p < 0,001$ ) com 0,01 $\mu$ M de docetaxel (Figura 12–B2), foi conseguido o menor nível de potenciação da actividade biológica, atingindo aumentos de apenas 2-3 vezes, em média, para todas as

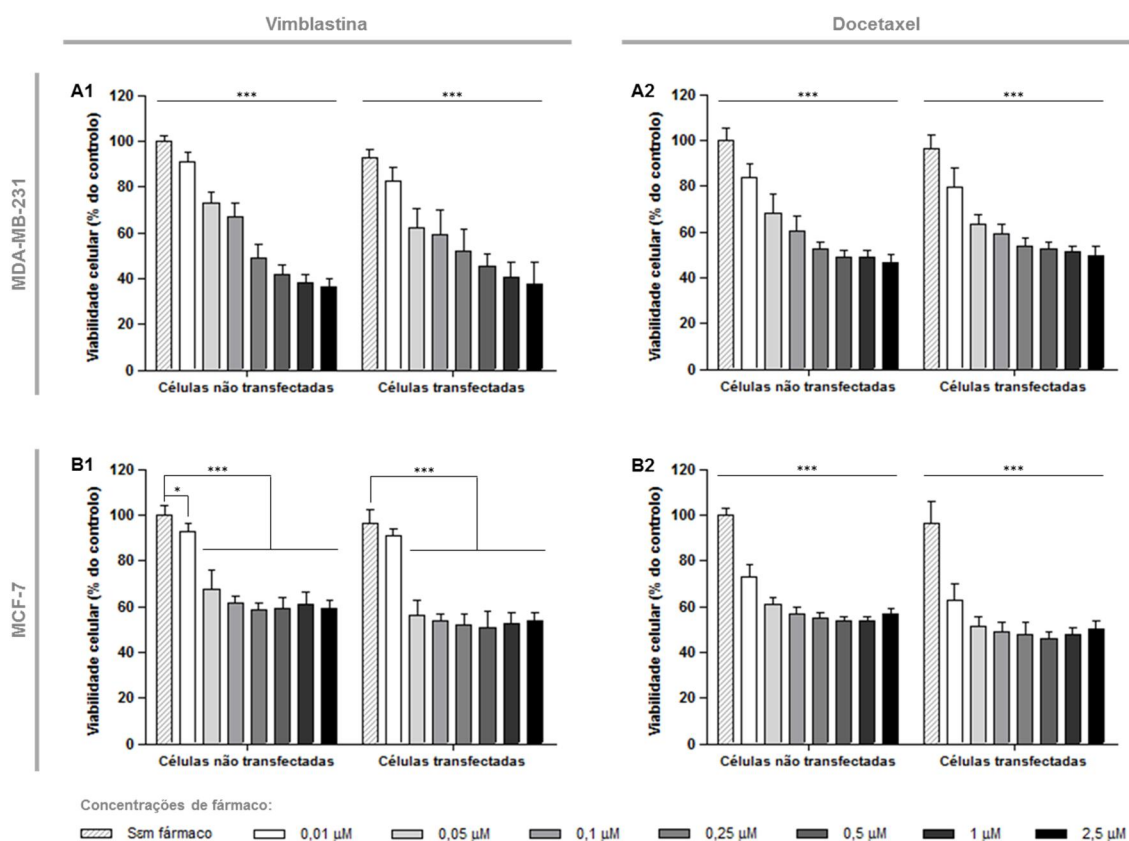
concentrações. Estes valores contrastam claramente com os das células MDA-MB-231, que reflectem aumentos na actividade de transfecção na ordem das 6-9 vezes, quando na presença de docetaxel.

### **3.1.2 Avaliação da citotoxicidade induzida pela estratégia combinada entre lipoplexos e fármacos**

Uma das particularidades dos lipoplexos que pode afectar a sua actividade biológica é o facto de a sua aplicação poder resultar em toxicidade [132]. No sentido de monitorizar a citotoxicidade associada à combinação de lipoplexos com fármacos, foi realizado o ensaio de Alamar Blue (como descrito na secção 2.6), 48h após o período de transfecção de 4h e imediatamente antes de se proceder à avaliação dos níveis de expressão de luciferase.

Os resultados apresentados na Figura 13 revelaram que, para todas as situações experimentais (A1, B1, A2, B2) a interacção entre os factores transfecção e concentração de fármaco não é estatisticamente significativa, indicando que as variações dos níveis de viabilidade celular dependem de apenas um dos factores. O perfil de valores de viabilidade celular varia com as diferentes concentrações de fármaco, mas não entre células transfectadas e não transfectadas, isto é, para cada uma das concentrações de fármacos, a viabilidade celular entre células transfectadas e células não transfectadas não é estatisticamente diferente. Assim, pode concluir-se que a combinação de lipoplexos e fármacos não resulta num aumento da citotoxicidade em relação à que é induzida apenas pela acção dos fármacos. Embora todas as concentrações de vimblastina ou docetaxel reduzam a viabilidade celular de forma significativa em relação às células não tratadas com fármaco, verifica-se que os maiores níveis de citotoxicidade ocorrem para concentrações iguais ou superiores a  $0,25\mu\text{M}$  de

vimblastina ou docetaxel, no caso das células MDA-MB-231 (Figura 13–A1-2); enquanto nas células MCF-7 a maior citotoxicidade se começa a denotar para concentrações mais baixas: 0,1µM de vimblastina (Figura 13–B1) e 0,05µM de docetaxel (Figura 13–B2).



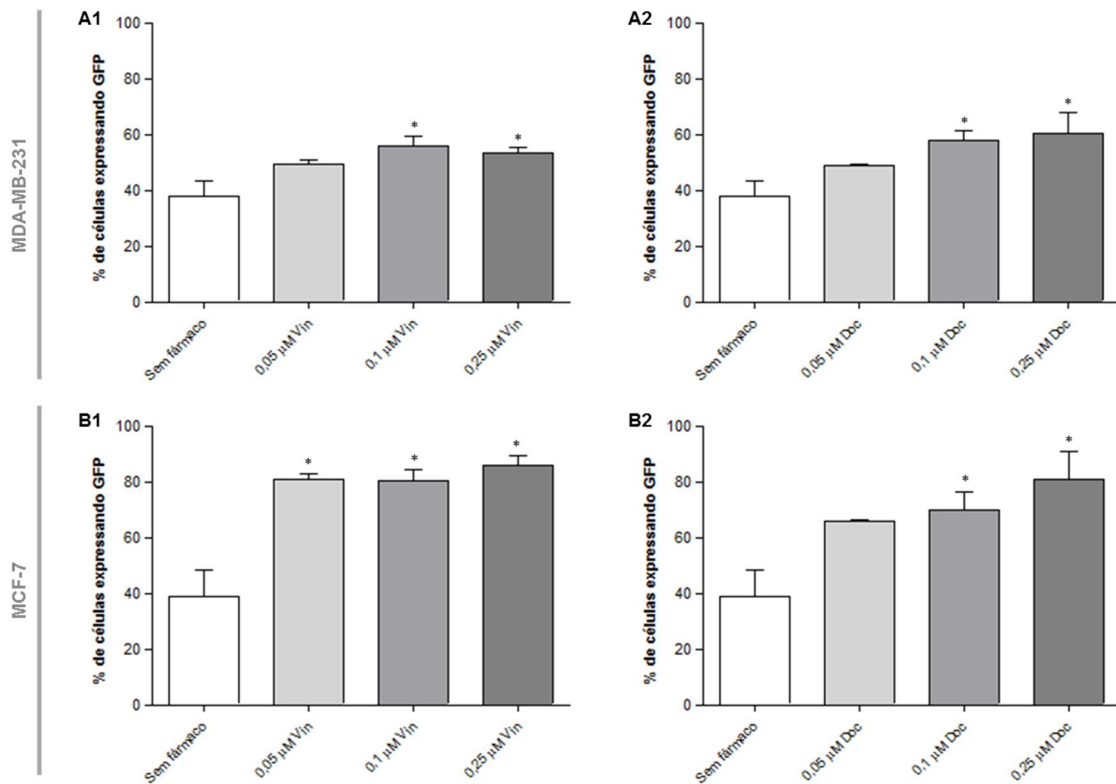
**Figura 13 – Efeito da conjugação de lipoplexos HSA-EPOPC:Chol/DNA com vimblastina ou docetaxel na viabilidade de células MDA-MB-231 e MCF-7.** Na presença ou ausência de diferentes concentrações de docetaxel (Doc) ou de vimblastina (Vin), células MDA-MB-231 e MCF-7, que foram cultivadas em placas de 48 poços ( $0,75 \times 10^5$  e  $0,4 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>, respectivamente), foram transfectadas com pLuc, perfazendo um total de 1µg de plasmídeos por cada cm<sup>2</sup> de área de poço, ou não transfectadas, durante 4h, como descrito nos materiais e métodos (2.7). A viabilidade celular foi determinada 48h após o período de transfecção, através do ensaio de Alamar Blue, como descrito nos materiais e métodos (2.6). Para cada gráfico, os resultados (média ± desvio padrão) são apresentados como percentagem do controle (células não transfectadas e não tratadas com fármaco), de, pelo menos 3 ensaios independentes (realizados em triplicado). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de 2 vias, combinada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. Os asteriscos (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ) correspondem à comparação dos valores de viabilidade das células não transfectadas ou transfectadas na presença de diferentes concentrações de fármacos com os das células transfectadas ou não transfectadas na ausência de fármaco, respectivamente.



Desta forma, cruzando os dados de potenciação da actividade biológica com os de citotoxicidade, consideramos que a gama de concentrações de fármaco mais vantajosa em termos de aplicação em estratégias de terapia génica será 0,05-0,25 $\mu$ M de vimblastina ou docetaxel. Dentro desta gama, consideramos que a concentração de 0,1 $\mu$ M será a que, de forma genérica, conjuga os níveis de citotoxicidade mais aceitáveis com os níveis de maior potenciação de actividade biológica dos lipoplexos, tendo sido, por isso, a concentração seleccionada para os estudos de actividade anti-tumoral.

### **3.1.3 Avaliação da eficiência de transfecção através da quantificação da percentagem de células que expressam GFP em resultado da combinação de lipoplexos e fármacos**

Com o intuito de analisar o efeito da presença de vimblastina ou docetaxel na eficiência de transfecção, avaliou-se a percentagem de células MDA-MB-231 e MCF-7 expressavam GFP, 48h após terem sido transfectadas com lipoplexos HSA-EPOPC:Chol/DNA preparados na razão de carga de 4/1 (+/-), recorrendo ao ensaio de citometria de fluxo (como descrito na secção 2.7). Com base nos resultados apresentados nas secções anteriores, neste estudo, apenas foi avaliado o efeito das concentrações de 0,05, 0,1 e 0,25 $\mu$ M de vimblastina e docetaxel. Como pode ser observado na Figura 14, a formulação HSA-EPOPC:Chol/DNA 4/1 (+/-) permite, em média, fazer expressar GFP em cerca de 40% das células MDA-MB-231 e MFC-7. A presença de docetaxel ou vimblastina durante o processo de transfecção promoveu um aumento substancial do número de células transfectadas. Nas células MDA-MB-231 esse aumento foi significativo ( $p < 0,05$ ) para as concentrações de 0,1 e 0,25 $\mu$ M de vimblastina ou docetaxel, reflectindo-se num aumento para 55 a 65% de células a



**Figura 14 – Efeito da vimblastina e do docetaxel na percentagem de células MDA-MB-231 e MCF-7 transfectadas com lipoplexos HSA-EPOPC:Chol/DNA.** Na presença ou ausência de diferentes concentrações de docetaxel (Doc) ou de vimblastina (Vin), células MDA-MB-231 e MCF-7, que foram cultivadas em placas de 12 poços ( $0,75 \times 10^5$  e  $0,4 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>, respectivamente), foram transfectadas com pGFP, perfazendo um total de 1μg de plasmídeos por cada cm<sup>2</sup> de área de poço, durante 4h, como descrito nos materiais e métodos (2.8). A expressão de GFP foi determinada 48h após o período de transfecção, através de citometria de fluxo, como descrito nos materiais e métodos (2.8). Para cada gráfico, os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de duplicados, sendo representativos de, pelo menos três ensaios independentes. A análise estatística foi realizada através de ANOVA de 1 via, combinada com o teste *post-hoc* de Tukey. Os asteriscos (\*  $p < 0,05$ ) correspondem à comparação das percentagens de células transfectadas na presença de fármaco com as percentagens das células transfectadas na ausência de fármaco.

expressarem GFP (Figura 14–A1-2). No que respeita às células MCF-7, o aumento da percentagem de células transfectadas foi significativo ( $p < 0,05$ ) para as concentrações de 0,05μM de vimblastina e 0,1 e 0,25μM de vimblastina ou docetaxel. Comparativamente às células MDA-MB-231, foi registada uma maior percentagem de células MCF-7 a expressarem GFP, obtendo-se valores de 80 a 90% de células transfectadas (Figura 14–

B1-2). O aumento da percentagem de células que expressavam GFP (Figura 14) observados na presença deste tipo de fármacos está de acordo com estudos de microscopia confocal do nosso grupo, realizados em células de adenocarcinoma mamário de ratinho transfectadas com a mesma formulação de lipoplexos na presença de 0,5 $\mu$ M de vimblastina [148]. Esta observação coaduna-se com os elevados níveis de expressão de luciferase (Figura 12) obtidos na presença das mesmas concentrações de vimblastina ou docetaxel.

### 3.1.4 Discussão

Devido à sua simplicidade, facilidade de produção em grande escala e baixa resposta imunitária, os complexos lipossomas catiónicos/DNA constituem uma ferramenta promissora na entrega de genes terapêuticos em doenças que envolvam factores genéticos, quer sejam hereditárias ou adquiridas. Contudo, a expressão de transgenes mediada por estes transportadores não virais é ineficiente, especialmente *in vivo*, sendo altamente influenciada pelas suas propriedades físico-químicas e pelas barreiras que a célula apresenta ao processo de transfecção [133, 136, 144, 235, 236]. Neste contexto, a compreensão e modulação desses parâmetros são cruciais para desenvolver novas e eficientes estratégias não-virais de entrega de genes.

Vários estudos têm testado hipóteses para o melhoramento da capacidade de lipoplexos mediar a entrega intracelular de material genético. Alguns deles têm objectivado a compreensão do tráfego intracelular de complexos de lípidos catiónicos/DNA, de forma a identificar as barreiras celulares que limitam a eficiente entrega de genes a células alvo. Neste contexto, o aprisionamento endolisossomal dos lipoplexos tem sido identificado como um dos factores mais limitantes da eficiência de transfecção [131, 132, 214, 239].

Neste trabalho, testou-se o potencial dos agentes destabilizadores dos microtúbulos vimblastina e docetaxel para o aumento da expressão de transgenes mediada por HSA-EPOPC:Chol/DNA preparados na razão de carga de 4/1 (+/-), em células MDA-MB-231 e MCF-7, provavelmente devido à diminuição do tráfego intracelular que conduz os lipoplexos até aos lisossomas. Assim, face à ampla aplicação clínica de vimblastina e docetaxel, como agentes anti-cancerígenos, a entrega de material genético mediada por lipoplexos na presença destes fármacos poderá constituir uma eficiente estratégia anti-tumoral devido ao seguinte efeito duplo: aumento da expressão do transgene e actividade quimioterapêutica. Os resultados ilustrados nas Figuras 12 e 14 revelam que a vimblastina e o docetaxel aumentam significativamente a expressão de transgenes (luciferase e GFP) em células MDA-MB-231 e MCF-7, quando usadas à concentração de 0,05-0,5 $\mu$ M (Figura 13). A citometria de fluxo (Figura 14) mostrou que tal aumento da expressão dos transgenes traduz quer os elevados níveis de expressão genética, quer a elevada percentagem de células transfectadas.

De acordo com estudos prévios realizados pelo nosso grupo [148], a potenciação da actividade de transfecção mediada por este tipo de fármacos não surgem como resultado do aumento de ligação à membrana e internalização dos lipoplexos. Esta observação é consistente com o já documentado papel da actina, mais do que os microtúbulos, como elemento responsável pela ligação inicial e internalização dos lipoplexos por endocitose [157, 240]. A vimblastina e o docetaxel provavelmente aumentam a expressão dos transgenes através da diminuição do tráfego intracelular que conduz os endossomas contendo os lipoplexos até aos lisossomas, onde podem ser degradados, e/ou da activação do factor nuclear NF- $\kappa$ B (factor de transcrição nuclear da cadeia leve kappa de imunoglobulina de linfócitos B) e consequente aumento da transcrição dos transgenes [184-186, 241-244]. Pode sugerir-se que a alteração do

normal funcionamento dos microtúbulos resulta na rápida libertação (escape) dos lipoplexos da via endocítica, com base em dados que mostram a baixa acumulação dos lipoplexos HSA-EPOPC:Chol/DNA na via endolisossomal na presença de vimblastina [148].

