Jasna Markovic

EXPRESSÃO GÊNICA DO FATOR DE
INDUÇÃO DE PROTEÓLISE (PIF) E DE SUA
FORMA VARIANTE (PIF-SV) EM CELULAS
NORMAIS E MALIGNAS

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

São Paulo
2003

Jasna Markovic

EXPRESSÃO GÊNICA DO FATOR DE
INDUÇÃO DE PROTEÓLISE (PIF) E DE SUA
FORMA VARIANTE (PIF-SV) EM CELULAS
NORMAIS E MALIGNAS

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração:
Farmacologia

Orientador:
Prof. Dr. José Ernesto Belizário

Co-orientação:
Profa. Dra. Anamaria Camarao

São Paulo
2003

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Ernesto Belizário, por ter me dado a oportunidade de trabalhar na área de biologia molecular, pela orientação e por todo incentivo durante o projeto,-

À Profa. Dra. Anamaría Aranha Camargo, por ter me aceito no laboratório dela, pela grande ajuda e apoio, por ser uma pessoa única como ser humano e profissional. Sou muito feliz por ter te conhecido;

Ao amigo Ricardo Moura, pela paciência incansável que ele teve comigo, pela ajuda e conselhos, por ser um bom amigo e colega, pelas muitas horas de riso e diversão;

Aos amigos Miguei Garay e Juliano Alves, pelas primeiras "aulas" da biologia molecular e da língua portuguesa, pelo apoio constante e otimismo, pelos bons momentos que tivemos trabalhando juntos,

Aos amigos Ana, Chris, Paula e Ricardo, pela ajuda, compreensão e apoio em momentos difíceis, por serem amigos além de bons colegas-,

A todos do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, Ana Chris, Paula, Ricardo, Dani, Fabrício, Elis, Lílían, Rapha, Fabi, Dirce, Newton, Jane, Elisa, Mari, Murilo, pela toda ajuda constante, pela amizade e por tornarem o ambiente de trabalho agradável-,

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, por tornar possível fazer o meu projeto em condições excelentes de pesquisa e educação,

Ao Prof. Dr. Edouard Vannier, pelos ensaios de Real-time PCR,

Aos Prof. Dra. Kornelia Polyak e Dr. Dale Porter, pela colaboração nos ensaios de RT-PCR da nova variante de PIF (PIF-SV) e uso dos dados obtidos 7-

Às secretárias do departamento, Selma e Julieta, por estarem sempre dispostas a ajudar e solucionar qualquer questão burocrática-,

À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro (Proc. 01101000-7) e bolsa de estudo.

RESUMO

O fator de indução de proteólise (Proteolysis-inducing factor) ou PIF é uma glicoproteína de 24 kDa encontrada no plasma de pacientes com câncer e responsável pelo catabolismo de proteínas musculares associado à caquexia neoplásica. O gene codificador desta proteína está mapeado na porção 12q 13.1 do cromossomo 12, e é identificado no banco de Dados do NCB 1 pelos seguintes nomes- HCAP (Human cachexia associated protein), Dermcidin/AIDD, DSEP (Diffusible survival evasion peptide) e IBC-1 (Invasive breast cancer-1). Durante o processamento do transcrito são gerados 5 éxons, contendo 330 pares de bases, sendo que a região de leitura aberta (ORF) codifica uma proteína de 110 aminoácidos. O presente trabalho investigou pelas técnicas de RT-PCR, RACE-PCR e Real-time PCR a presença de formas de expressão de mensagens do PIF em vários tipos celulares derivados de tecido normal e tumoral. A expressão de mRNA do gene foi testada em 37 amostras de tumores e 5 tecidos normais, sendo detectada em 7 de 20 linhagens tumorais de mama, uma linhagem tumoral de cólon e no tecido normal da mama, placenta e testículo. A expressão significativa do gene PIF entre as linhagens metastáticas da mama foi confirmada pela técnica de Realtime PCR. Uma nova variante da mensagem (PIF-SV), contendo um novo éxon de 64 bp, inserido entre os éxons 4 e 5, foi identificada em tecido normal de mama pela técnica de RACE-PCR. Esta forma variante de PIF é expressa concomitante com a forma principal de PIF em tumores primários da mama, linhagens tumorais de mama e nos tecidos normais da mama e placenta. Os nossos dados sugerem que o PIF exerce funções fisiológicas nas células da mama, testículo e placenta. Por outro lado, as alterações na expressão do gene, que incluem, a superexpressão e a geração da forma variante (PIF-SV), parece contribuir em algum evento da transformação de células normais em tumores malignos.

ABSTRACT

Proteolysis-inducing factor (PIF) is a 24 kDa glycoprotein identified in the plasma proteins of cancer patients and responsible for muscle catabolism associated with the process of cancer cachexia. The gene is mapped into 12q13.1 band of chromosome 12, and has been named-

HCAP (Human cachexia associated protein), Dermcidin/AIDD, DSEP (Diffusible survival evasion peptide) and IBC-1 (Invasive breast cancer-1). During the processing of the gene, 5 exons are transcribed and an open reading frame region codes a protein of approximately 110 amino acids. The present study has investigated, using the RT-PCR, RACE-PCR and Real-time PCR techniques, the presence of PIF messages in different cell types derived from normal and tumor tissues. The PIF mRNA expression was examined in 37 tumor tissues and 5 normal tissues and detected in 7 of 20 breast tumor cell lines, one colon tumor cell line and in normal breast, placenta and testis tissues. The differential expression of PIF message in metastatic breast cell lines was confirmed by the Real-time PCR technique. A new splicing form of the message, containing one new exon of 64 bp, inserted between the exons 4 and 5, was identified in normal breast tissue. This splicing form of PIF (PIF-SV) is expressed concomitantly with a main form of PIF in breast tumor cell lines and also in normal breast and placenta tissue. These data suggest that PIF exhibits physiological functions in the breast, testis and placenta cells. Our data also suggest that alterations in gene expression, which include an over-expression and a production of a new splicing form (PIFSV), seem to contribute in some event leading normal cell to a malignant phenotype.

INDICE

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A célula neoplásica	2
1.2. Ciclo celular	3
1.3. O que é caquexia?	5
1.4. Caquexia neoplásica	5
1.5. Anorexia e caquexia	6
1.6. O catabolismo de proteínas no músculo esquelético	7
1.7. Os principais mediadores no processo de caquexia	7
1.8. PIF como fator de indução de proteólise	8

1.9. A glicoproteína PIF	9
1.10. Detecção de PIF na urina	10
1.11. Mecanismo de ação de PIF	10
1.12. Outras funções de PIF	12
1.13. Homólogos da proteína PIF	13
1.14. Processamento alternativo do transcrito de PIF	14
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Linhagens celulares e tecidos	19
3.2. Extração do mRNA	19
3.3. Síntese de cDNA por RT-PCR	19
3.4. Reação de polimerase em cadeia para amplificação dos transcritos de PIF	20
3.5. Análise dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose e gel de poliacrilamida	21
3.6. Obtenção do cDNA por reação RACE-PCR	22
3.7. Purificação de produtos de PCR	23
3.8. Clonagem de produtos de RACE-PCR	23
3.9. Sequenciamento automático de produtos de PCR e produtos de RACE-PCR	24
3.10. Construção e montagem das sequências consenso	24
3.11. Construção do clone controle	24
3.12. Southern blotting	24
3.13 Real-time PCR	25
4. RESULTADOS	27
4.1. Amplificação do transcrito do gene PIF em vários tipos celulares derivados de tecido normal e tumores primários e metastáticos	28
4.2. Identificação de uma forma variante do gene	

PIF (PIF-SV) expressa no tecido de mama normal	29
4.3. Amplificação do transcrito de PIF-SV em vários tipos celulares derivados de tecido normal e tumores primários e metastáticos	30
5. FIGURAS E LEGENDAS	32
6. DISCUSSÃO	
6.1. Expressão do RNA mensageiro de PIF em vários tipos celulares derivados de tecido e tumores primários e metastáticos	48
6.2. Identificação de uma nova splicing variante da mensagem do gene PIF em células normais e tumorais	53
7. CONCLUSÕES	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

INTRODUÇÃO

1.1. A célula Neoplásica

A origem e a progressão do câncer dependem de múltiplos e interdependentes eventos celulares e moleculares, que ocorrem dentro e fora da célula. O câncer é considerado uma doença genética. Isso significa que pode ser transmitido a uma célula normal através da transferência de genes tumorais (cópias de genes normais que sofreram mutações). Quando tais genes são transcritos, provocam a síntese de proteínas que mostram perda ou ganho de sua função biológica. As mutações podem ser causadas por agentes físicos e químicos do meio ambiente ou por produtos tóxicos da própria célula (radicais livres, por exemplo). Além das mutações em genes, o câncer é também provocado por falhas na interação que cada célula do organismo mantém com as demais células, em especial, as células do sistema imune, e com moléculas presentes na chamada matriz extracelular (Hanahan & Weinberg, 2000).

A palavra neoplasia -- nome científico do câncer ou tumor maligno -- significa 'novo crescimento'. A diferença mais significativa entre uma célula normal e uma neoplásica é que o crescimento ou proliferação dessa última persiste mesmo na ausência de fatores de crescimento. No entanto, para que as células se tornem malignas não basta que elas se multipliquem em excesso. Elas precisam ignorar as restrições de crescimento impostas pelas diferentes partes do organismo, em especial por células vizinhas normais.

O que realmente distingue um câncer benigno de um maligno é a capacidade deste de invadir outros tecidos e formar novos tumores. Por isso, considera-se neoplásica uma célula que adquire as seguintes vantagens metabólicas e capacidades biológicas: 1. perda do controle da proliferação e da divisão celular; 2. imortalização celular, devida à ativação da enzima telomerase; 3. presença de alterações (de forma e número) nos cromossomos; 4. perda das propriedades adesivas da membrana plasmática, que permite o reconhecimento célula-célula e a inibição por contato do movimento e crescimento celular; 5. perda de função e da capacidade de diferenciação ou especialização; 6. capacidade para invadir o tecido vizinho e formar metástases; e 7. capacidade de induzir a formação de novos vasos sanguíneos, ou angiogênese (Hanahan & Weinberg, 2000).

1.2. Ciclo Celular

O ciclo celular compreende os processos de duplicação do DNA e divisão nuclear (mitose), e resulta na produção de nova célula. Para iniciar um ciclo, a célula em repouso (fase Go) precisa ser estimulada por fatores de crescimento (como o fator de crescimento derivado de plaquetas, ou PDGF, e o fator de crescimento epidermal, ou EGF), hormônios esteróides e citocinas (proteínas que atuam como hormônios), todos produzidos por elas mesmas ou por células ao seu redor. Esses fatores ligam-se aos seus receptores de membrana, deflagrando uma série de reações químicas que em última instância causam a ativação de fatores de transcrição (exemplos: c-myc, c-jun, c-fos), os quais promovem a síntese de RNA mensageiros de dezenas de enzimas-chaves da síntese de ácidos nucleicos, tais como diidrofolato redutase, DNA polimerases e topoisomerases. Esta cascata de eventos químicos e morfológicos ocorre de uma maneira ordenada e conduz a célula da fase Go para as fases sucessivas do ciclo celular, isto é, G1-S-G2 e mitose.

A execução das reações e eventos de cada fase do ciclo celular é mediada por dezenas de fatores, cuja síntese e destruição ocorrem em momentos determinados. Os principais são os seguintes: ciclinas A, B e D, enzimas quinases dependentes de ciclinas: CDK-1, 2, 4 e 6, fosfatases: cdc-25 A, B e C, proteínas inibidoras de CDKs: p21, p27, p57, p16, p18, e fatores de transcrição: c-myc, E2F, RB e p53. Os complexos formados por CDK/ciclina/inibidor de CDK são inativos e a ativação requer a eliminação por degradação do inibidor de CDK associado a ele (por exemplo: p21, p27), um evento que ocorre durante as transições de fases. A ativação dos complexos CDK-4/ciclina D, CDK-4/ciclina-6, CDK-2/ciclina A, CDK-2/ciclina E aumenta a atividade quinase dessas enzimas e provoca a fosforilação progressiva de RB. Esse causa a dissociação do complexo E2F/RB, permitindo que E2F inicie a transcrição de genes da fase S. Mais tarde, a ativação do complexo CDK-1/ciclina B promove a fosforilação de várias proteínas nucleares, a condensação dos cromossomos, a formação do fuso e o início da mitose. A atividade enzimática do complexo cessa após a degradação da ciclina B, e esse evento marca o fim do ciclo celular (Malumbres & Barbacid, 2001).

Essas reações e eventos são interrompidos durante a transição das fases G1/S e G2/mitose. Nesses momentos críticos do ciclo celular -- os 'pontos de checagem' -- a célula decide se avança para a fase seguinte, continuando o processo de divisão, ou sai do ciclo, iniciando o processo de morte celular por apoptose. Na maioria das vezes, a ativação dessas vias é iniciada pelo fator supressor de tumores p53, que atua na transcrição de dezenas de genes, incluindo o gene da proteína p21. A p21 bloqueia o ciclo celular inibindo a atividade de enzimas CDKs, que são responsáveis pelo controle positivo do ciclo celular.

Esse mecanismo de controle de falhas e erros na linha de montagem de uma nova célula é essencial. Portanto, qualquer defeito em um dos componentes ou operadores desse mecanismo provocará a proliferação contínua das células (Evan & Vousden, 2001).

Analisando as diferenças na expressão de genes em células normais e em células tumorais de pacientes e de animais de laboratório, os cientistas já identificaram dezenas de oncogenes e acredita-se que existam mais de 100. Na maioria dos casos, foram mutados genes que codificam fatores de crescimento, receptores da membrana, fatores de transcrição e enzimas quinases. Mais importante ainda, descobriu-se que todos estão envolvidos nas vias de transmissão de sinais biológicos e no controle positivo e negativo do ciclo celular e da apoptose.

