DAYSON FRIAÇA MOREIRA

**REDUÇÃO DO CRESCIMENTO E RESISTÊNCIA CELULAR
DE CARCINOMA MAMÁRIO APÓS SILENCIAMENTO DO
GENE PIF/DCD (*PROTEOLYSIS-INDUCING FACTOR /
DERMCIDIN*) VIA EXPRESSÃO DE shRNAi**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Farmacologia).

São Paulo

2007

DAYSON FRIAÇA MOREIRA

**REDUÇÃO DO CRESCIMENTO E RESISTÊNCIA CELULAR
DE CARCINOMA MAMÁRIO APÓS SILENCIAMENTO DO
GENE PIF/DCD (*PROTEOLYSIS-INDUCING FACTOR /
DERMCIDIN*) VIA EXPRESSÃO DE shRNAi**

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

Área de Concentração: Farmacologia

**Orientador: Prof. Dr. Gilberto De Nucci.
Co-Orientador: Prof. Dr. José Ernesto
Belizário.**

São Paulo
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Dayson Friaça Moreira

Título da Dissertação: Avaliação do potencial oncogênico do PIF/DCD
(Proteolysis-Inducing Factor / Dermcidin).

Orientador: Gilberto De Nucci.

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a...../...../....., considerou

() **Aprovado**

() **Reprovado**

Examinador(a) Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador(a) Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Presidente Assinatura:.....

Nome:.....

Esta dissertação foi realizada no Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro do **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), de onde o aluno foi bolsista (Processo nº 133911/2005-5).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 10 de agosto de 2006.

PARECER 729/CEP

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 67ª reunião realizada em 09.08.06, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: ***"Avaliação do potencial oncogênico da proteína PIF/DCD (Proteolysis-inducing Factor/Derminicin) e da variante PIF-SV"***.

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**.

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilmo. Sr.
PROF. DR. JOSÉ ERNESTO BELIZARIO
Departamento de Farmacologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas / USP

Aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, em 10 de fevereiro de 1998.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091-7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 083/03, sobre o projeto intitulado **“Caracterização gênica do fator indutor de proteólise (PIF)-uma nova citocina envolvida no processo de caquexia”**, sob a responsabilidade de **José Ernesto Belizário**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em reunião de **22/09/2003**.

(We certify that the protocol nº 083/03, about *“Genetic characterization of proteolysis-inducing factor (PIF)-a new cytokine involved in cachexia”* agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOMEDICAL SCIENCES INSTITUTE/USP- ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in **22/09/2003** meeting.)

São Paulo, 23 de setembro de 2003.

Prof. Dra. Sonia Malheiros L. Sanioto
Coordenadora da CEEA

Prof. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender
Secretária da CEEA

"O que sabemos é uma gota, o que não sabemos é um oceano."

Isaac Newton

DEDICATÓRIA

À minha querida Mãe Nélia Friaça
Moreira (*in memoriam*) pelo grande
amor, força e confiança.

AGRADECIMENTOS

A minha maravilhosa mãe Nélia Friaça Moreira, exemplo de amor, força, inteligência e garra.

Ao meu pai Manoel Lopes Moreira, pelo cuidado, apoio, e exemplo de retidão de caráter.

À minha tia Nelma Friaça, pela amizade, confiança, respeito, paciência, generosidade e amor que a senhora me deu durante todos esses anos de convivência. Serei eternamente grato.

Aos meus queridos irmãos, Dênio e Dayse, pela amizade, generosidade, confiança, parceria, amor e apoio incondicional durante todos esses anos.

Ao meu primo Marcelo, pela amizade, paciência, generosidade e parceria durante todos os nossos anos de convívio.

À minha tia Nilda Friaça, *in memoriam*, pela sua dedicação e generosidade.

À minha querida amiga Valdelice e sua filha Carla, pela amizade, paciência e carinho.

Ao Prof. Dr. José Ernesto Belizário pela oportunidade de aprender mais e por compartilhar seus conhecimentos. Muito obrigado pela sua confiança, amizade e orientação.

A minha grande amiga Priscila Sayami Akamine que foi de grande importância na realização deste trabalho. Muito obrigado pelo ombro amigo, pela

dedicação, pelas palavras de incentivo e pelos momentos divertidos que vivemos nestes dois anos de maravilhosa convivência.

A meu amigo Juan Aliaga pela amizade, companheirismo e pelas conversas sempre animadas e divertidas.

Aos queridos amigos do laboratório Gladis, Mayra, Ana Paula, Daniele, Priscila, Miguel, Juan, Juliano e Janaína pela amizade e companheirismo durante esses dois anos. Vocês sempre serão lembrados com muito carinho e creio que ainda faremos grandes colaborações nessa carreira maravilhosa que abraçamos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da Bolsa de Mestrado durante meu período de estudo.

Aos queridos amigos e funcionários do ICB, Manoel, Marcos e Mauro, pela constante apoio no desenvolvimento técnico deste trabalho e pelas grandes conversas.

Aos Drs. Marcelo Muscará e Simone Teixeira do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pelas facilidades concedidas no seu laboratório.

Ao Dr. Bryan Strauss do Instituto do coração da Faculdade de Medicina da USP (INCOR-FMUSP) pela construção dos lentivírus utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gilberto De Nucci por ter me aceito como seu aluno.

A outras pessoas que não pude mencionar, mas que torcem não só pela minha formação acadêmica, mas pelo sucesso na trajetória da minha vida. Recebam minha gratidão.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

15-HETE – Ácido hidroxieicosatetraenóico (*Hidroxyeicosatetraenoic acid*)

ATP – Adenosina trifosfato

APP – Proteínas de fase aguda

Ca²⁺ - Cálcio

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CNTF – Fator Neutrónico ciliar

CRP – Proteína C reativa

DCD – Dermicidina (*Dermcidin*)

DSEP – *Diffusible Survival Evasion Peptide*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IBC – Gene de câncer de mama invasivo (*Invasive Breast Cancer*)

IFN- γ - Interferon- γ

I- κ B – Inibidor de NF- κ B

IL-1 – Interleucina-1

IL-6 – Interleucina-6

kDa – Kilodaltons

LIF - Fator inibidor de leucemia

LMF – Fator mobilizador de Lipídeos (*Lipid-mobilizing factor*)

mPIF – PIF glicoproteína de 24k Da

NF- κ B – Fator nuclear κ B (*Nuclear Factor κ B*)

nM – nanomolar

PAM – Peptídeo antimicrobiano

pb – pares de bases

PIF – Fator Indutor de Proteólise (*Proteolysis-Inducing Factor*)

PIF/DCD - Fator Indutor de Proteólise/Dermicidina

PKC – Proteína cinase C (*Protein kinase C*)

PLA₂ – Fosfolipase A2

PLC – Fosfolipase C

pRB – Proteína retinoblastoma

RISC – Complexo indutor de silenciamento de RNA

RNA – Ácido ribonucléico

RNAi – Ácido ribonucléico de interferência

RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro

siRNA – Pequeno Ácido ribonucléico de interferência

shRNAi – Ácido ribonucléico de interferência em forma de pequenos grampos

TNF - Fator de Necrose Tumoral (*Tumour Necrosis Factor*)

TPPII – Tripeptidil peptidase II

Ub – Proteína Ubiquitina

Ub-P' - Ubiquitina -Proteassoma

Y-P30 – Peptídeo de sobrevivência celular (*Survival Peptide Y*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 O GENE PIF/DCD	20
1.2 O PEPTÍDEO ANTIBIÓTICO DERMICIDINA	22
1.3 YP-30 OU SURVIVAL PEPTIDE Y	24
1.4 INVASIVE BREAST CANCER (IBC I)	25
1.5 FATOR INDUTOR DE PROTEÓLISE (PROTEOLYSIS-INDUCING FACTOR – PIF) EM ROEDORES (MPIF)	26
1.5.1 <i>Caquexia neoplásica</i>	27
1.5.2 <i>Caracterização do mPIF</i>	29
1.6 O FATOR INDUTOR DE PROTEÓLISE (PIF) EXISTE EM HUMANOS?	33
1.7 RNA DE INTERFERÊNCIA	36
1.8 OBJETIVOS	40
1.8.1 <i>Geral</i>	40
1.8.2 <i>Específicos</i>	40
2 MATERIAIS E MÉTODOS	42
2.1 LINHAGENS CELULARES E CULTIVO	42
2.1.1 <i>Linhagens celulares e tecidos</i>	42
2.1.2 <i>Cultivo celular</i>	42
2.2 EXTRAÇÃO DO RNAM E SÍNTESE DE cDNA PELO MÉTODO DA TANSRIPTASE REVERSA (RT)	43
2.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO PIF/DCD POR RT-PCR EM TEMPO REAL	44

2.4 PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS LENTIVIRAIS CONTENDO CONSTRUÇÃO PARA EXPRESSÃO DE SHRNAI PARA O PIF/DCD	45
2.5 TRANSDUÇÃO DAS CÉLULAS MDA-MB-361 COM VETORES VIRAIS E OBTENÇÃO DOS CLONES CELULARES PKLO, IBC I, II E III	46
2.6 ENSAIOS DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS	49
2.7 ENSAIOS DE SOBREVIVÊNCIA DOS CLONES MDA 361 PKLO E IBC I	49
2.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO POR IMUNOCITOQUÍMICA DAS DUAS FORMAS DA PROTEÍNA PIF/DCD NOS CLONES CELULARES PKLO, IBC I, II E III	50
2.9 EFEITOS BIOLÓGICOS DO CRESCIMENTO DOS CLONES CELULARES MDA 361 PKLO, IBC I, II E III EM CAMUNDONGOS NUDE	51
2.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO POR IMUNOHISTOQUÍMICA DAS DUAS FORMAS DA PROTEÍNA PIF/DCD NOS TUMORES DERIVADOS DOS CLONES CELULARES PKLO, IBC I, II E III	52
2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
3 RESULTADOS	55
3.1 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE TRANSCRITOS DE PIF/DCD NO TECIDO NORMAL E EM LINHAGENS TUMORAIS	55
3.2 A EXPRESSÃO CONSTITUTIVA DE SHRNA NOS CLONES IBC I, IBC II E IBC III REDUZIU A EXPRESSÃO DO MRNA DO PIF/DCD	57
3.3 REDUÇÃO DA EXPRESSÃO DAS FORMAS NÃO GLICOSILADA E GLICOSILADA DE PIF/DCD NOS CLONES QUE EXPRESSAM SHRNAI	57
3.4 AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO DO PIF/DCD NO CRESCIMENTO E RESISTÊNCIA CELULAR	58

3.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS METABÓLICOS DO CRESCIMENTO TUMORAL EM CAMUNDONGOS	
NUDE DE 2 E 8 MESES DE IDADE	61
3.6 PRESENÇA DAS DUAS FORMAS DO PIF/DCD NOS TUMORES DERIVADOS DE CAMUNDONGOS	
NUDE	67
4 DISCUSSÃO	72
5 CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS	90
ANEXO	101

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O surgimento e o desenvolvimento do câncer são processos complexos que dependem da interação de múltiplos fatores que resultam em alterações celulares levando à transformação de uma célula normal em neoplásica. A transformação maligna é um processo análogo à evolução darwiniana, no qual as células tumorais têm que se adaptar para evadir das várias barreiras impostas pela natureza para evitar o crescimento descontrolado inerente a célula tumoral. Para que a esta célula seja bem sucedida, ela tem que adquirir certas habilidades. Dentre elas, destacam-se a auto-suficiência de fatores de crescimento, a resistência a fatores inibitórios de crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, estímulo a angiogênese, capacidade de invasão tecidual e metástase. Cada uma destas capacidades são adquiridas ao longo do desenvolvimento do tumor e estão intimamente relacionadas a alterações genéticas que são geradas por agentes físicos e/ou químicos do meio ambiente ou produtos tóxicos, tais como radicais livres produzidos pela própria célula (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000). Estes agentes ao atuarem sobre o DNA podem provocar mutações pontiformes, amplificação gênica e translocação cromossômicas que levam a desregulação da expressão genes mestres da proliferação e diferenciação celular. Estas alterações podem levar à inativação de certos genes, como os supressores de tumor (e.g. *p53*, *rb*), e/ou levar a superexpressão outros, como protooncogenes (eg. *c-myc*, *ras*) ou também levar a expressão de genes silenciados pela diferenciação celular. Quando tais genes são

transcritos, provocam a síntese de proteínas alteradas que pode resultar na perda, ganho ou alteração de sua função biológica. O gene *Proteolysis-Inducing Factor / Dermicinin* (PIF/DCD) é expresso constitutivamente na pele onde parece exercer ação antimicrobiana (SCHITTEK et al., 2001) e em neurônios do cérebro onde parece atuar como fator neuroprotetor (CUNNINGHAM et al., 1998), porém artigos recentes relataram que quando esse gene é expresso em células tumorais, parece exercer o papel de fator de crescimento e proteção celular (POTER et al., 2003). Por outro lado, existem algumas evidências de que esse gene está envolvido na caquexia neoplásica (TODOROV et al., 1996a). Ao longo deste trabalho iremos descrever as atividades normais desse gene e tentar compreender o papel desse gene no câncer.

1.1 O Gene PIF / DCD

Em 2000, o RNAm do gene PIF/DCD foi identificado em uma biblioteca de cDNA constituídas de extratos celulares derivados da pele, dendrócitos e melanócitos (HIPFEL et al., 2000). Em seguida o gene foi mapeado no cromossomo 12, *locus* 12q13.1 (POTER et al., 2003). Este transcrito codifica a um polipeptídio de 110 aminoácidos, o qual dá origem a uma proteína intacta de 11 kDa que pode ser processada em vários fragmentos derivados das porções N-terminal e C-terminal. Estes produtos foram caracterizados bioquimicamente e receberam nomes distintos baseados na suas diferentes atividades biológicas reproduzidas em modelos celulares e modelos animais (Ilustração I).

Quando esse gene é expresso na pele, ele é processado proteoliticamente, e o peptídeo resultante da sua região C-terminal foi chamado de Dermicidina (DCD) e possui atividade antimicrobiana (SCHITTEK et al., 2001). Já o peptídeo resultante da região N-terminal, que recebeu o nome de YP-30, foi encontrado em neurônios após estresse oxidativo e está envolvido na neuroproteção (CUNNINGHAM et al., 1998) (Ilustração 1). O transcrito desse gene também foi encontrado superexpresso em amostras de tumores invasivos de mama e foi denominado de IBC I (do inglês, *Invasive Breast cancer I*). Alguns estudos também têm sugerido que esse gene é processado e glicosilado na região N-terminal resultando na produção de um fator indutor de proteólise (*Proteolysis-Inducing Factor*, PIF) em humano semelhante ao encontrado em murino (TODOROV et al., 1996a) (Ilustração I). Uma vez que, a uma parte da seqüência N-terminal é idêntica à porção peptídica de uma glicoproteína sulfatada encontrada no adenocarcinoma murino MAC 16 que é responsável pela indução da proteólise muscular durante a caquexia neoplásica (TODOROV et al., 1996a).

Como podemos observar na ilustração 1, a proteína precursora pode dar a origem a dois produtos distintos nas regiões N- e C- terminal, PIF e DCD, portanto trataremos o gene ao longo do texto como PIF/DCD. Abaixo detalharemos um pouco mais sobre as funções de cada uma das funções atribuídas aos peptídeos resultantes do processamento proteína codificada pelo PIF/DCD.