### **3.2 Efeito da vimblastina e do docetaxel na potenciação da actividade antitumoral induzida pela expressão de p53 e miR-1 mediada por lipoplexos HSA-EPOPC:Chol/DNA em células MDA-MB-231 e MCF-7**

O principal objectivo deste trabalho foi avaliar o potencial terapeutico resultante da combinação de duas estratégias anti-tumorais: terapia génica envolvendo a expressão de p53 e miR-1 e a quimioterapia convencional. Neste sentido, células MDA-MB-231 e MCF-7 foram tratadas com vimblastina ou docetaxel (agentes quimioterapêuticos) ou transfectadas com lipoplexos HSA-EPOPC:Chol/DNA (4/1) (+/-) contendo os plasmídeos pp53/GFP e pmiR1, na presença (terapia combinada) ou ausência de 0,1  $\mu$ M de vimblastina ou docetaxel.

Os primeiros resultados mostraram que, quer na presença quer na ausência de fármaco, a transfecção realizada com os lipoplexos contendo os plasmídeos terapêuticos (pp53/GFP e pmiR-1, isoladamente ou em combinação) numa quantidade correspondente a 1  $\mu$ g de plasmídeo/cm<sup>2</sup> de área de poço não resultou numa diminuição significativa da viabilidade celular em relação ao controlo (células transfectadas com a quantidade de complexos correspondente a 1  $\mu$ g de pLuc ou pGFP/cm<sup>2</sup> de área de poço). Por esse motivo, passou a ser usado um rácio total de 2  $\mu$ g de pDNA/cm<sup>2</sup> de área de poço. Recorrendo ao ensaio de luciferase, este rácio mostrou resultar num aumento significativo da expressão de luciferase em relação à proporção de 1  $\mu$ g de pDNA/cm<sup>2</sup> de área de poço, com uma citotoxicidade acrescida de 10 a 20% (dados não mostrados).

### **3.2.1 Avaliação da viabilidade celular após aplicação da estratégia terapêutica envolvendo a combinação da expressão de p53 e miR-1 com os fármacos vimblastina ou docetaxel**

Os resultados apresentados na Figuras 15 e 16 revelaram que a citotoxicidade induzida é substancialmente superior para as estratégias que combinam terapia génica com quimioterapia, revelando o forte potencial das estratégias anti-tumorais que combinadas. A citotoxicidade das estratégias mostrou também ser dependente do tempo de incubação após o período de transfecção de 4h, facto que foi mais evidente no caso das estratégias combinadas entre fármacos e lipoplexos. De uma forma geral, a maior redução de viabilidade celular de MDA-MB-231 e MCF-7 foi obtida às 72h após o período de transfecção (Figuras 15 e 16), sendo mais pronunciada nas células MDA-MB-231 (Figura 15).

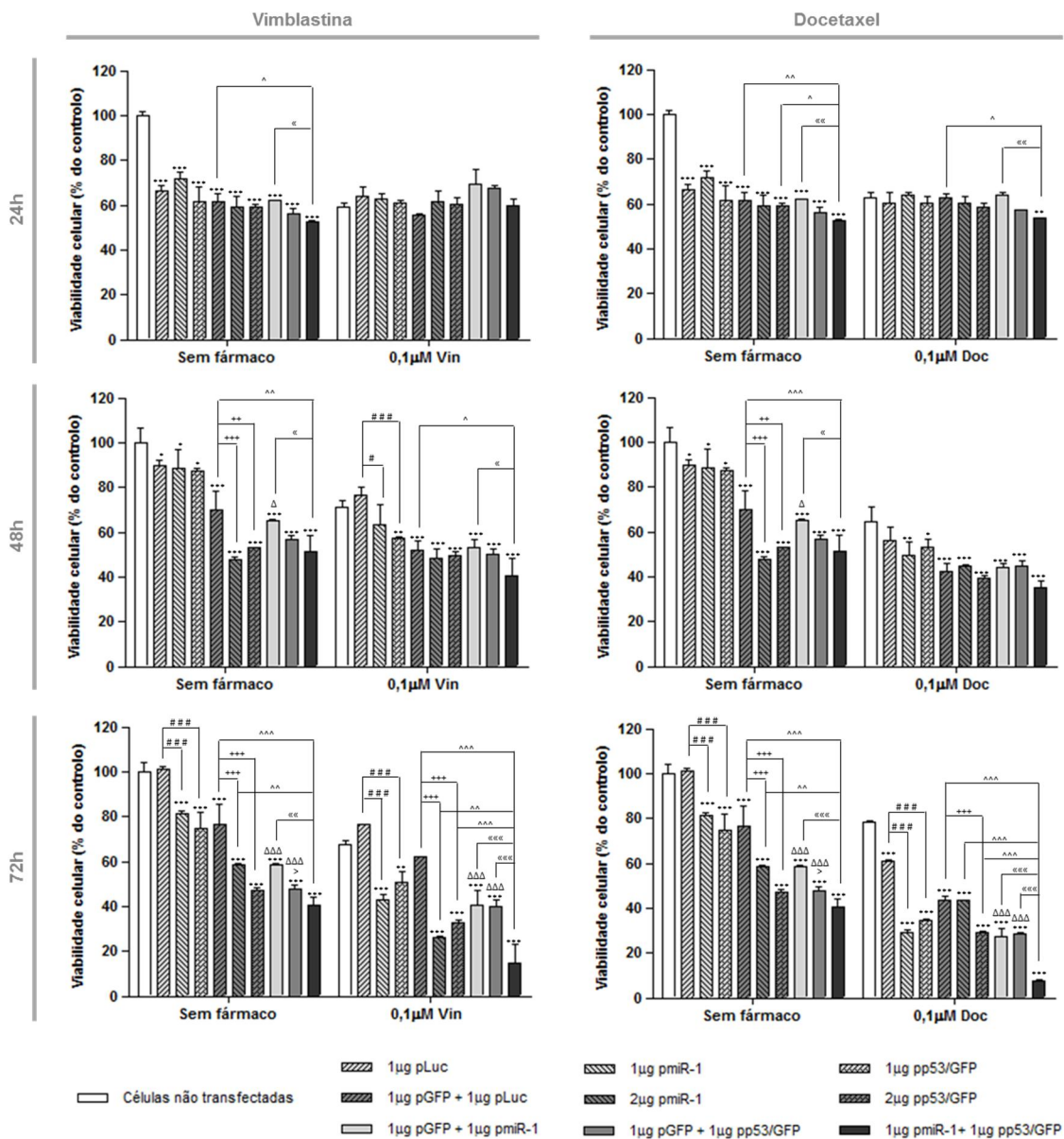
As células MDA-MB-231, na ausência de fármaco, apresentaram 60% de morte celular ( $p < 0,001$ ), 72h após terem sido transfectadas com os plasmídeos pp53/GFP e pmiR-1; enquanto células tratadas apenas com vimblastina ou docetaxel apresentaram níveis de morte na ordem dos 33% e 22%, respectivamente, estatisticamente considerados como não sendo significativos (Figura 15). No entanto, para células que foram transfectadas com os plasmídeos pp53/GFP e pmiR-1 na presença de vimblastina ou docetaxel (terapia combinada), 72h de incubação após o período de transfecção, mostraram níveis médios de morte celular de 85% e 93%, respectivamente ( $p < 0,001$ ) (Figura 15).

Paralelamente (para as mesmas 72h após o processo de transfecção), células MDA-MB-231 transfectadas com os plasmídeos não terapeuticos (pGFP e pLuc) na ausência de fármaco demonstraram níveis de citotoxicidade na ordem dos 24%, que aumentaram, significativamente para 38 e 56%, quando a mesma transfecção foi

realizada na presença de vimblastina ou docetaxel, respectivamente (Figura 15). Comparando com estes controlos directos, a citotoxicidade presente em células transfectadas com os plasmídeos pp53/GFP e pmiR-1 na presença de vimblastina ou docetaxel atingiu valores cerca de 2 vezes superiores ( $p < 0,001$ ). Com muito menor extensão de citotoxicidade absoluta, também o níveis de toxicidade celular presentes em células 72h após terem sido transfectadas com os plasmídeos pp53/GFP e pmiR-1 na ausência de fármacos (60%) se apresentaram cerca de 2,5 vezes superiores aos níveis de citotoxicidade correspondentes às células que foram transfectadas com os plasmídeos não terapêuticos (pGFP e pLuc) na ausência de fármaco (24%) (Figura 15).

De ressaltar é ainda o facto de, na presença de vimblastina ou docetaxel, os níveis de citotoxicidade em células MDA-MB-231 transfectadas com os plasmídeos pp53/GFP e pmiR-1 ( $1\mu\text{g}$  de cada/ $\text{cm}^2$ ) (85% e 93% para vimblastina e docetaxel, respectivamente) serem significativamente superiores ( $p < 0,001$ ) aos níveis de citotoxicidade provocados pela combinação de fármaco e transfecção com cada um desses plasmídeos isoladamente (em combinação com um plasmídeo não terapêutico,  $1\mu\text{g}$  de cada/ $\text{cm}^2$ ) que, não diferindo estatisticamente entre si, induzem níveis de citotoxicidade de 60 e 72% para vimblastina e docetaxel, respectivamente (Figura 15). Interessante foi também observar que a combinação de pmiR-1 e pp53/GFP foi capaz de induzir mais citotoxicidade ( $p < 0,001$ ; com excepção da condição de transfecção com  $2\mu\text{g}$  pmiR-1/ $\text{cm}^2$ , na presença de vimblastina  $p < 0,01$ ) do que a mesma quantidade de material terapêutico ( $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) de cada um dos plasmídeos isoladamente (Figura 15).

Estes resultados sugerem, assim, que o efeito anti-tumoral é potenciado pela combinação de vimblastina ou docetaxel com a terapia génica e pela combinação de diferentes plasmídeos (pmiR-1 e pp53/GFP).



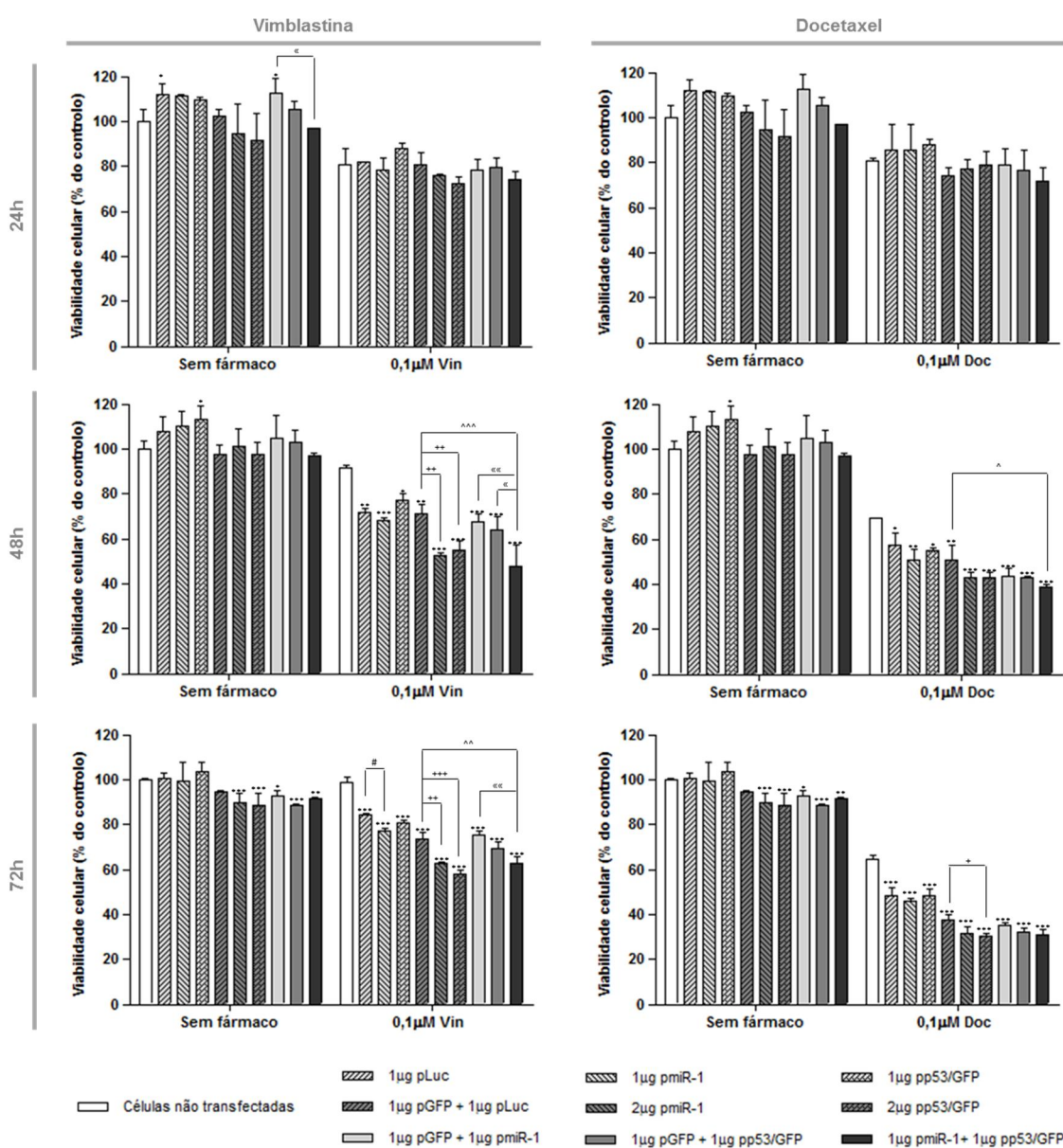
**Figura 15 – Avaliação da actividade anti-tumoral induzida pela acção combinada de miR-1, p53 e vimblastina ou docetaxel, em células MDA-MB-231.** Na presença ou ausência de 0,1µM de docetaxel (Doc) ou de vimblastina (Vin), células MDA-MB-231 foram cultivadas em placas de 48 poços ( $0,75 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>) e transfectadas com diferentes combinações de plasmídeos, perfazendo um total de 1 ou 2µg de plasmídeos por cada cm<sup>2</sup> de área de poço, durante 4h, como descrito nos materiais e métodos (2.9). A viabilidade celular foi determinada 24, 48 e 72h após o período de transfecção, através do ensaio de Alamar Blue, como descrito nos materiais e métodos (2.6). Os resultados (média ± desvio padrão) são apresentados como % do controlo (células não transfectadas, sem fármaco), de 1 ensaio que mostra a tendência do perfil de viabilidade celular de 3 ensaios independentes (realizados em triplicado). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de 2 vias, combinada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. As diferentes comparações múltiplas foram efectuadas individualmente para cada um dos grupos: sem fármaco; com 0,1µM Vin; (**Continua** →)



(**Continuação** →) com 0,1µM Doc. Os asteriscos (\* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001) correspondem à comparação dos valores de viabilidade das células transfectadas com as diferentes combinações de plasmídeos com os valores de viabilidade das células não transfectadas. Os cardinais (# p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001) correspondem à comparação das células transfectadas com 1µg pmiR-1 ou 1µg pp53/GFP com as células transfectadas com 1µg pLuc. Os símbolos de adição (+ p<0,05, ++ p<0,01, +++ p<0,001) correspondem à comparação das células transfectadas com 2µg pmiR-1 ou 2µg pp53/GFP com as células transfectadas com 1µg pLuc + 1µg pGFP. As aspas angulares duplas (« p<0,05, «« p<0,01, ««« p<0,001) correspondem à comparação entre células transfectadas com 1µg pLuc + 1µg pmiR-1 ou 1µg pLuc + 1µg pp53/GFP com células transfectadas com 1µg pmiR-1 + 1µg pp53/GFP. Os acentos circunflexos (^ p<0,05, ^^ p<0,01, ^^^ p<0,001) correspondem à comparação de células transfectadas com 1µg pLuc + 1µg pGFP, 2µg pmiR-1 ou 2µg pp53/GFP com células transfectadas com 1µg pmiR-1 + 1µg pp53/GFP. Os triângulos (Δ p<0,05, ΔΔ p<0,01, ΔΔΔ p<0,001) correspondem à comparação entre células transfectadas com 1µg pLuc + 1µg pmiR-1 ou 1µg pLuc + 1µg pp53/GFP com células transfectadas com 1µg pLuc + 1µg pGFP. As aspas angulares simples (< p<0,05) correspondem à comparação entre células transfectadas com 1µg pLuc + 1µg pmiR-1 com células transfectadas com 1µg pLuc + 1µg pp53/GFP.