O crescimento descontrolado que se verifica nas neoplasias decorre da transformação de proto-oncogenes (como *c-MYC*, *c-FOS* e *c-RAS*), envolvidos no controle positivo do ciclo celular, em oncogenes ativos. A ativação pode ser causada por mutações, deleções (eliminação de trechos) e translocações cromossômicas. Por outro lado, ficou também provado que, em certos tipos de células neoplásicas, o crescimento descontrolado devia-se ao aumento no número de cópias (amplificação), à mutação ou à deleção de proto-oncogenes (como *p53*, *RB*, *p19*, *p21*, *p27*, *BAX* e *BCL-2*) envolvidos no controle negativo do ciclo celular e na regulação da apoptose. Nesses casos, o que faz as células crescerem de forma autônoma é a inativação de genes supressores de tumor: com isso, a célula deixa de checar os erros e falhas que provocariam o bloqueio no ciclo celular ou a morte por apoptose (Evan & Vousden, 2001).

1.3. O que é caquexia?

Caquexia deriva do grego *kakos hexis*, e literalmente significa má condição (Tisdale, 1997, 2002). A caquexia está associada a muitas doenças crônicas degenerativas, como câncer, infecções microbianas, AIDS, doenças cardíaco-respiratórias, artrites reumatóides, tuberculose, fibrose cística e doença de Chron. Ela também se desenvolve nos idosos, nos quais nenhum sintoma óbvio de doença existe. Apesar da caquexia representar um estado metabólico complexo, ela é clinicamente reconhecida como uma perda progressiva do peso devido a depleção das reservas do tecido adiposo e músculo esquelético do hospedeiro (Baracos, 2000). Ao contrário da inanição, na qual a gordura é perdida e a massa muscular do corpo é preservada, os portadores da caquexia perdem peso em ambos os compartimentos. A perda de peso ocorre em tecido não gorduroso, preferivelmente nos músculos esqueléticos e não em órgãos viscerais. Na inanição, existe uma perda igual da proteína do músculo esquelético e das vísceras e o fígado diminui de massa. Na caquexia, a massa do fígado é aumentada devido a atividade metabólica de reciclagem e síntese de proteínas de fase aguda (PFA). Pacientes que perderam mais que 15% de peso podem sofrer diminuição da função psicológica, e a morte normalmente ocorre quando a perda de peso está em torno de 30%. A perda de peso durante a inanição, quando menor que 40%, também pode resultar em morte (Tisdale, 1999).

1.4. Caquexia neoplásica

A caquexia associada ao câncer, ou caquexia neoplásica, é uma síndrome de perda progressiva e maciça (até 80%) de tecido adiposo e massa muscular esquelética (Baracos, 2000, Tisdale, 2002, Argilés *et al.*, 2003). A caquexia é um dos efeitos mais freqüentes da malignidade e é responsável por mais de 20% das mortes por câncer. Ela é muito comum em alguns tipos de câncer, particularmente nos do trato gastrointestinal, pâncreas, próstata e pulmão (Barber *et al.*, 1999, Tisdale, 2002).

Esta condição pode aparecer em pacientes com um tumor menor que 0,01% de seu peso total (70kg tumor < 7g). Em contrapartida, alguns pacientes

portadores de grandes tumores não desenvolvem este quadro. No desenvolvimento do tumor, a caquexia não é o último estágio da doença, mas está sempre associada à morte. O quadro da caquexia pode levar à busca do tumor, ou seja, o câncer ainda não foi diagnosticado, ou pode estar presente no momento de diagnóstico (Barber *et al.*, 1999, Tisdale, 2002).

Perda do peso é um marcador importante para os pacientes com câncer. A sobrevivência desses pacientes é diretamente relacionada à perda total do peso. Pacientes que sofreram perda do peso têm também uma resposta diminuída à quimioterapia (Tisdale, 2002). É a perda de proteínas do músculo esquelético que resulta em fraqueza, imobilidade e finalmente morte devido à perda da função dos músculos respiratórios (Baracos, 2000, Tisdale, 2003).

1.5. Anorexia e caquexia

Anorexia é definida como perda do apetite e saciedade antecipada. Ela está presente em até metade dos recém-diagnosticados de câncer (Tisdale, 2002). Como a anorexia invariavelmente resulta em perda do peso, mudanças no peso em pacientes com câncer e com caquexia foram frequentemente atribuídas à anorexia. No entanto, a anorexia sozinha não explica as mudanças metabólicas complexas associadas a caquexia. Primeiro, como já foi dito acima, durante a inanição prolongada, reservas de gordura são usadas preferencialmente - o que significa que a massa magra do corpo, que é essencial para sobrevivência, é preservada até os últimos estágios da inanição. Segundo, a ingestão do alimento nos pacientes com caquexia não corresponde ao grau da má nutrição. Além disso, tentativas para aumentar a ingestão, ou pelo aconselhamento dietético, ou através da suplementação nutricional, não conseguem inverter a perda progressiva do peso. Portanto, parece que os eventos metabólicos produzem a diminuição do peso corpóreo e a ingestão do alimento se adapta ao peso mais baixo do corpo. Isso explica a observação que, em ambos modelos animal e humano, a caquexia pode ocorrer na ausência da anorexia - pelo menos inicialmente. Assim, a perda de ambos: músculo e tecido adiposo, precede a queda da ingestão dos alimentos.

Caquexia é caracterizada pela perda da gordura do corpo que pode ser explicado mais pelo aumento da lipólise, que pela diminuição na lipogênese. Pacientes com câncer e perda de peso têm um “turnover” mais alto de glicerol

e ácidos graxos livres, e uma mobilização elevada dos ácidos graxos livres, sendo está evidente antes mesmo do estabelecimento da perda do peso. Quanto às proteínas, o metabolismo é aumentado, originando-se do catabolismo aumentado e síntese diminuída das proteínas musculares. Por outro lado, a síntese das proteínas hepáticas está aumentada (Barber *et al.*, 1999, Tisdale, 1999, Tisdale, 2002).

1.6. O catabolismo de proteínas no músculo esquelético

Existem três vias principais de proteólise responsáveis pelo catabolismo das proteínas musculares. São elas: o sistema lisossomal, que está envolvido na proteólise das proteínas extracelulares e receptores da superfície celular; as calpaínas citoplasmáticas cálcio-dependentes, que são ativadas na injúria do tecido, necrose e autólise; e a via ubiquitina-proteasoma dependente do ATP. Destas três, a proteólise via proteasoma-ubiquitina é considerada a mais importante para degradação das proteínas nos estados catabólicos, incluindo inanição, sepse, acidose metabólica, trauma grave, atrofia por desnervação, e caquexia neoplásica. Nenhuma daquelas outras duas vias é capaz de degradar as proteínas miofibrilares (Baracos, 2000, Tisdale, 2002, Glass, 2003).

1.7. Os principais mediadores no processo de caquexia

Mediadores potenciais do processo caquético podem ser divididos em dois grupos (Baracos, 2000, Argilés *et al.*, 2003, Tisdale, 2003). No primeiro grupo estão as citocinas que são produzidas por células do hospedeiro, como as citocinas TNF- α , interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator inibidor de leucemia (LIF) e interferon- γ (IFN- γ). Esses agentes foram identificados em modelos animais e quase todos produzem supressão profunda do apetite (anorexia), enquanto o TNF- α foi identificado pela sua capacidade em provocar aumento de lipólise, efeito que ocorre devido à supressão da síntese e função da enzima da lipoproteína lipase (Tracey *et al.*, 1990). Seu efeito catabólico no músculo esquelético também está associado com indução da proteólise através do sistema proteolítico ubiquitina-proteasoma (Llovera *et al.*, 1997).

No segundo grupo estão os fatores produzidos pelas células tumorais como LMF (Lipid-mobilizing factor) e PIF (Proteolysis-inducing factor). (Tisdale, 2003). Existe uma correlação positiva entre os níveis desses fatores e o grau de caquexia humana (Todorov *et al.*, 1998; Wigmore *et al.*, 2000).

Pacientes com caquexia neoplásica podem excretar o fator mobilizante de lipídios (LMF) na urina. A purificação bioquímica desse fator mostrou que se trata de uma glicoproteína de 43 kDa, homóloga, na seqüência de aminoácidos, com a glicoproteína-á2 ligadora de Zinco do plasma humano (Todorov *et al.*, 1998, Tisdale, 2002). LMF estimula a hidrólise dos triglicérides do tecido adiposo através de aumento do AMP cíclico intracelular como o resultado direto da estimulação da adenilato ciclase, ciclase-GTP-dependente (Islaim-Ali *et al.*, 2001). Quando administrado em camundongos, LMF induziu uma redução específica da gordura da carcaça sem causar mudanças no conteúdo de água corporal e na massa não-gordurosa (Hirai *et al.*, 1998; Tisdale, 2003).

1.8. PIF como fator de indução de proteólise

As evidências bioquímicas da existência de fatores protéicos capazes de induzir a degradação no músculo esquelético foram reveladas utilizando-se um ensaio biológico de degradação de proteína em músculos esqueléticos isolados de ratos ou camundongos, sendo os mais usados os músculos *soleus*, *gastrocnemius*, *extensor digitorius longus* (EDL) e diafragma. Nesse ensaio, a concentração de tirosina liberada pelo músculo em um período de 2 horas representa a atividade de indução de proteólise intracelular do fator presente na amostra em estudo. Essa atividade foi primeiramente demonstrada no soro de camundongos portadores do adenocarcinoma de cólon MAC 16 (Beck *et al.*, 1987, Smith & Tisdale, 1993) e, em seguida, nos ensaios com frações de proteínas isoladas do soro dos pacientes portadores de câncer de várias origens com perda de peso maior que 10% (Belizário *et al.*, 1991). Em ambos casos, constatou-se que havia uma correlação direta com a atividade do fator de indução de proteólise circulante (PIF) e a perda de peso dos hospedeiros.

Subseqüentemente foi descoberto que os camundongos portadores do tumor MAC 16 produziam anticorpos que reconheciam um produto de 24 kDa no ensaio de Western blot de extratos de proteínas parcialmente purificados desse tumor e com atividade de indução de proteólise (McDevit *et al.*, 1995).

Uma proteína de massa molecular similar foi também identificada com o anticorpo monoclonal produzido pelos camundongos na urina dos pacientes com câncer e caquexia. Células B produtoras desse anticorpo foram utilizadas nos ensaios que levaram à produção do hibridoma que sintetiza o anticorpo monoclonal que reconhece essa glicoproteína de 24 kDa (Todorov *et al.*, 1996a, Todorov *et al.*, 1996b).

1.9. A glicoproteína PIF

Estudos de marcação metabólica com açúcares e aminoácidos, seguida de digestão enzimática, mostraram que a substância de 24 kDa era uma glicoproteína sulfatada, constituída de uma cadeia central polipeptídica de 4 kDa, com uma cadeia de oligossacarídeos sulfatada de 6 kDa e uma cadeia de oligossacarídeos de 10 kDa, ligadas a posições O (serina ou treonina) e N (aspártico/asparagina), respectivamente (Todorov *et al.*, 1996b, 1997). Os experimentos com o anticorpo monoclonal obtidos contra a proteína purificada de adenocarcinoma dos camundongos mostraram a existência de outras formas glicosiladas de 24, 30, 69 kDa em alguns tecidos, e no plasma e urina de pacientes com alguns tipos de neoplasia (Todorov *et al.*, 1996a).

O seqüenciamento de aminoácidos da porção N-terminal revelou a seguinte seqüência: Tyr-Asp-Pro-Glu-Ala-Ala-Ser-Ala-Pro-Gly-Ser-Gly-Asp-Pro-Ser-His-Glu-Ala-(Ser)-Ala (Todorov *et al.*, 1996b). Essa seqüência de aminoácidos foi encontrada na glicoproteína isolada de amostras de camundongos e humanos. Administração da glicoproteína purificada em camundongos causou uma perda em torno de 10% do peso corpóreo dos animais, e em 17% no peso do músculo *soleus*, em um período de 24 h, sem causar a redução na ingestão de água e ração (Cariuk *et al.*, 1997; Todorov *et al.*, 1996b, Lorite *et al.*, 2001). Na análise de conteúdo e composição de nutrientes e aminoácidos nos órgãos e músculos desses animais, verificou-se uma redução maior de massa magra corpórea. Desta forma, concluiu-se que o material purificado foi capaz de induzir catabolismo da proteína *in vitro* (Lorite *et al.*, 1997), confirmando que a glicoproteína de 24 kDa era o PIF.

1.10. Detecção de PIF na urina

O PIF foi encontrado na urina dos pacientes portadores de vários tipos de tumores, incluindo carcinomas de pâncreas, mama, ovário, pulmão, cólon e reto, em pacientes cuja perda de peso era em torno de 1.0 kg por mês (Cariuk *et al.*, 1997, Tisdale, 2003). Entretanto, estava ausente na urina dos pacientes com os mesmos tipos de tumores, nos quais nenhuma perda de peso foi verificada. Também foi ausente na urina daqueles que tinham perda de peso causada por outras condições diferentes ao câncer, como ressecção do fígado, cirurgia, sepse, múltiplas injúrias, queimaduras e doença do sono.

O PIF foi detectado na urina de 80% dos pacientes com carcinoma de pâncreas (Todorov *et al.*, 1998). Esses pacientes tinham significativamente maior perda de peso quando comparado aos pacientes em cuja urina não se encontrou o PIF. PIF também foi detectado nos cânceres gastrintestinais, e nesses casos, a sua presença também correlacionou-se diretamente com a perda de peso nos pacientes (Cabal-Manzano *et al.*, 2001). Além disso, a produção e secreção de PIF foram confirmadas em pacientes com carcinoma cervical (Hussey *et al.*, 2002) e melanoma G 361 (Todorov *et al.*, 1999).