Ilustração 1 - Seqüência de aminoácidos da proteína precursora PIF/DCD. Em destaque as regiões que dão origem aos diferentes peptídeos que foram nomeados de acordo com suas atividades biológicas. PIF-Proteolysis-Inducing Factor; YP-30 ou Survival peptide Y; DCD – dermcidin.

1.2 O peptídeo antibiótico Dermicidina

A Dermicidina (DCD) é um peptídeo antimicrobiano (PAM) recentemente descoberto e não possui nenhuma homologia a nenhum outro PAM até hoje descrito (SCHITTEK et al., 2001). Ele é o principal PAM da pele, sendo encontrado em grande quantidade no suor da face, braço e principalmente das mãos, ele também encontrado suor das pernas e tórax, mas em baixas concentrações (RIEG et al., 2006). A proteína não foi encontrada em outros fluidos corpóreos, tais como a saliva, lágrima, secreção nasal, sêmen e plasma (SAGAWA et al., 2003; REIG et al., 2005). E, ao contrário de outros PAM, não é expresso por queratinócitos de indivíduos saudáveis (REIG et al., 2005).

A Dermicidina é excretada por células escuras das glândulas écrinas da pele em uma forma precursora, a proteína PIF/DCD de 11 kDa, que sofre processamento enzimático no suor gerando seis peptídeos com pesos moleculares entre 2,5 a 4,7 kDa (SCHITTEK et al., 2001). Destes seis peptídeos apenas dois, DCD 1L e DCD 1, têm atividade microbida para *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* e regulam a

flora microbiana da pele (SCHITTEK et al., 2001). Em várias condições *in vitro*, estes peptídeos apresentaram um amplo espectro antimicrobiano contra *Staphylococcus epidermidis* (VOUNG et al., 2004), *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus* metilclina resistentes, *Mycobacterium tuberculosis* rifamicina e isonidazida resistentes (LAI et al., 2005), *Listeria monocytogenes* e *Salmonella entérica* (CIPAKOVA et al., 2006).

O mecanismo pelo qual os peptídeos exercem atividade antimicrobiana ainda não está totalmente esclarecido. Os PAMs têm em geral uma carga positiva, isto é, são catiônicos, e na sua maioria exercem sua ação ao permeabilizar a membrana bacteriana (HANCORK et al., 1998). Porém, os peptídeos derivados do DCD que têm ação antimicrobiana possuem uma carga negativa, isto é, são aniônicos (STEFFEN et al., 2006) e não atuam pelo mesmo sistema dos outros PAM. Steffen et al. (2006) demonstraram que a carga e a estrutura não são importantes para ação tóxica do DCD. Todavia, os peptídeos se ligam à membrana em sítios específicos no envelope celular e provocam alterações que resultam na morte do microorganismo. Mudanças nestes sítios de ligação causam diferenças na susceptibilidade ao DCD em bactérias mutantes (STEFFEN et al., 2006). Embora o mecanismo não esteja completamente compreendido, um mecanismo de resistência foi descrito em *S. epidermis*. Através de análise de expressão gênica por *microarray* foi demonstrado que o DCD induz um aumento na expressão de genes do sistema regulatório global do microorganismo, resultando na expressão de proteases com a capacidade de degradar o DCD, especialmente a *S. epidermis* Sep A. Curiosamente, os outros PAM catiônicos também levam ao um aumento Spe A, porém esta protease é mais eficiente em degradar o DCD

(LAI et al., 2007). Novos estudos são necessários para compreender o mecanismo de ação desses peptídeos. Além disso, recentemente, foi reportado que pacientes com dermatite atópica têm uma redução na quantidade de DCD no suor, a qual está correlacionada com uma diminuição da atividade antimicrobica das glândulas écrinas da pele, mostrando a importância desse peptídeo para a homeostase desse tecido (REIG et al., 2005).

1.3 Y-P30 ou *Survival peptide Y*

O peptídeo YP-30 foi isolado pela primeira vez em 1998, no lisado de células neuronais humanas e de roedores expostas a H_2O_2 . Quando o peptídeo era adicionado ao meio de cultura era capaz de exercer uma atividade neuroprotetora, por esse motivo os autores o denominaram de *Survival peptide Y* (CUNNINGHAM et al., 1998). Este peptídeo é constituído por uma sequência de 30 aminoácidos idêntica à porção N-terminal da proteína PIF/DCD.

Quando o peptídeo foi administrado diretamente no cérebro ou por via endovenosa foi capaz de proteger as células neuronais da morte celular, além de evitar a atrofia após lesão cirúrgica. Em outro estudo, o peptídeo também inibiu a migração e diferenciação de macrófagos e células microgliais para o local da lesão, diminuindo assim, o dano tecidual de uma resposta inflamatória local. Esse efeito foi acompanhado pela liberação da calreticulina da membrana celular, o que pode estar relacionado com uma alteração na excitabilidade de células nervosas (CUNNINGHAM et al., 2000). Mais recentemente a superexpressão do gene PIF/DCD, o qual foi denominado de DESP (*Diffusible Survival Evasion Peptide*)

pelos autores, em linhagens neuronais aumentava a resistência aos efeitos potencialmente tóxicos do peróxido de hidrogênio tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Assim, eles concluíram que o gene PIF/DCD produz o YP-30 quando expresso por células neuronais em condições de estresse (CUNNINGHAM et al., 2002). Novos trabalhos devem ser realizados afim de compreender melhor o mecanismo pelo qual o YP-30 produz seus efeitos e quais as suas funções na fisiologia normal do cérebro.

1.4 Invasive Breast Cancer I (IBC I)

Porter et al. (2003) utilizando a técnica de análise seriada de expressão gênica (do inglês SAGE) detectaram a presença de vários genes marcadores de tumores invasivos da mama identificados pela sigla IBC. Entre os genes, o grupo identificou o gene IBC-1 (*Invasive Breast cancer 1*), o qual tem a sua expressão amplificada em 10% dos casos de carcinoma invasivo de mama, porém não estava expresso em mama normal e em outras linhagens tumorais analisadas. Esta superexpressão foi correlacionada com uma amplificação gênica no *locus* 12q13.1 do cromossomo 12 e com o estágio avançado da doença. No mesmo trabalho, os autores verificaram que a seqüência do gene era a mesma expressa pelo gene DCD descrito por Schitteck et al. (2001), então o renomearam com esse nome. Na tentativa de compreender o papel desempenhado por esse gene na célula tumoral, os autores superexpressaram o PIF/DCD em uma linhagem de câncer de mama 21NT e verificaram um aumento na proliferação celular em relação à célula controle portadora do plasmídeo vazio, especialmente com a

diminuição de soro no meio. Um resultado similar foi encontrado em nosso laboratório quando o PIF/DCD foi superexpresso em células do melanoma B16-F10 (GARAY-MALPARTIDA, 2005). Além disso, as células 21NT apresentaram maior resistência ao estresse oxidativo provocado por meladiona, um potente indutor de espécies reativas de oxigênio mitocondrial. Em outros estudos, a superexpressão do PIF/DCD em células tumorais de mama MCF7 induziu um aumento no crescimento de tumor em animais NUDE (MONNITO et al., 2004).

1.5 O Fator indutor de proteólise (*Proteolysis-Inducing Factor*) em roedores (mPIF)

O PIF de roedores (mPIF) é uma glicoproteína sulfatada de 24 kDa que contém na porção central um polipeptídico de 4 kDa e duas cadeias de oligossacarídeos de 6kDa e 14 kDa produzida pela linhagem celular de adenocarcinoma MAC 16 de camundongos (TORODOV et al. 1996a, 1997). Esta molécula foi descoberta quando se observou o desenvolvimento de um quadro semelhante a uma síndrome conhecida por caquexia neoplásica em camundongos portadores do tumor de células MAC 16 (SMITH e TISDALE, 1993). Para compreendermos melhor a ação desta glicoproteína, temos primeiro que entender o que é a caquexia neoplásica.

1.5.1 Caquexia neoplásica

O termo caquexia deriva do grego *Kakos hexis* que significa, literalmente, má condição. Esta síndrome caracteriza-se pela progressiva perda de massa

muscular e de tecido adiposo, sendo acompanhada de fraqueza, imobilidade, anorexia, anemia e alterações no metabolismo, resultando em baixa qualidade de vida para o paciente e muitas vezes óbito (TISDALE, 2002). Em muitos pacientes com diversas doenças crônicas e de fase terminal como câncer, infecções, trauma, AIDS, artrite reumatóide, fibrose cística e doença de Corhn desenvolvem a síndrome da caquexia (TISDALE, 2002).

Em estágios de câncer avançado, mais que 50% dos pacientes exibem os sintomas de caquexia e aproximadamente 20% da mortalidade destes pacientes é devido à síndrome e não diretamente pela carga tumoral (TISDALE, 2002). O óbito geralmente ocorre quando a perda de peso do paciente está em torno de 30% do peso inicial. Ao contrário de uma inanição, cuja perda de peso pode chegar até 40% do peso sem óbito (TISDALE, 2002). Enquanto a incidência em câncer de mama e leucemia é baixa, a síndrome é altamente prevalente em câncer de pulmão e gastrointestinal. Pacientes com câncer de mama que não perderam peso respondem 2,5 vezes melhor ao tratamento do tumor do que os que apresentaram perda de peso (DEWYS, 1980).

A ingestão reduzida de alimentos relacionada a alterações no paladar e no controle central do apetite, depressão e aos efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia, todavia, isoladamente, não são suficientes para explicar os efeitos da caquexia (RUBIN, 2003; ARGILÉS et al., 2003a). Este fato pode ser comprovado quando se observa que a intervenção nutricional e a manipulação farmacológica do apetite são incapazes de restaurar a perda de peso ligada a caquexia (TISDALE, 2001).

Diferentemente da inanição na qual ocorre previamente a perda das reservas de gordura, mas a massa magra é preservada, na caquexia, os pacientes perdem peso em ambos os compartimentos. A perda de massa magra na caquexia envolve, principalmente, os músculos esqueléticos, enquanto as proteínas viscerais são preservadas. Já na inanição, a perda envolve ambos. Uma outra diferença marcante é que o peso do fígado na inanição é diminuído, porém na caquexia é aumentado devido a alterações metabólicas e a síntese de proteínas de fase aguda (TISDALE, 2001, 2002).

Durante a caquexia ocorrem mudanças significativas no metabolismo de carboidratos, lipídeos e, sobretudo, no metabolismo de proteínas. A perda da massa protéica é que distingue a caquexia de um estado de desnutrição calórica e de uma anorexia profunda. Esses efeitos são produzidos por várias perturbações profundas no metabolismo, tais como: alterações no metabolismo de aminoácidos, aumento na produção de proteínas de fase aguda, aumento da degradação de proteínas (hipercatabolismo) e na diminuição da síntese de proteínas (hipoanabolismo) (RUBIN, 2003; ARGILÉS et al., 2003a; TISDALE, 2002).

Nas últimas décadas foram identificados vários fatores que são capazes de induzir os efeitos catabólicos da caquexia. As evidências atuais indicam a participação de fatores solúveis dentre eles, as citocinas produzidas pelo hospedeiro como interleucinas 1 α (IL-1 α) e β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Interferon gama (INF- γ), fator inibidor de leucemia (LIF) e fator neutrófico ciliar (CNTF) (OLLIF et al., 1987; OLLIF, 1988; TRACEY et al., 1988; FONG et al., 1989; GRUNFELD et al., 1990; ARGILÉS et al., 1999; KUMAR et al., 2003; ACHARYYA e GUTTRIDGE et al., 2007). Além

desses fatores os efeitos catabólicos da caquexia podem ser causados por fatores produzidos pelo do tumor, como fator mobilizador de lipídeo (LMF), toxohormônio L e o fator indutor de proteólise (PIF) objeto do nosso estudo (TISDALE, 2001, 2002).

1.5.2 Caracterização do mPIF

O mPIF foi descoberto durante estudos de indução de caquexia em camundongos através do implante das linhagens celulares dos adenocarcinoma MAC 13, fraco indutor de caquexia e MAC 16, forte indutor de caquexia (SMITH e TISDALE, 1993). O que chamou a atenção dos investigadores foi que quando músculos esqueléticos *soleus* isolados foram expostos ao soro dos animais portadores do adenocarcinoma MAC 16, apresentaram um aumento da degradação protéica (SMITH e TISDALE, 1993). Em estudos subseqüentes, com a produção de um anticorpo monoclonal, foi possível purificar por cromatografia de imunoafinidade, o fator presente no soro e analisar a sua estrutura, bem como determinar a seqüência de aminoácidos do núcleo peptídeo (TORODOV et al., 1996a, 1997). Quando fator purificado foi injetado em camundongos resultou em uma perda de 10% do peso em um período de 24 horas. O mesmo fator foi capaz de produzir degradação em músculos isolados, sendo que este efeito foi anulado pela adição do anticorpo monoclonal contra o mPIF (TORODOV et al., 1996a).

A diminuição da massa muscular induzida pelo mPIF em camundongos foi explicada por um aumento de 50% na degradação protéica e uma diminuição de

50% na síntese protéica, observada no músculo gastrocnemius (LORITE et al., 1997). Estes efeitos parecem ser causados pela ativação da via das prostaglandinas, mediante aumento do ácido hidroxieicosatetraenóico (HETE-15) (SMITH et al., 1999) e da expressão dos componentes do sistema ubiquitina-proteassoma (LORITE et al., 2001). Assim, o principal mecanismo pelo qual o mPIF induz a degradação protéica no músculo pode ser através do aumento na atividade da via proteolítica do sistema ubiquitina-proteassoma. Nesta via, as proteínas selecionadas para a degradação são conjugadas a uma cadeia de ubiquitina através da ação de três enzimas ligases, E1, E2 e E3, com o gasto de ATP. Após esta etapa, as proteínas marcadas são dirigidas para o proteassoma, que na parte central é formado por 7 cadeias α e 7 cadeias β distintas em forma de anel. Estas últimas funcionam como enzimas proteolíticas degradando as proteínas em oligopeptídeos de 8-12 aminoácidos que são rapidamente degradados por endopeptidases citoplasmáticas, entre elas a Tripeptidil peptidase II (TTP II), gerando aminoácidos isolados (Ilustração 2) (JESNBERGER e JENTSCH et al., 2002).

Ilustração 2: A via de degradação de proteínas pelo sistema Ubiquitina Proteassoma (Ub-P'). Esta cascata de reações é mediada pelas enzimas E1, E2 e E3. A proteína substrato após ser ubiquitinada é apresentada e degradada pelas enzimas proteassomais, posteriormente por outras proteases, como a Tripeptidil peptidase II (TPPII).

Os principais indícios da ativação dessa via proteolítica foram obtidos com músculos gastrocnemius isolado de camundongo incubados com mPIF durante várias horas. A exposição levou ao (i) aumento de conjugados de ubiquitina de alto peso molecular (LORITE et al., 1998), (ii) acompanhada por um aumento nos níveis de RNAm da ubiquitina, principalmente da enzima E_{2 14k} e da subunidade C9 do proteassoma (GOMES-MARCONDES et al., 2002). Além do (iii) aumento nos níveis protéicos da porção da subunidade 20S que compõe o núcleo do proteassoma e subunidade regulatória 19S (LORITE et al., 1998). Resultados

similares aos encontrados em estudos *in vitro* com mioblastos diferenciados da linhagem celular C2C12. (LORITE et al., 2001).