Acreditamos que os indesejáveis valores de citotoxicidade das condições de controlo que contemplam a transfecção com plasmídeos não terapêuticos possam dever-se à já comprovada possibilidade de elevados níveis de expressão de GFP poderem induzir citotoxicidade nas células, embora os mecanismos adjacentes a este efeito não sejam claros [245, 246]. Esta limitação para o ensaio poderá ser ultrapassada recorrendo-se à utilização de plasmídeos com a mesma construção de *backbone*, mas vazios. Não considerando os níveis de citotoxicidade associados ao sistema de transporte de material genético na presença dos fármacos (indicados pelos controlos com células transfectadas com pGFP e pLuc), a combinação das duas estratégias terapêuticas (terapia génica e quimioterapia) não originou um efeito sinérgico, porém resultou num notável efeito aditivo, aumentando significativamente a citotoxicidade para as células.

As células MCF-7 transfectadas na ausência de fármaco só apresentam diminuições da viabilidade celular, em relação às células não transfectadas, 72h após o



**Figura 16 – Avaliação da actividade anti-tumoral induzida pela acção combinada de miR-1, p53 e vimblastina ou docetaxel, em células MCF-7.** Na presença ou ausência de 0,1µM de docetaxel (Doc) ou de vimblastina (Vin), células MCF-7 foram cultivadas em placas de 48 poços ( $0,4 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>) e transfectadas com diferentes combinações de plasmídeos, perfazendo um total de 1 ou 2µg de plasmídeos por cada cm<sup>2</sup> de área de poço, durante 4h, como descrito nos materiais e métodos (2.9). A viabilidade celular foi determinada 24, 48 e 72h após o período de transfecção, através do ensaio de Alamar Blue, como descrito nos materiais e métodos (2.6). Os resultados (média ± desvio padrão) são apresentados como % do controlo (células não transfectadas, sem fármaco), de 1 ensaio que mostra a tendência do perfil de viabilidade celular de 3 ensaios independentes (realizados em triplicado). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de 2 vias, combinada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. As diferentes comparações múltiplas foram efectuadas individualmente para cada µM dos grupos: sem fármaco; com 0,1µM Vin; (**Continua** →)

(**Continuação** →) com 0,1µM Doc. Os asteriscos (\* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001) correspondem à comparação dos valores de viabilidade das células transfectadas com as diferentes combinações de plasmídeos com os valores de viabilidade das células não transfectadas. Os cardinais (# p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001) correspondem à comparação das células transfectadas com 1µg pmiR-1 ou 1µg pp53/GFP com as células transfectadas com 1µg pLuc. Os símbolos de adição (+ p<0,05, ++ p<0,01, +++ p<0,001) correspondem à comparação das células transfectadas com 2µg pmiR-1 ou 2µg pp53/GFP com as células transfectadas com 1µg pLuc + 1µg pGFP. As aspas angulares duplas (« p<0,05, «« p<0,01, ««« p<0,001) correspondem à comparação entre células transfectadas com 1µg pLuc + 1µg pmiR-1 ou 1µg pLuc + 1µg pp53/GFP com células transfectadas com 1µg pmiR-1 + 1µg pp53/GFP. Os acentos circunflexos (^ p<0,05, ^^ p<0,01, ^^^ p<0,001) correspondem à comparação de células transfectadas com 1µg pLuc + 1µg pGFP, 2µg pmiR-1 ou 2µg pp53/GFP com células transfectadas com 1µg pmiR-1 + 1µg pp53/GFP. Os triângulos (Δ p<0,05, ΔΔ p<0,01, ΔΔΔ p<0,001) correspondem à comparação entre células transfectadas com 1µg pLuc + 1µg pmiR-1 ou 1µg pLuc + 1µg pp53/GFP com células transfectadas com 1µg pLuc + 1µg pGFP. As aspas angulares simples (< p<0,05) correspondem à comparação entre células transfectadas com 1µg pLuc + 1µg pmiR-1 com células transfectadas com 1µg pLuc + 1µg pp53/GFP.

período de transfecção, mas, em média, a citotoxicidade não ultrapassa os 10% e praticamente não existem diferenças na viabilidade celular entre as diferentes condições experimentais de transfecção (Figura 16). Os níveis de citotoxicidade induzidos pela transfecção na presença de fármaco, com os plasmídeos pp53/GFP e pmiR-1, 72h após o período de transfecção, foi mais denotada para docetaxel (70%) do que para vimblastina, que apesar de contribuir para uma redução significativa ( $p<0,001$ ) da viabilidade celular em relação às células transfectadas com os plasmídeos não terapêuticos pGFP e pLuc (26% de citotoxicidade), a combinação deste fármaco com p53/GFP e pmiR1 resultou apenas em 37% de citotoxicidade (Figura 16). Estes valores foram claramente inferiores aos observados nas células MDA-MB-231 (Figura 15). De grande relevância, foi também o facto de, 72h após o períodos de transfecção, células transfectadas com os plasmídeos pp53/GFP e pmiR-1, na presença de docetaxel, não apresentarem um nível de citotoxicidade (70% de citotoxicidade) significativamente mais elevado do que aquele verificado em células transfectadas com os plasmídeos não

terapêuticos (pGFP e pLuc), na presença do mesmo fármaco (62% de morte celular) (Figura 16).

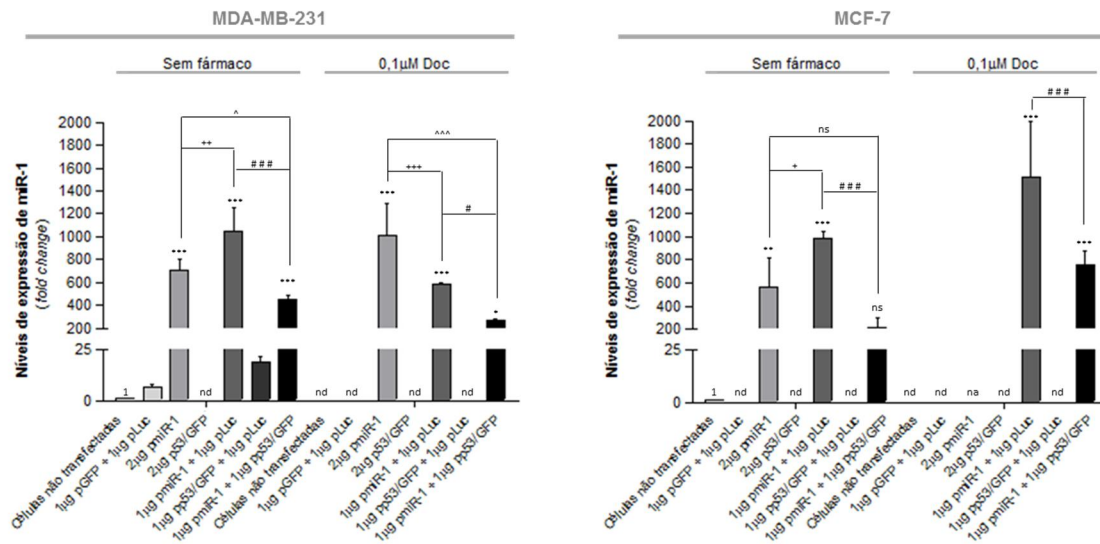
Comparativamente com as células MDA-MB-231, as MCF-7 parecem ser mais resistentes ao processo de transfecção, o que é indiciado pelos baixos níveis de citotoxicidade (0-6%) associados às condições de transfecção com pLuc e pGFP na ausência de fármaco, verificados 24, 48 e 72h após o período de transfecção (Figura 16).

### **3.2.2 Avaliação dos níveis de expressão de miR-1 e p53 obtidos após transfecção na presença de docetaxel**

Os níveis de morte celular, de uma forma geral, foram mais pronunciados para ambas as linhas celulares na presença de docetaxel, pelo que, nesta fase do estudo, se optou por começar a avaliação dos níveis de expressão de miR-1 e p53 na ausência ou presença deste fármaco.

Em nenhum ensaio realizado foi possível detectar os níveis basais de expressão de miR-1 nas células controlo (células não transfectadas, sem fármaco), com as quais todas as restantes condições devem ser calculadas. Desta forma, considerou-se que para tal condição, os níveis de miR-1 correspondem empiricamente a 1. Os valores das restantes condições experimentais foram calculadas normalmente, usando o método de Pfaffl, indicando o número de vezes que a expressão aumenta em relação ao valor empírico das células controlo. Embora ao método estejam associados alguns erros inespecíficos, este permitiu ter uma aproximação do aumento na expressão do microRNA.

Na Figura 17, é visível que as células MDA-MB-231 apresentam um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) da expressão de miR-1 em relação às células não transfectadas,



**Figura 17 – Avaliação dos níveis de expressão de miR-1 em células MDA-MB-231 e MCF-7 48h após transfecção com lipoplexos HSA-EPOPC:Chol/DNA, na presença ou ausência de docetaxel.** Na presença ou ausência de 0,1µM de docetaxel (Doc), células MDA-MB-231 e MCF-7, que foram cultivadas em placas de 6 poços ( $0,75 \times 10^5$  e  $0,4 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>, respectivamente), foram transfectadas com diferentes combinações de plasmídeos, perfazendo um total de 2µg de plasmídeos por cada cm<sup>2</sup> de área de poço, durante 4h, como descrito nos materiais e métodos (2.10). A avaliação foi realizada 48h após o período de transfecção, como descrito nos materiais e métodos (2.11 e 2.12). Os níveis de miRNA foram determinados seguindo o método de Pfaffl para a quantificação relativa de miRNA na presença dos genes alvo (miR-1) e de referência (snord44) com diferentes eficiências de amplificação. Os resultados são apresentados como valores de expressão relativa em relação aos níveis de expressão de miR-1 basais nas células não transfectadas e sem fármaco (que foram empiricamente considerados como 1). Os resultados (média ± desvio padrão) resultam de um ensaio representativo, efectuado em duplicado. A análise estatística foi realizada através de ANOVA de 2 vias, combinada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. As diferentes comparações múltiplas foram efectuadas individualmente para cada um dos grupos: sem fármaco e com 0,1µM Doc. Os asteriscos (\* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001) correspondem à comparação dos valores de expressão relativa de miR-1 em relação às células não transfectadas. Os cardinais (# p<0,05, ### p<0,001) correspondem à comparação dos valores de expressão relativa de miR-1 entre células transfectadas com 1µg pmiR-1 + 1µg pLuc e células transfectadas com 1µg pmiR-1 + 1µg pp53/GFP. Os sinais de adição (+ p<0,05, ++ p<0,01, +++ p<0,001) correspondem à (Continua →)

**(Continuação →)** comparação dos valores de expressão relativa de miR-1 entre células transfectadas com 2µg pmiR-1 e células transfectadas com 1µg pmiR-1 + 1µg pLuc. Os acêntos circunflexos (<sup>^</sup> p<0,05, <sup>^^</sup> p<0,001) correspondem à comparação dos valores de expressão relativa de miR-1 entre células transfectadas com 2µg pmiR-1 e células transfectadas com 1µg pmiR-1 + 1µg pp53/GFP. As siglas apresentadas são indicadas para resultado não apresentado (na), resultado não significativo (ns) e níveis de miR-1 não detectados (nd).

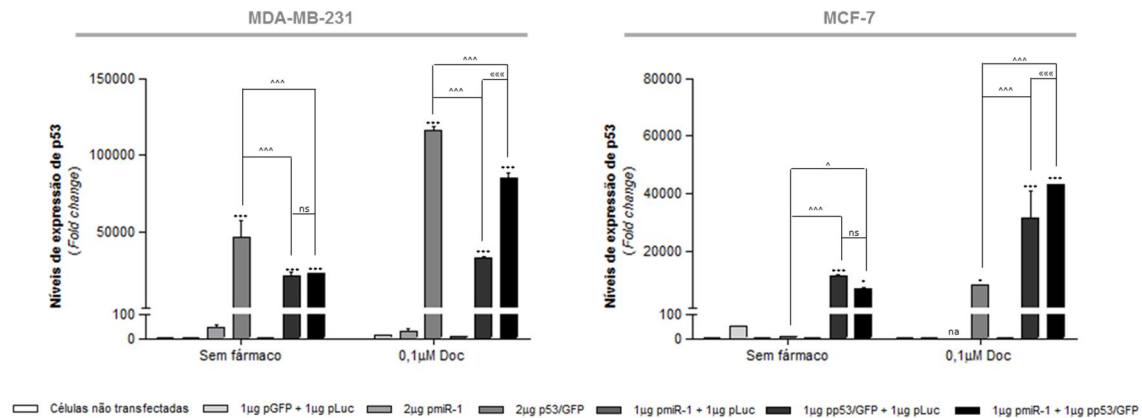
para as condições de transfecção com o plasmídeo pmiR-1, na ausência ou presença de docetaxel; com exceção das células transfectadas com 1 µg pmiR-1 em combinação com 1µg pp53, na presença de docetaxel, que tiveram um aumento da expressão do microRNA menos pronunciado ( $p<0,05$ ). Nas células MCF-7, o perfil de expressão foi semelhante, contudo, os aumentos dos níveis de miR-1 nem sempre foram significativos, como se verificou na condição em que células foram transfectadas com 1 µg pmiR-1 e 1µg pp53, na ausência de docetaxel.

Para ambas as linhas celulares, é perceptível que a transfecção na presença do fármaco produz um diferente perfil de expressão do miR-1 para as diferentes condições de transfecção (Figura 17). Quando na ausência de docetaxel, células MDA-MB-231 e MCF-7 transfectadas com 1µg de pmiR-1 (em combinação com 1µg de pLuc) expressam maior quantidade do microRNA do que quando transfectadas com 2µg de pmiR-1 ( $p<0,01$  e  $p<0,05$ , respectivamente). Mas, curiosamente, os valores de expressão do miR-1 são consideravelmente mais baixos do que os obtidos em células transfectadas com 1µg de pmiR-1 em combinação com 1µg de pLuc, quando a mesma quantidade de pmiR-1 (1µg) é transfectada em combinação com 1µg de pp53 ( $p<0,001$  para ambas as linhas celulares). Por outro lado, quando na presença de docetaxel, a transfecção com 2µg de pmiR-1 induz os maiores níveis de expressão do microRNA, pelo menos nas células MDA-MB-231 ( $p<0,001$ ). Nas células MCF-7, não foi possível

apresentar os resultados para esta condição experimental, condicionando algum tipo de comparações.

No que respeita aos níveis de mRNA de p53, de uma forma genérica, a Figura 18 revela que, nas células MDA-MB-231, esses foram largamente superiores aos obtidos nas células MCF-7. Na figura 18, é possível observar que as células MDA-MB-231 apresentam um aumento significativo dos níveis de mRNA da p53 em relação às células não transfectadas, para as condições de transfecção com o plasmídeo pp53, na ausência ou presença de docetaxel. Nas células MCF-7, esse aumento também foi verificado, mas nem sempre foi significativo, como se verificou, curiosamente, na condição em que células foram transfectadas com 2µg pp53, na ausência de docetaxel.

Para ambas as linhas celulares, é perceptível que a presença de fármaco durante o processo de transfecção induz um perfil de expressão de p53 diferente para as várias condições de transfecção, verificando-se que a presença de docetaxel potencia a expressão de p53 (Figura 18). Quando na ausência de fármaco, em células MDA-MB-231 e MCF-7 transfectadas com 1µg de pp53, os níveis de mRNA não diferiram entre as condições em que a transfecção foi combinada com 1µg de pLuc ou 1µg de pmiR-1. No entanto, na presença de docetaxel, quando a transfecção combina 1µg de pp53 com 1µg de pmiR-1, os níveis de mRNA de p53 são significativamente superiores ( $p < 0,001$ ) aos detectados nas condições de transfecção que combinam 1µg de pp53 com 1µg de plasmídeo controlo, também em ambas as linhas celulares (Figura 18). Além disso, os valores de expressão de p53 obtidos em células MDA-MB-231 transfectadas com 2µg de pp53, na ausência ou presença de fármaco, foram significativamente superiores ( $p < 0,001$ ) aos níveis de p53 obtidos nas condições de transfecção com apenas 1µg de pp53; enquanto, curiosamente, nas células MCF-7 se verificou precisamente o oposto (Figura 18).

