

DAYSON FRIAÇA MOREIRA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES
ENVOLVIDOS NA VIA DE SINALIZAÇÃO INDUZIDA PELA
PROTEÍNA DERMICIDINA NO CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2011

DAYSON FRIAÇA MOREIRA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES
ENVOLVIDOS NA VIA DE SINALIZAÇÃO INDUZIDA PELA
PROTEÍNA DERMICIDINA NO CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Ernesto Belizário.

Versão original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Moreira, Dayson Friaça.

Avaliação da expressão de genes envolvidos na via de sinalização induzida pela proteína Dermicidina na câncer de mama / Dayson Friaça Moreira. -- São Paulo, 2011.

Orientador: José Ernesto Belizário.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Biologia da célula tumoral.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the expression of genes involved in signaling pathway induced by the protein Dermcidin in breast cancer

Descritores: 1. Câncer de mama 2. Dermicidina 3. Família EGF/ErbB 4. Fator de crescimento I. Belizário, José Ernesto II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0216/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Dayson Friaça Moreira.

Título da Tese: Avaliação da expressão de genes envolvidos na via de sinalização induzida pela proteína Dermicidina na câncer de mama.

Orientador(a): José Ernesto Belizário.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a):
Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a):
Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a):
Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a):
Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Presidente:
Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Esta tese foi realizada no Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro da **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), de onde o aluno foi bolsista (Processo nº2007/59800-5).



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

São Paulo, 25 de agosto de 2008.

PARECER 849/CEP

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 87ª reunião realizada em 25.08.08, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Avaliação da expressão de genes envolvidos na via de sinalização induzida pela proteína demícidina No Câncer De Mama*".

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

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **25 de agosto de 2009.**

Atenciosamente,

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

Ilmo. Sr.
DAYSON FRIANÇA MOREIRA
Departamento de Farmacologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

À minha querida mãe Nelma Friaça (*in memórian*) por toda sua história;

Ao meu querido pai, por todo apoio e exemplo de retidão de caráter;

Aos meus irmãos, Dênio e Dayse, pelo seu constante apoio e encorajamento;

À minha Tia Nelma, pelo apoio e confiança;

À minha querida Cristiane, por todo amor, companheirismo e cumplicidade.

AGRADECIMENTOS

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

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

À minha grande amiga Guiomar, 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 nesses anos de maravilhosa convivência.

Aos meus amigos Juan Aliaga, Marcelo e Lídia, pela amizade, companheirismo e pelas conversas sempre animadas e divertidas.

À minha querida amiga Emari por todo o seu auxílio na correção deste trabalho.

Aos queridos amigos do laboratório, Beatriz, Paulo, Ana Maria, Olívia e Manar, pela amizade e companheirismo durante esses anos. Vocês sempre serão lembrados com muito carinho. Creio que ainda faremos grandes colaborações nessa carreira maravilhosa que abraçamos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da Bolsa de Doutorado durante meu período de estudo.

Aos queridos amigos e funcionários do ICB, Mauro, Larissa e Selma, pelo constante apoio no desenvolvimento técnico deste trabalho e pelas grandes conversas.

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

À Dra. Glaucia, do Departamento de Biologia Celular e do desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pelas facilidades concedidas no seu laboratório.

À Dra. Kornelia Polyak, do Dana-Faber Cancer Institute of Harvard Medical School, pela constante colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

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.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein.