Além da atividade direta sobre o músculo esquelético, o mPIF parece estar envolvido na resposta de fase aguda que acompanha a caquexia (TISDALE, 2004). Esta resposta provoca aumento nos níveis de proteínas de fase aguda (APP), proteína C reativa (CRP) e diminuição na produção de transferrina no fígado (TISDALE, 2004). Em culturas primárias de hepatócitos, o mPIF elevou a ativação do fator de transcrição NF- κ B e STAT 3, os quais resultaram no aumento da produção de IL-8, IL-6 e CRP e uma diminuição da produção de transferrina (WATCHORN et al., 2001). A ativação destes mecanismos envolvidos na degradação muscular e na resposta de fase aguda, somados a outros fatores inflamatórios gerados pela presença do tumor agem de forma sinérgica para o surgimento da caquexia.

Em resumo, estes estudos indicam que ao mPIF, juntamente com outras citocinas pro-inflamatórias secretadas elevam o catabolismo muscular e a produção de proteínas da fase aguda no fígado, e contribuem para a instalação de um quadro caquético em camundongos. Paralelamente, a estes estudos em camundongos, foram realizados estudos com linhagens celulares humanas para verificar a presença e atividade da mesma proteína em humanos.

1.6 Existe o Fator indutor de proteólise (PIF) em humanos?

Em estudos sobre a expressão e atividade do mPIF em pacientes com caquexia neoplásica, observou-se que o anticorpo utilizado para purificar a glicoproteína murina era capaz de reconhecer um material de mesmo peso molecular na urina de pacientes com câncer de próstata, com perda de peso maior que 1,5 Kg / mês e no soro de pacientes com perda de peso maior que 10% (TORODOV et al., 1996b). O mPIF também foi encontrado na urina de pacientes com uma variedade de tumores, incluindo carcinoma de pâncreas, mama, ovário, pulmão, cólon e reto, com perda de peso maior que 1 Kg / mês, porém não estava presente em amostras de pacientes com caquexia devido a trauma e sepse (CARIUK et al., 1997). Posteriormente, foi identificada pelo anticorpo murino uma molécula semelhante ao mPIF produzida pelo tumor humano em estudos com a linhagem de melanoma G361 (TORODOV et al., 1999).

A partir da identificação e clonagem do cDNA do PIF/DCD, vários investigadores iniciaram estudos para verificar as correlações estruturais e funcionais entre diferentes formas de PIF/DCD e da proteína murina PIF 24 kDa (WANG et al., 2003; PORTER et al., 2003; MONITO et al., 2004; GARAY-MALPATIDA et al., 2005) (Tabela 1). No primeiro, Wang et al. (2003) detectaram expressão do RNAm e da proteína PIF/DCD usando anticorpos policlonais contra a porção C-terminal, em extratos de tecidos de tumores de pacientes e linhagens celulares de câncer de próstata. O grupo também observou a presença da proteína mPIF, usando o anticorpo monoclonal gerado nos estudos com tumores de camundongos (TORODOV et al., 1998). A partir destes estudos os autores

passaram a chamar o gene de HCAP (do inglês, human cachexia associated protein).

Tabela 1 - Identificação e avaliação de efeitos biológicos das proteínas PIF/DCD e mPIF em linhagem celulares e em modelos experimentais.

Linhagem celular	Proteína não glicosilada (11kDa)	Proteína Glicosilada (24kDa)	Indução de Perda de Peso em camundongos	Aumento no crescimento do tumor	Referência
PC3	NC	Presente	Presente	NC*	WANG et al. (2003)
21 NT	Presente	Ausente	NC*	Presente	PORTER et al. (2003)
MCF 7, BT-20, MAC 16, MAC 13 e HEK 293	Presente	Ausente	Ausente	Presente	MONITO et al. (2004)
B16-F10	Presente	NC*	Presente	Presente	GARAY- MALPATIDA (2005)

* NC Nada consta.

O implante das linhagens de tumores de próstata, PC3-M e LuCaP35, produtoras do HCAP, em camundongos SCID imunodeficientes causou uma perda de peso significativa quando comparado ao controle sem o tumor. Contudo, esse experimento apresentou falhas no seu controle negativo, pois os autores não inocularam um tumor de próstata não produtor da proteína HCAP (WANG et al., 2003). No segundo estudo, Monitto et al. (2004) realizaram a expressão estável da

molécula em linhagens tumorais derivadas de camundongos, em particular MAC 13 e MAC16, e de células derivadas de tumores humanos de mama MCF7 e BT20 do rim linhagem HEK 293. Em nenhuma das linhagens os autores detectaram a expressão da forma glicosilada de 24 kDa, em ensaios de Western blot utilizando anticorpo monoclonal contra a proteína murina. Embora em todos os casos fosse detectada a presença da proteína PIF/DCD, identificada pelo uso de anticorpos policlonais utilizados nos estudos de Porter et al. (2003). Estes investigadores também avaliaram os efeitos do crescimento de células MCF-7 superexpressando o PIF/DCD em camundongos NUDE e não foi observada a perda de peso dos animais. Ao contrário, em estudos realizados em nosso laboratório, foi observado que camundongos C57/BL-6 portadores de melanoma B16 que superexpressam o gene PIF/DCD desenvolveram a síndrome de caquexia, com perda peso e de tecido muscular (GARRAY-MALPARTIDA, 2005). Porém, neste estudo não foi identificada a proteína de 24 kDa, muito provavelmente devido a especificidade do anticorpo utilizado que parece reconhecer outras regiões da proteína e não a relacionada a estrutura que é glicosilada. Ou seja, ainda permanece a dúvida acerca da identidade, presença, origem e das funções das proteínas PIF/DCD e mPIF em tumores humanos.

O estudo da atividade biológica desempenhada pelo PIF/DCD no câncer foi avaliado, até o momento, em modelos de superexpressão em linhagens celulares tumorais. Os resultados destes estudos mostraram fortes evidências da participação dessa molécula no crescimento e sobrevivência dessas células (PORTER et al., 2003; MONITTO et al., 2004). Porém, para confirmar essas evidências, é necessário eliminar ou reduzir significativamente a expressão desse

gene em modelos de linhagens tumorais que expressem a molécula. Neste sentido, o uso de técnicas capazes de causar esse efeito, como o RNA de interferência (RNAi), é de grande valia. A técnica de RNAi é considerada a mais eficiente ferramenta da genômica funcional recentemente descoberta (DYKXHOORN et al., 2003).

1.7 RNA de interferência

A inativação permanente de genes pela técnica de *knock-out* ou métodos que bloqueiam sua tradução são poderosas ferramentas para se atribuir à função aos genes, bem como caracterizar suas inter-relações com diferentes vias celulares. Um dos melhores meios para se obter o bloqueio da tradução é através do silenciamento gênico pós transcricional mediado por RNA de interferência (RNAi). Este fenômeno foi descrito pela primeira vez por Fire e Mello et al. (1998) em experimentos com o verme *Caenorhabditis elegans*. Os pesquisadores ao tentar inibir a expressão gênica pela tecnologia de RNA antisense, introduziram no verme RNAs de fita simples sendo senso, não-senso e uma mistura dos dois (senso e antisense). Eles observaram que a mistura dos dois foi dez vezes mais eficiente em inibir a expressão gênica do que os RNA senso e antisense sozinhos. Os estudos sobre os mecanismo molecular deste efeito mostraram que quando longos RNAs de fita dupla (dsRNA), homólogos ao gene alvo, são introduzidos nestes animais, eles são processados por uma endonuclease denominada de Dicer gerando pequenos RNAs de 21 a 23 nucleotídeos, denominados de siRNA (do inglês, *small interfering RNA*). Estes siRNAs são incorporados pelo complexo

RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), o qual separa a dupla fita e usa a antisenso como guia para localizar e degradar o RNAm específico (Ilustração 3) (DYKXHOORN et al., 2003, 2005; DORSETT et al., 2004; HONNON et al., 2002; 2004). Porém, em mamífero, a introdução de longo RNA de dupla fita (>30 pares de bases) resulta produção de interferon o que leva a uma sistêmica e não específica da inibição da transcrição. Esse problema foi contornado por Elbashir et al. (2001) ao transfectar siRNA de 21 nucleotídeos em células de mamíferos. Os autores não observaram a resposta de interferon nestas células, mas um silenciamento específico.

O RNAi pode ser introduzidos na célula alvo de duas formas, diretamente por transfecção de pequenos RNAi (siRNAi) sintéticos, porém com um silenciamento transitório, ou por meio vetores de plasmídiais. Estes últimos, quando transfectados na célula, levam a expressão de RNAs de fita dupla em forma de pequenos “grampos” (hairpins) (shRNA) que são processados pela RNase III, conhecida como DICER, em siRNA que ativam o complexo RISC (Ilustração 3). A principal vantagem do uso deste vetor é que, dependendo da construção utilizada, levam a uma expressão estável pela célula de shRNAi, diferentemente dos siRNA sintéticos (BRUMMELKAMP et al., 2002; MIYAGISHI et al., 2002; PAUL et al., 2002; DYKXHOORN et al., 2003). Porém, o uso de vetores plasmídiais é limitado devido à baixa taxa de transfecção. Entretanto, o uso de sistemas de vetores virais para a entrega, como o lentivirus, tem se destacado na literatura, por aumentar consideravelmente a taxa de transfecção (MATTA et al., 2003, MITTAL et al., 2004).

Desde a descoberta do RNAi em 1998 muitos trabalhos já foram realizados utilizando esta ferramenta. Há um grande entusiasmo no uso desta tecnologia para o desenvolvimento de poderosas terapias utilizando RNAi contra vários genes envolvidos em um grande número de doenças, incluindo infecções virais, doenças neurodegenerativas, choque séptico, degeneração macular e câncer (LEIBERMAN et al., 2003; GITLIN et al., 2003; DALLAS et al., 2006). Vale a pena mencionar que uma droga o Formiversem (Vitravene®) da ISIS Pharmaceuticals contra uma retinite causada por Citomegalovírus (CMV), utilizando um RNAi contra a proteína CMV IE2 do vírus foi recentemente aprovada pelo FDA (*Food and drug administration*), órgão do governo dos Estados Unidos da América que controla a liberação e o uso de medicamentos naquele país (DALLAS et al., 2006).

A técnica de RNAi vem sendo amplamente utilizada para avaliar a função de genes. No presente estudo foi utilizada essa técnica de RNAi para silenciar a expressão da mensagem de PIF/DCD na linhagem de célula de mama MDA-MB-361 e investigar o envolvimento desse gene no crescimento e resistência celular e na caquexia em camundongos.

Modificado de www.sigmaaldrich.com.

Ilustração 3 - Mecanismo de silenciamento induzido pelo RNA de interferência. O RNAi pode ser introduzido na célula diretamente por transfecção de siRNAi ou por vetores (virais ou plasmidiais) que expressam shRNAi que são reconhecidos pela DICER que são então processados em siRNAi. Estes por sua vez, são reconhecidos pelo complexo enzimático, denominado de RISC que utiliza o RNA antisenso para reconhecer e clivar o RNAm que é então degradado pelas RNase citoplasmáticas.

1.8 Objetivos

1.8.1 Geral

Investigar a influência do gene PIF/DCD no crescimento e resistência de células tumorais e na capacidade indução da caquexia através de silenciamento gênico mediado por RNA de interferência.

1.8.2 Específicos

1. Quantificar a expressão do PIF/DCD em linhagens de células tumorais por RT-PCR em tempo real;
2. Obter clones celulares expressando de forma estável shRNAi para o PIF/DCD;
3. Avaliar o efeito do silenciamento do gene PIF/DCD no crescimento celular e na capacidade em responder a agentes citotóxicos nos clones celulares expressando shRNAi;
4. Avaliar o efeito da expressão de shRNAi para o PIF/DCD na capacidade dos clones em induzir caquexia quando injetados em camundongos NUDE.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LINHAGENS CELULARES E CULTIVO

2.1.1 Linhagens celulares e tecidos

Para os ensaios de RT-PCR em tempos real foram obtidas amostras de RNA das seguintes linhagens celulares humanas: câncer de mama MDA-MB-361; MDA-MB-231; MDA-MB-415; ZR 75-30; PMC 42; DU-4775 e MCF-7; melanoma maligno SKMEL-23; SKMEL-28; A-375; câncer de próstata PC 3 e retinoblastoma RBO25. As amostras de linhagens de células tumorais foram adquiridas da ATCC (American Type Culture Collection) e da Clontech e oferecidas gentilmente por pesquisadores do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer e Hospital AC Camargo. No mesmo ensaio, foram utilizadas como controle amostras normais de pele e mama, obtidos de pacientes submetidas à cirurgia plástica da mama gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Ivan Dunshee de Abranches Oliveira Santos (Escola Paulista de Medicina - Unifesp), respeitando todos os padrões éticos e de segurança envolvidos neste procedimento (Parecer 729 CEP).

2.1.2 Cultivo celular

Células da linhagem de adenocarcinoma de mama humana MDA-MB-361 foram cultivadas em garrafas de 25 cm² em meio DMEM (Cultilab) suplementadas com 20% de soro bovino inativado (SBF) (Cultilab), 2 mM L-glutamina e antibióticos, mantidas em estufa sobre atmosfera úmida com 5% de CO₂ à 37°C.

2.2 Extração do RNAm e síntese de cDNA pelo método da Transcriptase reversa (RT)

A extração de RNA foi realizada pelo método de TRIZOL (Invitrogen) segundo instruções do fabricante. A síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de 1 µg RNA total foi realizada pelo método da transcriptase reversa. 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 *primer* OLIGO dT 0.5 µg/µl, 1 µl da enzima transcriptase reversa SuperScript II (GibcoBRL) ou M-MLV 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 à síntese do cDNA foi feita utilizando a mistura de *primer* randômico 3 µg/µl, (Random, Invitrogen) e *primer* OLIGO dT 0.5 µg/µl. Para as amostras de cDNA utilizadas nos ensaios de RT-PCR em tempo real, as amostras de RNA total foram incubadas com DNase I

(Quiagen) durante 15 minutos a 37 °C antes da reação de RT para evitar contaminação com DNA.