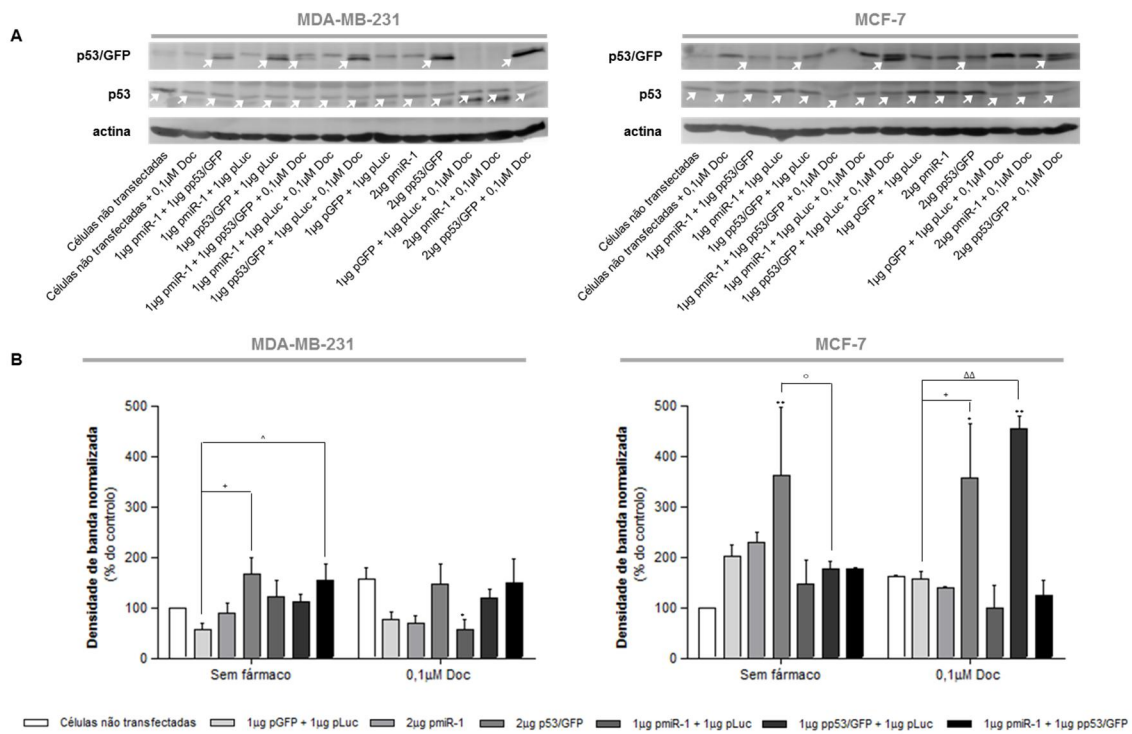


**Figura 18 – Avaliação dos níveis de expressão de p53 ao nível do mRNA, em células MDA-MB-231 e MCF-7 48h após transfecção com lipoplexos HSA-EPOPC:Chol/DNA, na presença ou ausência de docetaxel.** Na presença ou ausência de 0,1µM de docetaxel (Doc), células MDA-MB-231 e MCF-7, que foram cultivadas em placas de 6 poços ( $0,75 \times 10^5$  e  $0,4 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>, respectivamente), foram transfectadas com diferentes combinações de plasmídeos, perfazendo um total de 2µg de plasmídeos por cada cm<sup>2</sup> de área de poço, durante 4h, como descrito nos materiais e métodos (2.10). A avaliação foi realizada 48h após o período de transfecção, como descrito nos materiais e métodos (2.11 e 2.13). Os níveis de p53 foram determinados seguindo o método de Pfaffl para a quantificação relativa de miRNA na presença dos genes alvo (p53) e de referência (HPRT1) com diferentes eficiências de amplificação. Os resultados são apresentados como valores de expressão relativa em relação aos níveis de expressão de p53 basais nas células não transfectadas e sem fármaco. Os resultados (média ± desvio padrão) resultam de um ensaio representativo, efectuado em duplicado. A análise estatística foi realizada através de ANOVA de 2 vias, combinada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. As diferentes comparações múltiplas foram efectuadas individualmente para cada um dos grupos: sem fármaco e com 0,1µM Doc. Os asteriscos (\* p<0,05, \*\*\* p<0,001) correspondem à comparação dos valores de expressão relativa de p53 em relação às células não transfectadas. As aspas angulares duplas («««« p<0,001) correspondem à comparação entre células transfectadas com 1µg pp53/GFP + 1µg pLuc com células transfectadas com 1µg pmiR-1 + 1µg pp53/GFP. Os acentos circunflexos (^ p<0,05, ^^ p<0,001) correspondem à comparação de células transfectadas com 2µg pp53/GFP ou 1µg pGFP + 1µg pLuc com células transfectadas com 1µg pmiR-1 + 1µg pp53/GFP. As siglas apresentadas são indicadas para resultado não apresentado (na), resultado não significativo (ns) e níveis de miR-1 não detectados (nd).



A Figura 19 apresenta os níveis de proteína p53 em células MDA-MB-231 e MCF-7. Se comparadas com as células transfectadas com plasmídeos controle, na ausência de fármaco, as células MDA-MB-231 transfectadas com 2µg de pp53 ou com 1µg de pp53 em combinação com 1µg de pmiR-1 apresentam níveis de proteína significativamente superiores ( $p < 0,05$ ), apesar de nesta linha celular não se verificaram variações estatisticamente significativas quando os níveis de proteína das diferentes condições de transfecção são comparados com células não transfectadas. Assim, os elevados níveis de mRNA não parecem corresponder proporcionalmente a uma tradução em proteína p53. Tais resultados sugerem a existência de algum mecanismo de regulação pós-transcricional. Contudo, se comparadas com as células transfectadas com plasmídeos controle, na ausência de fármaco, as células MDA-MB-231 transfectadas com 2µg de pp53 ou com 1µg de pp53 em combinação com 1µg de pmiR-1 apresentam níveis de proteína significativamente superiores ( $p < 0,05$ ). Nas células MCF-7 (Figura 19), na ausência de fármaco, embora se verifique um aumento relativo da expressão da proteína p53 nas condições de transfecção em relação às células não transfectadas, esse aumento só é realmente significativo ( $p < 0,01$ ) para as células que foram transfectadas com 2µg de pp53. Quando na presença de docetaxel, as células MCF-7 transfectadas com 2µg de pp53 ou com 1µg de pp53 em combinação com 1µg de pLuc apresentam maiores níveis de proteína p53 em comparação com células não transfectadas ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente); o mesmo acontece quando a comparação é feita com células transfectadas com plasmídeos controle (Figura 19). Porém, contrariando esta tendência, na presença de docetaxel, 1µg de pp53 em combinação com 1µg de pmiR-1 não conduz a um similar aumento dos níveis de proteína p53 em células MCF-7 (Figura 19), indicando a provável existência de um

mecanismo de controlo pós-transcricional, onde o miR-1 poderá desempenhar alguma possível função.



**Figura 19 – Avaliação dos níveis de expressão da proteína p53, em células MDA-MB-231 e MCF-7 72h após transfecção com lipoplexos HSA-EPOPC:Chol/DNA, na presença ou ausência de docetaxel.** Na presença ou ausência de 0,1µM de docetaxel (Doc), células MDA-MB-231 e MCF-7, que foram cultivadas em placas de 6 poços ( $0,75 \times 10^5$  e  $0,4 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>, respectivamente), foram transfectadas com diferentes combinações de plasmídeos, perfazendo um total de 2µg de plasmídeos por cada cm<sup>2</sup> de área de poço, durante 4h, como descrito nos materiais e métodos (2.10). A avaliação foi realizada 72h após o período de transfecção, como descrito nos materiais e métodos (2.14). **(A)** Gel representativo (n=2), mostrando os níveis de expressão de p53 e p53/GFP. **(B)** Os dados (média ± desvio padrão), resultantes de dois ensaios independentes, representam as densidades de banda correspondente a p53 total (p53 + p53/GFP), normalizadas com actina e apresentadas como percentagem do controlo (células não transfectadas e sem fármaco). A análise estatística foi realizada através de ANOVA de 2 vias, combinada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. As diferentes comparações múltiplas foram efectuadas individualmente para cada um dos grupos: sem fármaco e com 0,1µM Doc. Os asteriscos (\* p=0,05, \*\* p=0,01) correspondem à comparação dos valores de expressão relativa de p53 em relação às células não (**Continua** →)

(Continuação →) transfectadas. Os símbolos de adição (+  $p < 0,05$ ) correspondem à comparação das células transfectadas com 2 $\mu$ g pp53/GFP com as células transfectadas com 1 $\mu$ g pGFP + 1 $\mu$ g pLuc. Os acentos circunflexos ( $\wedge p < 0,05$ ) correspondem à comparação de células transfectadas com 1 $\mu$ g pGFP + 1 $\mu$ g pLuc com células transfectadas com 1 $\mu$ g pmiR-1 + 1 $\mu$ g pp53/GFP. Os triângulos ( $\Delta \Delta p < 0,01$ ) correspondem à comparação entre células transfectadas com 1 $\mu$ g pp53/GFP + 1 $\mu$ g pLuc com células transfectadas com 1 $\mu$ g pGFP + 1 $\mu$ g pLuc. Os círculos ( $\circ p < 0,05$ ) correspondem à comparação entre células transfectadas com 2 $\mu$ g pp53 com células transfectadas com 1 $\mu$ g pp53 + 1 $\mu$ g pLuc.

### 3.2.3 Discussão

A acção combinada de terapia génica com agentes de quimioterapia, para o tratamento de cancro, pode não só resultar no aumento dos níveis de expressão dos transgenes, como também na interacção terapêutica ao nível das cascatas de sinalização metabólica activadas por esses genes e fármacos, que eventualmente conduzirão à morte celular. A sinergia (ou antagonismo) entre dois tipos de tratamento é um fenómeno empírico, no qual o efeito observado da combinação é mais (ou menos) do que o que seria previsto a partir dos efeitos de cada um actuando individualmente. Embora a sinergia observada *in vitro* possa não ser directamente demonstrável na prática clínica, ela faz prever a potencialidade da combinação de duas terapias. Um efeito aditivo, a par do sinérgico, faz também prever um resultado favorável quando as duas terapias são combinadas, contrariamente a um efeito antagonista que alerta para futuros problemas. Neste contexto, um dos principais objectivos deste trabalho consistiu no desenvolvimento de uma nova estratégia terapêutica, envolvendo a sobreexpressão de p53 e miR-1 combinada com o uso de baixas concentrações de docetaxel ou vimblastina, que produzisse uma acção antitumoral elevada.

A vimblastina ou o docetaxel em combinação com a co-expressão de p53 e miR-1 apresentaram uma eficácia significativamente superior à verificada nas condições de tratamento onde a vimblastina ou o docetaxel foram combinados com p53 ou miR-1, isoladamente, que mostraram níveis de citotoxicidade semelhantes aos obtidos na situação controlo correspondente (onde a vimblastina e o docetaxel foram combinados com lipoplexos contendo plasmídeos controlo). Contudo este efeito apenas se verificou em células que expressam a proteína p53 mutante em larga escala, as MDA-MB-231 [231]. Nas células MCF-7, que expressam a proteína p53 *wild-type* (wt) em baixos níveis [231], a combinação não foi capaz de induzir maiores níveis de citotoxicidade do que as condições controlo; mas, de salientar é o facto de nunca se ter verificado um efeito antagonista entre os dois fármacos e a expressão de p53 e/ou miR-1. Os valores de citotoxicidade observados nas condições controlo que contemplam a transfecção com plasmídeos não terapêuticos podem dever-se à já comprovada possibilidade de elevados níveis de expressão de GFP induzirem citotoxicidade nas células, embora os mecanismos adjacentes a este efeito não sejam claros [245, 246]. Esta constatação indesejável pode mascarar resultados e condicionar a interpretação dos dados, contribuindo para uma incorrecta depreciação do sucesso da estratégia combinada proposta neste trabalho. Esta limitação poderá, eventualmente ser ultrapassada recorrendo-se à utilização de plasmídeos vazios, com a mesma construção de *backbone*, que potencialmente serão mais inertes.

Num estudo de Nielsen, Lipari [247], onde testaram a acção combinada entre p53 e paclitaxel em células de cancro da mama (MDA-MB-231), associam fortemente o efeito sinérgico do tratamento ao facto de o fármaco poder aumentar o número de células transduzidas com a p53. Mas claramente não se pode dissociar o efeito

terapêutico das possíveis interações entre, neste caso, a p53 e eventos *down-stream* desencadeados pelo fármaco, ou mesmo da actuação da proteína p53 em alvos directos.

Apesar da clara ligação com o mecanismo mitótico, a apoptose tem sido geralmente aceite como um mecanismo de morte celular em resposta a quimioterapia com taxanos (como o docetaxel), ou alcaloides da vinca (como a vimblastina) [248, 249]. Mas, por outro lado, alterações nos produtos de genes como Bcl-2, p21 e p53 têm sido sugeridos como promotores da resistência à terapêutica de indução de apoptose em cancro da mama [250]. Por exemplo, células MDA-MB-231 apresentam p53 mutada; e as células MCF-7 e MDA-231-MB são parcialmente resistentes à apoptose devido à sobre-expressão de produtos de inibição de apoptose da família Bcl-2 e a defeitos na caspase-3, no caso particular das células MCF-7 [251, 252]. Neste sentido, fazer expressar a proteína p53 wt, ou inibir a proteína Bcl-2 em combinação com fármacos poderá constituir uma chance para indução apoptótica neste tipo de células. Além da proteína p53 poder genericamente reduzir a expressão de Bcl-2 [253], também o miR-1 mostrou ser um inibidor pós-transcricional da Bcl-2 em cardiomiócitos [210]. Este facto pode explicar os níveis de citotoxicidade da estratégia terapêutica combinada testada neste estudo, nas células MDA-MB-231, uma vez que p53 e miR-1 podem, conjuntamente, contribuir para a inibição da actividade anti-apoptótica de Bcl-2 e, assim, reduzir a viabilidade celular das células tratadas com ambos os plasmídeos e até aumentar a sensibilidade ao tratamento com os fármacos [254].

Contudo, os resultados mostrados na Figura 19 não são totalmente concordantes com esta teoria. Apesar dos elevados níveis de mRNA de p53 mostrados na Figura 18, algum mecanismo parece exercer um controlo pós-transcricional sobre a p53, fazendo com que não se verifique o aumento efectivo de proteína p53 nas células MDA-MB-231, bem como em algumas condições nas células MCF-7. Uma possível justificação

para tal acontecimento poderá estar relacionada com a regulação da p53 exercida pela fosfolipase D (PLD) e pela ligase de ubiquitina E3 (MDM2). As células MDA-MB-231 apresentam elevados níveis de actividade de PLD que origina um sinal de sobrevivência capaz de suprimir a apoptose [255-257]. Já foi mostrado que a elevada actividade de PLD em células MCF-7 é capaz de conduzir à degradação da proteína p53 wt [258]. No entanto, a PLD presente nas células MDA-MB-231 apresenta 10 vezes mais actividade do que em células MCF-7 [255, 257]. Curiosamente, enquanto a elevada actividade de PLD diminui a expressão da p53 wt [258], a actividade de PLD é aparentemente necessária para a elevada expressão de p53 mutante em células MDA-MB-231 [231]. Tem sido proposto que a acção da PLD para inibir a expressão da p53 é mediada pelo aumento da expressão de MDM2 [258]. Esta proteína é um regulador chave da actividade da proteína p53, através de sistemas reguladores de *feedback* que envolvem o controlo da expressão aos níveis da transcrição e tradução do mRNA, mas o efeito regulador melhor conhecido prende-se com a capacidade de MDM2 conduzir a proteína p53 à degradação [259]. Ao ser feita expressar p53 wt em células MDA-MB-231, é plausível propor que estas proteínas PLD e MDM2, altamente activas nesta linha celular, actuem de forma a suprimir a p53 wt introduzida (Figura 19B), à semelhança do que parece acontecer em células MCF-7 como controlo de *feedback*. Por outro lado, e embora Hui, Zheng [231] sugiram que a p53 mutante presente nas células MDA-MB-231 não parece estar envolvida na interação com membros da família da p53 (p72, por exemplo), formas mutantes de p53 podem, quando co-expressas com p53 wt, formar complexos com MDM2 e ser eficientemente ubiquitinadas, o que, possivelmente, poderá contribuir para o decréscimo dos níveis de p53 intrínsecos em MDA-MB-231, como é visível na Figura 19A. Segundo Blagosklonny [260], quando a p53 mutante compete com a p53 wt, exerce uma inibição dominante da transcrição de p53 wt,

processo este que requer um excesso de p53. Além disso, a estabilização de uma p53 mutante endógena devido à perda de funções wt não pode ocorrer na presença do alelo p53 wt. Dada a incapacidade da p53 mutante para se acumular na presença de p53 wt, um efeito dominante negativo não ocorre naturalmente, daí que as células heterozigóticas wt/mutante sejam raras, mas poderá ser passível de ocorrer num tratamento como o efectuado neste estudo [260]. A aparente redução dos níveis de p53 mutante na linha MDA-MB-231 gerados pela expressão de p53 wt exógena (Figura 19A) pode, a par dos possíveis eventos já referidos, contribuir para a maior redução de viabilidade nesta linha celular provocada pela transfecção com p53 wt, uma vez que a quantidade de p53 mutante pode não ser suficiente para que as suas funções tumorigénicas sejam tão denotadas: como a interacção e inibição da p53 wt [260], ou activação de promotores que não são activados pela p53 wt [231], como o da MAP2K3 (proteína cinase cinase 3 activada por mitogénicos, associada a invasão e progressão tumoral) , incluindo nas células MDA-MB-231 [261].