1.11. Mecanismo de ação de PIF

Os primeiros estudos sobre o mecanismo de ação do PIF foram realizados *in vitro* usando preparações de músculos esquelético, como exemplos: *soleus*, EDL e mais recentemente, com a linhagem de mioblastos indiferenciado de camundongos, denominada C2C12 (Smith *et al.*, 1999, Lorite *et al.*, 2001). Nestas células, PIF induziu uma diminuição dose dependente na síntese de proteínas, a qual foi atenuada pela insulina, sugerindo seu papel na regulação fisiológica normal. O efeito biológico máximo foi encontrado com a concentração 4 nM de PIF, a mesma dose que causou um aumento na degradação de proteínas. O efeito na degradação protéica foi atenuado pelo ácido graxo poli-insaturado: ácido eicosapentaenóico (EPA). Contudo, EPA não interferiu na diminuição de síntese protéica induzida pelo PIF. Esse efeito do EPA está de acordo com o estudo inicial (Belizário *et al.*, 1991) onde ficou demonstrado que a indometacina, um inibidor da ciclooxygenase, era capaz de abolir o efeito de PIF na degradação de proteínas musculares.

Quando administrado em animais, EPA mostrou-se muito efetivo na atenuação da perda de peso e caquexia induzida pelo tumor MAC 16 (Beck *et al.*, 1991). Nesse modelo, EPA significativamente reduziu degradação de proteína sem provocar alteração na síntese protéica. Em miotúbulos C2C12 (miócitos diferenciados) o PIF provocou a liberação do ácido araquidônico de fosfolípidios da membrana, com uma curva dose-resposta paralela àquela da degradação protéica. O ácido araquidônico liberado foi rapidamente metabolizado em prostaglandinas E_2 e F_{2a} e metabólicos da lipoxigenase: ácidos 5-, 12-, e 15-hidroieicosatetraenóicos (HETE). A produção de todos esses eicosanóides foi atenuada nas células pré-tratadas com EPA. Entre os metabólicos formados, apenas o 15-HETE foi capaz de induzir degradação protéica significativa, sugerindo que ele deve servir de sinalizador intracelular da ação do PIF (Smith *et al.*, 1999, Lorite *et al.*, 2001, Whitehouse *et al.*, 2003).

Os estudos realizados por Tisdale e colaboradores (Lorite *et al.*, 2001, Smith & Tisdale, 2003) também mostraram que o mecanismo principal pelo qual o PIF induz proteólise de proteínas do músculo esquelético é dependente da ativação da via ubiquitina-proteasoma dependente de ATP. Nesta via, as proteínas selecionadas para degradação são conjugadas a uma cadeia de ubiquitina. A conjugação da ubiquitina ao substrato é feita em um mecanismo de três etapas e requer a participação de três classes de enzimas denominadas E1, E2 e E3. Primeiro, a molécula de glicina da porção C-terminal da ubiquitina forma uma ligação tio-éster com o resíduo de cisteína da enzima ativadora de ubiquitina E1. Essa reação requer a hidrólise de ATP (Ciechanover, 1998).

O complexo proteolítico denominado proteasoma é constituído de uma parte central que contém 4 unidades formando um anel, sendo que cada anel é formado por 7 cadeias α e 7 cadeias β distintas. O coeficiente de sedimentação de complexo protéico é 20S e corresponde a uma massa molecular de 700-750 kDa. As subunidades- β funcionam como enzimas proteolíticas e atuam diretamente na degradação das proteínas-substrato. Essas proteases têm especificidade distintas; a primeira possui atividade similar à tripsina, a segunda similar à quimiotripsina e a terceira, similar à glutamil peptidil hidrolases. O proteasoma libera oligopeptídeos de 8-12 aminoácidos, que são rapidamente degradados em aminoácidos por outras peptidases citosólicas

(Lecker *et al.*, 1999). Níveis teciduais aumentados de mRNA da ubiquitina e das subunidades de 20S do proteasoma: HC3, HC5, HC7 e HC9, em 2 a 4 vezes, foram detectados no músculo de pacientes com câncer, mostrando a importância dessa via no catabolismo de proteínas induzido por tumores (Lecker *et al.*, 1999, Tisdale, 2003).

A análise de proteínas do músculo *gastrocnemius* dos camundongos expostos ao PIF por 24 horas mostrou um aumento na presença de proteínas conjugadas à ubiquitina de alta massa molecular (Lorite *et al.*, 1998). Esse efeito foi acompanhado com um incremento de expressão de mRNA da ubiquitina, proteína conjugadora de ubiquitina E2_{14k}, como também da subunidade C9 do proteasoma (Lorite *et al.*, 2001). Efeitos similares foram observados *in vitro* com miotúbulos de células C2C12, confirmando que o PIF pode atuar através da indução de componentes centrais da via ubiquitina-proteasoma (Whitehouse *et al.*, 2003).

O pré-tratamento dos camundongos com EPA (0.5 g kg⁻¹) foi capaz de anular completamente o efeito caquetizante do PIF *in vivo* (Hussey & Tisdale, 1999). Efeito similar foi observado em relação à perda de peso em camundongos portadores do tumor MAC16 que expressa a proteína PIF (Beck *et al.*, 1991). Aparentemente o EPA exerce seu efeito através da regulação negativa da expressão de subunidades da via ubiquitina-proteasoma em músculo esquelético (Whitehouse *et al.*, 2001, Whitehouse *et al.*, 2003). O mecanismo pelo qual o PIF induz catabolismo da proteína e caquexia neoplásica parece depender da ativação da fosfolipase A2 e conseqüentemente da produção de 15(S)-HETE e do aumento da expressão de componentes da via ubiquitina-proteasoma (Tisdale, 2003). Contudo, ainda não foi caracterizada a proteína receptora na membrana plasmática de miócitos acopladas a estes eventos químicos desencadeados por PIF.

1.12. Outras funções de PIF

O PIF pode participar na indução da resposta da fase aguda associada a resposta imunológica. Doses de 10-100 ng/ml de PIF quando adicionadas à culturas de hepatócitos e células endoteliais primárias e tumorais provocaram a ativação dos fatores de transcrição NF-κB e STAT3, e subsequente síntese de IL-6, IL-8, proteína C-reativa e proteínas de adesão, enquanto que a síntese da

transferina foi diminuída (Watchorn *et al.*, 2001; Watchorn *et al.*, 2002). Portanto, o PIF pode exercer uma regulação da expressão dos genes hepáticos, contribuindo para o efeito geral da caquexia.

Em camundongo, verificou-se que a expressão da proteína PIF ocorre durante o período embrionário E8-E9, com pico em E8.5 (Watchorn *et al.*, 2001). Este é o estágio crucial na modelação e desenvolvimento do músculo esquelético em camundongo e está associado com expressão da miogenina. Ambos, os níveis da miogenina e do PIF caíram a níveis não detectáveis depois do período E9.5. Portanto, outro possível papel fisiológico do PIF seria a modelagem do músculo esquelético durante do desenvolvimento embrionário.

1.13. Homólogos da proteína PIF

A sequência conhecida de PIF de roedores possui uma homologia de 98% com um peptídeo de 30 aminoácidos chamado Y-P30 – “survival-evasion peptide” e DSEP (diffusible survival evasion peptide). O nome deve-se a sua capacidade de induzir aumento de sobrevivência de células nervosas estimuladas por agentes neurotóxicos como a H₂O₂ (Cunningham *et al.*, 1998; Cunningham *et al.*, 2000, Cunningham *et al.*, 2002).

Durante o seqüenciamento de uma biblioteca de cDNA de mRNA de amostras da pele, nevus, e culturas de melanócitos e melanomas, SCHITTEK e colaboradores identificaram um clone designado dermcidin ou DCD (Schitteck *et al.*, 2001). O gene contém 5 éxons, 330 pares de base e codifica uma proteína de 110 aminoácidos. A região 5' do gene codifica um peptídeo idêntico (100%) à sequência peptídica do PIF. Nesse estudo, mostrou-se também que um peptídeo C-terminal de 47 aminoácidos, gerado por processamento enzimático da proteína dermcidin, apresenta uma atividade antimicrobial quando adicionado a culturas de *E.coli* e *C. Albicans*. Esta atividade antibiótica do DCD é detectada na secreção (suor) de glândulas sudoríparas da pele e pode ter papel importante no controle da flora microbiana desse tecido. Além disso, outros peptídeos derivados do DCD foram identificados em quantidades diferentes em várias amostras de suor (Flad *et al.*, 2002, Sagawa *et al.*, 2003).

1.14. Processamento alternativo do transcrito de PIF

Os dados citados acima indicam que o PIF é uma citocina com múltiplas atividades biológicas e que pode ter papel relevante em muitas doenças inflamatórias e no processo de caquexia. Os dados também sugerem que essas diferentes funções do PIF poderiam estar relacionadas com a expressão de isoformas da proteína geradas por processamento alternativo do mensageiro, processamento proteolítico da proteína, ou ainda, modificações pós-traducionais, como a glicosilação e sulfatação.

Em um estudo inicial de identificação dos possíveis genes relacionados à sequência de aminoácidos da porção N-terminal do PIF no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/page.cgi>), foi encontrado 100% de homologia com a sequência de um gene predito que codifica uma proteína de 400 aminoácidos (Icl/Hs12_9720_22_5_43). Esse gene está localizado no cromossomo 12 humano (Homo sapiens 12q BAC RP11-850F7). A análise das possíveis regiões de processamento desse mRNA indicou que na sequência de DNA do gene PIF são possíveis 9 éxons. Nessa sequência de nucleotídeos estão presentes os éxons 1, 2, 3, 4 e 5 da forma identificada do gene. Portanto, é possível que existam outras formas de expressão desse gene. Esse processamento alternativo do gene poderia ter relação com a célula produtora e/ou certas patologias de órgãos e tecidos.

Portanto, a caracterização das mensagens gênicas do PIF em diferentes células humanas poderá auxiliar na interpretação das diferentes atividades biológicas atribuídas ao PIF. Há uma grande expectativa de que esses estudos sejam de fundamental importância para o futuro desenvolvimento de medidas terapêuticas e preventivas para uma série de doenças como câncer e doenças inflamatórias.

Sequências do precursor humano da dermcidin: mRNA e proteína

```

atgaggttcatgactctcctcttctcctgacagctctggcaggagccctggtctgtgcctat
M R F M T L L F L T A L A G A L V C A Y
gatccagaggccgcctctgccccaggatcggggaacccttgccatgaagcatcagcagct
D P E A A S A P G S G N P C H E A S A A
caaaaggaaaatgcaggtgaagacccagggttagccagacaggcaccaaagccaaggaag
Q K E N A G E D P G L A R Q A P K P R K
cagagatccagccttctggaaaaaggcctagacggagcaaaaaaagctgtggggggactc
Q R S S L L E K G L D G A K K A V G G L
ggaaaactagggaaaagatgcagtcgaagatctagaaagcgtgggttaaaggagccgtccat
G K L G K D A V E D L E S V G K G A V H
gacgttaaagacgtccttgactcagtacta>tagctgtaaggagaagctgagaaatgatac
D V K D V L D S V L - L - G E A E K - Y
ccaggagcagcaggcctttacgtcttcagcctaaaacct
P G A A G F T S S A - N

```

OBJETIVOS

O objetivo principal do estudo é a validação das predições determinadas *in silico* que mostram que gene que codifica a proteína PIF poderia ter várias formas alternativas de expressão. Os objetivos específicos do projeto são os seguintes:

1- Investigar a expressão de RNA mensageiros do PIF em diferentes tipos celulares derivados de tecido normal e tumoral;

2- Clonar, seqüenciar e “clusterizar” os produtos gênicos para estudos da organização gênica das isoformas.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares e tecidos

As seguintes linhagens celulares humanas foram utilizadas: 1) carcinoma do cérvix, HeLa, 3) osteosarcoma, 4) leucemia K 562, HL 60, 5) melanoma, SKMEL-23, -25, -28, 6) carcinoma de próstata DU 145 e PC 3, 8) carcinoma de cérebro A 172 e T98G, 9) carcinoma de estômago, 10) carcinoma de cólon SW 480, 11) carcinoma de faringe, FaDu, 12) carcinoma de pulmão H 1155 e H 358.

Amostras de RNA obtidas das seguintes linhagens celulares humanas de câncer de mama foram utilizadas: ZR 7530, 734 B, BT 20, ZR 751, GI 101, SKBR 5, CAMA 1, SKBR 7, MDA-MB-175, -435, -361, -415, -453, -468, -134, PMC 42, MCF-7, CAL 51, DU 4475 e SKBR 3.

Amostras de RNA total dos seguintes tecidos normais humanos foram utilizados: 1) mama, 2) pulmão, 3) testículo, 4) útero e 5) placenta. As linhagens celulares foram cultivadas em meio DMEM suplementado com soro fetal 10% e antibióticos.

As amostras de linhagens de células tumorais, amostras de RNA de tecido normal, adquiridas da ATCC (American Type Culture Collection), da Clontech e amostras de pacientes com câncer, foram preparadas e gentilmente oferecidas por pesquisadores do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer e Hospital AC Camargo.

3.2. Extração do mRNA

A extração de RNA total foi feita utilizando o reagente TRIzol (Life Technologies USA) de acordo com o protocolo do fornecedor. O mRNA isolado foi estocado a - 70° C até sua utilização.

3.3. Síntese de cDNA por RT-PCR

A síntese de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total foi realizada pelo método da transcriptase reversa utilizando a enzima Superscript II (Gibco-BRL) de acordo com o protocolo do fabricante. A reação foi feita em volume final de 20 µl na presença dos seguintes reagentes: 1 µl de dNTPs mix 10 mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 4 µl de tampão de reação 5X (Tris-HCl 50 mM, KCl 75 mM e MgCl 3 mM), 2 µl de DTT 100 mM, 1 µl de inibidor de RNase (RNase OUT, Invitrogen) 40 U/µl, 1 µl do iniciador OLIGO dT 0.5 µg/µl, 1 µl da

enzima transcriptase reversa SuperScript II (GibcoBRL) 200 U/μl e 1 μg de RNA. As etapas da reação de transcrição reversa foram as seguintes: 1) desnaturação 65°C, 5 min; 2) síntese, 42°C, 60 min; 4) reação de inativação da enzima transcriptase reversa 70°C, 15 min. Quando necessário a síntese do cDNA foi feita utilizando a mistura de primer randômico, 3 μg/μl, (Random, Invitrogen), e OLIGO dT, 0.5 μg/μl.