2.3 Análise da expressão gênica do PIF/DCD por RT-PCR em tempo real

Nos ensaios de expressão semiquantitativa das mensagens de PIF/DCD 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 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. Os passos da reação foram os seguintes: 1) desnaturação a 95°C por 10 min, o qual ativa a enzima AmpliTaq Gold, 2) 40 ciclos à 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 min (anelamento). Em seguida, a fluorescência foi lida no detector ABI PRISM 7700 Sequence Detector. Através dos valores da fluorescência foi obtido o Ct (“*threshold cycle*”), isto é, ciclo no qual a quantidade de produto formado corresponde a concentração inicial de fitas moldes (RNA_m / cDNA) amplificados pela reação. Os valores do Ct de cada amostra foram normalizados através do método da curva padrão utilizando os resultados da expressão do gene ribossomal 18S. Para a construção da curva realizou-se diluição 1x, 1/3, 1/27, e 1/81 da amostra positiva de cDNA do gene de interesse

(por exemplo, cDNA das amostras da pele). Os primers usados nos ensaios de foram os seguintes:

PIF forward	5' TTC ATG CTC CTC TTC CTG ACA 3'
PIF reverse	5' TCC TTT TGA GCT GAT GCT 3'
MGB PROBE	5' 6 FAM TCT GTG CCT ATG ATC CAG A MGBNFQ3'
18S RNA forward	5' CCG GCG GCT TTG GTG 3'
18S RNA reverse	5' CCA TCG AAA GTT GAT AGG GCA GA 3'
18S RNA MGB probe	5' 6 FAM CGT GCG ATC GGC CCG AGG TTA TCT MGBNF 3'

2.4 Produção de partículas lentivirais contendo construção para expressão de shRNAi para PIF/DCD

Foram utilizados três oligonucleotídeos para a geração de shRNAi PIF/DCD denominados de shRNAi-IBC I, shRNAi-IBCII e shRNAi-IBC III para três diferentes regiões do gene (Ilustração 4). Estes foram clonados no plasmídeo pLKO.1 puro (ZUFFERY et al., 1997) formando as construções IBC I-RNAi, IBC II-RNAi e IBC III-RNAi (Ilustração 5). Estas construções, juntamente com o plasmídeo vazio (pLKO), foram gentilmente cedidas pela Dra. Kornelia Polyak (Dana-Farber - Cancer Institute). Os vetores virais foram produzidos pela co-transfecção de 10 µg de vetores de empacotamento, pCMV-VSV e pUMVC3 (9:1), junto 10 µg do vetor, contendo cada construção de IBC-RNAi, em células HEK 293T que expressam grandes quantidades de antígeno T de SV40, transcriptase

reversa e proteínas do envelope viral como previamente descrito por Zufferey et al. (1997). Os vetores lentivirais foram gentilmente produzidos pelo Prof. Dr. Bryan E. Strauss (Incor/FMUSP) em seu laboratório. As seqüências dos oligonucleotídeos usadas para a construção dos shRNAs PIF/DCD foram as seguintes:

IBC I Sense / Antisense

5' CGGTCCTAGATCCCAAGATCTCCAACCTCGAGTTGGAGATCTTGGGATCTAGGTTTTTG 3' /

5' AATTCAAAAAGGTTAGCCAGACAGGCACCAACTCGAGTTGGTGCCTGTCTGGCTAACCA 3'

IBC II Sense / Antisense

5' CCGGRGGTTAGCCAGACAGGCACCAACTCGAGTTGGTGCCTGTCTGGCTAACCTTTTTTG 3' /

5' AATTCAAAAAGGTTAGCCAGACAGGCACCAACTCGAGTTGGTGCCTGTCTGGCTAACCA 3'

IBC III Sense / Antisense

5'CGGTAGCTGTAAGGAGAAGCTGAGACTGCAGTCTCAGCCTCAGCTTCTCCTTACAGCTTTG3' /

5' AATTCAAAAAGCTGTAAGGAGAAGCTGAGACTCGAGTCTCAGCTTCTCCTTACAGCTA

2.5 Transdução das células MDA-MB-361 com os vetores virais e obtenção dos clones celulares pLKO, IBC I, II e III

As células MDA-MB-361 foram transduzidas com os lentivirus contendo as construções para expressão dos três diferentes shRNAi para o PIF/DCD (IBC I-RNAi, IBC II-RNAi e IBC III-RNAi) e com o controle (pLKO). Neste ensaio, as células MDA-MB-361 foram cultivadas em placas de 24 poços até atingir a confluência. Em seguida, o meio aspirado completamente e adicionado aos poços 100 µl do sobrenadante obtido da cultura das células empacotadoras contendo as

artículas virais diluído na razão de 1:1 com meio completo contendo 8 µg/ml de polibreno para um volume final de 200 µl. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C na estufa de cultura de células. Após este período, foi adicionado meio fresco e iniciou-se a seleção com doses crescentes de puromicina (2-20 µg/ml).

IBC I

1 GGGAC CCTAGATCCCAAGATCTCAA GGATTTCGGTGGCATACCCACTCCAGCACACAGAA
61 GCATGAGGTTTCATGACTCTCCTCTTCCTGACAGCTCTGGCAGGAGCCCTGGTCTGTGCCT
121ATGATCCAGAGGCCGCCTCTGCCCCAGGATCGGGGAACCCTTGCCATGAAGCATCAGCAG

IBC II

181CTCAAAAGGAAAATGCAGGTGAAGACCCAG GGTAGCCAGACAGGCACCAA AGCCAAGGA
241AGCAGAGATCCAGCCTTCTGGAAAAAGGCCTAGACGGAGCAAAAAAGCTGTGGGGGGAC
301 TCGGAAAAGTAGGAAAAGATGCAGTCGAAGATCTAGAAAGCGTGGGTAAAGGAGCCGTCC

IBC III

361 ATGACGTTAAAGACGTCCTTGACTCAGTAC TATAGCTGTAAGGAGAAGCTGAGAAATGAT
421 ACCCAGGAGCAGCAGGCTTTACGTCTTCAGCCTAAACCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
481 AATTTAAACAGCTATTAAACTGAAAGCATCTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
541 AAAA

Ilustração 4 - Sequência do RNAm codificador do PIF/DCD com as seqüências alvo das construções de shRNAi-IBC. A seqüência em vermelho corresponde ao alvo do shRNAi-IBC I, amarela, shRNAi-IBC II e em verde, shRNAi-IBC III.

Ilustração 5 - Mapa do vetor viral baseado em lentivirus para expressão de shRNAi. Cada construção foi desenhada para expressão de shRNAi, cuja sequência é complementar ao RNAm do PIF/DCD, o que permite ativar os mecanismos celulares que leva ao silenciamento gênico. A expressão de shRNAi é dirigida pela RNA Pol. III controlada pelo promotor humano U6. O shRNAi representado acima contém as regiões sense e antisense separados pela alça ou *loop*. O vetor viral pLKO puro.1 possui gene de resistência a puromicina controlado pelo promotor humano PGK para seleção dos clones celulares. Esta construção também possui gene para resistência a ampicilina (AMP) e origem de replicação (pUC ori) para permitir a multiplicação do plasmídeo em bactéria. Os cassetes de expressão da puromicina (Puro) e do shRNAi são flanqueados pelas regiões terminais repetidas (LTR) do HIV que permitem a integração no genoma da célula hospedeira. A região 3' LTR possui modificação para a impedir sua auto-inativação após integração (SIN), ou seja, impede a replicação viral na célula. A construção também possui um sinal de empacotamento de RNA (Ψ), elemento de transporte constitutivo (trato central de polipurina) (cPPT) e elemento de resposta reversa (RRE) que aumentam a eficiência de transdução.

2.6 Ensaios de formação de colônias

Neste ensaio, as células selecionadas previamente com puromicina foram transferidas para garrafas de 25 cm² em um número equivalente (100 – 200 células) para cultivo por 3-4 semanas. Após este período, as colônias com mais de 20 células foram contadas em um microscópio óptico em um aumento de 100x e 200x.

2.7 Ensaios de sobrevivência dos clones MDA 361 pLKO e IBC I

Os clones celulares foram cultivados em placas de 96 poços até atingir a confluência. Em seguida, a placa foi dividida em quatro regiões com 24 poços cada aos quais foram adicionados os agentes citotóxicos. Em cada região, os quatros primeiros poços (controles) foram incubados somente com o meio de cultura e soro fetal, nos demais, cada fileira de quatro foram tratadas com concentrações crescentes das drogas: estaurosporina (0.05 – 1 mM) por um período de incubação de 15 horas e TNF- α (10-200 ng/ml), na presença de 5 μ g/ml cicloheximida e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (0,0005% - 0,01%) por um período de incubação de 24 horas. Após esse período, o meio foi retirado e adicionou-se 100 μ l uma solução de 0,5 mg/ml de Methyl Thiazolyl Blue (MTT). Incubou-se por 2 horas e então foi retirada a solução. Em seguida, para a solubilização do MTT foi adicionado 100 μ l de álcool isopropílico a cada poço. Esse volume foi transferido para uma placa nova que foi lida em um

espectrofotômetro de placa da Bio-Rad Modelo 3550 em um comprimento de onda de 585 nm.

2.8 Análise da expressão por imunocitoquímica das duas formas da proteína PIF/DCD nos clones celulares pLKO, IBC I, II e III

Neste ensaio foram utilizados dois anticorpos, um policlonal anti-DCD de coelho que reconhece porção a central da proteína (⁵³RQAPKPRKORSS⁶⁴), o qual foi gentilmente cedido pela Dra. Polyak e o outro monoclonal de camundongo anti-mPIF 24 kDa contra a porção glicosilada da proteína (Todorov et. al., 1996) o qual foi gentilmente cedido pelo Dr Tisdale (Astron University).

Os clones celulares pLKO, IBCI, II e III foram cultivados sobre lamínulas em uma placa de 24 poços até atingir a confluência. Em seguida, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com solução salina-fosfato (PBS), pH 7.2, por 3 vezes de 5 minutos para retirar o meio e soro fetal bovino (SBF). Depois as células foram fixadas com solução contendo metanol e 1% de paraformaldeído e lavadas 3 vezes por 5 minutos em PBS. Em seguida, incubou-se por 30 minutos em solução pré-bloqueadora (PBS, 1% de acetato de sódio e 3% de H₂O₂). Depois, foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos em PBS. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com a solução bloqueadora (PBS, pH 7.2, 3% de gelatina e 0,1% de Triton-x 100) por 1 hora. Após esse período, foi adicionado o anticorpo primário em solução bloqueadora (1:1000). Incubou-se por 2 horas. Depois, a solução contendo o anticorpo foi retirada e lavou-se com a solução bloqueadora por 3 vezes de 5 minutos. Em seguida, incubou-se com o

anticorpo secundário (biotinilado) diluindo na solução bloqueadora (1:1000) por 1 hora. No próximo passo, lavou-se com a solução bloqueadora por 3 vezes de 5 minutos. Adicionou-se, então, uma solução de estreptavidina peroxidase diluída (1:1000) em solução bloqueadora por 30 minutos e lavou-se com a solução bloqueadora por 3 vezes. Para a revelação, as células foram incubadas por 5 minutos com 0,25 mg/ml diaminobenzidina (DAB) em solução salina PBS. Após esse intervalo, adicionou-se 10 µl de uma solução de 0,3 % H₂O₂ e esperou-se o tempo necessário para visualização da coloração marrom no controle positivo. A reação foi parada lavando o material em água corrente. Em seguida, foram desidratadas em álcool 70% por 5 min, álcool 90% por 5 min e 2 vezes no álcool 100% e montadas em solução 50% de glicerol e analisadas ao microscópio óptico. As imagens foram capturadas utilizando um microscópio invertido Olympus BX40 acoplado a uma máquina fotográfica.

2.9 Efeitos biológicos do crescimento dos clones celulares MDA 361 pLKO, IBC I, II e III em camundongos NUDE

Dois grupos de camundongos Nude com 2 e 6 meses de idade proveniente do Biotério do Centro de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) foram mantidos em isoladores no biotério experimental do departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas. Após uma semana de adaptação, os animais velhos (8 meses) foram injetados com 10⁶ células no dorso, marcados, separados em grupos de 5 animais e identificados como se segue: pLKO, IBC I, II e III. O grupo de animais jovens (2 meses) foram

injetados também no dorso com 5×10^6 células suspensas em 100 μ l de Matrigel™ (BD Biosciences) e separados em grupos de 5 animais como se segue: pLKO e IBC I. O crescimento visível do tumor e a variação do peso dos animais foram acompanhados ao longo de 8 semanas. Ao final do experimento, os animais foram sacrificados com excesso de anestésico (0,5 mg Ketamina e 0,002 mg Xilazina via i.p) e dissecados para a retirada de pulmão, coração, fígado, rins, cérebro, baço, músculos *gastrocnemius* e *soleus*, carcaça e o tumor. Todas as amostras foram pesadas e armazenadas a -70°C para futuros ensaios bioquímicos. Uma parte do tumor foi fixada em solução de paraformaldeído 2% para ensaios de imunohistoquímica.

2.10 Análise da expressão por imunohistoquímica das duas formas da proteína PIF/DCD nos tumores derivados dos clones celulares pLKO, IBC I, II e III

Os tumores provenientes dos camundongos Nudes foram fixados por um período de 8 horas em paraformaldeído 2%. Após esse período, as amostras foram desidratadas com duas lavagens em álcool 70%, sendo 30 minutos cada, duas lavagens de 30 minutos em etanol 95% e quatro lavagens em etanol 100%. Em seguida foram diafanizadas com três banhos em xilol, sendo cada banho de 30 minutos. Ao final, as amostras foram impregnadas com dois banhos em parafina (Paraplast Plus) a 60°C , de 1 hora cada. Uma vez impregnado, o material foi colocado em pequenos recipientes contendo parafina fundida, deixando-se endurecer. Após a inclusão, foram feitos cortes de 5 μ m de espessura e as

lâminas foram desparafinizadas com dois banhos em xilol de 10 minutos cada, um banho em xilol-álcool (1:1) por 10 minutos, seguido de banhos em álcool 100%, 95% e 70% por 10 minutos cada e um banho de 10 minutos em água corrente. Ao final desse processo, as lâminas foram utilizadas para a reação de imunohistoquímica.

Para esta etapa foram utilizados os anticorpos para as duas formas da proteína PIF/DCD descritos no item 2.8. A reação foi feita sobre as lâminas confeccionadas no passo anterior seguindo os procedimentos de imunohistoquímica descritos no item 2.8.3. Ao final da reação, as lâminas foram mergulhadas na hematoxilina por 3 minutos, depois lavadas em água corrente, mergulhadas em uma solução de carbonato de lítio e novamente lavadas em água corrente. Depois foram desidratadas, montadas e analisadas em microscópio óptico. As imagens foram capturadas utilizando um microscópio Zeiss acoplado a um sistema de captura de imagem digital da mesma empresa.

2.11 Análise estatística

Os dados apresentados como média $\pm$ erro padrão foram comparados entre si pelo teste t student ou por análise de variância (ANOVA), quando conveniente, utilizando software InStat versão 3.05 (GraphPad, San Diego, CA). Os valores foram considerados significante quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

3 RESULTADOS

3.1 Expressão diferencial de transcritos de PIF/DCD no tecido normal e em linhagens tumorais

Com o intuito de estabelecer padrões de expressão e correlações de malignidade da expressão de transcritos PIF/DCD entre células normais e células malignas, quantificamos a sua expressão em algumas amostras de tecidos normais e linhagens celulares de tumores. A figura 1 mostra a expressão do PIF/DCD obtida por RT-PCR em tempo real nas amostras de pele, mama normal e em algumas linhagens tumorais. Os transcritos desse gene foram encontrados de forma mais abundante na pele com 335 unidades (U), confirmando estudos anteriores (SCHITTEK et al., 2001). A expressão encontrada na mama normal (8 U) foi cerca de 42 vezes menor que na pele (Fig. 1). Estes dados sugerem uma função diferencial do gene na fisiologia da pele e do tecido mamário.

Ao analisar a expressão desse transcrito em linhagens tumorais, observamos que as células MDA-MB-361 apresentaram os níveis mais altos (104 U) dentre todas as linhagens analisadas, sendo que essa expressão foi cerca de 13 vezes maior que na mama normal (Fig. 1). Porém, não foi tão alta como a apresentada pela pele cuja expressão foi três vezes superior as células MDA-MB-361. Dentre outras linhagens avaliadas, a MDA 415 (8 U) mostrou uma expressão correspondente à da mama normal (Fig. 1). As outras linhagens apresentaram uma expressão em níveis mais baixos, segundo a ordem: MDA-MB-175 (2 U) e

ZR 7530 (2 U), carcinoma de mama; A375 (0,6 U), melanoma; e PC3 (0,6 U), carcinoma de próstata. A expressão mais alta do PIF/DCD apresentado pela linhagem tumoral MDA-MB-361 quando comparada com a da mama normal, sugere uma possível participação desse gene no processo tumoral. Portanto, escolhemos essa linhagem como modelo de estudo para mais investigações sobre as funções deste gene no carcinoma de mama.