O facto de os níveis de mRNA de p53 conseguidos nas células MCF-7 serem consideravelmente mais baixos do que nas células MDA-MB-231 (Figura 18) não parece relacionar-se com os níveis de expressão transgénica favorecida ou não pela presença de fármaco, já que, no caso do miR-1 foram conseguidos similares níveis de expressão em ambas as linhas celulares e ambos os plasmídeos utilizados são dotados do mesmo promotor, CMV. Como as células MCF-7 expressam p53 wt, esse fenómeno pode antes estar relacionado com algum tipo de mecanismo activo de auto-regulação desconhecido que seja capaz de reconhecer os genes de p53 e diminua a transcrição desses, pelo menos em parte. No que respeita à questão dos níveis de proteína p53 em células MCF-7 não corresponder proporcionalmente ao aumento de expressão ao nível do mRNA, esta poderá, em parte, ser devida a uma regulação pós-transcricional

exercida pela elevada expressão e actividade de MDM2 verificada nesta linha celular [262]. Apoiando esta teoria, está um estudo mostrou que o restabelecimento da expressão de p53 por transfecção transiente de cDNA de p53 em células MCF-7 conduziu mais ainda para o aumento dos níveis de expressão de MDM2 [262]. Juntando todas estas considerações e apoiado pelos estudos de Hui, Abbas [258], a expressão transiente de p53 promovida pela estratégia terapêutica em estudo pode promover a ubiquitinação e degradação da proteína p53, contribuindo para o insucesso da estratégia verificado nesta linha celular (Figura 16). Além disso, a estabilidade da proteína p53, ou de formas mutantes, tem vindo a ser mostrada como estando dependente do *background* celular [263, 264], nomeadamente em células MCF-7, onde se verificou uma instabilidade relativa da p53 wt endógena, sugerindo-se nesse estudo que seja qual for o mecanismo responsável pela resultante expressão aberrante da p53, esse pode exercer o mesmo efeito sobre a p53 proveniente de um gene exógeno [265]. De acordo com o estudo de Vojtesek and Lane [265], é fácil propor que a relativa instabilidade da p53 wt em MCF-7 (Figura 16) poderá explicar o porquê de esta linha celular ser resistente ao efeito inibitório do crescimento celular da transfecção com p53 wt exógena verificado na linha celular MDA-MB-231 (Figura 15), uma vez que pode não acumular-se suficiente proteína para exercer tal função reguladora. Alternativamente, pode sugerir-se a possibilidade de as células MCF-7 terem perdido a capacidade de dar uma resposta *down stream* à p53 (como explorado mais abaixo) e que isso, de alguma forma, esteja relacionado com a sua expressão instável de p53. Em ambos os casos, é claro que o ambiente celular e, conseqüentemente, outros produtos genéticos desempenhem um papel crítico na manutenção dos níveis de proteína p53 e sua actividade.

Por exemplo, um estudo de Moll, Riou [266] sobre mecanismos de inactivação de p53 em cancro da mama mostrou que em casos com p53 wt, esta só existia enquanto



proteína citoplasmática. Desta forma, a exclusão nuclear desta proteína wt, desencadeada por mecanismos ainda desconhecidos, pode constituir um potencial mecanismo para a inactivação da p53 independente da presença de mutações. Por outro lado, alterações em proteínas reguladoras *upstream* e *downstream* têm sido apontadas como sendo responsáveis por incapacitar ou comprometer a via da p53 em cancros que não apresentam mutações nesta proteína [267]. Por exemplo, a proteína supressora de tumor p14(ARF) interage directamente com a MDM2, impedindo que esta interaja com a proteína p53 e medeia a sua degradação [268], e está frequentemente ausente ou mutada em cancro da mama [269]. Já foi mostrado que a expressão do gene p14(ARF) exógeno em células MCF-7 transformadas para serem proficientes em caspase-3 foi capaz de induzir apoptose dependente de caspase-3, enquanto em células MCF-7 normais mostrou total ineficiência [270]. Um outro estudo revelou que a reactivação da via p14(ARF)-p53-p21-Rb em células MCF-7 através da reposição da expressão de p14(ARF) é capaz de despoletar a senescência nestas células, o que leva os autores a acreditarem na reactivação de p14(ARF) como um potencial alvo para o tratamento de cancro da mama [271]. Estes estudos sugerem que a inactivação de p14ARF desempenha um papel importante em cancro da mama e permitem-nos extrapolar que, se, por um lado, a inactivação de p14ARF contribui para a degradação de p53, por outro lado, impede que possa ser induzida apoptose nas células MCF-7 devido ao facto de estas apresentarem a caspase-3 inactiva. Um outro aspecto relevante para a interpretação dos nossos resultados prende-se com os elevados níveis de proteínas desacopladoras (UCPs) em cancros. Sabe-se, no entanto, que a linha tumoral MCF-7 expressa, consideravelmente maior quantidade de UCP-2 e 5 do que as células MDA-MB-231 [272]. As UCPs podem ser reguladas por stress oxidativo. O anião superóxido pode estimular a actividade desacopladora da UCP-2, reduzindo a produção de ROS pela

cadeia respiratória mitocondrial. Por sua vez, isto reduz a actividade da UCP por um *feedback loop* [273]. Uma vez que p53 e UCP-2 podem regular e responder a stress oxidativo, pode ser possível que exista uma potencial interacção entre estas duas proteínas. Por exemplo, em cancro do colon, Derdak, Mark [274] demonstrou que UCP-2 inibe a apoptose dessas células, suprimindo a fosforilação da p53 dentro do domínio de transactivação através da supressão de ROS. Desta forma, sendo que o desacoplamento mitocondrial pode causar a dissipação do potencial mitocondrial, uma diminuição de ROS e a redução da resposta da p53 ao stress oxidativo [273], é razoável propor-se que o desacoplamento mitocondrial possa prover as células cancerígenas de uma vantagem de pro-sobrevivência através da supressão da via apoptótica mediada por p53. Também é plausível que este fenómeno possa estar dependente dos níveis de extensão da expressão das UCPs ou outros factores moleculares, como a resposta a estrogénio mediada por receptores, já que a inibição de UCPs em células MCF-7 é capaz de elevar os níveis de produção de ROS mitocondrial, o que não acontece em células MDA-MB-231 [272]. Estes dados contribuem, assim, para a possível justificação de a estratégia terapêutica proposta neste estudo não ser capaz de reduzir os níveis de viabilidade nas células MCF-7 (Figura 16).

Não obstante, e sem estudos anteriores que corroborem este fenómeno, quando p53 é co-expressa com miR-1 em células MCF-7, verifica-se uma redução dos níveis miR-1 (Figura 17); mas também os níveis de p53 (ao nível da proteína, Figura 19) são mais baixos na co-transfecção do que quando a p53 é feita expressar na ausência de miR-1, mas só na presença de docetaxel. Se, por um lado, isto pode constituir parte do insucesso da estratégia terapêutica verificado nas células MCF-7, o mesmo não se deveria aplicar à linha celular MDA-MB-231, onde também se observa que os níveis de miR-1 nas células co-transfectadas com p53 são mais baixos do que quando o

microRNA é feito expressar na ausência de p53 (Figura 17). Além disso, e em sentido contrário, em ambas as linhas celulares, a co-expressão de miR-1 com p53 na presença de docetaxel faz com que os níveis de mRNA de p53 sejam mais elevados do que nas condições em que a p53 é feita expressar na ausência de miR-1 (Figura 18). Estes dados sugerem a possível existência de algum mecanismo de controlo que correlacione a p53 com o miR-1. É estimado que 30% de todos os genes e a maioria das vias genéticas estejam sujeitas à regulação por múltiplos miRNAs [275, 276]. A título de exemplo, recentemente, o miR-504 [277] e o miR-125b [278] têm sido descritos como miRNAs *down-regulators* negativos directos de p53, limitando as funções da proteína, especialmente ao nível da apoptose mediada por p53 [277, 278]. Como já referido acima, o miR-1, ao inibir a Bcl-2, pode estar a actuar como um regulador *downstream* positivo da via da p53, desbloqueando a indução apoptótica, o que pode justificar parte dos resultados obtidos neste trabalho com as células MDA-MB-231 (Figura 15). Além da regulação directa da proteína p53 por miRNAs, estudos recentes têm mostrado que a p53 pode ser indirectamente regulada por vários miRNAs através da regulação por miRNAs de proteínas reguladores da p53 [277]. A própria proteína p53 pode induzir a expressão de miRNAs específicos que revelam funções supressoras de tumor, como os membros da família do miR-34 [279, 280], ou até mesmo regular o processo de maturação dos miRNAs [277]. Actualmente, não são bem conhecidas as formas de regulação da maturação do miR-1. Recentes estudos revelam que a p53 promove a maturação pós-transcricional de miRNAs, nomeadamente de de certos miRNAs com funções supressoras de tumor, através do processo de maturação mediado por Drosha, que requiere o envolvimento de proteínas como DDX17 (*DEAD box RNA helicases p68 and p72*), membros da família da p53 [277, 281]. Além disto, a proteína p53 também faz a monitorização da maturação de miRNAs. A perda da maturação dos miRNAs, por

exemplo, pode activar a via de sinalização da p53 [282]. Outro aspecto interessante é o facto de, embora os mecanismos não estejam ainda esclarecidos, os miRNAs desempenharem um papel na defesa celular contra o stress endógeno e estarem envolvidos na resposta celular generalizada ao stress oxidativo genotóxico, verificando-se uma alteração dos perfis de expressão dos miRNAs em resposta ao stress oxidativo [283]. Nomeadamente, os níveis de miR-1 aumentam drasticamente em resposta ao aumento de stress oxidativo em cardiomiócitos [210, 284] e a sobre-expressão desse miRNA facilita a apoptose induzida por peróxido de hidrogénio nessas células, por actuar sobre a Bcl-2 [210]. É difícil exercer um paralelismo entre estes dados e os nossos resultados, mas, de alguma forma, estes estudos indiciam a forte probabilidade de existir um mecanismo responsável por regular os níveis de mRNA de p53 em função dos níveis de miR-1 e/ou regular os níveis de miR-1 em função dos níveis de proteína p53, mecanismo esse que também poderá estar dependente do estado de stress oxidativo das células.

Actualmente, não se conhecem alvos directos do miR-1 que possam estar envolvidos na regulação de p53. Contudo, sabe-se que o miR-1 regula, não só a expressão de Bcl-2 [210], como também a expressão de proteínas como a FSCN1, LASP1 e TAGLN2, inibindo a capacidade de proliferação, invasão ou metastização das células [194, 197, 198, 204]. Este aspecto pode também contribuir para os níveis de citotoxicidade aumentados nas condições onde se combina a transfecção com p53 e miR-1, obtidos neste trabalho, com as células MDA-MB-231. A potencial acção do miR-1 sobre estes alvos poderá não ser suficiente para induzir alterações significativas que culminem com uma redução da viabilidade celular na linha MCF-7.

O contributo dos fármacos vimblastina e docetaxel, além de poder passar pelo aumento da expressão transgénica num maior número de células, pode ainda estar

relacionado com indução de catástrofes mitóticas com consequente multinucleação, mitoses aberrantes e morte celular [134, 252, 285]. Estes fármacos são também capazes de induzir morte apoptótica por via mitocondrial, que implica uma forte indução da produção de espécies reactivas de oxigénio [220, 221, 286]. Não obstante, também já foi demonstrado em ensaios clínicos que o docetaxel actua melhor em tumores com baixos níveis de Bcl-2, estando os elevados níveis de expressão desta proteína relacionados com a resistência à quimioterapia com docetaxel [222-224]. Por sua vez, a vimblastina parece também ser capaz de induzir apoptose mediada por alterações na estrutura, localização sub-celular e estado de activação de membros da família Bcl-2 [248], incluindo a proteína Bcl-2 [287]. Estes são factores que, a se verificarem, podem contribuir para o efeito terapêutico observado nas células MDA-MB-231.

---

SECÇÃO 4

Conclusões

---



## CONCLUSÕES

Embora o adenocarcinoma mamário seja um tumor com elevada dispersão a nível mundial, constituindo a principal causa de morte por cancro entre as mulheres, a mama é um órgão que possui características moleculares que o tornam bastante atraente para a terapia génica. Algumas das suas características são a sua assinatura de expressão de microRNAs, que em células mamárias cancerígenas se denota consideravelmente alterada [188], nomeadamente o miR-1 [195, 196, 199]. Os miRNAs desempenham funções cruciais ao nível de vários processos biológicos, e, quando desregulados, podem contribuir para o processo carcinogénico [192], o que os tornam fortes candidatos a alvos terapêuticos para a terapia génica do cancro. Além disso, a perda de funções da p53 e a resultante resistência a apoptose verificada em cancro da mama [167, 168] que, normalmente, seria desencadeada pela instabilidade do genoma ou por muitos agentes quimioterapêuticos do cancro [1], torna a restauração de p53, um alvo atraente para a terapia genética.

A terapia génica constitui uma estratégia promissora, devido à descoberta destes novos alvos moleculares associados ao cancro. Devido à sua simplicidade, fácil produção em larga escala e com pouca resposta imunitária específica, os complexos lipossoma cationico/DNA constituem uma promissora ferramenta para entrega de genes terapêuticos, nomeadamente para o tratamento de cancro. Porém, a expressão de transgenes mediada por estes transportadores não-virais é ineficiente, sobretudo *in vivo*, pelo que a identificação e modulação das barreiras impostas são cruciais para que novas estratégias de entrega de genes não-viral sejam cada vez mais eficientes.

Neste contexto, desenvolvemos e avaliámos uma nova estratégia antitumoral, abrangendo a combinação dos fármacos docetaxel ou vimblastina com estratégias de



terapia génica envolvendo a expressão de p53 e/ou miR-1, com o objectivo de aumentar a actividade biológica dos lipoplexos e registar um forte efeito antitumoral.

Os resultados obtidos na primeira fase deste trabalho permitem concluir que a combinação de baixas concentrações de docetaxel ou vimblastina com lipoplexos HSA-EPOPC:Chol/DNA (+/-) (4/1), resulta numa potenciação significativa da sua actividade biológica, quer em termos dos níveis de expressão dos transgenes quer em termos da percentagem de células transfectadas, sendo essa potenciação dependente da concentração de fármaco. Contudo, este aumento da actividade biológica induzida pela presença destes fármacos é maioritariamente devido ao incremento substancial dos níveis de expressão dos transgenes. Esta potenciação deve-se, muito provavelmente, ao facto destes fármacos interferirem ao nível da dinâmica microtubular, afectando o tráfego intracelular, incluindo o transporte dos endossomas para os lisossomas, consequentemente contribuindo para que os lipoplexos ultrapassem o aprisionamento endolisossomal e, logo, a degradação do DNA ao nível do lisossoma, resultando numa maior actividade biológica. Os nossos resultados mostram também que quer o tipo de fármaco quer a linha celular representam igualmente factores importantes para a extensão dos níveis de potenciação da actividade biológica registados.

Na segunda fase do trabalho, constatou-se que a combinação das estratégias de terapia génica, envolvendo a expressão dos genes de p53 e miR-1 (que estão *down-regulated* em células MDA-MB-231 e respectivamente mutado e *down-regulated* em células MCF-7) com baixas concentrações de docetaxel ou vimblastina resultou num aumento notável da morte das células tumorais MDA-MB-231 em relação às condições controlo. Por outro lado, as células tumorais MCF-7 parecem ser mais resistentes a este tratamento combinado.