Para correção da eficiência da transcrição reversa e da amplificação do cDNA foram usados em todos os experimentos um par de primers para a amplificação dos transcritos do gene constitutivo GAPDH (glicerol-aldeído-3-fosfato desidrogenase) e do gene supressor de tumor p53. Os primers são os seguintes:

GAPDH	forward: 5'- CTGCACCACCAACTGCTTA-3'
GAPDH	reverse: 5'- CATGACGGCAGGTCAGGTC-3'.
P53	forward: 5'-GGAGGAGCCGCAGTCAGA-3'
P53	reverse: 5'-CAAGAAGCCCAGACGGAAAC-3'

3.4. Reação de polimerase em cadeia para amplificação dos transcritos de PIF

Com base no peptídeo de 20 aminoácidos da glicoproteína PIF isolada de camundongo (Todorov *et al.*, 1996b) foram feitos estudos iniciais pelo programa BLAST para identificação de genes codificadores dessa proteína. Neste estudo, identificou-se uma seqüência BAC do cromossomo 12 humano (Homo sapiens 12q BAC RP11-850F7), para um gene predito em uma mensagem de 1250 bp (lcl/Hs12_9720_22_5_43). Em seguida, foram desenhados e sintetizados vários oligonucleotídeos primers “forward” e “reverse” para regiões contidas nos éxons 1 a 9 desse gene. Os primers são, como segue:

Primer 1: forward	5'-GGAATTCTCAATGAGGGAGAAATCCTG-3'
Primer 2: forward	5'- GGGATCCAAGATGTGGGAGCCAGGAAG-3'
Primer 3: forward	5'-GGGATCCAAGGAGAGCCTTCTGGG C-3'
Primer 4: forward	5'-GGGATCCGATGATCCAGAGGCCGCC-3'
Primer 5: forward	5'-GGGATCCTGAAGCATCAGCAGCTCAAA-3'
Primer 6: forward	5'-GGGATCCCAAGATCTCCAAGGATTGCG-3'
Primer 7: reverse	5'-GGAATTCTTTTTACAGATGCTTTCAG-3'
Primer 8: forward	5'-CCACGCTTTCTAGATCTTCGA-3'

Primer 9: forward 5'-CCCCAGGACCCCAGATGC-3'

Primer 10: forward 5'-GGGAACCCTTGCCATGAAG-3'

Primer 11: reverse 5'-CTGCTTCCTTGGCTTTGGTG-3'

Durante o andamento do projeto foram desenhados e sintetizados novos oligonucleotídeos primers “forward” e “reverse” para regiões contidas dentro dos éxons 3 a 5 do gene do PIF e de um novo éxon encontrado em uma forma variante do gene durante esta investigação. Os primers são, como segue:

Primer 12: forward 5'-CACCAAAGCCAAGGAAGCAG-3'

Primer 13: reverse 5'-CAGCTATAGTACTGAGTCAAGG-3'

Primer 14: reverse 5'-TTTAACGTCATGGACGGCTCC-3'

Primer 15: reverse 5'-GACCAACCTCTCTTCCCCACC-3'(PIF-SV)

Primer 16: reverse 5'-GGAATTCTCATGGACGGCTCACAGA-3' (PIF-SV)

As reações de PCR eram preparadas, para um volume final de 25 µl, contendo os seguintes reagentes: 2.0 µl de produto da reação de transcrição reversa (c-DNA), 2.5 µl do tampão de reação 10X [Tris-HCl 20 mM, pH 8.4, KCl 50 mM], 0.75 µl de MgCl₂ 50 mM, 4 µl da mistura de dNTPs 1.25 mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0.5 µl de cada primer (10 µM concentração final) e 0.3 µl (2.5 unidades) da enzima Taq DNA polimerase (GibcoBRL) e 14.45 µl de H₂O estéril. As etapas da reação foram as seguintes: 1) reação de desnaturação e ativação da Taq, 95°C, 5 min; um ciclo; 2) reação de desnaturação, 95°C, 1 min, 35 ciclos; 3) reação de anelamento, 62°C, 1 min, 35 ciclos; 4) reação de extensão, 72°C, 1 min; 35 ciclos; 5) reação de extensão final, 72°C, 3 min, um ciclo; e 6) resfriamento, 16°C, tempo indeterminado.

3.5. Análise dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose e gel de poliacrilamida

Após a amplificação, alíquotas contendo o produto de PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose à 1 % ou em gel de poliacrilamida à 8% em tampão TBE 1X (Tris-borato-EDTA: Tris 10.8 g/L, ácido bórico 5.5 g/L e EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) 0,925 g/L; pH 8.3)). O marcador de peso molecular foi DNA “Ladder” 100 bp (GibcoBRL). Em seguida, o gel foi

corado com nitrato de prata 10% ou brometo de etídio (0.75 µg/ml) e fotografado para documentação dos resultados.

3.6. Obtenção do cDNA por reação RACE-PCR

O protocolo para amplificação rápida de terminais livre de cDNA (RACE) foi segundo descrito no Marathon-Ready cDNA Amplification Kit e Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech). Nesta técnica, um adaptador 5' é primeiramente ligado a todos os mRNA com extensão poli-A. Os primers para o adaptador 5' usados foram AP1 e AP2 e os primers específicos para a região investigada: GSP1, GSP2; NGSP1 (nested) e NGSP2 (nested).

A solução de "master mix" foi preparada com os seguintes reagentes: 1) 2.5 µl de cDNA PCR Reaction Buffer; 10X, 2) 0.5 µl de dNTP Mix, 10mM; 3) 0.5 µl de Advantage 2 Polymerase Mix, 50X, e 4) 18 µl de água estéril.

A reação de 5'-RACE foi preparada com os seguintes reagentes: 1) 2.5 µl de RNA com calda poli-A extraído do tecido de mama normal (Marathon-ready cDNA); 2) 0.5 µl de AP1 Primer, 10 µM; e 3) 0.5 µl de GSP 1, ("primer reverse" - Primer 13), 10 µM.

A reação de 3'-RACE foi preparada com os seguintes reagentes: 1) 2.5 µl de RNA poli-A extraído de tecido mamário normal (Marathon-ready cDNA); 2) 0.5 µl de AP1 Primer, 10 µM, 3) 0.5 µl de GSP2 ("primer forward" - Primer 5), 10 µM.

Na reação Nested PCR utilizou-se as mesmas concentrações de "master mix". A reação de 5'-RACE foi realizada com seguintes reagentes: 1) 2.5 µl do produto de 5'-RACE-PCR diluído; 2) 0.5 µl de AP2 primer, 3) 0.5 µl de NGSP1 ("primer reverse"- Primer 11). A reação de 3'-RACE foi realizada com os seguintes reagentes: 1) 2.5 µl do produto de 3'-RACE-PCR diluído; 2) 0.5 µl de AP2 Primer; 3) 0.5 µl de NGSP2 ("primer forward"- Primer 12). As condições do ensaio de PCR-Nested foram as seguintes: 1) 94°C, 30 seg, um ciclo; 2) 94°C, 5 seg, 30 ciclos; e 3) 68°C, 3 min, 30 ciclos.

3.7. Purificação de produtos de PCR:

Os produtos do Nested-PCR foram purificados para clonagem em plasmídeos TOPO. A purificação foi feita depois da reação PCR seguindo o protocolo do Qiaquick PCR Extraction Kit (Qiagen). A purificação também foi feita após eletroforese em gel de agarose: Neste caso, o produto do PCR ou de Nested-PCR (RACE-PCR) foi aplicado no gel de agarose. A banda desejada foi recortada do gel durante a exposição à luz UV e colocada no tubo. A parte seguinte do processamento foi feita segundo o protocolo do Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

3.8. Clonagem de produtos de RACE-PCR

Os produtos de Nested-PCR foram clonados conforme descrito no TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). Os produtos de Nested-PCR (4 µl) foram ligados ao plasmídeo TOPO Vector (1 µl) em solução salina (1 µl) durante 5 minutos à temperatura ambiente. A transformação foi feita pelo método químico. Durante a transformação as bactérias *E. coli* DH5α-T1 competentes (1 µl) foram incubadas com os produtos da reação de ligação (0.5 à 4 µl) e, em seguida, a mistura foi mantida em gelo por 5 minutos, sendo depois exposta a choque térmico por 30 segundos à 42°C. Em seguida, foi adicionado 250 µl de meio SOC. As bactérias foram incubadas sob agitação por 1 hora à 37°C e após esse período, uma alíquota foi semeada em placas de Petri contendo meio LB (Luria-Bertani)-Agar (peptona de caseína 1%, extrato de levedura 0.5 %, NaCl 0.5% e Agar 1.5%) suplementado com X-Gal 40 µg/ml, IPTG 0.5 mM e Ampicilina 100 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989). No dia seguinte, as colônias positivas, identificadas por ausência de coloração azul, foram selecionadas para amplificação do produto clonado por PCR usando os primers M13 “forward” e M13 “reverse” para posterior seqüenciamento e purificação de plasmídeos. A purificação de plasmídeos foi feita transferindo os clones de interesse para meio LB-Líquido em tubos de 5 ml. Após o crescimento, o DNA plasmidial foi extraído utilizando o Wizard Plus SV Minipreps Kit (Promega).

3.9. Seqüenciamento automático de produtos de PCR e produtos de RACE-PCR clonados

Produtos de PCR purificados ou plasmídeos contendo produtos clonados foram seqüenciados após reação de PCR com primers específicos. O kit de seqüenciamento utilizado foi o BigDye III (Applied Biosystems) e o equipamento ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem), locado no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer.

3.10. Construção e montagem das seqüências consenso (contigs)

Com os dados do seqüenciamento dos produtos clonados de RACE-PCR foram construídos consensos baseados nas seqüências obtidas. Estes consensos foram comparados com as seqüências do mensageiro do PIF e com a seqüência do mRNA controle (clone DKFZp313H1523). Nesse estudo, usamos o programa *Phred/Phrap*.

3.11. Construção do clone controle

O plasmídeo pTripLEX2 (clone DKFZp313H1523) contendo o mRNA completo de PIF, obtido de uma biblioteca de cDNA de tecido fetal da pele, medula óssea e tecido adiposo, adquirido do RZPD (Deutsches Ressourcebzebtrum fur Genomforschung GmbH – German Cancer Research Center), Berlin, Alemanha, foi utilizado para subclonagem de PIF no plasmídeo pGEX-4T (Pharmacia) e pAE 3.1 (Invitrogen). Esses clones foram utilizados na padronização de primers e como controle de expressão dos experimentos de PCR.

3.12. Southern blotting

As amostras foram preparadas misturando-se 5 μ l do produto amplificado de PCR, 5 μ l de água e 4 μ l de tampão corrida. Após a separação em gel de agarose 2% com brometo de etídio, o DNA foi fragmentado através de exposição à luz ultra-violeta (60 mJ/cm²). Depois disso, o gel foi lavado na solução de desnaturação (1.5 M NaCl e 1.0 M NaOH) por 45 minutos, e solução de neutralização (0.5 M Tris e 1.5 M NaCl), duas vezes, por 30 minutos sob agitação constante. A transferência para membrana de Nylon Hybond-N⁺ (Amersham Pharmacia Biotech) foi feita com aproximadamente 300 ml de

tampão SSC 10x (0.3 M de Citrato de Sódio e 3.0 M NaCl, pH 7,0), por 10-20 horas (Southern, 1975).

As membranas foram lavadas em solução SSC 2x. A reação de “cross-link” foi feita através de exposição à luz ultravioleta (120 mJ/cm²). Na reação de pré-hibridação, as membranas foram colocadas na solução de hibridação (SDS 0,5%, DENHARDT'S 50x, SSC 6X, 200 µl/ml de DNA de salmão e água deionizada) em tubos e mantidas em rotação constante a 60°C. A marcação das sondas Primer 14 (PIF) e Primer 15 (PIF-SV)), foi feita com fósforo radioativo através da incorporação de nucleotídeo [α -³²P]ATP, usando T4 Kinase Kit 200 U (10 U/ì l) (Invitrogen). O tampão de reação com volume final de 30 ì l foi preparado com os seguintes reagentes: 10 µl de tampão de reação 5x (Forward reaction buffer); 1 ì l de [α -³²P]ATP; 1 ì l de T4 kinase e 18 ì l de H₂O estéril. O volume total da reação foi dividido em dois tubos de 15 ì l cada. Os primers foram adicionados em volume de 10 ì l (1 pM). Os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos. Depois disso, 6 ì l de solução de parada (EDTA 250mM) foi adicionado. As sondas foram purificadas e expostas a temperatura de 95°C para desnaturação por 5 minutos. As sondas foram adicionadas as membranas depositadas em tubos de hibridação a uma temperatura de incubação à 60°C por uma noite.

A lavagem de membranas com a solução de lavagem (SSC 2x, SDS 0,1%) foi feita em temperatura ambiente por 10 minutos e duas vezes em temperatura de hibridação de 60°C por 10 minutos. Em seguida, as membranas foram expostas ao filme fotográfico (KODAK) à -80°C por períodos que variaram de 5 a 10 dias, para então ser revelados utilizando-se soluções reveladoras e fixadoras, conforme as especificações do fabricante (KODAK).