Figura 1 – Expressão de transcritos do PIF/DCD em tecidos normais e em células de linhagens tumorais por RT-PCR em tempo real. O cDNA obtido da reação de transcrição reversa do RNAm total extraído pelo método Triozol foi amplificado com *primers* específicos. A leitura da reação foi feita no equipamento ABI Prism 7700. Os resultados da expressão foram normalizados em relação à expressão do controle endógeno, gene ribossomal 18S. O resultado é expresso como média dos valores obtidos em três experimentos independentes.

3.2 A expressão constitutiva de shRNA nos clones IBC I, II e III reduziu a expressão do RNAm do PIF/DCD

Em uma segunda etapa deste estudo foram realizados experimentos de transdução de células MDA-MB-361 por vetores virais que expressam shRNAi para três regiões distintas do RNAm do PIF/DCD. Após várias semanas de seleção com puromicina, avaliamos a expressão do RNAm do PIF/DCD por RT-PCR em tempo real. A figura 2 apresenta os resultados da expressão de transcritos de PIF/DCD nos clones estáveis obtidos pela transdução com vetores virais denominados de pLKO (plasmídeo vazio sem expressão do shRNAi) , IBC I, II e III. Em todos os clones IBCs foram detectados níveis mais baixos de expressão para o PIF/DCD em relação ao controle pLKO. O melhor resultado foi obtido no clone IBC I, cuja expressão foi 93,21% menor que a verificada no controle pLKO. Já os clones IBC II e III, o silenciamento foi satisfatório, porém as reduções variaram entre 55% a 70% (Fig. 2). Estes resultados indicam que o shRNAi foi eficiente em induzir o silenciamento do PIF/DCD nesta linhagem celular.

3.3 Redução da expressão das formas não glicosilada e glicosilada de PIF/DCD nos clones que expressam o shRNAi

Uma vez constatado o silenciamento do RNAm do PIF/DCD, verificamos os níveis de expressão da proteína nos clones em ensaios de imunocitoquímica. Para tal, utilizamos os anticorpos contra as duas formas da proteína, a forma

glicosilada (24 kDa) e a forma não glicosilada (11 kDa). Como pode ser observado pela intensidade da coloração marrom (positiva), todos dos os clones IBCs apresentaram uma diminuição significativa na expressão da forma não glicosilada (Fig. 3A). Porém, a expressão da forma glicosilada foi mais evidente nos clones IBC I e II do que no clone IBC III (Fig. 3B). Estes resultados indicam que embora a redução do RNAm para o PIF/DCD não tenha sido total (entre 50-93%) nos clones analisados, percebe-se claramente que houve uma redução expressiva das duas formas variantes da proteína PIF/DCD nos clones IBC I, II e III quando comparada a das células controle positiva (clone pLKO) e negativa (C2C12). Estes dados sugerem que as duas formas de proteínas são sintetizadas a partir do mesmo mensageiro.

Figura 2 – Expressão do PIF/DCD no controle (pLKO) e nos clones IBC I, II e III que expressam shRNAi por RT-PCR em tempo real. O cDNA obtido da reação de transcrição reversa do RNAm total extraído pelo método Trizol foi amplificado com primers específicos. A leitura da reação foi feita no equipamento ABI Prism 7700. Os resultados da expressão foram normalizados em relação á expressão do controle endógeno, gene ribossomal 18S.

A **B**

Figura 3 – Fotos ilustrativas de imunocitoquímica mostrando a expressão das formas da proteína PIF/DCD nos clones celulares pLKO, IBC I, II e III. Em (A) expressão da proteína na forma não glicosilada (11 kDa) nos ensaios com o anticorpo policlonal anti-DCD, aumento 100x. Em (B) expressão da proteína na forma glicosilada (24 kDa) nos ensaios com o anticorpo monoclonal anti-PIF, aumento 200x. Células de mioblastos murino C2C12 são mostrados como controle negativo da reação. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas, sendo repetidos por três vezes nas mesmas condições.

3.4 Avaliação do silenciamento de PIF/DCD no crescimento e resistência celular

Após constatar o silenciamento gênico, realizamos experimentos para avaliar os efeitos biológicos no crescimento celular dos clones em relação aos controles. No primeiro ensaio, verificamos a capacidade de formação de colônia dos clones que está intimamente relacionada com o crescimento celular (Fig. 5). Os dados indicam que o silenciamento gênico provocou uma diminuição expressiva na capacidade de formação de colônias pelos clones IBC I, II e III (15-25 colônias/mm²), quando comparadas as células transfectadas com o plasmídeo pLKO vazio (40-50 colônias/mm²) ($p < 0,001$). Estes resultados sugerem que o PIF/DCD atua como um fator de crescimento das células epiteliais de tumores da mama como sugerido nos estudos de PORTER et al. (2003).

Em seguida foram realizados experimentos para avaliar os efeitos do silenciamento do PIF/DCD na capacidade das células MDA-MB-361 em responder a estímulos citotóxicos. Os ensaios foram feitos com os clones pLKO e IBC I. A indução de estresse oxidativo pelo peróxido de hidrogênio mostrou-se mais tóxicas nas concentrações 0,0012% de 0,01%, para os clones IBC I quando comparado ao controle pLKO ($p < 0,0001$) (Fig. 5A). O tratamento das células com estaurosporina, também resultou em uma acentuada morte celular de forma dose dependente. Mais uma vez, o clone IBC I foi mais sensível que pLKO ($p < 0,0001$) (Fig. 5B). Por último, avaliamos a resistência das células na presença do Fator de Necrose tumoral-alfa (TNF- α) humano. Novamente, o clone IBC I foi

significativamente mais sensível na maior concentração utilizada (200 ng/ml e cicloheximida 5 μ g/ml), quando comparado ao clone pLKO ($p < 0,001$). Porém, em doses menores não houve diferença estatisticamente significativa (Fig. 5C). Tomados em conjunto, estes dados sugerem que o PIF/DCD está envolvido na proteção contra estímulos citotóxicos induzidos pelo TNF- α , estaurosporina e peróxido de hidrogênio. Estes dados estão condizentes com os resultados da literatura que mostram o que PIF/DCD aumenta a sobrevivência celular e a resistência ao estresse oxidativo em células de carcinoma de mama (PORTER et al., 2003) e neurônios (CUNNINGHAM et al., 2002).

Figura 4 - Gráfico de avaliação da capacidade de formação de colônias entre o clone pLKO e clones IBC I, II e III expressando shRNAi para o RNAm PIF/DCD. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de duas triplicatas. * $p < 0,001$ comparado com o controle pLKO.

Figura 5 - Gráficos de sobrevivência celular dos clones pLKO (barras escuras) e IBC I (barras claras) com tratamento com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (A), estaurosporina (B) e Fator de Necrose Tumoral - alfa humano (TNF-α) associado com cicloheximida (5μg/ml) (C). Os resultados representam média ± erro padrão do percentual de sobrevivência em relação às células não tratadas de três experimentos realizados isoladamente. *p<0,001 comparado com o pLKO; **p<0,0001 comparado com pLKO.

3.5 Avaliação dos efeitos metabólicos do crescimento tumoral em camundongos Nude de 2 e 8 meses de idade

A expressão do PIF/DCD tem sido relacionada à indução de caquexia em camundongos e humanos, porém essa relação não está totalmente comprovada (TISDALE, 2002; MONITO et al., 2003). Assim, em seguida foram feitos estudos para avaliar se células MDA-MB-361, que produz as duas formas do PIF/DCD, eram capazes de induzir a caquexia em um modelo animal e se a expressão do shRNAi era capaz de inibir o seu desenvolvimento. Na tentativa de estabelecer o melhor modelo animal para se estudar a caquexia *in vivo* foram realizados dois experimentos com animais Nude com duas idades distintas: animais jovens com 2 meses de idade e animais velhos com 8 meses de idade.

Inicialmente, os clones pLKO e IBC I foram implantados no dorso de camundongos Nude com 8 semanas de idade e a alteração do peso desses animais foi acompanhada ao longo de 6 semanas. O grupo de animais controle e o injetado como o clone IBC I ganharam peso de forma progressiva até a 3ª semana (~2 gramas), depois estabilizaram com aproximadamente 20 gramas (Fig. 6). Já o grupo injetado com o clone pLKO apresentou ganhou de peso de forma progressiva ao longo de todo o experimento, porém de forma mais lenta que os demais (Fig.6). Entre a terceira e quarta semana, pode-se perceber a diferença significativa de peso entre o pLKO com os demais grupos ($p < 0,05$). Ao final do experimento, porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa e os animais terminaram o experimento com cerca de 19 gramas (Fig. 6).

Após 42 dias, os animais foram sacrificados e os órgãos, tumor e tecidos foram dissecados e pesados (peso úmido). Ao final do experimento, o tumor derivado do clone pLKO apresentou um crescimento cerca de 2,5 vezes maior comparado com clone IBC I como mostra a Tabela 2 e figura 8 A. Nesta mesma tabela, podemos observar que os músculos esqueléticos, gastrocnemius e sóleus, e os músculos totais representados pelo peso da carcaça (peso do animal retirado as vísceras, cabeça e pele) apresentaram um peso menor quando comparado aos grupos controle e IBC I ($p < 0,05$). Diferentemente ao que ocorreu com os músculos, o baço e o pulmão dos animais portadores dos tumores derivados dos clones pLKO e IBC I mostraram uma redução significativa comparada com o controle ($p < 0,05$). Nos demais órgãos não ocorreu nenhuma alteração de peso significativa (Tabela 2). Tomados em conjunto, estes dados indicam que o PIF/DCD está envolvido no crescimento do tumor *in vivo* e que o crescimento do tumor influencia de alguma forma no desenvolvimento do animal. Estes resultados também sugerem que o PIF/DCD pode, de alguma forma, atrapalhar o desenvolvimento muscular, uma vez que, quando sua expressão foi silenciada, o peso dos músculos dos animais não diferiram do controle. Por outro lado, o pulmão e o baço dos dois grupos pLKO e IBC I sofreram uma redução de peso de forma semelhante, sugerindo que a presença do tumor e não do PIF/DCD estaria de algum modo influenciando o desenvolvimento desses órgãos.

Figura 6 - Efeito do crescimento do tumor sobre peso dos camundongos Nude jovens de 8 semanas de idade. Os camundongos foram divididos em três grupos e injetados por via subcutânea no dorso como se segue: solução controle (sem tumor), 5×10^6 células de MDA-MB-361 pLKO (pLKO) e MDA-MB-361 ICB I (IBC I), respectivamente ($n = 5$ por grupo). Os pesos foram monitorados a cada dois dias durante 6 semanas. Os resultados representam média $\pm$ erro padrão do peso semanal. As diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por *one-way* ANOVA seguido pelo teste de múltipla comparação Tukey-Kramer. *pLKO comparado com o controle e IBC I ($p < 0,05$).

TABELA 2 - Efeito do crescimento do tumor sobre pesos (em microgramas) da carcaça, órgãos e músculos esqueléticos de camundongos Nude portadores de tumores derivados de células dos clones pLKO e ICB I.

	Controle	pLKO	ICB I	<i>p</i>
Tumor	No	142 ± 40	56 ± 17	0.0152*
Carcaça	8243 ± 417	7176 ± 340	7782 ± 438	0.021**
Músculos esqueléticos				
<i>Gastrocnemius</i>	114 ± 15	96 ± 8	104 ± 4	0.011**
<i>Sóleus</i>	7 ± 1	4 ± 0	7 ± 1	0.0003**
Órgãos				
Coração	116 ± 14	106 ± 7	111 ± 9	0.6092
Rim	155 ± 12	148 ± 8	145 ± 14	0.1903
Pulmão	222 ± 16	185 ± 17	182 ± 21	0.0305***
Baço	154 ± 15	119 ± 13	128 ± 15	0.0294***
Cérebro	432 ± 30	432 ± 19	439 ± 33	0.7726
Fígado	1081 ± 88	1191 ± 120	1140 ± 94	0.4780

Solução controle ou 5×10^6 células de pLKO ou ICB I foram injetadas por via subcutânea no dorso de camundongos Nude de 2 meses de idade ($n = 5$ por grupo). O peso e a ingestão de ração foram monitorados a cada dois dias. No 42º dia os animais foram anestesiados e sacrificados. Amostras de tumor, órgãos e tecidos foram dissecados e pesados. A diferença significativa entre os grupos foi determinada por *one-away* ANOVA seguido pelo teste de múltipla comparação Tukey-Kramer. *pLKO comparado com ICB I; **pLKO comparado com o controle e ICB I; *** Controle comparado com pLKO e ICB I.

Os animais portadores do clone pLKO apresentaram uma perda progressiva do peso até a 6ª semana, sendo estatisticamente significativa a partir da 3ª semana quando comparada ao controle (sem tumor) ($p < 0,05$). O grupo controle ganhou um pouco de peso no início do experimento e se manteve estável até o fim, quando a diferença entre os grupos foi de 16%. (Fig. 7A). Por outro lado, os camundongos portadores dos tumores das células que expressavam o shRNAi para o PIF/DCD não apresentaram redução do peso corpóreo ao longo das 6 semanas (Fig. 7B). Ao final do experimento, a diferença entre os grupos ICBs e

pLKO chegou a 35% ($p < 0,0001$). Estes dados sugerem que, aparentemente neste modelo, o PIF/DCD foi o indutor da perda de peso acentuada apresentada por estes animais, pois quando o gene foi silenciado não ocorreu a alteração no peso dos camundongos.

Ao final do experimento os animais foram sacrificados e seus órgãos, tecidos e tumor foram dissecados e pesados. Os dados da tabela 3 mostram que tumor induzido pela injeção de células do clone pLKO apresentou um peso superior que os demais grupos (Tabela 3). Este dado, embora não estatisticamente significativo, corrobora com os obtidos no experimento anterior, cujo número de células utilizado foi maior (Fig. 8). Neste experimento o que chama atenção é que os músculos esqueléticos, gastrocnemius e sóleus, e a carcaça apresentaram um peso menor quando comparado aos grupos IBC I, II e III ($p < 0,05$) (Tabela 3). O percentual de perda média da carcaça, gastrocnemius e sóleus do grupo pLKO foi de 17%, 23% e 33%, respectivamente. Porém, nenhum outro órgão desses animais foi observado perda de peso. Estes dados sugerem que o PIF/DCD está envolvido diretamente na indução da perda de massa muscular apresentada por estes animais, pois quando a expressão desse gene é silenciada a massa muscular não é alterada.

Figura 7 - Efeito do crescimento do tumor sobre peso dos camundongos Nude de 8 meses de idade. Os camundongos foram divididos em 5 grupos e injetados por via subcutânea no dorso como se segue: Em (A) camundongos injetados com solução controle (sem tumor) e com 1×10^6 células do clone pLKO. Em (B) camundongos injetados com 1×10^6 células do clone pLKO, IBC I, IBC II e IBC III, respectivamente. Os pesos foram monitorados a cada dois dias durante 6 semanas. Os valores expressos em percentagens representam a média $\pm$ erro padrão do ganho ou perda de peso percentual em relação ao peso de cada animal no início do experimento. As diferenças foram significativas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,0001$) quando comparado o grupo pLKO contra os demais grupos.