Resumo

MOREIRA, D. F. **Avaliação da expressão de genes envolvidos na via de sinalização induzida pela proteína Dermicidina no câncer de mama.** 2011. 139 f. Tese (Doutorado em Farmacologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. Em 2003, um estudo mostrou evidências que a Dermicidina (DCD), uma proteína de 110 kDa identificada na pele e no cérebro humano, poderia atuar como um oncogene devido sua expressão desregulada durante a progressão dos carcinomas de mama ductal *in situ* para carcinomas invasivos. Desde então, vários estudos mostraram que a DCD é capaz de induzir a proliferação e sobrevivência celular, porém, os mecanismos envolvidos ainda não são conhecidos. Para compreender melhor este papel da DCD foram geradas sublinhagens de células do carcinoma mamário luminal MDA-MB-361 na qual a expressão do gene DCD esta silenciada pela expressão de RNA interferente. Em seguida, foram feitos ensaios de microarranjo de DNA para identificar os genes diferencialmente expressos entre as sublinhagens. Entre os 235 genes alterados pelo silenciamento, encontramos 208 com uma expressão reduzida, e 29 genes com a expressão aumentada. Nos estudos de bioinformática de formação de vias canônicas e redes de sinalização encontrou-se que a via de sinalização EGF/ErbB era a mais afetada pela o silenciamento do DCD. Os ensaios de qPCR de expressão relativa de todos os membros da família EGF/ErbB mostraram que expressão de EGFR estava reduzida enquanto de HER-4 aumentada na sublinhagem silenciada. A taxa de expressão dos transcritos dos ligantes BTC, AREG, HB-EGF e NRG4 foi regulada negativamente, enquanto a expressão de EREG, NRG2 e NRG3 foi regulada positivamente. A via de sinalização mediada por EGF/ErbB foi avaliada por ensaios de Western blot nos quais ficou comprovado uma redução da fosforilação de EGFR, AKT, MAPK e STAT3, além da diminuição da expressão proteica de ciclina B e C-myc. O silenciamento também promoveu um aumento na expressão dos transcritos de VEGF A e B, enquanto a expressão do supressor tumoral TXNIP foi reduzida. O tratamento das células MDA-MB-361 com a proteína DCD recombinante resultou em uma curva de proliferação em forma de sino. O mesmo foi observado em relação à expressão dos transcritos para EGFR e C-myc, sendo o oposto observado para o p21. A taxa de expressão do RNAm para os ligantes EGF, HB-EGF e NRG-3 também foi aumentada pelo tratamento com DCD. A linhagem MDA-MB-361 possui amplificação de HER-2, assim analisamos os efeitos da superexpressão do gene DCD na linhagem MCF-7 que expressa níveis basais desse gene. A expressão constitutiva de DCD na sublinhagem MCF-7 DCD resultou em um aumento significativo do crescimento e sobrevivência celular. A taxa de expressão dos transcritos para os receptores de EGFR e HER-2 e dos ligantes AREG, EGF, HB-EGF, NRG3 e NRG4 foram aumentadas, porém a de TGF- α e TXNIP foram reduzidas. A superexpressão de DCD também promoveu a ativação da via de sinalização EGF/ErbB avaliada pela fosforilação de EGFR, AKT, STAT3, MAPK e ERK na linhagem MCF-7 DCD. Além disso, a expressão proteica de ciclina B e C-myc foram aumentadas, sendo o inverso observado para o p27. Tomados em

conjuntos, os dados sugerem que o DCD é capaz de modular a expressão dos receptores e ligantes da família EGF/ErbB resultando na ativação das vias de sinalização intracelular, que devem atuar de maneira sinérgica na indução do crescimento e sobrevivência celular dos tumores de mama positivos para a DCD.

Palavras-chaves: Câncer de mama. Dermicidina. Família EGF/ErbB. Fator de crescimento.

Abstract

MOREIRA, D. F. **Identification of genes involved in signaling pathway induced by the Dermicidin in breast cancer.** 2011. 139 f. Ph.D. Thesis (Pharmacology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

Breast cancer is the second most common cancer worldwide and the most common among women. In 2003, a study suggested that Dermicidin (DCD), a 110 kDa protein identified in human skin and brain, could act as an oncogene because of its upregulation during the progression of ductal carcinoma in situ (DCIS) to invasive breast carcinomas. Since then, several studies showed that DCD is able to induce cell proliferation and survival, however, the mechanisms involved are not yet known. To better understand this role of DCD, we generated cell lineages of luminal-like mammary carcinoma MDA-MB-361 in which the expression of DCD gene expression is silenced by shRNA. Next, we applied DNA microarray to identify genes differentially expressed between control and shRNA expressing lineages. Among the 235 genes altered by DCD silencing, we found 208 with a reduced expression and 29 genes with increased expression. Bioinformatics analysis for networks and canonical pathways revealed that the EGF/ErbB canonical signaling pathway was the most affected by the silencing of DCD. Real time PCR analysis for all members of the EGF/ErbB family showed that EGFR expression was reduced while HER-4 increased in shRNA expressing cell lines. The expression of transcripts of the BTC, AREG, HB-EGF and NRG4 was negatively regulated, whereas expression of EREG, NRG2 and NRG3 was positively regulated. The signaling pathway mediated by EGF/ErbB was assessed in these cell lines by Western blot analysis. We observed a reduction of phosphorylation state of EGFR, AKT, MAPK and STAT3, in addition to decreased protein levels of cyclin B and C-myc. The DCD silencing also promoted upregulation in the expression of VEGF A and B, while the expression of tumor suppressor TXNIP was reduced. Treatment of MDA-MB-361 cells with the recombinant DCD protein resulted in a proliferation increase that follows a bell-shaped curve. The same was observed for mRNA expression levels for EGFR and C-myc, whereas the inverse was observed for p21. The transcription rate of mRNA for the ligands EGF, HB-EGF and NRG-3 was also increased by treatment with DCD. The MDA-MB-361 cell lineage has HER-2 amplification, so we analyzed the effects of overexpression of the DCD gene in MCF-7 cell line that expresses basal levels of this gene. The constitutive expression of DCD in the MCF-7 DCD cell line resulted in a significant increase in growth and cell survival. The expression rates of transcripts for the EGFR and HER-2 and their ligands AREG, EGF, HB-EGF, and NRG3 NRG4 were increased, but the expression for TGF- α and TXNIP were reduced. Overexpression of DCD also promoted the activation of the EGF/ErbB signaling pathway which was assessed by phosphorylation of EGFR, AKT, STAT3, ERK and MAPK. In addition, the protein expression of cyclin B and C-myc were increased, and the p27 protein decreased in MCF-7 DCD cell lineage. Taken together, the data suggest that DCD is able to modulate the expression of