3.13. Real-time PCR

Nos ensaios de expressão semi-quantitativa das mensagens de PIF e de sua forma variante, PIF-SV, foi usada a técnica de PCR multiplex denominada “Taqman Technology” padronizada pela Applied Biosystem em equipamento ABI Prism 7700. Nesse ensaio, a primeira fita de cDNA (1-6 ml) era amplificada em 25 µl de reação contendo 12.5 µL TaqMan, 2x mistura de “master mix”, primers específicos para o gene desejado (900 nM cada) e probe (200 nM). No

ensaio controle foi usado o gene ribossomal 18S ou da proteína ribossomal S29. Os passos da reação foram os seguintes: 1) desnaturação a 95°C por 10 min, o qual ativa a enzima AmpliTaq Gold, 2) 45 ciclos à 95°C por 15 sec (desnaturação) e 60°C por 1 min (anelamento). Em seguida, a fluorescência em CT era lida no detector ABI PRISM 7700 Sequence Detector. As unidades de cintilação (CT) de expressão do genes foram calculadas dividindo as CTs do gene-alvo pela CTs de expressão do gene ribossomal 18S ou S29 obtidos para cada amostra. Os primers usados nos ensaios de Real-time PCR foram os seguintes:

Primer 17 (PIF)	forward	5' TTC ATG CTC CTC TTC CTG ACA 3'
Primer 18	reverse	5' TCC TTT TGA GCT GAT GCT 3'
MGB probe		5' TCT GTG CCT ATG ATC CAG A 3'
Primer 19 (PIF-SV)	forward	5' TGA ATC TAA CCT CCA TCC CTC TGA 3'
Primer 20	reverse	5' GTACTGAGTCAAGGA CGT CTT TAA CG 3'
MGB probe		5' TCT GTG AGC CGT CCA TG 3'

RESULTADOS

4.1 Amplificação do transcrito do gene PIF em vários tipos celulares derivados de tecido normal, tumores primários e metastáticos

Nos experimentos iniciais de RT-PCR foram usados para amplificar transcritos do gene PIF os primers de 1 à 14 (Ver lista em Material e Métodos) específicos para regiões de vários éxons do gene predito na sequência do cromossomo 12 (Homo sapiens 12q BAC RP11-850F7). Dentre as diversas condições testadas, grande reprodutibilidade e especificidade foram obtidas com os primers 13 e 14 cujos tamanhos dos amplicons são 173 bp, em ensaios com cDNA, e 931 bp, em ensaios com DNA genômico (figuras 1, 2).

O gel na figura 2 mostra os resultados de amplificação dos produtos de PIF com as linhagens tumorais de mama (MCF-7, ZR 7530, HS 5785), melanoma (SKMEL-25, A 2058) e leucemias (K 562, HL 60). Como controle positivo foi usado o plasmídio pAE contendo um inserto do gene completo de PIF.

Em seguida, foram feitos ensaios RT-PCR para confirmar a expressão da mensagem de PIF em amostras RNA derivadas de 20 linhagens de tumor de mama provenientes da ATCC, e de várias outros tecidos normais e linhagens tumorais. Como controle interno e de qualidade da síntese de cDNA foram feitas reações paralelas de amplificação do gene constitutivo GAPDH e do gene p53 (Figuras 3 e 4). Os resultados destes estudos estão resumidos na Tabela 1.

O gel da figura 4 mostra as amplificações do gene PIF em amostras de cDNA de várias linhagens tumorais e tecido normal (útero e mama). A amplificação do PIF foi observada apenas no tumor de cólon SW 480 e tecido de mama normal.

A expressão positiva de PIF foi detectada em 8 de 37 linhagens de tumores de várias origens. Entretanto, durante esta análise, notou-se que 7 de 20 linhagens de tumores da mama e em apenas um tumor de cólon (SW 480) eram positivas para a expressão de PIF. Não se detectou PIF em amostras de tumores de pulmão, cérebro, próstata, carcinoma da cérvix, carcinoma da faringe e estômago. Entre os tecidos normais, a expressão foi confirmada na mama, testículo e placenta.

4.2. Identificação de uma forma splicing variante do gene PIF (PIF-SV) expressa no tecido de mama normal.

Com o objetivo de investigar a presença de formas variantes de expressão do PIF foram feitos ensaios de amplificação das regiões 3' e 5' da mensagem usando a técnica de RACE-PCR. Estes estudos foram realizados com o cDNA sintetizado a partir de uma amostra de RNA mensageiros com calda Poli-A extraído de mama normal (Clontech, Inc). Neste ensaio, os produtos da primeira reação de PCR -5'-RACE e 3'-RACE foram submetidos à a segunda reação "Nested PCR". Os vários produtos obtidos na "Nested PCR" foram separados em gel de agarose à 1% (Figura 5), purificados e clonados em plasmídeo TOPO. Com o seqüenciamento dos insertos nas colônias transformantes verificamos diferenças de seqüências entre os clones 3'-RACE, sugerindo a existência de uma nova variante do gene PIF.

Em seguida, foram construídos 5 contigs das seqüências dos clones selecionados pelo programa Phred/Phrap. Esses contigs foram então comparados com a variante depositada no GenBank. O resultado desta análise mostrou a existência de uma nova variante do gene PIF contendo um novo éxon de 64 bp inserido entre os éxons 4 e 5 (Figura 6).

A partir destes dados foram desenhados três novos primers: Primer 14 (5'-ttaacgtcatggacggctcc-3') e Primer 15 (5'-gaccaacctctctccccacc-3') para amplificação de PIF e PIF-SV em combinação com Primer 12 nas varias linhagens tumorais, tumores primários e tecidos normais (Figuras 11 e 12). Um terceiro primer contendo na região 5' a seqüência de restrição para a enzima *EcoR1* (Primer 16 - 5'- ggaattctcatggacggctcacaga-3') foi também desenhado para ser utilizado em combinação com os primers 4 ou 6 nas reações de amplificação de PIF-SV sem (Δ N-PIF-SV) e com (PIF-SV) a seqüência sinalizadora do peptídeo sinal na porção N-terminal por RT-PCR, tornando possível assim a sua clonagem em um vetor de expressão. Os resultados destes estudos estão apresentados nas figuras 7, 8, 9 e 10. Após várias etapas de amplificação e reamplificação dos produtos gerados, obteve-se seis clones com o gene completo de PIF-SV com e sem a seqüência sinalizadora do peptídeo sinal da porção N-terminal (Figuras 9 e 10).

4.3 Amplificação do transcrito de PIF-SV em vários tipos celulares derivados de tecido normal e tumores primários e metastáticos

Os géis da figura 11 mostram os resultados de amplificação do transcritos de PIF e PIF-SV em amostras de cDNA de várias linhagens de tumores de mama, usando os primers 12 e 14, e 12 e 15, respectivamente. Notar que nesses ensaios os produtos de amplificação de PIF e PIF-SV são de tamanhos iguais, isto é, 146 bp. A figura 12 mostra os resultados da amplificação dos transcritos de PIF e PIF-SV em amostras de vários tipos de tumores e tecido normal (testículo, placenta). O resumo destes estudos é apresentado na tabela 2. Como pode ser visto, em 5 linhagens de tumores de mama foi encontrada a presença de ambas variantes de PIF (ZR 7530, SKBR 5, MDA-MB-175, -361, -415), enquanto nas linhagens SKBR 3, 7 e MDA-MB-453 só da variante PIF-SV. A forma variante de PIF (PIF-SV) foi também detectada nas linhagens tumorais de células HeLa (carcionoma da cérvix) e H 358 (carcinoma de pulmão). Em relação a expressão em tecido normal, o PIF-SV foi encontrado na placenta e mama normal, mas estava ausente no testículo, pulmão e útero.

Os resultados de RT-PCR da expressão de PIF e PIF-SV foram confirmados usando a técnica de Southern blotting (Figura 13). Nestes ensaios também foi verificada a expressão concomitante das duas formas de PIF nas linhagens de tumores da mama MDA-MB-175, -361, -415, SKBR 5 e ZR 7530 e mama normal (Figura 13).

Em seguida, foram feitos ensaios de Real-time-PCR de expressão quantitativa da mensagem de PIF em algumas amostras de linhagens de mama e tecido normal da mama, em colaboração com o Dr Edouard Vannier da New England Medical Center, Boston, USA. Este estudo revelou que a linhagem com maior quantidade de expressão de PIF é a MDA-MB-361. Nestas células em particular detectou-se uma expressão de 65 unidades relativa de expressão, um valor superior a 30 vezes a quantidade de mensagem detectada nas amostras de mama normal e em outras linhagens (Figura 14).

Em um estudo complementar, realizado em colaboração com a Dra Kornelia Polyak da Dana-Farber Câncer Institute, Boston, USA, a expressão de PIF e PIF-SV foi detectada pela técnica de RT-PCR em uma coleção de 36 amostras de tumores primários da mama e 37 amostras de linhagens tumorais

de mama (Figura 15). Os resultados mostram que 22 das 36 amostras analisadas eram positivas para o transcrito de PIF, e que 16 das 22 amostras positivas, expressavam PIF e PIF-SV. Portanto, aproximadamente 60% dos tumores primários possuem expressão ativa do gene PIF. Por outro lado, os estudos revelaram que entre as 37 linhagens de mama, que incluem várias linhagens de tumores metastáticos, 14 expressavam mensagens de PIF. A presença concomitante de ambas as mensagens (PIF e PIF-SV) foi detectada em 8 das 14 amostras positivas. Neste estudo também foi confirmada a expressão em pequena quantidade das mensagens de PIF e PIF-SV em amostras de mama normal (Figura 15).

FIGURAS E LEGENDAS

A

EST, clone DKFZp313H1523, 5'end
 SEQUENCE INFORMATION
 GenBank entry:
 dbEST entry: AL598959.1
 Sequence length: 497 bases
 Clone: DKFZp313H1523
 Library: 313 (synonym: hlcc2)
 dbEST 9691
 FEATURES prot_sim (+) 65 ... 394 Homo sapiens
 dermcidin precursor; AIDD protein; dermcidin [Homo sapiens]
 (100% identity in aligned region, p=3e-57)
 See protein sequence ref:NP_444513.1
 Also See: ProtEST
 SEQUENCE DATA

```
>gi|15161650|emb|AL598959.1| DKFZp313H1523_r1 313 (synonym:
hlcc2) Homo sapiens cDNA clone DKFZp313H1523 5', mRNA sequence
GACACCCTAGTATCCCAAGTATCTCCAAGGATTTGGTGGCATACCCACTCCAGCACACAGAAG
CATGAGGTTTCATGACTCTCCTCTTCCTGACAGCTCTGGCAGGAGCCCTGGTCTGTGCCTATGA
TCCAGAGGCCGCTCTGCCCCAGGATCGGGGAACCCCTTGCCATGAAGCATCAGCAGCTCAAAA
GGAAAATGCAGGTGAAGACCCAGGGTTAGCCAGACAGGCACCAAAGCCAAGGAAGCAGAGATC
CAGCCTTCTGAAAAAGGCCTAGACGGAGCAAAAAAAGCTGTGGGGGGACTCGGAAAACCTAGG
AAAAGATGCAGTCGAAGATCTAGAAAGCGTGGGTAAAGGAGCCGTCCATGACGTTAAAGACGT
CCTTGACTCAGTACTATAGCTGTAAGGAGAAGCTGAGAAATGATACCCAGGAGCAGCAGGCTT
TACGTCTTCAGCCTAAAACCTAAAAAATTTTAAACAGCT
```

B

Figura 1. (A) Seqüência da EST correspondente ao mRNA do gene Dermcidin/PIF depositada no banco de dados do NCBI, código de acesso AL598959.1 e inserida no plasmídeo DKFZp313H1523 utilizado nesse estudo. Na figura estão indicados os locais de anelamento dos primers 12 (forward) e 13 (reverse) usados para amplificação da mRNA do PIF. **(B)** Esquema de posicionamento dos primers 12 e 13 com os quais são amplificados os éxons 3, 4 e 5 da mensagem do PIF. Os produtos esperados são de 931 bp e 173 bp após amplificação do DNA genômico e cDNA da mensagem, respectivamente.

Figura 2. Análise por RT-PCR da amplificação de mRNA do PIF nas linhagens de melanoma SKMEL-25 e A 2058, leucemias K 562 e HL 60, plasmídeo DKFZp313H1523 (clone controle) e DNA genômico. 1 μ g de RNA extraído pelo método do TRIzol foi usado para a síntese de cDNA pela enzima transcriptase reversa, e 2 μ l do cDNA foi amplificado na reação de PCR com os primers 12 e 13. MW, padrão de marcador de peso molecular DNA Ladder de 100 bp.

Figura 3. Análise por RT-PCR da amplificação de mRNA do p53 (2-9) e PIF (10-15) em linhagens de tumor de mama. 1 μ g de RNA extraído pelo método do TRIzol foi usado para a síntese de cDNA pela enzima transcriptase reversa, e 2 μ l do cDNA foi amplificado na reação de PCR com os primers 12 e 13. MW, padrão de marcador de peso molecular DNA Ladder de 100 bp.

Figura 4. Análise por RT-PCR da amplificação de mRNA de PIF no tecido normal de útero e mama, linhagens SW 480 (tumor de cólon), HeLa (tumor da cérvix), FaDu (carcionoma da faringe). 1 μ g de RNA extraído pelo método do TRIzol foi usado para a síntese de cDNA pela enzima transcriptase reversa, e 2 μ l do cDNA foi amplificado na reação de PCR com os primers 12 e 13. MW, padrão de marcador de peso molecular DNA Ladder de 100 bp.

Tabela 1. Expressão do gene PIF em tecido normal, tumores primários e metastáticos*

Nº.	Nome	Origem	Expressão PIF
Tumores Malignos			
1	ZR 7530	mama, ascite	-
2	734 B	mama, metástases em pleura	-
3	BT 20	mama	-
4	ZR 751	mama, ascite	-
5	GI 101	mama	+
6	SKBR 5	mama, metástases em pleura	+
7	CAMA 1	mama, metástases em pleura	-
8	SKBR 7	mama, metástases em pleura	-
9	MDA-MB-175	mama, metástases em pleura	+
10	MDA-MB-435	mama, metástases em pleura	+
11	MDA-MB-361	mama, metástases em cérebro	+
12	PMC 42	mama, metástases em pleura	-
13	MCF-7	mama, metástases em pleura	-
14	MDA-MB-415	mama, metástases em pleura	+
15	CAL 51	mama, metástases em pleura	-
16	MDA-MB-468	mama, metástases em pleura	-
17	DU 4475	mama, metástases em pele	-
18	SKBR 3	mama, metástases em pleura	-
19	MDA-MB-453	mama, metástases em pleura	-
20	MDA-MB-134	mama, metástases em pleura	+
21	H 1155	pulmão	-
22	H 358	pulmão	-
23	A 172	cérebro	-
24	T98G	cérebro	-
25	DU 145	próstata	-
26	PC 3	próstata	-
27	SW 480	cólon	+
28	OSTEOSARCOMA	tumor primário	-
29	HeLa	carcinoma da cérvix	-
30	FaDu	carcinoma da faringe	-
31	ESTÔMAGO	tumor primário	-
32	SKMEL-25	melanoma	-
33	SKMEL-23	melanoma	-
34	SKMEL-28	melanoma	-
35	A 2058	melanoma	-
36	K 562	leucemia	-
37	HL 60	leucemia	-
Tecido Normal			
1	PULMÃO		-
2	TESTÍCULO		+
3	ÚTERO		-
4	PLACENTA		+
5	MAMA		+

*Os resultados foram obtidos pelo método de RT-PCR, como descrito em materiais e métodos.