TABELA 3- Efeito do crescimento do tumor sobre pesos (em microgramas) da carcaça, órgãos e músculos esqueléticos de camundongos nude adultos portadores de tumores derivados de células dos clones pLKO e IBC I, II e III.

	pLKO	IBC I	IBC II	IBC III	<i>p</i>
Tumor	11 ± 6	6 ± 2	8 ± 2	6 ± 2	0.6026
Carcaça	6876 ± 910	8308 ± 470	8147 ± 610	8291 ± 310	0.048*
Músculos esqueléticos					
<i>Gastrocnemius</i>	87 ± 20	110 ± 10	113 ± 8	118 ± 10	0.0066*
<i>Sóleus</i>	6 ± 0.1	9 ± 0.5	9 ± 0.7	8 ± 0.3	0.0001*
Órgãos					
Coração	124 ± 18	119 ± 7	122 ± 17	113 ± 2	0.7484
Rim	139 ± 10	149 ± 13	143 ± 14	145 ± 11	0.3430
Pulmão	178 ± 27	196 ± 7	188 ± 30	186 ± 10	0.2027
Baço	152 ± 30	125 ± 10	105 ± 10	132 ± 30	0.7549
Cérebro	417 ± 15	456 ± 9	470 ± 4	449 ± 10	0.0909
Fígado	1024 ± 18	1223 ± 110	1145 ± 70	1224 ± 27	0.1034

Aproximadamente 1×10^6 células de pLKO ou ICB I, II ou III foram injetadas por via subcutânea no dorso de camundongos Nude adultos de oito meses de idade ($n = 5$ por grupo). O peso e a ingestão de comida foram monitorados a cada dois dias. No 60º dia os animais foram anestesiados e sacrificados. Amostras de tumor, órgãos e tecidos foram dissecados e pesados. A diferença significativa entre os grupos foi determinada por *one-away* ANOVA seguido pelo teste de múltipla comparação Tukey-Kramer. *pLKO comparado com IBC I, II e III.

3.6 Presença das duas formas do PIF/DCD nos tumores derivados de camundongos Nude

Após constatar os efeitos causados pelos tumores implantados nos camundongos Nude, procuramos avaliar se as células depois de implantadas *in vivo* continuavam a expressar as duas formas do PIF/DCD. Através de ensaio de imunohistoquímica, verificamos que o tumor derivado do clone pLKO expressava tanto a forma não glicosilada (Fig 9A) quando a forma glicosilada (Fig. 9B). Porém,

os clones IBC I, II e III não expressavam nenhuma das duas formas (Fig. 9 A e B). Estes resultados indicam que o silenciamento do PIF/DCD por shRNAi foi eficiente e estável, pois mesmo depois de implantadas *in vivo*, os clones IBCs não expressavam nenhuma forma da proteína. Estes dados também sugerem que o efeito biológico observado é referente à ausência (IBCs) ou a presença (pLKO) da proteína PIF/DCD nos tumores.

Figura 8 - Fotos ilustrativas dos camundongos Nude. Em (A) camundongos jovens de 2 meses de idade injetados com 5×10^6 células com 100 μ l de matrigel. Em (B) camundongos adultos velhos de 8 meses de idade injetados com aproximadamente 1×10^6 células. Setas indicam os tumores formados pelos clones pLKO e IBC I.

Figura 9 - Fotos ilustrativas de imunohistoquímica mostrando a expressão das formas da proteína PIF/DCD nos tumores derivados dos clones celulares pLKO, IBC I, II e III retirados dos camundongos Nude. Em (A) expressão da proteína na forma não glicosilada (11 kDa) nos ensaios com o anticorpo policlonal anti-DCD, aumento 200x. Em (B) expressão da proteína na forma glicosilada (24 kDa) nos ensaios com o anticorpo monoclonal anti-PIF, aumento 200x. Como controle negativo da reação tumores derivados do clone pLKO reagiram somente com o anticorpo secundário e passaram por todas as outras etapas. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas, sendo repetidos por duas vezes sobre as mesmas condições.

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

Estudos iniciais mostraram que a proteína PIF/DCD é expressa de forma constitutiva por glândulas écrinas e que exerce função antibiótica, reduzindo o crescimento de vários microorganismos da pele (SCHITTEK et al., 2001). Em seguida, vários estudos mostraram que o gene está superexpresso em alguns subtipos de tumores da mama (PORTER et al., 2003; MARKOVIC, 2003), próstata (WANG et al., 2003) e gastrointestinais (DEANS et al., 2006). Existem fortes indícios de que esta expressão desregulada está envolvida no crescimento e sobrevivência celular (PORTER et al., 2003). Em paralelo a estes estudos, foram realizados trabalhos para verificar uma possível associação da expressão de PIF/DCD e sua atividade na degradação muscular durante a caquexia neoplásica em humanos (MONITO et al., 2004; GARAY-MALPARTIDA, 2005). E, assim, confirmar as evidências de similaridade química e funcional da glicoproteína mPIF identificada em estudos anteriores utilizando um modelo murino de caquexia com os tumores MAC-16 (TORODOV et al., 1996a). Porém, ainda persiste na literatura a controvérsia acerca da glicosilação proteína PIF/DCD em células humanas e de sua associação com a caquexia neoplásica em humanos (WANG et al., 2003; PORTER et al., 2003, MONITO et al., 2004, LOWRIE et al., 2006). No presente trabalho tentou esclarecer o papel desempenhado pelo PIF/DCD no câncer utilizando o silenciamento gênico mediado pelo RNA de interferência. Ao mesmo tempo, realizou-se estudos para verificar a presença das duas formas da proteínas nas células MDA-MB-361 e clones expressando o shRNAi para o PIF/DCD

Em nosso laboratório foi demonstrado que o RNAm do PIF/DCD é expresso constitutivamente em baixas quantidades em mama normal, placenta e testículo (MARKOVIC, 2003). Porém, superexpresso em tumores primários de mama, com metástase em linfonodo, bem como em linhagens celulares de câncer de mama, indicando a possível participação do PIF/DCD no desenvolvimento do tumor (MARKOVIC, 2003). No presente trabalho, ao quantificar a expressão do PIF/DCD em tecidos normais, verificamos que ele está presente em grande abundância na pele, conforme descrito por Schitteck et al. (2001). A expressão na mama normal em pequena quantidade está de acordo com o observado anteriormente (MARKOVIC, 2003; MONITO et al., 2004), sugerindo alguma participação na homeostase deste tecido, ainda não esclarecida.

Para entender o papel do PIF/DCD na biologia da célula tumoral foram realizadas quantificações da expressão do seu RNAm em algumas linhagens de tumores de mama e em outras células tumorais. Dentre as avaliadas, a MDA-MB-361 foi a que apresentou a maior expressão. Esta linhagem é derivada de um carcinoma mamário metastático do cérebro que expressa o receptor para estrógeno e receptor EGF/ERB2 (CALLIAU et al., 1976; ADAMS et al., 1989). Nos ensaios de imunocitoquímica verificamos que estas células produzem ambas as formas da proteína, não glicosilada (11kDa) e glicosilada (24 kDa), mostrando-se um excelente modelo de estudo. Além disso, os estudos realizados anteriormente em nosso laboratório mostraram que o RNAm do PIF/DCD estava superexpresso em amostras de tumores de mama com metástase à distância (MARKOVIC, 2003). Porter et al. (2003) também detectou a superexpressão em 10% das amostras de carcinomas mamários invasivos. Outro ponto que nos chamou a

atenção é que a expressão PIF/DCD também foi detectada em casos de tumores de mama receptor estrógeno positivo (HELMS et al. 2005). Portanto, a linhagem MDA-MB-361 apresenta um perfil muito característico com relação à expressão do PIF/DCD até então relatada.

Apesar dos estudos de superexpressão do PIF/DCD em modelos celulares terem elucidado muitas questões sobre seu papel na biologia da célula tumoral, ainda restava muitas dúvidas que não podiam ser esclarecidas através dessa estratégia (MONITO et al., 2004; GARAY-MALPARTIDA, 2005). Neste trabalho, utilizamos o silenciamento gênico do PIF/DCD nas células MDA-MB-361 para tentar compreender melhor a ação desse gene sobre a célula tumoral e sobre o hospedeiro. Os dados das figuras 2 e 3 mostram que o silenciamento do gene PIF/DCD com as três construções foi eficiente, embora o silenciamento não fosse total, como já foi observado em outros trabalhos utilizando outros genes (ELBASHIR et al., 2001; KROP et al., 2005). As construções IBC I e IBC II apresentaram um silenciamento mais pronunciado das duas formas da proteína, diferentemente ao que ocorreu com a expressão do RNAm, na qual o clone IBC III mostrou uma redução mais significativa do RNAm para o PIF/DCD quando comparado com o IBC I. Provavelmente, algum fator intrínseco a maquinaria de funcionamento do RNAi, até então não elucidada, possa estar envolvido nesta resposta diferencial as três construções utilizadas, como se vê em outros trabalhos utilizando a mesma tecnologia (ELBASHIR et al., 2001; KROP et al., 2005). A expressão dos shRNAi mostrou-se estável em todos os clones após a seleção e mesmo após o implante nos camundongos Nude, como mostraram os experimentos de imunohistoquímica (Fig. 8). Este dado é importante, pois mostra

que o silenciamento estava presente durante os experimentos. Ao utilizar o plasmídeo vazio como controle, mostramos que não foi o ato de transduzir as células que levou a alteração na expressão do PIF/DCD apresentada pelos clones IBCs, uma vez que ambas as proteínas estavam presentes mesmo depois da transdução e seleção no clone pLKO. Contudo, no estudo faltou o controle com os nucleotídeos “embaralhados” ou com alguns pares de bases trocadas para sugerir a especificidade. Por outro lado, a análise da seqüência do RNAm precursor do PIF/DCD não mostrou similaridade com nenhum outro gene do genoma humano (GARAY-MALPARTIDA, 2005). Além disso, análise nos bancos de dados públicos usando a plataforma BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BAST>) para verificar possíveis alvos para os shRNAi, revelou que os shRNAis têm especificidade apenas para o PIF/DCD (dados não mostrados). Além do mais, os resultados dos experimentos *in vivo* foram reprodutíveis para as três construções de shRNAi utilizadas. Portanto, os dados sugerem fortemente que os shRNAi utilizados foram específicos para o PIF/DCD. Contudo, o perfil de expressão gênica por *microarray* da célula MDA-MB-361 e dos clones IBCs estão sendo realizadas para se confirmar esses dados.

Quando procuramos compreender o papel de um gene no câncer, temos que lembrar que a célula tumoral passa um processo evolutivo, isto é, ela tem que se adaptar ao ambiente do hospedeiro adquirindo certas habilidades. Dentre elas, destaca-se aumento da capacidade replicativa, auto-suficiência em fatores de crescimento e evasão da morte celular (HANAHA e WEINBERG, 2000). Estas habilidades estão ligadas intimamente à ação de oncogenes. Os estudos de Porter et al. (2003) sugerem que PIF/DCD é um candidato a oncogene em tumores de

mama. No presente estudo, ao silenciar a expressão do PIF/DCD nas células MDA-MB-361, observa uma significativa ($p < 0,001$) redução na capacidade de formação de colônias (Fig. 5), indicando que essa molécula está envolvida diretamente no crescimento celular. Estes dados foram condizentes com os obtidos anteriormente em nosso laboratório em um modelo de superexpressão de PIF/DCD na linhagem de melanoma B16-F10 (GARAY-MALPARTIDA, 2005) e com os da literatura em células de carcinoma de mama 21NT geneticamente modificadas para superexpressar o PIF/DCD (PORTER et al., 2003) e MCF-7 (MONITO et al., 2004) superexpressando o PIF/DCD. No trabalho de Porter et al. (2003) foi demonstrado que na ausência de soro no meio de cultura, as células 21NT que superexpressavam o PIF/DCD, cresceram mais que o controle, sugerindo uma diminuição na dependência de fatores de crescimento. Em nossos estudos, quando se injetou 5×10^6 células nos camundongos Nude de 8 semanas, os tumores derivados do clone pLKO cresceram mais que o IBC I ($p < 0,05$), indicando que o gene está relacionado com o crescimento do tumor também *in vivo*, embora o mecanismo não seja conhecido (Tabela 1). Monito et al. (2004) também relatou um aumento na taxa de crescimento do tumor *in vivo* quando superexpressou o PIF/DCD em células MCF 7 e injetou em camundongos.

O silenciamento de PIF/DCD também tornou as células MDA-MB-361 mais susceptíveis a agentes citotóxicos. Os dados da figura 6 mostram que o clone IBC-I é mais susceptível a morte celular induzida por estaurosporina e $\text{TNF-}\alpha$, indicando que o PIF/DCD pode de alguma forma proteger estas células da morte celular induzidas por esses agentes. Ao expor as células a H_2O_2

constatamos maiores índices de morte celular na ausência de PIF/DCD (Fig. 6). Resultados similares foram descritos pela literatura. Os estudos de Cunningham et al. (1998, 2000, 2002) evidenciaram que o peptídeo YP-30 derivado do PIF/DCD foi capaz de proteger células neuronais contra os efeitos potencialmente citotóxicos do peróxido de hidrogênio tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Porter et al. (2003) também demonstraram que a linhagem de carcinoma de mama 21NT superexpressando o PIF/DCD foi mais resistente ao estresse oxidativo provocado pela redução de glicose no meio e pela ação da meladiona, um forte indutor de radicais livres de oxigênio na mitocôndria. Recentemente, Lowrie et al. (2006) demonstrou que a transfecção de células hepáticas com o cDNA do PIF/DCD foi capaz de diminuir em 26% a morte celular por necrose induzida por glicose oxidase. No mesmo trabalho, os autores mostraram que a glicosilação não é necessária para produção desse efeito, porém os resíduos de asparagina (N³² e N⁴⁴) são de grande importância, pois quando estes foram substituídos pela alanina através de mutações sítio dirigida, o efeito protetor foi perdido. Portanto, aparentemente, a glicosilação não interfere na proteção celular, bem como na ação de fator de crescimento.

Por outro lado, a literatura tem mostrado que a glicoproteína sulfatada de 24 kDa, encontrada inicialmente em adenocarcinoma murino MAC 16, é capaz de indução da proteólise muscular e caquexia em camundongos (LORITE et al., 1997, 1998; SMITH et al., 1999; HUSSEY et al., 1999). Além disso, várias vias efetoras e de sinalização para essa glicoproteína foram descritas e discutidas, incluindo a via do ácido araquidônico (BELIZÁRIO et al., 1991; SMITH et al., 1998), a ativação do sistema proteolítico ubiquitina proteassoma (LORITE et al.,

1998; WHITEHOUSE et al., 2003a; SMITH et al., 2003a), ativação de caspases (BELIZÁRIO et al., 2001), via de sinalização regulada por fatores de transcrição NF- κ B e STAT 3 (WHITEHOUSE et al., 2003b; WATCHORN et al., 2001, 2003), fosfolipase A2 e quinase MAPK (SMITH et al., 2003a).

Embora esta forma da proteína seja sempre encontrada no tumor de camundongo MAC-16, a sua produção por tumores humanos ainda é incerta. Inicialmente, a glicoproteína foi encontrada por imunodeteção na urina de pacientes com câncer de mama, ovário, pulmão e cólon retal com perda de peso superior a 1 Kg / mês, e em pacientes com câncer de próstata com redução do peso corpóreo maior que 10% (TORODOV et al., 1996a). Porém, quando o cDNA do DCD foi superexpresso em linhagens de tumores de mama 21NT (PORTER et al., 2003) e MCF-7 (MONITO et al., 2004) não foi possível encontrar a forma glicosilada. Além disso, nenhum fenótipo característico da caquexia foi encontrado em camundongos Nude portadores de células MCF-7 superexpressando o gene PIF/DCD (MONITO et al., 2003).