receptors and ligands of the EGF/ErbB family as well as the activation of downstream signaling pathways, which could act in a synergistic manner to the increase in cell growth and survival of breast tumors positive to DCD.

Key-words: Breast cancer, Dermcidin, EGF/ErbB family, oncogenesis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AREG - Anfiregulina

ATP - Adenosina trifosfato

AKT - Proteína homóloga ao oncogene murino viral timoma v-akt.

BTC - Betacelulina

BrdU - Bromodesoxiuridina

cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar

CDC42 - Proteína do ciclo de divisão celular 42

C-myc - Oncogene viral homólogo a mielocitomatose aviária

Ct - Ciclo limiar (*Threshold Cycle*)

DAB - Diaminobenzidina

DAPI - 4, 6-diamidino-2-fenilindol

DAVID - The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery

DICS – Carcinoma Ductal *in situ*

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

dATP - Desoxiadenosina trifosfatada

dCTP - Desoxicitidina trifosfatada

dGTP - Desoxiguanosina trifosfatada

dTTP - Desoxitimidina trifosfatada

DCD - Dermicidina (*Dermcidin*)

DCDr – Proteína Dermicidina recombinante

DNA - Ácido desoxidoribonucleico

DSEP - *Diffusible Survival Evasion Peptide*

DTT - Ditioneitol

EGF - Fator de Crescimento Epitelial

EGFR - Receptor do Fator de Crescimento Epitelial

ER - Receptor de Estrógeno

EREG - Epiregulina

FGF - Fator de Crescimento de Fibroblasto

FITC - Fluoresceína

GDF15 - Fator de Crescimento e Diferenciação 15

GTP - Guanosina trifosfatada

HB-EGF - Fator de Crescimento Similar ao EGF – ligado à Heparina

HER-2 - Receptor do Fator de Crescimento Epitelial Humano tipo 2

HER-3 - Receptor do Fator de Crescimento Epitelial Humano tipo 3

HER-4 - Receptor do Fator de Crescimento Epitelial Humano tipo 4

HGF - Fator de Crescimento de Hepatócitos

HIF 1 α - Fator Induzido por Hipóxia 1 alpha

HPRT - Hipoxantina-guanidina fosforibosiltransferase

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

IBC I - *Invasive Breast Cancer-1*

IFN- γ - Interferon- γ

IGFR-1 - Receptor do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IP - Imunoprecipitação

kDa - Kilodaltons

LIF - Fator inibidor da leucemia

M - Molar

mg - Micrograma

mL - Mililitro

µg - Micrograma

µL - Microlitro

µM - Micromolar

nM - Nanomolar

nm - Namômetro

mTOR - Alvo celular da Rapamicina

MTT - *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*

NRG1 - Neuregulina 1

NRG2 - Neuregulina 2

NRG3 - Neuregulina 3

NRG4 - Neuregulina 4

°C - Graus Celsius

pAKT 308 - Proteína AKT fosforilada na serina 308

pAKT 473 - Proteína AKT fosforilada na treonina 473

pb - Pares de bases

PBS - Tampão Fosfato/Salino

PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta

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

PI3K - Fostatidil-Inositol 3-Kinase

PgR - Receptor de Progesterona

pERK - Proteína Quinase Regulada por Sinal Extracelular Fosforilada
(*Extracellular signal-Regulated Kinases*)

pMAPK - Proteína Quinase Ativada por Mitógeno Fosforilada (*Mitogen-activated protein kinase*)

pTyr - Tirosina Fosforilada

qPCR - Reação da Polimerase em Cadeia Auantitativa

RAC1 - Substrato 1 Relacionado a Ras Toxina Botulínica C3

RNA - Ácido ribonucléico

RNAi - RNA de interferência

RNAm - RNA mensageiro

RT-PCR - Reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

SAGE - Técnica de Análise Seriada da Expressão Gênica

SBF - Soro Fetal Bovino

siRNA - RNA de interferência de tamanho pequeno

shRNA - RNA de Interferência em Formato de Grampo

Src - Proteína humana homóloga codificada pelo gene v-src de sarcoma aviário

STAT3 - Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3

TBS - Tampão Tris Fosfato

TBS-t – Tampão Tris Fosfato acrescido de 0.2% de Tween.