Figura 5. Análise por “Nested RACE-PCR” das porções 5’ e 3’ do mRNA de PIF. 2.5µl de cDNA poli-A de mama normal, fornecido pela Clontech, Inc, foi usado para a reação de RACE-PCR das porções 5’ e 3’ de mRNA de PIF. Em seguida, 2.5µl do produto de PCR foi usado na reação de Nested RACE-PCR. MW, padrão de marcador de peso molecular DNA Ladder de 100 bp.

AF144011 Homo sapiens dermcidin precursor, mRNA, complete cds

```

atgaggttcatgactctcctcttctgacagctctggcaggagccctgggtctgtgcctat
M R F M T L L F L T A L A G A L V C A Y
gatccagaggccgcctctgccccaggatcggggaacccttgccatgaagcatcagcagct
D P E A A S A P G S G N P C
caaaaggaaaatgcaggtgaagacccagggttagccagacaggcaccaaagccaaggaag
Q K E N A G E D P G L A R Q A P K P R K
cagagatccagccttctggaaaaaggcctagacggagcaaaaaaagctgtgggggggactc
Q R S S L L E K G L D G A K K A V G G L
ggaaaactaggaagatgcagtcgaagatctagaaagcgtgggttaaaggagccgtccat
G K L G K D A V E D L E S V G K G A V H
gacgttaaagacgtccttgactcagtactatagctgtaaggagaagctgagaaatgatac
D V K D V L D S V L - L - G E A E K - Y
ccaggagcagcaggcctttacgtcttcagcctaaaacct
P G A A G F T S S A - N

```

Homo sapiens dermcidin precursor, mRNA, complete cds, with a new exon

```

atgaggttcatgactctcctcttctgacagctctggcaggagccctgggtctgtgcctat
M R F M T L L F L T A L A G A L V C A Y
gatccagaggccgcctctgccccaggatcggggaacccttgccatgaagcatcagcagct
D P E A A S A P G S G N P C H E A S A A
caaaaggaaaatgcaggtgaagacccagggttagccagacaggcaccaaagccaaggaag
Q K E N A G E D P G L A R Q A P K P R K
cagagatccagccttctggaaaaaggcctagacggagcaaaaaaagctgtgggggggactc
Q R S S L L E K G L D G A K K A V G G L
ggaaaactaggaagatgcagtcgaagatctagaaagcgtgggttaaagggtgggaagag
G K L G K D A V E D L E S V G K G G E E
aggttggtctttggggatcctgtgaatctaacctccatccctctgacttctgtgagccgt
R L V F G D P V N L T S I P L T S V S R
ccatgacgttaaagacgtccttgactcagtactatagctgtaaggagaagctgagaaatg
P - R - R R P - L S T I A V R R S - E M
ataccagagcagcaggcctttacgtcttcagcctaaaacct
I P R S S R L Y V F S L K P

```

Figura 6. Sequências de nucleotídeos e aminoácidos codificadores da mensagem e proteína do PIF (A) e sua forma variante, PIF-SV (B) identificados no tecido de mama normal. O novo éxon de 64 bp de PIF-SV está indicado em cor rosa. As seqüências de parada TGA e TAG estão indicadas em vermelho.

Figura 7. Análise da amplificação de PIF-SV com (PIF-SV) e sem (Δ N-PIF-SV) a sequência sinalizadora do peptídeo sinal na porção N-terminal por RT-PCR. 1 μ g de RNA obtido do tecido de mama normal (Clontech) foi usado para a síntese de cDNA pela enzima transcriptase reversa, e 2 μ l deste cDNA foi usado na reação de PCR com os primers 4 e 16, e primers 6 e 16. Em seguida, o cDNA foi amplificado com os primers 12 e 15, cujo o produto é de 146bp. MW, marcador de peso molecular DNA Ladder de 100 bp.

Figura 8. Reamplificação de PIF-SV com (PIF-SV) e sem (Δ N-PIF-SV) a sequência sinalizadora do peptídeo sinal na porção N-terminal por RT-PCR. 1 μ l do produto amplificado do primeiro PCR foi submetido a reação PCR usando os primers 4 e 16, e 6 e 16. MW, marcador de peso molecular DNA Ladder de 100 bp.

Figura 9. Análise da inserção de Δ N-PIF-SV clonado em vetor TOPO após a reamplificação dos produtos da primeira reação. O produto obtido por reamplificação com os primers 4 e primer 16, foi purificado do gel de agarose e utilizado para reação de clonagem. O clone 9 não contém produto clonado. MW, marcador de peso molecular DNA Ladder de 100 bp.

Figura 10. Análise da inserção de PIF-SV clonado em vetor TOPO. O produto obtido por reamplificação com os primers 6 e primer 16, foi purificado do gel de agarose e utilizado para reação de clonagem. O clone 1 não contém produto clonado. MW, marcador de peso molecular DNA Ladder de 100 bp.

Figura 11. Análise por RT-PCR da amplificação de mRNA de PIF (A, B) e PIF-SV (C) em tecido da mama normal e linhagens de tumores da mama. 1 μ g de RNA extraído pelo método do TRIzol foi usado na síntese de cDNA pela transcriptase reversa, e 2 μ l do produto de cDNA foi amplificado na reação de PCR com os primers 12 e 14 (A, B) e 12 e 15 (C). Em ambos os ensaios, o produto esperado corresponde a 146 bp. Padrão de marcador de peso molecular DNA Ladder de 100 bp (MW).

Figura 12. Análise por RT-PCR da amplificação de mRNA do PIF (**A**) e PIF-SV (**B**) em tecidos normais e linhagens de tumores primários e metastáticos. 1 µg de RNA extraído pelo método do TRIzol foi usado a síntese de cDNA pela transcriptase reversa, e 2 µl do produto de cDNA foi amplificado na reação de PCR com os primers 12 e 14 (A) e 12 e 15 (B). Em ambos os ensaios, o produto esperado corresponde a 146 bp. MW, Padrão de marcador de peso molecular DNA Ladder de 100 bp.

Tabela 2. Expressão do PIF e PIF-SV em tecido normal, tumores primários e metastáticos*

Nº.	Nome	Origem	Expressão	
			PIF	PIF-SV
Tumores Malignos				
1	ZR 7530	mama, ascite	+	+
2	734 B	mama, metástases em pleura	-	-
3	BT 20	mama	-	-
4	ZR 751	mama, ascite	-	-
5	GI 101	mama	-	-
6	SKBR 5	mama, metástases em pleura	+	+
7	CAMA 1	mama, metástases em pleura	-	-
8	SKBR 7	mama, metástases em pleura	-	+
9	MDA-MB-175	mama, metástases em pleura	+	+
10	MDA-MB-435	mama, metástases em pleura	+	-
11	MDA-MB-361	mama, metástases em cérebro	+	+
12	PMC 42	mama, metástases em pleura	-	-
13	MCF-7	mama, metástases em pleura	-	-
14	MDA-MB-415	mama, metástases em pleura	+	+
15	CAL 51	mama, metástases em pleura	-	-
16	MDA-MB-468	mama, metástases em pleura	-	-
17	DU 4475	mama, metástases em pele	-	-
18	SKBR 3	mama, metástases em pleura	-	+
19	MDA-MB-453	mama, metástases em pleura	-	+
20	MDA-MB-134	mama, metástases em pleura	+	-
21	H 1155	pulmão	-	-
22	H 358	pulmão	-	+
23	A 172	cérebro	-	-
24	T98G	cérebro	-	-
25	DU 145	próstata	-	-
26	PC 3	próstata	-	-
27	SW 480	cólon	+	-
28	OSTEOSARCOMA	tumor primário	-	-
29	HeLa	carcinoma da cérvix	-	+
30	FaDu	carcinoma de faringe	-	-
31	ESTÔMAGO	tumor primário	-	-
32	SKMEL-25	melanoma	-	-
33	SKMEL-23	melanoma	-	-
34	SKMEL-28	melanoma	-	-
35	A 2058	melanoma	-	-
36	K 562	leucemia	-	-
37	HL 60	leucemia	-	-
Tecido Normal				
1	PULMÃO		-	-
2	TESTÍCULO		+	-
3	ÚTERO		-	-
4	PLACENTA		-	+
5	MAMA		+	+

*Os resultados foram obtidos pelo método de RT-PCR, como descrito em materiais e métodos.

Figura 13. Análise por “SOUTHERN BLOTTING” da expressão de PIF e PIF-SV em tecidos normais, linhagens de células, tumorais primários e metastáticos. 2 μ l de cDNA obtido na síntese com 1 μ g de RNA extraído das diferentes células de linhagens tumorais e tecidos, foram usados na reação de PCR com os primers 12 e 14 (A), 12 e 15 (B) e 12 e 13 (C). 5 μ l dos produtos amplificados foram separados em gel de agarose, e após isto, transferidos para a membrana de nylon. A hibridação foi feita usando as sondas preparadas com o primer 14 específico para o gene PIF (A, C) e primer 15 específico para PIF-SV (B).

Linhagens de tumores da mama

Figura 14. Análise por real time-PCR da amplificação de mRNA do PIF em tecido normal da mama e linhagens de tumores primários e metastáticos da mama. 1 µg de RNA extraído pelo método do TRIzol foi usado síntese de cDNA pela enzima transcriptase reversa, e 2 µl do produto da síntese foi usado na reação de amplificação com os primers 17 e 18. A leitura do reações de real-time PCR foi feita em equipamento ABI Prism 7700. As unidades relativas de expressão da mRNA para o PIF em cada linhagem celular foi obtida dividindo as CT (cintilações) de mensagem de PIF pela CT das mensagens de subunidade 18S do rRNA.

A

B

Figura 15. Análise por RT-PCR da amplificação de mRNA do PIF e PIF-SV em tumores primários de mama (A) e tecido mamário normal e em linhagens de tumores primários e metastáticos da mama. 1 μ g de RNA extraído pelo método do TRIzol foi usado síntese de cDNA pela enzima transcriptase reversa, e 2 μ l do produto da síntese foi usado na reação de amplificação com primers específicos para ambas variantes. As características histopatológicas dos carcinomas de mama primários e de linhagens tumorais foram descritas em detalhes em Porter et al. 2003.

DISCUSSÃO

6.1 Expressão do RNA mensageiro de PIF em vários tipos celulares derivados de tecido normal e tumores primários e metastáticos

O primeiro candidato a mRNA codificador de uma cadeia de 17 aminoácidos (Tyr-Asp-Pro-Glu-Ala-Ala-Ser-Pro-Gly-Asp-Pro-Ser-His-Glu-Ala-(Ser)-(Ala) da subunidade de 4 kDa da glicoproteína PIF de camundongo descrita por TODOROV e colaboradores (Todorov *et al.*, 1996b) foi identificado em uma biblioteca de carcinoma da mama e denominado “Human cachexia-associated protein” (HCAP). A sequência de 523 bp foi depositada no Genbank (número de acesso AR 053250) e registrada na patente US 5834192 (Akerblom & Murry, 1998).

Na nossa pesquisa inicial de genes candidatos a codificadores dessa sequência de 20 aminoácidos do PIF, usando o programa “GenomeScan” identificamos dentro de uma sequência BAC do cromossomo 12 humano (Homo sapiens 12q BAC RP11-850F7), um gene predito para uma mensagem de 1250 bp (lcl/Hs12_9720_22_5_43). A análise das possíveis regiões de processamento do mRNA do gene predito mostrou que o gene completo teria 9 éxons e codificaria uma proteína de 400 aminoácidos. Posteriormente, encontramos no banco de dados de ESTs uma EST de 497 bp (código de acesso AL598959), identificada em uma biblioteca de cDNA extraída da pele, medula óssea e tecido adiposo de feto, contendo o gene dessa sequência de aminoácidos. O clone DKFZp313H1523 contendo o gene foi adquirido para os estudos de clonagem e expressão da proteína PIF no nosso laboratório.

Durante o desenvolvimento desse estudo, uma mensagem homóloga a HCAP foi encontrada em uma outra biblioteca de cDNA construída com as mensagens expressas na pele, dendrócitos dermais e células de nevus benigno (Hipfel *et al.*, 2000) e denominado inicialmente AIDD (número de acesso AAL18349) e depois Dermcidin/DCD (Schitteck *et al.*, 2001). Nos estudos desses pesquisadores foi evidenciado que um peptídeo gerado da porção C-terminal da proteína, com aproximadamente 4,7 kDa, produzido em grandes quantidades na secreção (suor) de células sudoríparas, era capaz de inibir o crescimento de bactérias, e portanto, exercer uma função antibiótica na pele (Schitteck *et al.*, 2001).

Em um estudo de identificação de fatores peptídicos liberados pela linhagem de células humana de neuroblastoma SY5Y durante o estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 (Cunnigham *et al.*, 1998, 2000), foi identificado um peptídeo de 30 aminoácidos, denominado “survival peptide” ou Y-P30, com similaridade de seqüência de 18 de 20 aminoácidos da região N-terminal do PIF produzido pelo tumor MAC-16 descrita por TODOROV e colaboradores (Todorov *et al.*, 1996b). Em um estudo recente, o gene codificador do Y-P30 foi identificado no banco de dados da Incyte Genomics Inc. Palo Alto, CA, USA, e portadora da patente: US 5834192, e denominado DSEP (Diffusible survival evasion peptide) (Cunningham *et al.*, 2002).