Os efeitos observados nas células MDA-MB-231 poderão estar associados aos elevados níveis de expressão de miR-1, conseguidos com a terapia combinada, em que o microRNA possivelmente actua em alvos moleculares pro-oncogénicos ou anti-apoptóticos, como a Bcl-2. Por outro lado, o aumento dos níveis de mRNA de p53 produzido com a combinação da transfecção com miR-1, na presença de fármaco, indicia uma cooperação favorável para aplicação conjunta das estratégias, apesar do aparente envolvimento da p53 no controlo negativo dos níveis de miR-1. A expressão proteica da p53 parece sofrer um tipo de controlo repressivo, mas o aparente aumento do rácio p53wt/p53mt (mutada) nas células MDA-MB-231 poderá contribuir para um efeito cooperativo na redução da viabilidade das células tratadas com as estratégias combinadas, induzindo potencialmente a apoptose. O insucesso da estratégia terapêutica combinada nas células MCF-7 poderá estar relacionado com o possível envolvimento do miR-1 no controlo negativo da proteína p53, com o défice na actividade da caspase-3 desta linha celular e com defeitos da maquinaria *down-stream* responsável por efectivar as potenciais funções anti-tumorais da proteína p53.

De uma forma global, apesar de se verificar alguma citotoxicidade nas condições controlo (lipoplexos preparados com genes marcadores), a partir dos resultados obtidos neste trabalho (desde a potenciação da expressão de transgenes na presença de fármaco, à notável diminuição de viabilidade das células tratadas com a combinação das estratégias terapêuticas de terapia génica e quimioterapia) acreditamos que um aumento substancial da actividade antitumoral pode ser conseguido com estratégias combinadas envolvendo o uso de pequenas doses de fármaco e genes terapêuticos. Não dispensando posteriores estudos detalhados sobre todas as implicações da interacção entre as duas estratégias terapêuticas, este trabalho realça o potencial das estratégias combinadas para

futuras aplicações clínicas anti-tumorais, devido à maior acção terapêutica e aos menor potenciais efeitos secundários.

---

SECÇÃO 5

Prespectivas Futuras

---



## **PRESPECTIVAS FUTURAS**

Este trabalho mostrou a grande potencialidade terapêutica da combinação de duas estratégias, com possibilidade de redução de efeitos secundários, dado que, para se conseguir o mesmo efeito ou uma eficácia superior, podem ser usadas menores quantidades de fármaco (quimioterapia) ou genes terapêuticos (terapia génica) do que o que seria necessário se as estratégias fossem aplicadas isoladamente. Porém, é necessário conhecer com maior detalhe os mecanismos que são activados e que sustentam este persuposto, conduzindo as células tumorais à morte e qual o tipo de morte que é desencadeada, para que também seja possível otimizar o sistema terapêutico proposto.

Os próximos passos deverão passar por testar novas condições terapêuticas com menores quantidades de DNA, já que a toxicidade do sistema de entrega de material genético se revela dependente da quantidade de material que é aplicado às células. A citotoxicidade basal do sistema de entrega de material pode mascarar resultados e condicionar as análises subsequentes, pelo que deve ser a próxima barreira a ser ultrapassada.

Uma análise mais cuidada da expressão da p53, com anticorpos específicos para formas mutadas e *wild-type*, seria indicada para perceber se, por exemplo, a expressão de p53wt (e não fundida com GFP) faz efectivamente reduzir os níveis de expressão da p53mt endógena, no caso das células MDA-MB-231. Também a localização intracelular da proteína, recorrendo a imunofluorescência e microscopia confocal, seria uma mais-valia para compreender o tipo de actividade que a p53 possa estar a exercer nas duas linhas celulares. A par disto, ensaios de actividade de caspases e de detecção de apoptose com anexinaV/iodeto de propídio ou recorrendo ao ensaio LIVE/DEATH,

determinaríamos se a estratégia terapêutica é capaz de induzir apoptose por uma via dependente de caspases. A avaliação dos níveis de expressão de proteínas como Bcl-2, Bax e PUMA por wester blot permitiria ainda perceber se, estando a ocorrer apoptose, esta está ou não dependente da actividade da proteína p53.

Posteriormente, deveriam ser avaliados os níveis de expressão dos alvos moleculares do miR-1, nomeadamente Bcl-2, TAGLN2, LASP1 e FSCN1, por RT-PCR e western blot, o que também nos deixaria perceber se os níveis de LASP1 sofrem alterações em resposta à expressão de p53 exógena. Revelando-se que, nestas condições terapêuticas, estes são alvos do miR-1, será interessante avaliar se a capacidade proliferativa e de migração das células é afectada, recorrendo, por exemplo, a ensaios com sulforrodamina-B e ensaios de “*fluorescent beads phagocytosis*” ou “*transwell migration*”.

---

SECÇÃO 6

Referências

---





## REFERÊNCIAS

1. Bertram, J.S., *The molecular biology of cancer*. Mol Aspects Med, 2000. **21**(6): p. 167-223.
2. Balmain, A., J. Gray, and B. Ponder, *The genetics and genomics of cancer*. Nat Genet, 2003. **33 Suppl**: p. 238-44.
3. Beckmann, M.W., et al., *Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity*. J Mol Med (Berl), 1997. **75**(6): p. 429-39.
4. Lerebours, F. and R. Lidereau, *Molecular alterations in sporadic breast cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2002. **44**(2): p. 121-41.
5. Marusyk, A. and K. Polyak, *Tumor heterogeneity: causes and consequences*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1805**(1): p. 105-17.
6. Vogelstein, B., et al., *Cancer genome landscapes*. Science, 2013. **339**(6127): p. 1546-58.
7. Weinberg, R.A., *How cancer arises*. Sci Am, 1996. **275**(3): p. 62-70.
8. Ames, B.N., M.K. Shigenaga, and L.S. Gold, *DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis*. Environ Health Perspect, 1993. **101 Suppl 5**: p. 35-44.
9. Aaronson, S.A., *Growth factors and cancer*. Science, 1991. **254**(5035): p. 1146-53.
10. Black, P.M., et al., *Platelet-derived growth factor expression and stimulation in human meningiomas*. J Neurosurg, 1994. **81**(3): p. 388-93.
11. Yen, L., et al., *Heregulin selectively upregulates vascular endothelial growth factor secretion in cancer cells and stimulates angiogenesis*. Oncogene, 2000. **19**(31): p. 3460-9.
12. Formigli, L., et al., *Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis*. J Cell Physiol, 2000. **182**(1): p. 41-9.
13. Sperandio, S., I. de Belle, and D.E. Bredesen, *An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14376-81.
14. Debnath, J., E.H. Baehrecke, and G. Kroemer, *Does autophagy contribute to cell death?* Autophagy, 2005. **1**(2): p. 66-74.
15. Lodish H, B.A., Zipursky SL, et al., *Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Gene*, in *Molecular Cell Biology*. 2000, W. H. Freeman: New York.
16. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
17. Kasibhatla, S. and B. Tseng, *Why target apoptosis in cancer treatment?* Mol Cancer Ther, 2003. **2**(6): p. 573-80.
18. Suen, D.F., K.L. Norris, and R.J. Youle, *Mitochondrial dynamics and apoptosis*. Genes Dev, 2008. **22**(12): p. 1577-90.
19. Sas, K., et al., *Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders*. J Neurol Sci, 2007. **257**(1-2): p. 221-39.
20. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 383-424.

21. Parone, P.A., et al., *Inhibiting the mitochondrial fission machinery does not prevent Bax/Bak-dependent apoptosis*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(20): p. 7397-408.
22. Johnson, T.M., et al., *Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11848-52.
23. Kowaltowski, A.J. and A.E. Vercesi, *Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 1999. **26**(3-4): p. 463-71.
24. Oesterreich, S. and S.A. Fuqua, *Tumor suppressor genes in breast cancer*. Endocr Relat Cancer, 1999. **6**(3): p. 405-19.
25. Polyak, K., et al., *A model for p53-induced apoptosis*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 300-5.
26. Waldman, T., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells*. Cancer Res, 1995. **55**(22): p. 5187-90.
27. Korsmeyer, S.J., et al., *Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c*. Cell Death Differ, 2000. **7**(12): p. 1166-73.
28. Green, D.R. and G.I. Evan, *A matter of life and death*. Cancer Cell, 2002. **1**(1): p. 19-30.
29. Shay, J.W. and W.E. Wright, *Hayflick, his limit, and cellular ageing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(1): p. 72-6.
30. Hayflick, L., *The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains*. Exp Cell Res, 1965. **37**: p. 614-36.
31. Hayflick, L., *The illusion of cell immortality*. Br J Cancer, 2000. **83**(7): p. 841-6.
32. Artandi, S.E. and L.D. Attardi, *Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **331**(3): p. 881-90.
33. van Steensel, B., A. Smogorzewska, and T. de Lange, *TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions*. Cell, 1998. **92**(3): p. 401-13.
34. Artandi, S.E., et al., *Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice*. Nature, 2000. **406**(6796): p. 641-5.
35. Sarvesvaran, J., et al., *Is small cell lung cancer the perfect target for anti-telomerase treatment?* Carcinogenesis, 1999. **20**(8): p. 1649-51.
36. Umbricht, C.B., et al., *Telomerase activity in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer*. Oncogene, 1999. **18**(22): p. 3407-14.
37. Nishida, N., et al., *Angiogenesis in cancer*. Vasc Health Risk Manag, 2006. **2**(3): p. 213-9.
38. Dameron, K.M., et al., *Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1*. Science, 1994. **265**(5178): p. 1582-4.
39. Hahnfeldt, P., et al., *Tumor development under angiogenic signaling: a dynamical theory of tumor growth, treatment response, and postvascular dormancy*. Cancer Res, 1999. **59**(19): p. 4770-5.
40. Ferlay J, S.H., Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. *GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase*. 2010 15/06/2013]; Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
41. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
42. Mathers, C., et al., *The global burden of disease : 2004 update*. 2008, Geneva, Switzerland: World Health Organization. vii, 146 p.
43. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-917.

44. Eroles, P., et al., *Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways*. *Cancer Treat Rev*, 2012. **38**(6): p. 698-707.
45. Bombonati, A. and D.C. Sgroi, *The molecular pathology of breast cancer progression*. *J Pathol*, 2011. **223**(2): p. 307-17.
46. Margolese RG, F.B., Hortobagyi GN, et al., *Neoplasms of the Breast*, in *Holland-Frei Cancer Medicine*, K.D. Bast RC Jr, Pollock RE, et al., Editor. 2000, Hamilton (ON): BC Decker.
47. Cunha, P.O., M. Ornstein, and J.L. Jones, *Progression of Ductal Carcinoma in Situ from the Pathological Perspective*. *Breast Care (Basel)*, 2010. **5**(4): p. 233-239.
48. Jones, J.L., *Overdiagnosis and overtreatment of breast cancer: progression of ductal carcinoma in situ: the pathological perspective*. *Breast Cancer Res*, 2006. **8**(2): p. 204.
49. Virnig, B.A., et al., *Ductal carcinoma in situ of the breast: a systematic review of incidence, treatment, and outcomes*. *J Natl Cancer Inst*, 2010. **102**(3): p. 170-8.
50. organization, B.c. 2013 20/06/2013]; Available from: breastcancer.org.
51. Fisher, E.R., et al., *Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) eight-year update of Protocol B-17: intraductal carcinoma*. *Cancer*, 1999. **86**(3): p. 429-38.
52. Foote, F.W. and F.W. Stewart, *Lobular carcinoma in situ: A rare form of mammary cancer*. *Am J Pathol*, 1941. **17**(4): p. 491-496 3.
53. Ben-David, M.A., et al., *Is lobular carcinoma in situ as a component of breast carcinoma a risk factor for local failure after breast-conserving therapy? Results of a matched pair analysis*. *Cancer*, 2006. **106**(1): p. 28-34.
54. Frykberg, E.R., *Lobular Carcinoma In Situ of the Breast*. *Breast J*, 1999. **5**(5): p. 296-303.
55. Aulmann, S., et al., *[Lobular carcinoma in situ (LCIS): risk factor and precursor of invasive lobular breast cancer]*. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 2007. **91**: p. 208-13.
56. Ehemann, C.R., et al., *The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999-2004*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009. **18**(6): p. 1763-9.
57. Fisher, B., et al., *Prevention of invasive breast cancer in women with ductal carcinoma in situ: an update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience*. *Semin Oncol*, 2001. **28**(4): p. 400-18.
58. Innos, K. and P.L. Horn-Ross, *Risk of second primary breast cancers among women with ductal carcinoma in situ of the breast*. *Breast Cancer Res Treat*, 2008. **111**(3): p. 531-40.
59. Li, C.I., et al., *Risk of invasive breast carcinoma among women diagnosed with ductal carcinoma in situ and lobular carcinoma in situ, 1988-2001*. *Cancer*, 2006. **106**(10): p. 2104-12.
60. Zurrida, S. and U. Veronesi, *A new TNM classification for breast cancer to meet the demands of the present and the challenges of the future*. *Womens Health (Lond Engl)*, 2011. **7**(1): p. 41-9.
61. Aaltomaa, S., et al., *Hormone receptors as prognostic factors in female breast cancer*. *Ann Med*, 1991. **23**(6): p. 643-8.
62. Althuis, M.D., et al., *Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004. **13**(10): p. 1558-68.
63. Osborne, C., P. Wilson, and D. Tripathy, *Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications*. *Oncologist*, 2004. **9**(4): p. 361-77.

64. Perou, C.M., *Molecular stratification of triple-negative breast cancers*. *Oncologist*, 2011. **16 Suppl 1**: p. 61-70.
65. Zhang, H., et al., *BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity*. *Oncogene*, 1998. **16(13)**: p. 1713-21.
66. Qureshi, H.S., et al., *E-cadherin status in breast cancer correlates with histologic type but does not correlate with established prognostic parameters*. *Am J Clin Pathol*, 2006. **125(3)**: p. 377-85.
67. Berry, D.A., et al., *Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer*. *N Engl J Med*, 2005. **353(17)**: p. 1784-92.
68. Parkin, D.M., F.I. Bray, and S.S. Devesa, *Cancer burden in the year 2000. The global picture*. *Eur J Cancer*, 2001. **37 Suppl 8**: p. S4-66.
69. Tabar, L., et al., *The natural history of breast carcinoma: what have we learned from screening?* *Cancer*, 1999. **86(3)**: p. 449-62.
70. McPherson, K., C.M. Steel, and J.M. Dixon, *ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics*. *BMJ*, 2000. **321(7261)**: p. 624-8.
71. Reeves, G.K., et al., *Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study*. *BMJ*, 2007. **335(7630)**: p. 1134.
72. Cecchini, R.S., et al., *Body mass index and the risk for developing invasive breast cancer among high-risk women in NSABP P-1 and STAR breast cancer prevention trials*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2012. **5(4)**: p. 583-92.
73. Bakken, K., et al., *Menopausal hormone therapy and breast cancer risk: impact of different treatments. The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. *Int J Cancer*, 2011. **128(1)**: p. 144-56.
74. Hulka, B.S., *Links between hormone replacement therapy and neoplasia*. *Fertil Steril*, 1994. **62(6 Suppl 2)**: p. 168S-175S.
75. Brooks, P.J. and S. Zakhari, *Moderate alcohol consumption and breast cancer in women: from epidemiology to mechanisms and interventions*. *Alcohol Clin Exp Res*, 2013. **37(1)**: p. 23-30.
76. Singletary, S.E., *Rating the risk factors for breast cancer*. *Ann Surg*, 2003. **237(4)**: p. 474-82.
77. Easton, D.F., D. Ford, and D.T. Bishop, *Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium*. *Am J Hum Genet*, 1995. **56(1)**: p. 265-71.
78. Jatoi, I. and W.F. Anderson, *Qualitative age interactions in breast cancer studies: a mini-review*. *Future Oncol*, 2010. **6(11)**: p. 1781-8.
79. Stanford, J.L., et al., *Breast cancer incidence in Asian migrants to the United States and their descendants*. *Epidemiology*, 1995. **6(2)**: p. 181-3.
80. Goodwin, J.S., et al., *Geographic variations in breast cancer survival among older women: implications for quality of breast cancer care*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2002. **57(6)**: p. M401-6.
81. Fontelonga, A.a.D. *Estatísticas do cancro*. 2009 [24/06/2013]; Available from: <http://www.alert-online.com/pt/medical-guide/estatisticas-do-cancro>.
82. Alberts B, J.A., Lewis J, et al., *Cancer Treatment: Present and Future*, in *Molecular Biology of the Cell*, J.A. Alberts B, Lewis J, et al., Editor. 2002, Garland Science: New York.
83. Fonseca, R., et al., *Ductal carcinoma in situ of the breast*. *Ann Intern Med*, 1997. **127(11)**: p. 1013-22.