Em contrapartida, em certos tumores humanos como o melanoma G361 (TORODOV et al., 1999) e câncer de próstata PC-3M (WANG et al., 2003) foi encontrada por imunodeteção a glicoproteína de 24 kDa, e o crescimento destes tumores induziu a caquexia em camundongos Nude. Os nossos resultados de imunocitoquímica e imunohistoquímica mostraram que o anticorpo para a glicoproteína murina foi capaz de reconhecer o PIF/DCD de 24 kDa nas células MDA-MB-361. Além do mais, quando o gene PIF/DCD foi silenciado pelo shRNAi a proteína glicosilada foi encontrada em menor quantidade nas células, sugerindo

que esse gene é o responsável sua produção. Contudo, a identidade da proteína reconhecida pelo anticorpo gerado contra glicoproteína murina em células humanas, ainda permanece desconhecida. Não podemos afirmar que a proteína produzida pela célula MDA-MB-361 seja a idêntica glicoproteína murina e que tenha as mesmas propriedades biológicas. Todavia, não podemos excluir totalmente essa possibilidade, pois existe, em alguns tumores, um evento conhecido como glicosilação aberrante que pode adicionar açúcares a proteínas em células tumorais alterando a sua função e promovendo a progressão tumoral (DENNIS et al., 1999; HAKOMORI, 1999).

O significado biológico da glicosilação de proteínas secretadas extracelularmente ainda não está totalmente claro. Existem estudos indicando que ela sirva para evitar degradação de cadeias polipeptídicas de proteínas durante o tráfego na célula e na circulação. Porém, em tumores podem ocorrer eventos de glicosilação aberrante alterando a função primordial da proteína e levando a progressão tumoral e metástase (DENNIS et al., 1999; HAKOMORI, 1999). A adição de açúcares as proteínas é um processo coordenado pela ação de enzimas específicas e muitas delas mostraram-se alteradas em alguns tipos de tumores como câncer de cólon (KEMMER et al., 2003; KANNAGI et al., 2004), próstata (HOLMES et al., 1996), melanoma e leucemias (YOSHIMURA et al., 1995). Este tipo de evento pode, provavelmente, ocorrer com o PIF/DCD em certos tipos de tumores nos quais é encontrada a glicoproteína. Em análises *in silico* foi verificada a presença de um sítio com a probabilidade de ocorrência desse evento (dados não mostrados), sugerindo que esta seja uma provável explicação para a presença da proteína PIF/DCD na forma glicosilada de 24 kDa

em alguns tipos tumorais, porém mais estudos devem ser realizados para se confirmar essa hipótese. Por outro lado, não conhecemos a identidade molecular dessa proteína e não sabemos se ela é realmente glicosilada ou se está ligada à outra molécula resultado no peso de 24 kDa, por obra do acaso. Mais estudos no sentido de purificar e esclarecer a natureza molecular do material reconhecido em células humanas pelo anticorpo produzido contra a glicoproteína murina são necessários.

Os trabalhos iniciais com a glicoproteína isolada do adenocarcinoma murino mostram o seu envolvimento na indução da proteólise muscular e caquexia em camundongos (TORODOV et al., 1996a; LORITE et al., 1997, 1998; SMITH et al., 1999; HUSSEY et al., 1999). Estes estudos mostraram uma relação da presença do PIF/DCD na urina de pacientes com caquexia neoplásica (TORODOV et al., 1996a) e trabalhos posteriores relatam a produção de uma molécula semelhante por linhagens de tumores humanos (TORODOV et al., 1999; WANG et al., 2003). Porém, estudos recentes têm levantado dúvidas acerca da relação da presença do PIF/DCD na urina com o desenvolvimento da caquexia em pacientes humanos com câncer (DEANS et al., 2006; JATOI et al., 2006).

Neste trabalho, tentamos entender o papel desempenhado pelo PIF/DCD, produzido por uma linhagem de células humanas, no tumor *in vivo*, utilizando para tal dois grupos de camundongos Nude com idades distintas. O implante do tumor no grupo de animais jovens não resultou a perda de peso durante o experimento, porém os camundongos tiveram sua taxa de crescimento a partir da terceira semana em relação ao grupo controle e com o gene silenciado (Fig. 6). Isso se deve, em parte, ao crescimento do tumor que foi maior no clone

pLKO que nos outros. A presença do tumor, por si só, foi suficiente para alterar o peso do Pulmão e do baço, como observamos nos animais pLKO e IBC I (Tabela 1). Contudo, o peso dos músculos, representados pela carcaça, gastrocnêmicos e soleus, foi afetado de forma mais expressiva no animais pLKO, cujo peso se diferiu de forma significativa no controle e IBC I ($p < 0,05$) (Tabela 1). Além disso, quando se compara a diferença entre peso do animal IBC I pelo pLKO com a diferença entre a carcaça destes mesmos grupos, observa-se que a perda de peso está diretamente relacionada com a perda da carcaça, ou seja, grande parte da diferença de peso entre os dois grupos se deve a perda muscular (Anexo). Portanto, estes dados indicam que o PIF/DCD afetou diretamente o desenvolvimento muscular nestes animais. Estes dados foram reforçados pelo segundo experimento *in vivo* com os animais velhos de 8 meses de idade. Neste ensaio, o peso do tumor não diferiu estatisticamente entre os clones, isso se deve, provavelmente, ao número menor de células utilizadas neste experimento (1×10^6 células). Como o tumor não se desenvolveu muito, não afetou muito o peso dos órgãos desses animais, que não se diferiram (Tabela 2). Todavia, como ocorreu com o grupo anterior de animais mais novos, o peso da carcaça e dos músculos esqueléticos foram diretamente afetados pela presença do PIF/DCD no grupo pLKO. Aliás, quando se faz a mesma comparação entre a diferença de peso total e da carcaça dos grupos IBCs pelo pLKO notamos que a perda de peso total está, mais uma vez, relacionada com a perda de massa muscular (Anexo). Estes dados indicam que a expressão do PIF/DCD pelo tumor afeta diretamente os músculos esqueléticos dos camundongos Nude.

Embora tenham sido descritas várias vias de degradação muscular induzidas pela glicoproteína murina (BELIZÁRIO et al., 1991; SMITH et al., 1998; BELIZÁRIO et al., 2001; LORITE et al., 1998; WHITEHOUSE et al., 2003a; SMITH et al., 2003a) não podemos afirmar ao certo que essas vias são ativadas pela proteína reconhecida pelo anticorpo contra a proteína murina nas linhagens de células humanas. Uma vez que, em estudos nosso laboratório com a proteína não glicosilada de 11 kDa mostraram que quando essa proteína é injetada em camundongos resulta na perda de peso dos músculos gastrocnêmios e soleus, efeito similar aos nossos resultados (GARAY-MALPARTIDA, 2005). Além disso, músculos isolados de ratos incubados com 5 nM de PIF/DCD (11 kDa) mostraram um aumento na proteólise quando comparado ao controle (GARAY-MALPARTIDA, 2005). No mesmo estudo, ao analisar mais afundo o músculo gastrocnêmio dos animais injetados com o PIF/DCD, observou-se que a perda de massa muscular é parcialmente associada à ativação das vias proteolíticas do sistema ubiquitina-proteassoma e enzimas caspases (GARAY-MALPARTIDA, 2005). Portanto, estes dados sugerem que a proteína PIF/DCD de 11 kDa, sem a glicosilação, pode afetar o músculo esquelético quando produzida de forma aberrante por um tumor.

Monito et al. (2004) reportaram que o implante de células MCF-7 superexpressando o PIF/DCD em camundongos Nude não foi capaz de induzir a perda de peso destes animais. Porém, os autores utilizaram um modelo de suplementação com estrogênio para promover o crescimento tumoral. O estrogênio tem atividade antiinflamatória e em níveis fisiológicos normais ele atenua a produção aberrante de citocinas pró-inflamatórias (KOVACS et al., 2005; POZZI et al., 2006). E como se sabe, a caquexia tem evidentemente uma origem

multifatorial e depende da ação conjunta e sinérgica de diversas citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- α e INF- γ (OLLIF et al., 1987; OLLIF, 1988; TRACEY et al., 1988; FONG et al., 1989; GRUNFELD et al., 1990; ARGILÉS et al., 1999; KUMAR et al., 2003) que, muito provavelmente, geram um quadro inflamatório crônico em resposta ao crescimento e invasão tumoral (ARGILÉS e SORIANO, 1999; TISDALE, 2002; ARGILÉS et al. 2003; RUBIN, 2003). Assim, é possível que a administração do estrógeno possa ter mascarado os resultados de Monito et al. (2004). Um outro fato que chama atenção neste sentido de ação sinérgica do PIF/DCD com outras citocinas, é que o quando o melanoma G361, que produz PIF/DCD, foi implantado em camundongo Nude ele induziu um quadro de caquexia, com perda de peso (TORODOV et al., 1999). Já foi relatado pela literatura que esse tumor também induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e fator inibidor de leucemia (LIF) ambas envolvidas na caquexia (HANADA et al., 2004). Isso reforça a idéia de que é necessário mais de um fator para a indução da caquexia.

Estudos com indivíduos saudáveis revelam que a idade avançada está associada com um estado hiper-inflamatório, referido em inglês como *inflamm-aging* (FRANCESCHI et al., 2000) que se caracterizam por elevação nos níveis circulatórios de fatores pró-inflamatórios tais como: IL1 β , IL-6, TNF- α e prostaglandina E₂ (FRANCESCHI et al., 2000; BRUUNSGAARD et al., 2003; KRABBE et al., 2004; SACHECK et al., 2006). Esse evento pode nos ajudar a entender a discrepância encontrada entre os resultados dos dois grupos de animais, de 2 e 8 meses. O grupo pLKO dos animais mais velho apresentou uma

perda de peso significativa a partir da terceira semana (Fig. 7) o mesmo não ocorreu com o grupo pLKO dos animais jovens (Fig. 6). No primeiro grupo, como se trata de animais velhos, provavelmente os níveis de citocinas pró-inflamatórias estavam elevados, devido ao fato discutido anteriormente, e ao decréscimo no nível de estrogênio, cuja secreção é diminuída durante o envelhecimento e pode ajudar a regular a resposta inflamatória (GOMEZ et al., 2007). Ambos os eventos do envelhecimento podem ter contribuído de forma sinérgica à presença do PIF/DCD no grupo pLKO, resultando na perda de peso mais acentuada neste grupo quando comparada aos demais. Um outro fato que leva a acreditar nesta ação sinérgica das citocinas e do PIF/DCD é que em um experimento piloto, utilizando animais do biotério do ICB que durante a estadia no nosso biotério se mostraram doentes (provavelmente sofreram de uma infecção não esclarecida), os animais do grupo pLKO apresentaram uma profunda perda de peso chegando a 12 gramas, o que não foi visto nos animais injetados com os grupos IBCs (dados não mostrados). Em contrapartida, o segundo grupo, por se tratar de animais mais novos, provavelmente a produção de citocinas pró-inflamatórias deveria estar bem regulada e a produção de estrogênio em níveis normais, o que auxilia no controle da resposta inflamatória (GOMEZ et al., 2007), o que contribuiu, por sua vez, para evitar a perda de peso como no grupo de animais mais velhos. Talvez a ação do PIF/DCD sobre o músculo destes animais não seja necessariamente induzindo a degradação, mas atrapalhando a diferenciação. Estudos no nosso laboratório evidenciaram que o PIF/DCD está envolvido neste processo (FONTES DE OLIVEIRA, 2005). Quando o PIF/DCD foi superexpresso na linhagem de mioblastos C2C12 e estas células foram colocadas em um meio condicionado

para a diferenciação em miócitos, elas entraram em apoptose ao invés de se diferenciarem, sugerindo que o PIF/DCD bloqueava a diferenciação muscular (FONTES DE OLIVEIRA, 2005).

Tomados em conjunto esses dados sugerem que o PIF/DCD é um dos elementos envolvidos na caquexia, porém não age isoladamente na síndrome, ou seja, precisa de outros fatores, como citocinas pró-inflamatórias, para deflagrar esse processo. Estes dados deixam claro que a superexpressão do PIF/DCD pelo tumor tem efeito direto no músculo esquelético. Existem indícios de que a glicosilação não é necessária para produzir esse efeito (GARAY-MALPARTIDA, 2005), porém neste modelo não podemos esclarecer esse fato, uma vez que a célula MDA-MB-361 produz as duas formas da proteína e o silenciamento do gene não seletivo para nenhuma das duas formas, ou seja, durante todos os experimentos contávamos com a presença de ambas as formas. Ademais, não temos certeza de que a proteína reconhecida pelo anticorpo gerado contra glicoproteína murina tem as mesmas características estruturais e funcionais da proteína produzida pelo tumor MAC 16.

Em resumo, com o silenciamento gênico do PIF/DCD foi possível demonstrar seu envolvimento no crescimento e sobrevivência celular, além de sua ação direta sobre o músculo esquelético quando superexpresso no tumor. Além disso, ficou comprovado que o gene PIF/DCD é o responsável para produção da proteína de 24 kDa que é reconhecida pelo anticorpo gerado contra a glicoproteína murina do tumor MAC 16. No entanto, ainda restam dúvidas sobre a natureza molecular do material reconhecido por este anticorpo em tumores humanos. Mais estudos devem ser feitos para se esclarecer a identidade

molecular dessa proteína e esclarecer as vias pelas quais o PIF/DCD atua sobre os músculos esqueléticos.

CONCLUSÕES

5 Conclusões

Considerando os resultados desse estudo podemos concluir que:

1. O gene PIF/DCD está envolvido no crescimento e resistência a estímulo citotóxicos nas células tumorais MDA-MB-361;
2. A superexpressão do gene PIF/DCD pelo tumor acentua sua capacidade de induz perda de peso e massa muscular;
3. O PIF/DCD e outros fatores pró-inflamatórios agem de forma sinérgica para indução da síndrome da caquexia.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADAMS, J.B.; PHILLIPS, N.S.; PEWNIM, T. Expression of hydroxysteroid sulphotransferase is related to estrogen receptor status in human mammary cancer. **J. Steroid Biochem.**, v. 33, n. 4A, p. 637-642, 1989.

ARGILÉS M. J.; LÓPEZ SORIANO J. F. The role of cytokines in cancer cachexia. **Cancer. Treat. Res.**, v. 19, n. 3, p. 223-248, 1999.

ARGILÉS M. J.; MOORE-CARRASCO R.; BUSQUETS S.; FUSTER, G.; BUSQUETS, G.; LÓPEZ-SORIANO J. F. Cancer cachexia: the molecular mechanisms. **Intl. J. Cell Biol.**, v. 35, p. 405-409, 2003a.

BECK, S. A.; 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.

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 substrates by proteases in skeletal muscles from mice undergoing cancer cachexia. **Br. J. Cancer**, v. 84, p. 47-60, 2001.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUMMELKAMP, T. R.; BERNARDS, R.; AGAMI, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. **Science**, v. 296, p. 550-553, 2002.

BRUUNSGAARD, H.; PEDERSEN, B.K. Age-related inflammatory cytokines and disease. **Immunol. Allergy Clin. North Am.**, v. 23, p. 15-39, 2003.

CAILLEAU, R.; CRUCIGER, Q.; HOKANSON, K. M.; OLIVE, M.; BLUMENSCHEN, G. Morphological, Biochemical and Chromosomal Characterization of Breast Tumor Lines from Pleural Effusions. **In Vitro**, v. 72, p. 331-335, 1976.

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 cachectic cancer patients. **Br. J. Cancer**, v. 76, p. 606-613, 1997.