Em um estudo comparativo pelo programa BLAST (Blast two sequence) concluímos que as seqüências de nucleotídeos das mensagens de HCAP, inserto do clone DKFZp313H1523, dermcidin/AIDD e DSEP são idênticas, tratando-se, portanto, do mesmo gene. No banco de dados do NCBI, o gene está mapeado na porção 12q13.1 do cromossomo 12 e marcadores D12S1896 e D12s1632 (código de acesso AF144011). Durante o processamento do transcrito gênico são gerados 5 éxons, e a região de leitura aberta (open reading frame) codifica uma proteína de aproximadamente 110 aminoácidos.

Usando as informações do gene predito na seqüência 12q BAC RP11-850F7 foram desenhados e sintetizados vários primers (Primer 1-11) “forward” e “reverse” para explorar a expressão do gene PIF em três linhagens tumorais de mama: MCF-7, ZR 7530 e Hs 578T pela técnica de RT-PCR. Nesses ensaios preliminares usando as combinações de primers: 5 - 7, e 4 -11, não foi visto nenhuma amplificação de transcritos. Em seguida, utilizando dois novos pares de primers (12 e 13) foi verificada a presença de um amplicon de tamanho de 173 bp de um fragmento de mRNA do PIF e um amplicon de 931 bp de um fragmento do gene no DNA genômico (Figuras 1, 2). O cDNA de alguns tecidos normais e de várias linhagens tumorais de origem primária e metastática foram examinados nos ensaios de RT-PCR usando este par de primers (Figuras 2, 3, 4, Tabela 1). Em relação ao câncer de mama, foi verificado que 7 (35%) de 20 linhagens eram positivas para a expressão de PIF. Outro fato interessante revelado nesse estudo foi uma alta incidência de PIF entre os tumores de mama de origem em metástases, particularmente, a metástase de pleura (Tabela 1). Esses dados estão de acordo com um estudo

SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) que identificou que a sequência tag “ACGTTAAAGA”, era significativamente expressa em carcinomas da mama. Mais tarde essa sequência foi identificada como sendo da mensagem que codifica a proteína Dermcidin/IBC-1 (Porter *et al.*, 2003). A super expressão de DCD/IBC-1 em uma linhagem de células de mama, denominada 21NT, aumentou o crescimento e a sobrevivência das células e reduziu dependência do soro (Porter *et al.*, 2003). O mesmo grupo determinou que a super expressão do DCD/IBC-1 em tumores de mama ocorre devido a um aumento no número de cópias do gene por um processo de amplificação do locus 12q13.1, onde o gene está inserido. Mais importante, os autores não observaram aumento na expressão de outros oncogenes (MDM2, CDK4, SAS) inseridos no mesmo locus genético. Em resumo, todas as evidências sugerem um possível papel de PIF na oncogênese do câncer de mama.

Entre as linhagens tumorais, a expressão PIF foi detectada apenas na linhagem tumoral de cólon SW 480. A expressão de PIF é comumente detectada em carcinomas gastrintestinais (Cariuk *et al.*, 1997). Neste trabalho a expressão do PIF foi encontrada nas 6 de 16 amostras. Todos os 6 pacientes, cujo tecido e a urina eram positivos para o PIF, a perda de peso variou entre 8% a 39% (média 18%), enquanto os 8 pacientes cujo tecido e a urina eram negativos, a perda de peso variou entre 1% a 7% (média 5%). Esses dados confirmam o envolvimento de PIF na caquexia neoplásica.

Entre os tecidos normais, a expressão do PIF foi encontrada na mama, placenta e testículo. Na literatura, é descrita a expressão de PIF pelas glândulas sudoríparas (Schitteck *et al.*, 2001; Sagawa *et al.*, 2003) e por neurônios no SNC (Cunningham *et al.*, 2000, Porter *et al.*, 2003). A produção de PIF na pele poderia ter uma função antibiótica envolvida na resposta imunológica inata dos seres humanos. Já a produção de PIF no cérebro, em especial no córtex cerebral, parece estar envolvida na proteção neuronal contra o estresse oxidativo (Cunningham *et al.*, 2002). De fato, nossos estudos mostram que administração de PIF em ratos reduz a ação tóxica do ácido caínico (Daniele Persike, tese de doutorado).

Ainda não se sabe qual seria a função do PIF em tecido normal de mama, testículo e placenta. A placenta e o testículo são tecidos germinativos capazes de expressar uma grande variedade de genes e hormônios

polipeptídicos envolvidos na proliferação e diferenciação celular. Portanto, não é surpreendente que esses tecidos expressem PIF. Por outro lado, a presença de PIF poderia estar associada ao processo de diferenciação durante embriogênese. De fato, nos estudos em camundongos, verificou-se que PIF está expresso durante o período embrionário E8-E9, com o pico em E8.5 (Watchorn *et al.*, 2001). Este é o estágio crucial na modelação e desenvolvimento do músculo esquelético em camundongo e está associado com expressão da miogenina.

A transformação do epitélio normal de mama ao fenótipo maligno depende de uma série de eventos morfológicos e genéticos que se iniciam com o aparecimento de uma doença hiperproliferativa benigna de mama, e depois ao carcinoma *in situ*, e finalmente, o tumor completamente maligno, invasivo e com potencial metastático. Todos estes estágios da doença – hiperplasia epitelial difusa com ou sem atipia, papiloma e fibroadenoma – estão intimamente associados e são fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama (Dietrich *et al.*, 1995). Essas alterações morfológicas estão ligadas a deleções e mutações em cromossomos específicos.

Alterações estruturais envolvendo cromossomo 12, em particular, no locus onde o gene PIF foi mapeado, são descritas com a frequência relativamente alta em fibroadenomas e outras doenças de mama. Translocações envolvendo o braço 12p12 foram observadas em fibroadenomas. Em tumor filóide de mama, a região 12p12 é freqüentemente deletada, enquanto a região 12p13 translocada. O oncogene K-RAS está localizado no braço 12p12 e está freqüentemente alterado em carcinomas de mama (Cavalli *et al.*, 2001). Alterações envolvendo a região 12q12-15 (posição dos oncogenes INT1 e GLI) foram descritas em subgrupos de adenomas pleomórficos de glândulas salivárias, leiomiomas uterinas e lipomas, e também, em lesões benignas epiteliais, incluindo fibroadenomas e hamartomas. Esta região do cromossomo 12, designada como MAR (Multiple Aberration Region), é o principal sítio (cluster) de quebras do cromossomo 12, observado na maioria dos tumores benignos (Cavalli *et al.*, 2001; Rohen *et al.*, 1995).

Além disso, foi identificado por técnicas citogenéticas convencionais que o ganho do cromossomo 12, que leva a sua trisomia, é um processo recorrente e muitas vezes inicial da carcinogênese da mama. Nestes carcinomas, a

duplicação do segmento 12q é mais freqüente que a 12p (Adeyinka *et al.*, 1997). A trisomia do cromossomo 12 foi também descrita em outros tumores. Ela é aberração cromossômica numérica mais freqüente entre as leucemias linfóides crônicas (CLL) e, em menor freqüência, nos tumores do trato genital feminino como tumores de ovário, útero e adenocarcinomas endometriais (Mark *et al.*, 1999). Portanto, as similaridades de algumas alterações cromossômicas observadas nos carcinomas e doenças hiperproliferativas benignas de mama deveriam ser consideradas como fatores de risco da progressão fatal das doenças da mama (Cavalli *et al.*, 2001). Mais uma vez a importância do gene PIF emerge. Como a região MAR é a mais importante na transição das doenças benignas para as malignas, será que a expressão do PIF seria um elemento chave para a conversão de doenças benignas de mama em doenças malignas?

Os nossos dados mostram a presença de PIF nas metástases dos tumores de mama. Os dados apresentados por PORTER e colaboradores (Porter *et al.*, 2003) mostram que o PIF está expresso em tumores invasivos de mama em estágio 2 e 3 com comprometimento em linfonódulos. De fato, em um estudo foi verificado que PIF (glicoproteína purificada) induz a expressão de das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM, e a liberação de syndecan, em células endoteliais (Watchorn *et al.*, 2002). Syndecan é uma proteoglicana que quando ausente provoca a proliferação descontrolada e redução na adesão de células tumorais.

Enquanto os dados apresentados nesse trabalho sugerem que PIF tem um papel em algum evento da tumoregênese dos tumores de mama, outros estudos envolvem o PIF na indução da caquexia neoplásica (Tisdale, 2003, Garay *et al.*, 2003). Quantidades significantes da glicoproteína PIF de 24 kDa foi detectada na urina de pacientes com vários tipos de cânceres, incluindo carcinoma de pâncreas, mama, ovário, pulmão, próstata, cólon e reto (Tisdale, 2003, Wang *et al.*, 2003). A via de ação do PIF na indução da caquexia esta sendo aos poucos desvendada. A suplementação nutricional com EPA de pacientes e camundongos portadores de tumores que induzem a caquexia previne a perda de peso (Hussey & Tisdale, 1999). Os estudos mostraram também que EPA parece bloquear a ativação de fosfolipase A2, a liberação do ácido araquidônico e a sua conversão em ácido 15-hidroxi-eicosatetraenóico

(15-HETE), um possível fator ativador do sistema ubiquitina-proteasoma nas células musculares (Smith *et al.*, 1999). Os medicamentos que inibem o proteasoma surgem como os novos agentes com ação potencial no tratamento de tumores e da caquexia (Tan & Waldmann, 2002). Entretanto, como o proteasoma é essencial em muitas atividades celulares, e o risco de toxicidade para tecidos normais é bem maior. Desta forma, antagonistas do PIF, em especial do receptor de PIF, poderiam ser mais promissores como agentes inibidores da degradação músculo-proteica e da caquexia.

6.2 Identificação de uma nova splicing variante da mensagem do gene PIF em células normais e tumorais

Com objetivo de definir as mensagens preditas nas regiões 3' e 5' do gene PIF em amostra de tecido normal de mama foram construídos clones com diferentes seqüências 3' e 5' gerados pela reação de RACE-PCR. Os cinco contigs foram formados pelo programa Phred/Phrap. Os resultados mostraram a existência de uma nova forma de expressão de PIF com um novo éxon de 64 bp na porção 3' do gene. Esse variante chamado de PIF-SV foi identificado primeiramente em uma amostra de RNA do tecido normal de mama. Em seguida, a presença de PIF e PIF-SV foi detectada em várias linhagens tumorais de mama e tecidos normais (Tabela 2). Em relação às outras linhagens tumorais, a expressão de PIF foi positiva apenas no tumor de cólon SW 480 e, curiosamente, a expressão de PIF-SV foi detectada em algumas linhagens tumorais de pulmão e de útero. Em relação aos tecidos normais, a forma de PIF-SV foi detectada no tecido normal de placenta e mama (Tabela 2).

Para mostrar a especificidade do transcrito amplificado, foram realizados ensaios de “Southern blotting” (Figura 13). A primeira forma de PIF foi detectada em todos ensaios, enquanto a forma de PIF-SV não foi consistentemente observada. Este fato pode ser atribuído a baixa expressão da nova forma PIF.

Para avaliar quantitativamente o nível de expressão das duas variantes entre as linhagens de tumores de mama e tecido normal de mama foram feitos ensaios de Real-time PCR, em colaboração com Dr Edouard Vannier da New England Medical Center, Boston, MA, USA. Estes estudos confirmaram que a

linhagem de células da mama MDA-MB-361 é que apresenta o maior nível de expressão de PIF entre as 6 amostras de células investigadas (Figura 14). Estes estudos foram ampliados através de ensaios de RT-PCR, usando um painel de 73 amostras de tumores da mama. Os ensaios foram realizados em colaboração com a Dra Kornelia Polyak da Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA. Os resultados apresentados na Figura 15 mostram que a expressão positiva de PIF foi encontrada em 22 das 36 amostras de tumores primários da mama. Nos 22 casos positivos para o transcrito de PIF, 16 casos (72%) também expressavam a forma PIF-SV. Por outro lado, os estudos também revelaram uma acentuada expressão de PIF em 14 (40%) das 35 linhagens estabelecidas de tumores da mama avaliadas. A presença concomitante de ambas mensagens, PIF e PIF-SV, foi detectada em 8 (57%) das 14 amostras positivas. Neste estudo também foi confirmada a expressão em pequena quantidade das mensagens de PIF e PIF-SV em amostras de mama normal (Figura 15).

A nova variante do gene PIF ainda não foi descrita em nenhum artigo de literatura até o momento. Por que ela é expressa concomitante com a principal forma de expressão do gene ainda não é sabido. Será que seriam os erros no spliceosoma da mensagem de PIF que levariam ao seu aparecimento? Se expressa, qual seria a função dessa proteína? Todas estas perguntas precisam ser respondidas para melhor compreensão do papel desta proteína no câncer e caquexia.

A definição das diferentes funções de PIF e PIF-SV depende da identificação das vias de sinalização envolvidas na resposta biológica, e principalmente, do receptor de membrana da proteína. Estes estudos estão em desenvolvimento em nosso laboratório, na esperança que no futuro sejam revelados novos métodos de diagnóstico e terapia do câncer.

CONCLUSÕES

---

1. A expressão do transcrito do gene PIF foi detectada em 8 de 37 amostras de células derivadas de tumores primários, metastáticos e linhagens tumorais estabelecidas. Nas linhagens de tumores de mama, a expressão foi detectada em 7 das 20 linhagens testadas;
2. O transcrito do gene PIF está presente em células normais de mama, placenta e testículo;
3. Uma forma “splicing” variante do gene PIF, com um novo éxon de 64 bp, inserido entre os éxons 4 e 5, foi identificada em tecido normal de mama;
4. A variante PIF-SV foi detectada em uma linhagem tumoral de pulmão (H 358) e em uma linhagem carcinoma de cérvix (HeLa);
5. A presença concomitante de ambas mensagens (PIF e PIF-SV) foi encontrada em 5 linhagens tumorais de mama, e em células normais de placenta e mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEYINKA A.; PANDIS N.; BARDI G.; BONALDI L.; MERTENS F.; MITELMAN F.; HEIM S. A subgroup of breast carcinomas is cytogenetically characterized by trisomy 12. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 97, n. 2, p. 119-121, 1997.