84. Group, E.B.C.C., et al., *Breast-conserving treatment with or without radiotherapy in ductal carcinoma-in-situ: ten-year results of European Organisation for Research and Treatment of Cancer randomized phase III trial 10853--a study by the EORTC Breast Cancer Cooperative Group and EORTC Radiotherapy Group*. J Clin Oncol, 2006. **24**(21): p. 3381-7.
85. Yu, F.L. and W. Bender, *A proposed mechanism of tamoxifen in breast cancer prevention*. Cancer Detect Prev, 2002. **26**(5): p. 370-5.
86. Fisher, B., et al., *Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-24 randomised controlled trial*. Lancet, 1999. **353**(9169): p. 1993-2000.
87. Davies, C., et al., *Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial*. Lancet, 2013. **381**(9869): p. 805-16.
88. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet, 2005. **365**(9472): p. 1687-717.
89. Fisher, B., et al., *Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(18): p. 1371-88.
90. Eifel, P., et al., *National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(13): p. 979-89.
91. Voordeckers, M., et al., *Adjuvant radiotherapy after mastectomy for pT1-pT2 node negative (pN0) breast cancer: is it worth the effort?* Radiother Oncol, 2003. **68**(3): p. 227-31.
92. Clarke, M., et al., *Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet, 2005. **366**(9503): p. 2087-106.
93. Darby, S.C., et al., *Risk of ischemic heart disease in women after radiotherapy for breast cancer*. N Engl J Med, 2013. **368**(11): p. 987-98.
94. Lingos, T.I., et al., *Radiation pneumonitis in breast cancer patients treated with conservative surgery and radiation therapy*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1991. **21**(2): p. 355-60.
95. Deutsch, M., et al., *The incidence of arm edema in women with breast cancer randomized on the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project study B-04 to radical mastectomy versus total mastectomy and radiotherapy versus total mastectomy alone*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008. **70**(4): p. 1020-4.
96. Galecki, J., et al., *Radiation-induced brachial plexopathy and hypofractionated regimens in adjuvant irradiation of patients with breast cancer--a review*. Acta Oncol, 2006. **45**(3): p. 280-4.
97. Berrington de Gonzalez, A., et al., *Proportion of second cancers attributable to radiotherapy treatment in adults: a cohort study in the US SEER cancer registries*. Lancet Oncol, 2011. **12**(4): p. 353-60.
98. Hassan, M.S., et al., *Chemotherapy for breast cancer (Review)*. Oncol Rep, 2010. **24**(5): p. 1121-31.
99. Charfare, H., S. Limongelli, and A.D. Purushotham, *Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer*. Br J Surg, 2005. **92**(1): p. 14-23.

100. Marquette, C. and L. Nabell, *Chemotherapy-resistant metastatic breast cancer*. *Curr Treat Options Oncol*, 2012. **13**(2): p. 263-75.
101. Society, A.C., *Breast Cancer Facts & Figures 2011-2012*, 2013, Atlanta: American Cancer Society, Inc.
102. Arias, J.L., *Drug targeting strategies in cancer treatment: an overview*. *Mini Rev Med Chem*, 2011. **11**(1): p. 1-17.
103. Pritchard, K.I., et al., *Increased thromboembolic complications with concurrent tamoxifen and chemotherapy in a randomized trial of adjuvant therapy for women with breast cancer*. *National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Breast Cancer Site Group*. *J Clin Oncol*, 1996. **14**(10): p. 2731-7.
104. Shapiro, C.L., J. Manola, and M. Leboff, *Ovarian failure after adjuvant chemotherapy is associated with rapid bone loss in women with early-stage breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(14): p. 3306-11.
105. Lage, H., *Drug resistance in breast cancer*. *Cancer Therapy*, 2003. **1**: p. 81-91.
106. Oakman, C., L. Santarpia, and A. Di Leo, *Breast cancer assessment tools and optimizing adjuvant therapy*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010. **7**(12): p. 725-32.
107. Alkhalaf, M. and A.M. El-Mowafy, *Overexpression of wild-type p53 gene renders MCF-7 breast cancer cells more sensitive to the antiproliferative effect of progesterone*. *J Endocrinol*, 2003. **179**(1): p. 55-62.
108. Panno, J., *Gene therapy : treating disease by repairing genes*. The "new biology" series. 2005, New York, NY: Facts On File. xvii, 172 p.
109. Edelstein, M.L., M.R. Abedi, and J. Wixon, *Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update*. *J Gene Med*, 2007. **9**(10): p. 833-42.
110. Prokop, A., *Intracellular delivery : fundamentals and applications*. Fundamental biomedical technologies. 2011, Dordrecht ; New York: Springer. xix, 867 p.
111. Kresina, T.F., *An introduction to molecular medicine and gene therapy*. 2001, New York: Wiley-Liss. xvi, 386 p.
112. Hall, S.J., S.H. Chen, and S.L. Woo, *The promise and reality of cancer gene therapy*. *Am J Hum Genet*, 1997. **61**(4): p. 785-9.
113. Griffiths AJF, M.J., Suzuki DT, et al., *Gene therapy*, in *An Introduction to Genetic Analysis*, M.J. Griffiths AJF, Suzuki DT, et al., Editor. 2000, W. H. Freeman: New York.
114. Strachan, T. and A.P. Read, in *Human Molecular Genetics*. 1999: New York.
115. Caplen, N.J., *Gene therapy progress and prospects. Downregulating gene expression: the impact of RNA interference*. *Gene Ther*, 2004. **11**(16): p. 1241-8.
116. Dykxhoorn, D.M., C.D. Novina, and P.A. Sharp, *Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(6): p. 457-67.
117. Al-Dosari, M.S. and X. Gao, *Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress*. *AAPS J*, 2009. **11**(4): p. 671-81.
118. Rochlitz, C.F., *Gene therapy of cancer*. *Drugs Today (Barc)*, 2000. **36**(9): p. 619-29.
119. Davis, B.R., et al., *Micro-injection-mediated hematopoietic stem cell gene therapy*. *Curr Opin Mol Ther*, 2000. **2**(4): p. 412-9.
120. Zha, Y., C. Lin, and X. Liang, *[The use of gene gun in cancer gene therapy]*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2000. **80**(7): p. 522-5.
121. Sakakima, Y., et al., *Gene therapy for hepatocellular carcinoma using sonoporation enhanced by contrast agents*. *Cancer Gene Ther*, 2005. **12**(11): p. 884-9.
122. Heller, L.C. and R. Heller, *Electroporation gene therapy preclinical and clinical trials for melanoma*. *Curr Gene Ther*, 2010. **10**(4): p. 312-7.

123. Walther, W. and U. Stein, *Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases*. *Drugs*, 2000. **60**(2): p. 249-71.
124. Yi, Y., S.H. Hahm, and K.H. Lee, *Retroviral gene therapy: safety issues and possible solutions*. *Curr Gene Ther*, 2005. **5**(1): p. 25-35.
125. McCormack, M.P. and T.H. Rabbitts, *Activation of the T-cell oncogene LMO2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(9): p. 913-22.
126. Nayak, S. and R.W. Herzog, *Progress and prospects: immune responses to viral vectors*. *Gene Ther*, 2010. **17**(3): p. 295-304.
127. Pizzato, M., et al., *Evidence for nonspecific adsorption of targeted retrovirus vector particles to cells*. *Gene Ther*, 2001. **8**(14): p. 1088-96.
128. Niidome, T. and L. Huang, *Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors*. *Gene Ther*, 2002. **9**(24): p. 1647-52.
129. Li, S. and L. Huang, *In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes*. *Gene Ther*, 1997. **4**(9): p. 891-900.
130. Tros de Ilarduya, C., Y. Sun, and N. Duzgunes, *Gene delivery by lipoplexes and polyplexes*. *Eur J Pharm Sci*, 2010. **40**(3): p. 159-70.
131. Wasungu, L. and D. Hoekstra, *Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes*. *J Control Release*, 2006. **116**(2): p. 255-64.
132. Simoes, S., et al., *Cationic liposomes for gene delivery*. *Expert Opin Drug Deliv*, 2005. **2**(2): p. 237-54.
133. Rakhmanova, V.A., E.V. Pozharski, and R.C. MacDonald, *Mechanisms of lipoplex formation: dependence of the biological properties of transfection complexes on formulation procedures*. *J Membr Biol*, 2004. **200**(1): p. 35-45.
134. Koltover, I., et al., *An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery*. *Science*, 1998. **281**(5373): p. 78-81.
135. Hui, S.W., et al., *The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer*. *Biophys J*, 1996. **71**(2): p. 590-9.
136. Faneca, H., S. Simoes, and M.C. de Lima, *Evaluation of lipid-based reagents to mediate intracellular gene delivery*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1567**(1-2): p. 23-33.
137. Sternberg, B., et al., *Ultrastructural characterization of cationic liposome-DNA complexes showing enhanced stability in serum and high transfection activity in vivo*. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1375**(1-2): p. 23-35.
138. Song, Y.K., et al., *Characterization of cationic liposome-mediated gene transfer in vivo by intravenous administration*. *Hum Gene Ther*, 1997. **8**(13): p. 1585-94.
139. Song, Y.K. and D. Liu, *Free liposomes enhance the transfection activity of DNA/lipid complexes in vivo by intravenous administration*. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1372**(1): p. 141-50.
140. Faneca, H., S. Simoes, and M.C. Pedroso de Lima, *Association of albumin or protamine to lipoplexes: enhancement of transfection and resistance to serum*. *J Gene Med*, 2004. **6**(6): p. 681-92.
141. Floch, V., et al., *Cation substitution in cationic phosphonolipids: a new concept to improve transfection activity and decrease cellular toxicity*. *J Med Chem*, 2000. **43**(24): p. 4617-28.
142. Felgner, J.H., et al., *Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(4): p. 2550-61.
143. Lee, E.R., et al., *Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung*. *Hum Gene Ther*, 1996. **7**(14): p. 1701-17.



144. Pedroso de Lima, M.C., et al., *Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001. **47**(2-3): p. 277-94.
145. Hirko, A., F. Tang, and J.A. Hughes, *Cationic lipid vectors for plasmid DNA delivery*. *Curr Med Chem*, 2003. **10**(14): p. 1185-93.
146. MacDonald, R.C., et al., *Physical and biological properties of cationic triesters of phosphatidylcholine*. *Biophys J*, 1999. **77**(5): p. 2612-29.
147. MacDonald, R.C., et al., *O-ethylphosphatidylcholine: A metabolizable cationic phospholipid which is a serum-compatible DNA transfection agent*. *J Pharm Sci*, 1999. **88**(9): p. 896-904.
148. Faneca, H., A. Faustino, and M.C. Pedroso de Lima, *Synergistic antitumoral effect of vinblastine and HSV-Tk/GCV gene therapy mediated by albumin-associated cationic liposomes*. *J Control Release*, 2008. **126**(2): p. 175-84.
149. Sawitzky, D., *Protein-glycosaminoglycan interactions: infectiological aspects*. *Med Microbiol Immunol*, 1996. **184**(4): p. 155-61.
150. Mounkes, L.C., et al., *Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery in vitro and in vivo*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(40): p. 26164-70.
151. Mislick, K.A. and J.D. Baldeschwieler, *Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(22): p. 12349-54.
152. Kopatz, I., J.S. Remy, and J.P. Behr, *A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin*. *J Gene Med*, 2004. **6**(7): p. 769-76.
153. Wrobel, I. and D. Collins, *Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis*. *Biochim Biophys Acta*, 1995. **1235**(2): p. 296-304.
154. Friend, D.S., D. Papahadjopoulos, and R.J. Debs, *Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes*. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1278**(1): p. 41-50.
155. Felgner, P.L., et al., *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(21): p. 7413-7.
156. Simoes, S., et al., *Mechanisms of gene transfer mediated by lipoplexes associated with targeting ligands or pH-sensitive peptides*. *Gene Ther*, 1999. **6**(11): p. 1798-807.
157. Conner, S.D. and S.L. Schmid, *Regulated portals of entry into the cell*. *Nature*, 2003. **422**(6927): p. 37-44.
158. Bally, M.B., et al., *Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers*. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999. **38**(3): p. 291-315.
159. Simoes, S., et al., *Human serum albumin enhances DNA transfection by lipoplexes and confers resistance to inhibition by serum*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1463**(2): p. 459-69.
160. Pires, P., et al., *Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1418**(1): p. 71-84.
161. Nunes, R., et al., *'Albumin-receptor' uptake kinetics do not require an intact lobular architecture and are not specific for albumin*. *J Hepatol*, 1988. **7**(3): p. 293-304.
162. Xu, Y. and F.C. Szoka, Jr., *Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection*. *Biochemistry*, 1996. **35**(18): p. 5616-23.
163. Noguchi, A., et al., *Membrane fusion plays an important role in gene transfection mediated by cationic liposomes*. *FEBS Lett*, 1998. **433**(1-2): p. 169-73.
164. Garcia, L.A., et al., *Fusion of small unilamellar vesicles induced by bovine serum albumin fragments*. *Braz J Med Biol Res*, 1983. **16**(2): p. 89-96.
165. Brunner, S., et al., *Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus*. *Gene Ther*, 2000. **7**(5): p. 401-7.

166. Takahashi, S., et al., *Gene therapy for breast cancer. --Review of clinical gene therapy trials for breast cancer and MDR1 gene therapy trial in Cancer Institute Hospital.* Breast Cancer, 2006. **13**(1): p. 8-15.
167. Stoff-Khalili, M.A., P. Dall, and D.T. Curiel, *Gene therapy for carcinoma of the breast.* Cancer Gene Ther, 2006. **13**(7): p. 633-47.
168. Qi, X., et al., *Adenovirus-mediated p53 gene therapy reverses resistance of breast cancer cells to adriamycin.* Anticancer Drugs, 2011. **22**(6): p. 556-62.
169. Chen, Q.R. and A.J. Mixson, *Systemic gene therapy with p53 inhibits breast cancer: recent advances and therapeutic implications.* Front Biosci, 1998. **3**: p. D997-D1004.
170. Xu, M., et al., *Parenteral gene therapy with p53 inhibits human breast tumors in vivo through a bystander mechanism without evidence of toxicity.* Hum Gene Ther, 1997. **8**(2): p. 177-85.
171. Nielsen, L.L., et al., *Efficacy of p53 adenovirus-mediated gene therapy against human breast cancer xenografts.* Cancer Gene Ther, 1997. **4**(2): p. 129-38.
172. Gurnani, M., et al., *Adenovirus-mediated p53 gene therapy has greater efficacy when combined with chemotherapy against human head and neck, ovarian, prostate, and breast cancer.* Cancer Chemother Pharmacol, 1999. **44**(2): p. 143-51.
173. Hortobagyi, G.N., et al., *Cationic liposome-mediated E1A gene transfer to human breast and ovarian cancer cells and its biologic effects: a phase I clinical trial.* J Clin Oncol, 2001. **19**(14): p. 3422-33.
174. Ueno, N.T., et al., *E1A-mediated paclitaxel sensitization in HER-2/neu-overexpressing ovarian cancer SKOV3.ip1 through apoptosis involving the caspase-3 pathway.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(1): p. 250-9.
175. Arteaga, C.L. and J.T. Holt, *Tissue-targeted antisense c-fos retroviral vector inhibits established breast cancer xenografts in nude mice.* Cancer Res, 1996. **56**(5): p. 1098-1103.
176. Wang, Y.H., et al., *Knockdown of c-Myc expression by RNAi inhibits MCF-7 breast tumor cells growth in vitro and in vivo.* Breast Cancer Res, 2005. **7**(2): p. R220-8.
177. Holt, J.T., et al., *Gene therapy for the treatment of metastatic breast cancer by in vivo transduction with breast-targeted retroviral vector expressing antisense c-fos RNA.* Hum Gene Ther, 1996. **7**(11): p. 1367-80.
178. Stewart, A.K., et al., *Adenovector-mediated gene delivery of interleukin-2 in metastatic breast cancer and melanoma: results of a phase I clinical trial.* Gene Ther, 1999. **6**(3): p. 350-63.
179. Pandha, H.S., et al., *Genetic prodrug activation therapy for breast cancer: A phase I clinical trial of erbB-2-directed suicide gene expression.* J Clin Oncol, 1999. **17**(7): p. 2180-9.
180. Lin, J., et al., *Suppression activity of pro-apoptotic gene products in cancer cells, a potential application for cancer gene therapy.* Anticancer Res, 2001. **21**(2A): p. 831-9.
181. Ealovega, M.W., et al., *bcl-xs gene therapy induces apoptosis of human mammary tumors in nude mice.* Cancer Res, 1996. **56**(9): p. 1965-9.
182. Nana-Sinkam, S.P. and C.M. Croce, *MicroRNAs as therapeutic targets in cancer.* Transl Res, 2011. **157**(4): p. 216-25.
183. Gomez-Navarro, J., W. Arafat, and J. Xiang, *Gene therapy for carcinoma of the breast: Pro-apoptotic gene therapy.* Breast Cancer Res, 2000. **2**(1): p. 32-44.
184. Wang, L. and R.C. MacDonald, *Effects of microtubule-depolymerizing agents on the transfection of cultured vascular smooth muscle cells: enhanced expression with free drug and especially with drug-gene lipoplexes.* Mol Ther, 2004. **9**(5): p. 729-37.