CIPAKOVA, I.; GASPERIK, J.; HOSTINOVA. Expression and purification of human antimicrobial peptide, dermcidin, in *Escherichia coli*. **Protein Expr. Purif.**, v. 45, p. 269-274, 2006.

CUNNINGHAM T. J.; HODGE L.; SPEICHER D.; REIM D.; TYLER-POLSZ K.; LEVITT P. 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.

DALLAS, A.; VLASSOV, A. V. RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potential. **Med. Sci. Monit.**, v. 12, n. 4, p. RA67-RA74, 2006.

DEANS, D. A.; WIGMORE, S. J.; GILMOUR, H.; TISDALE, M. J.; FEARON, K. C.; ROSS, R. A. Expression of the proteolysis-inducing factor core peptide mRNA is upregulated in both tumor and adjacent normal tissue in gastro-oesophageal malignancy. **Br. J. Cancer**, v. 94, n. 5, p. 731-736, 2006.

DENNIS, J. W.; GRANOVSKY, M.; WARREN, C. E. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1473, p. 21-34, 1999.

DEWYS, W. D.; BEGG, C.; LAVIN, P. T.; BAND, P. R.; BENNET, J. M.; BERTINO, J. R.; COHEN, M. H.; DOUGLAS JR, H. O.; ENGSTROM, P.F.; HORTON, J.; JOHNOSON, G. J.; MOERTEL, C. G.; OKEN, M. M.; PERLIA, C.; ROSENBAUM, C.; SILVERSTEIN, M. N.; SKEEL, R. T.; SPONZO, R. W.; TORNEY, D. C. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients Eastern Cooperative Oncology Group. **Am. J. Med.**, v. 69 n. 4, p. 491-497, 1980.

DORSETT, Y.; TUSCHL T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, p. 318-329, 2004.

DYKXHOORN, D. M.; NOVINA, C. D.; SHARP, P. A. Killing the messenger: Short RNAs that silence gene expression. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 4, p. 457-467, 2003.

DYKXHOORN, D. M.; LIEBERMAN, J. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. **Annu. Rev. Med.** V. 55, p. 401-423, 2005.

ELBASHIR, S. M.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W.; YALCIN, A.; WEBER, K.; TUSCHL, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v. 24, n. 411. p. 494-498, 2001.

FENG, G.; KAPLOWITZ. Mechanism of staurosporine-induced apoptosis in murine hepatocytes. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 282, p. 825-834, 2002.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DREVER, S. E.; & MELLO. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.

FONG, Y.; MOLDAWER, L. L.; MARANO, M.; WEI, H.; BARBER, A.; MANOGUE, K.; TRACEY, K. J.; KUO, D. A.; CERAMI, A.; LOWRY, S. F. Cachectin/TNF

induces cachexia with redistribution of body proteins. **Am. Phys. Soc.**, v. 256, p. 659-665, 1989.

FONTES DE OLIVEIRA, C. C. **Efeitos biológicos do PIF/DCD (*Proteolysis-inducing Factor / Dermicidin*) durante o crescimento e diferenciação celular.** Dissertação (Mestrado em Ciências - Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

FRANCESCHI, C.; BONAFA, M.; VALENSIN, S.; OLIVIERI, F.; DE LUCA, M.; OTTAVIANI, E.; DE BENEDICTIS, G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. **Ann. N.Y. Acad Sci.**, v. 908, p. 244–254, 2000.

GARAY-MALPARTIDA, H. M., **Clonagem, expressão e caracterização funcional da proteína hPIF (Human Proteolysis-Inducing Factor).** Tese (Doutorado em Ciências – Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

GITLIN, L.; ANDINO, R. Nucleic acid-based immune system: the antiviral potential of mammalian RNA silencing. **J. Virol.**, v. 77, p. 7759-7765, 2003.

GOMEZ, C. R.; PLACKETT, T. P.; KOVACS, E. J. Aging and estrogen: Modulation of inflammatory responses after injury. **Exp. Gerontol.** In Press, 2006.

GRUNFELD, C.; ADI, S.; SOUED, M.; MOSER, A.; FIER, W.; FEINGOLD, K. R. Search for mediators of the lipogenic effectors of Tumor Necrosis Factor: Potential role for Interleukin 6. **Cancer Res.**, v. 50, p. 4233-4238, 1990.

ACHARYYA, S.; GUTTRIDGE. Cancer cachexia signaling pathways continue to emerge yet much still points to the proteasome. **Clin. Cancer Res.**, v. 13, n. 5, p. 1356-1361, 2007.

HAKOMORI, S. Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 99, n. 16, p. 10231-10233, 2002.

HANADA.; TOSHINAI, K.; DATE, Y.; KAJUMURA, N.; TSUDADA, T.; HAYASHI, Y.; KANGAWA, K.; NAKAZATO, N. Upregulation of ghrelin expression in cachectic

Nude mice bearing human melanoma cells. **Metabolism**, v. 53, n. 1, p. 84-88, 2004.

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

HANCOCK, R. E.; LRHRER, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. **Trends Biotechnol.**, v. 16, p. 82-88, 1998.

HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, v. 418, p. 244-251, 2002.

HANNON, G. J.; ROSSI, J. J. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. **Nature**, v. 431, p. 371-378, 2004.

HELMS, M. W.; PACKEISEN, J.; AUGUST C.; SCHITTEK, B.; BOECKER, W.; BRANDT, B. H.; BUERGER, H. First evidence supporting a potential role for the BMP/SMAD pathway in the progression of oestrogen receptor-positive breast cancer. **J. Pathol.**, v. 206, p. 336-376, 2005.

HIPIFEL, F.; SCHITTEK, B.; BODINGBAUER, Y.; GARBE, C. Specifically regulated genes in malignant melanoma tissues identified by subtractive hybridation. **Br. J. Cancer**, v. 82 p. 1149-1157, 2000.

HOLMES, E. H. Analysis of glycosylation of prostate-specific membrane antigen derived from LNCaP cells, prostatic carcinoma tumors, and serum from prostate cancer patients. **Prostate**, v. 7, p. 25-29, 1996.

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

JATOI, A.; FOSTER, N.; WIELAND, B.; MURPHY, B.; NIKCEVICH, D.; LAPANT, B.; PALCIC, M. M.; BARACOS, V. The proteolysis-inducing factor: in search of its clinical relevance in patients with metastatic gastric/esophageal cancer. **Dis. Esophagus.**, v. 19, n. 4, p. 241-247, 2006.

KANNAGI, N.; KANNGI, R.; IZAWA, M.; KOIKE, T.; MIYAZAKI, K.; KIMURA, N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. **Cancer Sci.**, v.95, n. 5, p. 377-384, 2004.

KEMMBER, W.; ROEFZAAD, C.; HAENASCH.; SCHLAG, P. M. Glycosyltransferase expression in human colonic tissue examined by oligonucleotide arrays. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1821, n. 3, p. 272-279, 2003.

KOVACS, E.J. Aging, traumatic injury, and estrogen treatment. **Exp.Gerontol.**, v. 40, p. 549–555, 2005.

KRABBE, K.S.; PEDERSEN, M.; BRUUNSGAARD, H. Inflammatory mediators in the elderly. **Exp. Gerontol.**, v. 39, p. 687–699, 2004.

KROP, I.; MARZ, A.; CARLSSON, H.; LI, X.; BLOUSHTAIN-OIMRON, N.; HU, M.; GELMAN, R.; SABEL, M. S.; SCHNITT, S.; RAMASWAMV, S.; KLEER, C. G.; ENERBACK, C.; POLYAK, K. A puntative role for psoriasin in breast tumor progression. **Cancer Res.**, n. 65, v. 24, p. 11326-11334, 2005.

KUMAR, S.; KISHIMOTO, H.; CHUA, H. L.; BADVE, S.; MILLER, K. D.; BIGSBY, R. M.; NAKASHATRI, H. Interleukin-1 α promotes tumor growth and cachexia in MCF-7 Xenograft model of breast cancer. **Am. J. Pathol.**, v. 163, p.2531-2541, 2003.

LAI, Y, P.; PENG, Y. P.; ZUO, Y.; HAUNG, J.; WANG, L. F.; WU, Z. R. Functional and structural characterization of recombinant dermcidin-1L, a human antimicrobial peptide. **Biochem. Biophys. Res. Commum.**, v. 328, p. 553-561, 2005.

LAI, Y.; VILLARUZ, A. E.; LI, M.;CHA, D. J.; STURDEVANT, D. E.; OTTO, M. The human anionic antimicrobial defence mechanisms in staphylococci. **Mol. Microbiol.**, v. 63, n. 2 p. 497-506, 2007.

LEMASTERS, J. J. Dying a thousand deaths: Redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis. **Gastroenterology**, v. 129, p. 351-360, 2005.

LIEBERMAN, J.; SONG, E.; LEE, S.K.; SHANKAR, P. Interfering with disease: opportunities and roadblocks to harnessing RNA interference. **Trends Mol. Med.**, v. 9, p. 397-403, 2003.

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.

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.

LOWRIE A., G; WIGMORE, S. J.; WRIGHT D. J.; WADDELL, I. S. ; ROSS. Dermcidin expression in hepatic cells improves survival without N-glycosylation, but requires asparagine residues. **Br. J. Cancer**, v. 94, n. 11, p. 1663-1671, 2006.

MARCOVIK, J. **Expressão gênica do fator de indução de proteólise (PIF) e de sua forma variante (PIF-SV) em células normais e malignas.** Dissertação (Mestrado em Ciências - Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MATTA, H.; HOZAYEV, B.; TOMAR, R.; CHUNG, P.; CHAUDHARY, P. M. Use of Lentiviral Vectors for Delivery of Small Interfering RNA. **Cancer Biol. Therap.**, v. 2, n. 2, p. 206-202, 2003.

MINAMI, Y.; UEDE, K.; SAGAWA, K.; KIMURA, A.; TSUJI, T.; FURUKAWA, F. Immunohistochemical staining of cutaneous tumours with G-81, a monoclonal antibody to dermcidin. **Br. J. Dermatol.**, v. 151, p. 165 – 169, 2004.

MITTAL, V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. **Nat. Rev. Genet.**, v. 5 p. 355-365, 2004.

MONITTO, C. L.; DONG, S. M.; JEN, J.; SIDRANSKY, D. Characterization of a human homologue of proteolysis inducing factor and its role in cancer cachexia. **Clin. Cancer Res.**, v. 10 p. 5862-5869, 2004.

MIYAGISHI, M.; TAIRA, K; U6 promoter-driven siRNA with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. **Nat. Biotechnol.**, v. 20, p. 497-500, 2002.

OLLIF, A. The role of Tumor Necrosis Factor (Cachetin) in Cachexia. **Cell**, v. 54, p. 141-142, 1998.

OLLIF, A.; DEFEO-JONES, D.; BOYER, M.; MARTINEZ, D.; KIEFER, D., VUOCOLO, G.; WOLFE, A.; SOCHER, S. Tumor secreting human TNF/Cachectin induce cachexia in mice. **Cell**, v. 50, p. 555-563, 1987.

PAUL, G. P.; GOOD, P. D.; WINER, I. ENGELKE, D. R. Effective expression of small interfering RNA in human cells. **Nat. Biotechnol.**, v. 20, p. 505-508, 2002.

PORTER D.; WEREMOWICZ S.; CHIN K.; SETH P.; KESHAVIAH A.; LAHTI-DOMENICI J.; BAE, Y. K.; MONITTO, C. L.; MERLO-SUAREZ, A.; CHAN, J.; HULETE, C.; RICHARDSON, A.; MORTON, C. C.; MARKS, J.; DUYAO, M.; HRUBAN, R.; GABRIELSON, E.; GELMAN, R.; POLYAK, K. A neural survival factor is a candidate oncogene in breast cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, n. 19, p. 10931-10936, 2003.

POZZI, S.; BENEDUSI, V.; MAGGI, A.; VEGETO, E. Estrogen action in neuroprotection and brain inflammation. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1089, p. 302-23, 2006.

REIG, S.; GARBE, B.; SAUER, H.; KALBACHER, SCHITTEK, B. Dermcidin is constitutively produced by eccrine sweat glands and is not induced in epidermal cells under inflammatory skin conditions. **Br. J. Dermatol.**, v. 151, p. 534-539, 2004.

REIG, S.; STEFFEN, H.; SEEGER, S; HUMMER, A.; KALBACHER, H.; DIETZ, C.; GARBE, C.; SCHITTECK, B. Deficiency of dermicidin-derived antimicrobial peptides in sweat of patients with atopic dermatitis correlates with an impaired innate defense of human skin in vivo. **J. Immunol.**, v. 174, p.8003-8010, 2005.

REIG, S.; SEEGER, S; STEFFEN, H. HUMMER, A.; KALBACHER, H.; STEVANOVIC, S.; KIMURA, A.; GARBE, C.; SCHITTECK, B. Generation of multiple stable Dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of different body sites. **J. Invest. Dermatol.**, v. 126, n. 2, p. 354-365, 2006.

RUBIN, H. Cancer cachexia: Its correlations and causes. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA.**, v. 100, n. 9, p. 5384-5389, 2003.

SACHECK, J. M.; CANNON, J. G.; HAMADA, K.; VANNIER, E.; BLUMBERG, J. B.; ROUBENOFF, R. Age-related loss of associations between acute exercise-induced IL-6 and oxidative stress. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 291, n 2, p. E340-E349, 2006.

SAGAWA K.; KIMURA A.; SAITO Y.; INOUE H.; YASUDA S.; NOSAKA M. 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.

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

SMITH, K. L.; TISDALE, M. J. Mechanism of muscle protein degradation in cancer cachexia. **Br. J. Cancer**, v. 68, p. 314-318, 1993.

STEFFEN, H.; RIEG, S.; WIEDEMANN, I.; KALBACHER, H.; DEEG, M.; SAHL, H.G.; GÖTZ, F; GARBE, C.; SCHITTECK, B. Naturally processed Dermcidin-derived do not permeabilize bacterial and kill microorganisms irrespective of their charge. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 8, p. 2608-2620, 2006.

TISDALE, J. M. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, v. 17, p. 438-442, 2001.

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

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

TISDALE M. J. Tumor-Host Interactions. **J. Cell. Biochem.**, v. 98, p. 871-877, 2004.

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

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

TRACEY, K. J.; WEI, H.; MANOGUE, K. R.; FONG, Y.; HESSE, D. G.; NGUYEN, H. T.; KUO, G. C.; BEUTLER B.; COTRAN R.S.; CERAMI, A.; LOWRY S. F. Cachetin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia and inflammation. **Exp. J. Med.**, v. 167, p. 1211-1227, 1988.

VOUNG, G.; VOYICH, J. M.; FISCHER, E. R., BRAUGHTON, K. R., WHITNEY, A. R.; DeLEO, F. R.; OTTO, M. Polysaccharide intercellular adhesion (PIA) protects *Staphylococcus epidermis* against major components of the human innate immune system. **Cell Microbiol.**, v. 6, p. 269-275, 2004.

WANG Z.; COREY E.; HASS M. G.; HIGANO C. S.; TRUE L. D.; WALLACE D. Jr., TISDALE M.J.; VESSELA R.L. 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.

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

ZUFFERY, R.; NAGY, D.; MANDEL, R. J.; NALDINI, L.; TRONO, D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. **Nat. Biotechnol.**, v. 15, p. 871-875, 1997.

ANEXO

Figura 10 -Correlação entre o peso corpório total e o peso da carcaça dos camundongos pKLO e IBC I dos grupos de 2 meses e 8 meses de idade. A relação foi obtida subtraindo-se os pesos dos grupo IBC I pelo