AKERBLOM, I. E.; MURRY L. E. Human cachexia associated protein. Patent US 5,834,192, 10-Nov-1998.

AGRILÉS M. J., MOORE-CARRASCO R., BUSQUETS S., LÓPEZ-SORIANO J. F. Catabolic mediators as targets for cancer cachexia. **DDT**, v. 8, n. 18, p. 838-844, 2003.

BARACOS E.V. Regulation of skeletal-muscle-protein turnover in cancer-associated cachexia. **Nutrition**, v. 16, n. 10, p. 1015-1018, 2000.

BARBER M.D., ROSS J.A., FEARON K.C.H. Cancer cachexia. **Surgical Oncol**, v. 8, p. 133-141, 1999.

BECK A. S.; TISDALE M. J. Production of lipolytic and proteolytic factors by a murine tumor-producing cachexia in the host. **Cancer Res**, v. 47, p. 5919-5923, 1987.

BECK A. S.; SMITH K. L.; TISDALE M. J. Anticachectic and antitumor effect of eicosapentaenoic acid and its effect on protein turnover. **Cancer Res**, v. 51, p. 6089-6093, 1991.

BELIZÁRIO J. E.; KATZ M.; CHENCKER E.; RAW I. Bioactivity of skeletal muscle proteolysis-inducing factor in the plasma proteins from patients with weight loss. **Br J Cancer**, v. 64, p. 705-710, 1991.

BELIZÁRIO J. E.; LORITE M. J.; TISDALE M. J. Cleavage of caspases -1, -3, -6, -8 and -9 substrates by proteases in skeletal muscle from mice undergoing cancer cachexia. **Br J Cancer**, v. 84, n. 8, p. 1135-1140, 2001.

CABAL-MANZANO R.; BHARGAVA P.; TORRES-DUARTE A.; MARSHALL J.; WAINER I. W. Proteolysis-inducing factor is expressed in tumors of patients with gastrointestinal cancer and correlates with weight loss. **Br J Cancer**, v. 84, p. 1599-1601, 2001.

CARIUK P.; LORITE M. J.; TODOROV P. T.; FIELD W. N.; WIGMORE S. J.; TISDALE M. J. Induction of cachexia in mice by a product isolated from the urine of cancer cachectic patients. **Br J Cancer**, v. 76, p. 606-613, 1997.

De acordo com a ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e Documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2000.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of Journals in Index Medicus. 2001. Available from: www.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser/egi
www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html

CAVALLI L. R., CORNELIO D. A., WUICIK L., BRAS A. T., RIBEIRO E. M., LIMA R. S. et al. Clonal chromosomal alterations in fibroadenomas of the breast. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 131, n. 2, p. 120-124, 2001.

CIECHANOVER A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. **EMBO J**, v. 17, p. 7151-7160, 1998.

CUNNINGHAM T. J.; HODGE L.; SPEICHER D.; REIM D.; TYLER-POLSKY K.; LEVITT P. et al. Identification of a survival-promoting peptide in medium conditioned by oxidatively stressed cell lines of nervous system origin. **J Neurosci**, v. 18, n. 18, p. 7047-7060, 1998.

CUNNINGHAM T. J.; JING H.; WANG Y.; HODGE L. Calreticulin binding and other biological activities of survival peptide Y-P30 including effects of systemic treatment of rats. **Exp. Neurol**, v. 163, p. 457-468, 2000.

CUNNINGHAM T. J.; JING H.; AKERBLUM I.; MORGAN R.; FISHER T. S.; NEVEU M. Identification of the human cDNA for new survival evasion peptide (DSEP): studies *in vitro* and *in vivo* of overexpression by neural cells. **Exp Neurol**, v. 177, p. 32-39, 2002.

DIETRICH C. U.; PANDIS N.; TEIXEIRA M. R.; BARDI G.; GERDES A. M.; ANDERSON J. A. et al. Chromosome abnormalities in benign hyperproliferative disorders of epithelial and stromal breast tissue. **Int J Cancer**, v. 60, n. 1, p. 49-53, 1995.

EVAN G.I., VOUSDEN, K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v. 411, p.342-348, 2001.

FLAD T.; BOGUMIL R.; TOLSON J.; SCHITTEK B.; GARBE C.; DEEG M. et al. Detection of dermcidin-derived peptides in sweat by Protein Chip Technology. **J Immunol Methods**, v. 270, p. 53-62, 2002

GARAY M., MARKOVIC J., KASHIABARA J. A., ALVES J., LILA S., MOURA R., CAMARGO A.A., VANNIER E., BELIZARIO J. E. Human proteolysis-inducing factor (PIF/DCD): evidence for a cachectic factor. Em redação, 2003.

GLASS J. D. Molecular mechanism modulating muscle mass. **TRENDS in Molecular Medicine**, v. 9, n.8, p. 344-350, 2003.

GREENLEE R. T.; MURRAY T.; BOLDEN S.; WINGO P. A. Cancer statistics. **Ca Cancer J Clin**, v. 50, n. 1, p. 7-33, 2000.

HANAHAN D., WEINBERG R. A. The hallmarks of cancer. **Cell** v. 100, p. 57-70, 2000.

HIRAI K.; HUSSEY H. J.; BARBER M. D.; PRICE S. A.; TISDALE M. J. Biological evaluation of a lipid-mobilizing factor isolated from the urine of cancer patients. **Cancer Res**, v. 58, n. 11, p. 2359-2365, 1998.

HIPFEL, R., SCHITTEK, B., BODINGBAUER, Y., GARBE, C. Specifically regulated genes in malignant melanoma tissues identified by subtractive hybridization. **Br J Cancer**, v. 82(6): 1149-1157, 1999.

HUSSEY H. J.; TISDALE M. J. Effect of a cachectic factor on carbohydrate metabolism and attenuation by eicosapentaenoic acid. **Br J Cancer**, v. 80, p. 1231-1235, 1999.

HUSSEY H. J.; TODOROV P. T.; FIELD W. N.; INAGAKI N.; TANAKA Y.; ISHITSUKA H. et al. Effect of a fluorinated pyrimidine in cachexia and tumour growth in murine cachexia models: relationship with a proteolysis-inducing factor. **Br J Cancer**, v. 83, p. 56-62, 2000.

ISLAİM-ALI B.; KHAN S.; PRICE S. A.; TISDALE M. J. Modulation of adipocyte G-protein expression by a lipid-mobilizing factor (LMF). **Br J Cancer**, v. 85, n. 5, p. 758-763, 2001.

LECKER, S.H., SOLOMON, V., MITCH, W., GOLDEBERG, A.L. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **J Nutr**, v. 129, p. 227S-237S, 1999.

LORITE M. J.; CARIUK P.; TISDALE M. J. Induction of muscle protein degradation by a tumour factor. **Br J Cancer**, v. 76, n. 8, p. 1035-1040, 1997.

LORITE M. J.; THOMPSON M. G.; DRAKE J. L.; CARLING G.; TISDALE M. J. Mechanism of muscle protein degradation induced by a cancer cachectic factor. **Br J Cancer**, v. 78, p. 850-856, 1998.

LLOVERA M., GARCÍA-MARTÍNEZ C., AGELL N., LÓPEZ-SORIANO F., ARGULÉS M. J. TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 230, p. 238-241, 1997.

LORITE M. J.; SMITH H. J.; ARNOLD J. A.; MORRIS A.; THOMPSON M. G.; TISDALE M. J. Activation of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscle *in vivo* and murine myoblasts *in vitro* by a proteolysis-inducing factor (PIF). **Br J Cancer**, v. 85, n. 2, p. 297-302, 2001.

MARK H. F.; BROWN S.; TAYLOR W.; BASSILY N.; SUN C. L.; SAMY M. et al. Study of chromosome 12 copy number in breast cancer using fluorescence in situ hybridization. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 108, n. 1, p. 26-31, 1999.

MALUMBRES M., BARBACID, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nature**, v. 1, p. 222-231, 2001.

MCDEVIT T. M.; TODOROV P. T.; BECK S. A.; KHAN S. H.; TISDALE M. J. Purification and characterization of a lipid-mobilizing factor associated with cachexia-inducing tumors in mice and humans. **Cancer Res**, v. 55, p. 1458-1463, 1995.

PORTER D.; WEREMOWICZ S.; CHIN K.; SETH P.; KESHAVIAH A.; LAHTI-DOMENICI J. et al. A neural survival factor is a candidate oncogene in breast cancer. **PNAS**, v. 100, n. 19, p. 10931-10936, 2003.

ROHEN C.; CASELITZ J.; STERN C.; WANSCHURA S.; SCHOENMAKERS E. F.; VAN DE VEN W. J. et al. A hamartoma of the

breast with an aberration of 12q mapped to the MAR region by fluorescence in situ hybridization. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 84, n. 1, p. 82-84, 1995.

SAGAWA K.; KIMURA A.; SAITO Y.; INOUE H.; YASUDA S.; NOSAKA M. et al. Production and characterization of a monoclonal antibody for sweat-specific protein and its application for sweat identification. **Int J Legal Med**, v. 117, p. 90-95, 2003.

SAMBROOK J.; FRITSCH E. F.; MANIATIS T. Molecular Cloning. A laboratory Manual. Cold Spring NY: Cold Spring Harbor Press, 1989.

SCHITTEK B.; HIPFER R.; SAUER B.; BAUER J.; KALBACHER H.; STEVANOVIC S. et al. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. **Nature Immunol**, v. 2, n. 12, p. 1133-1137, 2001.

SMITH H. L.; LORITE M. J.; TISDALE M. J. Effect of a cancer cachectic factor on protein synthesis/degradation in murine C2C12 myoblasts: modulation by eicosapentaenoic acid. **Cancer Res**, v. 59, 5507-5513, 1999.

SMITH H.J., TISDALE M. J. Induction of apoptosis by a cachectic-factor in murine myotubes and inhibition by eicosapentaenoic acid. **Apoptosis**, v. 8, p.161-169, 2003.

SOUTHERN E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J Mol Biol**, v. 98, p. 503-517, 1975.

TAN C.; WALDMANN T. A. Proteasome inhibitor PS-341, a potential therapeutic agent for adult T-cell leukaemia. **Cancer Res**, v. 62, p. 1083-1086, 2002.

TISDALE M. J. Biology of Cachexia. **J Natl Cancer Inst**, v. 89, p. 1763-1773, 1997.

TISDALE M. J. Wasting in Cancer. **J Nutrition**, v. 129, p. 243S-246S, 1999.

TISDALE M. J. Cachexia in cancer patients. **Nature**, v. 2, p. 862-871, 2002.

TISDALE M. J. The 'cancer cachectic factor'. **Support Care Cancer**, v. 11, p. 73-78, 2003.

TODOROV P.; MCDEVIT T.; CARIUK P.; COLES B.; DEACON M.; TISDALE M. J. Induction of muscle protein degradation and weight loss by a tumor product. **Cancer Res**, v. 56, p. 1256-1261, 1996a.

TODOROV P.; CARIUK P.; MCDEVIT T.; COLES B.; FEARON K.; TISDALE M. J. Characterization of cancer cachectic factor. **Nature**, v. 379, p. 739-742, 1996b.

TODOROV P.; DEACON M.; TISDALE M. J. Structural analysis of a tumor-produced sulfated glycoprotein capable of initiating muscle protein degradation. **J Biol Chem**, v. 272, p. 12279-12288, 1997.

TODOROV P, MCDEVIT T. M., MEYER D. J.; UEYAMA H.; OHKUBO I.; TISDALE M. J. Purification and characterization of a tumor lipid-mobilizing factor. **Cancer Res**, v. 58, p. 2353-2358, 1998.

TODOROV P. T.; FIELD W. N.; TISDALE M. J. Role of a proteolysis-inducing factor (PIF) in cachexia induced by a human melanoma (G361). **Br J Cancer**, v. 80, p. 1734-1737, 1999.

TRACEY J. K., MORGELLO S., KOPLIN B., FAHEY III J. T., FOX J., ALEDO A. et al. Metabolic effects of cachectin/tumor necrosis factor are modified by site of production. **J Clin Invest**, v. 86, p. 2014-2024, 1990.

WATCHORN T. M.; WADDELL I. D.; DOWIDAR N.; ROSS J. A. Proteolysis-inducing factor regulates hepatic gene expression via the transcription factors NF-kB and STAT3. **FASEB J**, v. 15, p. 562-564, 2001.

WATCHORN T. M.; WADDELL I. D.; ROSS J. A. Proteolysis-inducing factor differentially influences transcriptional regulation in endothelial subtypes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 282, p. E763-769, 2002.

WHITEHOUSE A. S.; SMITH H. J.; DRAKE J. L.; TISDALE M. J. Mechanism of attenuation of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by eicosapentaenoic acid. **Cancer Res**, v. 61, p. 3604-3609, 2001.

WHITEHOUSE A. S.; TISDALE M. J. Downregulation of ubiquitin-dependent proteolysis by eicosapentaenoic acid in acute starvation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 285, p. 598-602, 2001.

WHITEHOUSE A.S., KHAL J., TISDALE, M.J. Induction of protein catabolism by 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid through increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway. **Br J Cancer**, v. 89, p. 737-45, 2003.

WIGMORE S. J.; TODOROV P. T.; BARBER M. D.; ROSS J. A.; TISDALE M. J.; FEARON K. C. Characteristics of patients with pancreatic cancer expressing a novel cancer cachectic factor. **Br J Surg**, v. 87, p. 53-58, 2000.

WANG Z.; COREY E.; HASS M. G.; HIGANO C. S.; TRUE L. D.; WALLACE D. Jr. et al. Expression of the human cachexia-associated protein (HCAP) in prostate cancer and in a prostate cancer animal model of cachexia. **Int J Cancer**, v. 105, p. 123-129, 2003.