185. Hasegawa, S., N. Hirashima, and M. Nakanishi, *Microtubule involvement in the intracellular dynamics for gene transfection mediated by cationic liposomes*. Gene Ther, 2001. **8**(21): p. 1669-73.
186. Chowdhury, N.R., et al., *Microtubular disruption prolongs the expression of human bilirubin-uridinediphosphoglucuronate-glucuronosyltransferase-1 gene transferred into Gunn rat livers*. J Biol Chem, 1996. **271**(4): p. 2341-6.
187. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
188. Blenkiron, C., et al., *MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype*. Genome Biol, 2007. **8**(10): p. R214.
189. Budhu, A., J. Ji, and X.W. Wang, *The clinical potential of microRNAs*. J Hematol Oncol, 2010. **3**: p. 37.
190. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7065-70.
191. Mishra, P.J. and G. Merlino, *MicroRNA reexpression as differentiation therapy in cancer*. J Clin Invest, 2009. **119**(8): p. 2119-23.
192. Tekiner, T.A. and H. Basaga, *Role of microRNA Deregulation In Breast Cancer Cell Chemoresistance and Stemness*. Curr Med Chem, 2013.
193. Ambs, S., et al., *Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(15): p. 6162-70.
194. Hudson, R.S., et al., *MicroRNA-1 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in human prostate cancer*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(8): p. 3689-703.
195. Jiang, J., et al., *Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(17): p. 5394-403.
196. Navon, R., et al., *Novel rank-based statistical methods reveal microRNAs with differential expression in multiple cancer types*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e8003.
197. Kano, M., et al., *miR-145, miR-133a and miR-133b: Tumor-suppressive miRNAs target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma*. Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2804-14.
198. Nohata, N., et al., *miR-1 as a tumor suppressive microRNA targeting TAGLN2 in head and neck squamous cell carcinoma*. Oncotarget, 2011. **2**(1-2): p. 29-42.
199. Wu, Z.S., et al., *Loss of miR-133a expression associated with poor survival of breast cancer and restoration of miR-133a expression inhibited breast cancer cell growth and invasion*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 51.
200. Chiyomaru, T., et al., *miR-145 and miR-133a function as tumour suppressors and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer*. Br J Cancer, 2010. **102**(5): p. 883-91.
201. Hashimoto, Y., M. Skacel, and J.C. Adams, *Roles of fascin in human carcinoma motility and signaling: prospects for a novel biomarker?* Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(9): p. 1787-804.
202. Pelosi, G., et al., *Independent prognostic value of fascin immunoreactivity in stage I nonsmall cell lung cancer*. Br J Cancer, 2003. **88**(4): p. 537-47.
203. Grothey, A., et al., *C-erbB-2/ HER-2 upregulates fascin, an actin-bundling protein associated with cell motility, in human breast cancer cell lines*. Oncogene, 2000. **19**(42): p. 4864-75.
204. Yoshino, H., et al., *The tumour-suppressive function of miR-1 and miR-133a targeting TAGLN2 in bladder cancer*. Br J Cancer, 2011. **104**(5): p. 808-18.

205. Chiyomaru, T., et al., *Functional role of LASP1 in cell viability and its regulation by microRNAs in bladder cancer*. Urol Oncol, 2012. **30**(4): p. 434-43.
206. Grunewald, T.G. and E. Butt, *The LIM and SH3 domain protein family: structural proteins or signal transducers or both?* Mol Cancer, 2008. **7**: p. 31.
207. Wang, B., et al., *LIM and SH3 protein 1 (Lasp1) is a novel p53 transcriptional target involved in hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2009. **50**(3): p. 528-37.
208. Rho, J.H., M.H. Roehrl, and J.Y. Wang, *Tissue proteomics reveals differential and compartment-specific expression of the homologs transgelin and transgelin-2 in lung adenocarcinoma and its stroma*. J Proteome Res, 2009. **8**(12): p. 5610-8.
209. Latronico, M.V. and G. Condorelli, *microRNAs in hypertrophy and heart failure*. Exp Biol Med (Maywood), 2011. **236**(2): p. 125-31.
210. Tang, Y., et al., *MicroRNA-1 regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Bcl-2*. Int Heart J, 2009. **50**(3): p. 377-87.
211. Haldar, S., et al., *Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells*. Cancer Res, 1994. **54**(8): p. 2095-7.
212. Joensuu, H., L. Pylkkanen, and S. Toikkanen, *Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer*. Am J Pathol, 1994. **145**(5): p. 1191-8.
213. Elouahabi, A. and J.M. Ruyschaert, *Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes*. Mol Ther, 2005. **11**(3): p. 336-47.
214. Lechardeur, D. and G.L. Lukacs, *Intracellular barriers to non-viral gene transfer*. Curr Gene Ther, 2002. **2**(2): p. 183-94.
215. Sparano, J.A., et al., *Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer*. N Engl J Med, 2008. **358**(16): p. 1663-71.
216. Piccart-Gebhart, M.J., et al., *Taxanes alone or in combination with anthracyclines as first-line therapy of patients with metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(12): p. 1980-6.
217. Baselga, J., et al., *Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer*. N Engl J Med, 2012. **366**(2): p. 109-19.
218. Crown, J., M. O'Leary, and W.S. Ooi, *Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience*. Oncologist, 2004. **9 Suppl 2**: p. 24-32.
219. Jordan, M.A. and L. Wilson, *Microtubules as a target for anticancer drugs*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(4): p. 253-65.
220. Cao, D., et al., *Amplification loop cascade for increasing caspase activity induced by docetaxel*. J Cell Biochem, 2005. **96**(4): p. 810-20.
221. Mizumachi, T., et al., *Increased mitochondrial DNA induces acquired docetaxel resistance in head and neck cancer cells*. Oncogene, 2008. **27**(6): p. 831-8.
222. Buchholz, T.A., et al., *Chemotherapy-induced apoptosis and Bcl-2 levels correlate with breast cancer response to chemotherapy*. Cancer J, 2003. **9**(1): p. 33-41.
223. Ogston, K.N., et al., *Can patients' likelihood of benefiting from primary chemotherapy for breast cancer be predicted before commencement of treatment?* Breast Cancer Res Treat, 2004. **86**(2): p. 181-9.
224. Izbicka, E.C., D.; Carrizales, G.; Tolcher, A., *Biomarkers for sensitivity to docetaxel and paclitaxel in human tumor cell lines in vivo*. Cancer Genomics & Proteomics, 2005. **2**: p. 219-226.
225. Chang, J.T., et al., *Induction of tubulin by docetaxel is associated with p53 status in human non small cell lung cancer cell lines*. Int J Cancer, 2006. **118**(2): p. 317-25.

226. Faneca, H., et al., *Evaluation of the antitumoral effect mediated by IL-12 and HSV-tk genes when delivered by a novel lipid-based system*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1768**(5): p. 1093-102.
227. Onitilo, A.A., et al., *Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival*. *Clin Med Res*, 2009. **7**(1-2): p. 4-13.
228. Lostumbo, A., et al., *Flow cytometry: a new approach for the molecular profiling of breast cancer*. *Exp Mol Pathol*, 2006. **80**(1): p. 46-53.
229. Olivier, M., et al., *The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users*. *Hum Mutat*, 2002. **19**(6): p. 607-14.
230. Lu, X., et al., *The impact of p53 status on cellular sensitivity to antifolate drugs*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(7): p. 2114-23.
231. Hui, L., et al., *Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D*. *Oncogene*, 2006. **25**(55): p. 7305-10.
232. Konopka, K., et al., *Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes*. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1312**(3): p. 186-96.
233. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(9): p. e45.
234. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
235. Sakurai, F., et al., *Effect of DNA/liposome mixing ratio on the physicochemical characteristics, cellular uptake and intracellular trafficking of plasmid DNA/cationic liposome complexes and subsequent gene expression*. *J Control Release*, 2000. **66**(2-3): p. 255-69.
236. Ross, P.C. and S.W. Hui, *Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency*. *Gene Ther*, 1999. **6**(4): p. 651-9.
237. Sorensen, K.K., J. Melkko, and B. Smedsrod, *Scavenger-receptor-mediated endocytosis in endocardial endothelial cells of Atlantic cod *Gadus morhua**. *J Exp Biol*, 1998. **201**(Pt 11): p. 1707-18.
238. Wilschut, J. and D. Hoekstra, *Membrane fusion: lipid vesicles as a model system*. *Chem Phys Lipids*, 1986. **40**(2-4): p. 145-66.
239. Khalil, I.A., et al., *Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery*. *Pharmacol Rev*, 2006. **58**(1): p. 32-45.
240. Durrbach, A., D. Louvard, and E. Coudrier, *Actin filaments facilitate two steps of endocytosis*. *J Cell Sci*, 1996. **109** ( Pt 2): p. 457-65.
241. Huang, Y., et al., *Regulation of Vinca alkaloid-induced apoptosis by NF-kappaB/IkappaB pathway in human tumor cells*. *Mol Cancer Ther*, 2004. **3**(3): p. 271-7.
242. Rosette, C. and M. Karin, *Cytoskeletal control of gene expression: depolymerization of microtubules activates NF-kappa B*. *J Cell Biol*, 1995. **128**(6): p. 1111-9.
243. O'Neill, A.J., et al., *Characterisation and manipulation of docetaxel resistant prostate cancer cell lines*. *Mol Cancer*, 2011. **10**: p. 126.
244. Taniguchi, T., et al., *Involvement of NF-kappaB and mitochondrial pathways in docetaxel-induced apoptosis of human oral squamous cell carcinoma*. *Int J Mol Med*, 2005. **15**(4): p. 667-73.

245. Sekar, R.B., et al., *Lentiviral vector-mediated expression of GFP or Kir2.1 alters the electrophysiology of neonatal rat ventricular myocytes without inducing cytotoxicity*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(5): p. H2757-70.
246. Koike, M., Y. Yutoku, and A. Koike, *Ku80 attenuates cytotoxicity induced by green fluorescent protein transduction independently of non-homologous end joining*. FEBS Open Bio, 2013. **3**: p. 46-50.
247. Nielsen, L.L., et al., *Adenovirus-mediated p53 gene therapy and paclitaxel have synergistic efficacy in models of human head and neck, ovarian, prostate, and breast cancer*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(4): p. 835-46.
248. Upreti, M., et al., *Vinblastine-induced apoptosis is mediated by discrete alterations in subcellular location, oligomeric structure, and activation status of specific Bcl-2 family members*. J Biol Chem, 2006. **281**(23): p. 15941-50.
249. Wang, L.G., et al., *The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review*. Cancer Chemother Pharmacol, 1999. **44**(5): p. 355-61.
250. Gewirtz, D.A., *Growth arrest and cell death in the breast tumor cell in response to ionizing radiation and chemotherapeutic agents which induce DNA damage*. Breast Cancer Res Treat, 2000. **62**(3): p. 223-35.
251. Devarajan, E., et al., *Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance*. Oncogene, 2002. **21**(57): p. 8843-51.
252. Morse, D.L., et al., *Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells*. Mol Cancer Ther, 2005. **4**(10): p. 1495-504.
253. Miyashita, T., et al., *Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo*. Oncogene, 1994. **9**(6): p. 1799-805.
254. Emi, M., et al., *Targeted therapy against Bcl-2-related proteins in breast cancer cells*. Breast Cancer Res, 2005. **7**(6): p. R940-52.
255. Chen, Y., Y. Zheng, and D.A. Foster, *Phospholipase D confers rapamycin resistance in human breast cancer cells*. Oncogene, 2003. **22**(25): p. 3937-42.
256. Zhong, M., et al., *Phospholipase D prevents apoptosis in v-Src-transformed rat fibroblasts and MDA-MB-231 breast cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **302**(3): p. 615-9.
257. Chen, Y., V. Rodrik, and D.A. Foster, *Alternative phospholipase D/mTOR survival signal in human breast cancer cells*. Oncogene, 2005. **24**(4): p. 672-9.
258. Hui, L., et al., *Phospholipase D elevates the level of MDM2 and suppresses DNA damage-induced increases in p53*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(13): p. 5677-86.
259. Naski, N., et al., *The p53 mRNA-Mdm2 interaction*. Cell Cycle, 2009. **8**(1): p. 31-4.
260. Blagosklonny, M.V., *p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect*. FASEB J, 2000. **14**(13): p. 1901-7.
261. Gurtner, A., et al., *Mutant p53-induced up-regulation of mitogen-activated protein kinase kinase 3 contributes to gain of function*. J Biol Chem, 2010. **285**(19): p. 14160-9.
262. Alkhalaf, M., A.M. El-Mowafy, and L.A. Abou-Zeid, *Progesterone inhibition of MDM2 p90 protein in MCF-7 human breast cancer cell line is dependent on p53 levels*. J Mol Genet Med, 2005. **1**(1): p. 33-7.
263. Reihnsaus, E., et al., *Regulation of the level of the oncoprotein p53 in non-transformed and transformed cells*. Oncogene, 1990. **5**(1): p. 137-45.
264. Srivastava, S., et al., *Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome*. Nature, 1990. **348**(6303): p. 747-9.
265. Vojtesek, B. and D.P. Lane, *Regulation of p53 protein expression in human breast cancer cell lines*. J Cell Sci, 1993. **105 ( Pt 3)**: p. 607-12.

266. Moll, U.M., G. Riou, and A.J. Levine, *Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(15): p. 7262-6.
267. Gasco, M., S. Shami, and T. Crook, *The p53 pathway in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2002. **4**(2): p. 70-6.
268. Agrawal, A., et al., *Regulation of the p14ARF-Mdm2-p53 pathway: an overview in breast cancer*. Exp Mol Pathol, 2006. **81**(2): p. 115-22.
269. Silva, J., et al., *Concomitant expression of p16INK4a and p14ARF in primary breast cancer and analysis of inactivation mechanisms*. J Pathol, 2003. **199**(3): p. 289-97.
270. Milojkovic, A., et al., *p14 induces apoptosis via an entirely caspase-3-dependent mitochondrial amplification loop*. Int J Cancer, 2013.
271. McGowan, E.M., et al., *p14ARF post-transcriptional regulation of nuclear cyclin D1 in MCF-7 breast cancer cells: discrimination between a good and bad prognosis?* PLoS One, 2012. **7**(7): p. e42246.
272. Sastre-Serra, J., et al., *Estrogen down-regulates uncoupling proteins and increases oxidative stress in breast cancer*. Free Radic Biol Med, 2010. **48**(4): p. 506-12.
273. Robbins, D. and Y. Zhao, *New Aspects of Mitochondrial Uncoupling Proteins (UCPs) and Their Roles in Tumorigenesis*. Int J Mol Sci, 2011. **12**(8): p. 5285-93.
274. Derdak, Z., et al., *The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells*. Cancer Res, 2008. **68**(8): p. 2813-9.
275. Lim, L.P., et al., *Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs*. Nature, 2005. **433**(7027): p. 769-73.
276. Griffiths-Jones, S., et al., *miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D140-4.
277. Feng, Z., et al., *Tumor suppressor p53 meets microRNAs*. J Mol Cell Biol, 2011. **3**(1): p. 44-50.
278. Le, M.T., et al., *MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53*. Genes Dev, 2009. **23**(7): p. 862-76.
279. Chang, T.C., et al., *Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis*. Mol Cell, 2007. **26**(5): p. 745-52.
280. Corney, D.C., et al., *MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth*. Cancer Res, 2007. **67**(18): p. 8433-8.
281. Suzuki, H.I., et al., *Modulation of microRNA processing by p53*. Nature, 2009. **460**(7254): p. 529-33.
282. Mudhasani, R., et al., *Loss of miRNA biogenesis induces p19Arf-p53 signaling and senescence in primary cells*. J Cell Biol, 2008. **181**(7): p. 1055-63.
283. Simone, N.L., et al., *Ionizing radiation-induced oxidative stress alters miRNA expression*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6377.
284. Xu, C., et al., *The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 17): p. 3045-52.
285. Chan, K.S., C.G. Koh, and H.Y. Li, *Mitosis-targeted anti-cancer therapies: where they stand*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e411.
286. Selimovic, D., et al., *Vinblastine-induced apoptosis of melanoma cells is mediated by Ras homologous A protein (Rho A) via mitochondrial and non-mitochondrial-dependent mechanisms*. Apoptosis, 2013. **18**(8): p. 980-97.

287. Fan, M., et al., *Vinblastine-induced phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL is mediated by JNK and occurs in parallel with inactivation of the Raf-1/MEK/ERK cascade*. J Biol Chem, 2000. **275**(39): p. 29980-5.