TGF- α - Fator de Transformação e Crescimento alfa

Tm - Temperatura de temperatura de anelamento (*melting*)

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TXN - Tioredoxina

TXNIP - Proteína de interação com a Tioredoxina (*Thioredoxin Interacting Protein*)

VEGFA - Fator de Crescimento Endotelial Vascular A

VEGFB - Fator de Crescimento Endotelial Vascular B

VEGFR - Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular

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

Sumário

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 As diferentes atividades biológicas associadas ao gene Dermicidina	23
1.2 Potencial oncogênico do gene Dermicidina	26
1.3 A relação entre o câncer de mama e o gene Dermicidina	29
1.4 A família de receptores e fatores de crescimento EGF/ErbB	32
1.5 Objetivos	36
1.5.1 <i>Objetivo Geral</i>	36
1.5.2 <i>Objetivos específico</i>	36
2 MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.1 Linhagens celulares e cultivo	37
2.2 Análise da expressão global de genes diferencialmente expressos	37
2.2.1 <i>Ensaio de Microarranjo de oligonucleotídeos (DNA microarray)</i>	37
2.2.2 <i>Plataforma e softwares de análise de dados de expressão gênica</i>	38
2.3 Extração de RNA e síntese de cDNA pelo método da Transcriptase reversa	39
2.4 Amplificação gênica por RT-PCR em tempo real (qPCR)	40
2.5 Western Blot	42
2.6 Imunofluorescência	44
2.7 Tratamento da sublinhagens celulares com EGF	46
2.8 Imunoprecipitação	46
2.9 Ensaio de proliferação celular pela incorporação de BrdU	47
2.10 Ensaio de crescimento celular e formação de colônias	48
2.11 Análises de viabilidade celular pelo método do MTT	48
2.12 Análise estatística	48
3 RESULTADOS	50
3.1 Análise dos genes alterados pelo silenciamento do gene DCD nas sublinhagens de células MDA-MB-361	50

3.2 DCD modula a expressão dos membros da família EGF/ErbB e seus ligantes nas células MDA-MB-361	65
3.3 O silenciamento do DCD nas células MDA-MB-361 reduz a ativação das vias de sinalização mediadas pelo receptor de crescimento EGFR	69
3.4 O silenciamento do DCD na linhagem MDA-MB-361 reduz a expressão de C-myc e ciclina B	70
3.5 Silenciamento de DCD aumenta a expressão de VEGFA, VEGFB e reduz a expressão de TXNIP nas células MDA-MB-361	71
3.6 Tratamento das células MDA-MB-361 com a proteína DCD recombinante modula a expressão de EGF/ErbB, C-myc e p21	72
3.7 A superexpressão de DCD nas células MCF-7 aumenta a proliferação e resistência celular	75
3.8 A superexpressão de DCD nas células MCF-7 aumenta expressão dos receptores EGF/ErbB e de seus ligantes	78
3.9 A superexpressão do gene DCD nas células MCF-7 inibe a expressão do gene TXNIP	81
3.10 DCD ativa as vias de sinalização mediadas pelo EGFR nas células MCF7	81
3.11 A superexpressão de DCD nas células MCF-7 aumenta a expressão de C-myc, Ciclina B e reduz a expressão de p27	86
4 DISCUSSÃO	89
5 CONCLUSÕES	111
REFERÊNCIAS	112
ANEXO I	127
ANEXO II	128

1 Introdução

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. Em todo o mundo, cerca de 1.38 milhões de mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama em 2008 e, aproximadamente, 458 mil morreram devido a essa doença no mesmo ano (FERLAY et al., 2008). No Brasil são esperados cerca de 50 mil novos casos em 2010. Trata-se da maior causa de morte entre as mulheres brasileiras, principalmente na faixa entre 40 e 69 anos, com mais de 11 mil mortes confirmadas durante o ano de 2008 no país (fonte: www.inca.com.br - Instituto Nacional de Câncer-INCA).

A história natural do câncer de mama envolve a progressão através de estágios patológicos e clínicos definidos. Inicialmente, as células epiteliais da mama sofrem uma transformação, o que leva a uma hiperproliferação *in situ*, com a subsequente evolução para um carcinoma *in situ* (DCIS), progredindo para um carcinoma invasivo, que resulta em uma doença metastática (POLYAK, 2007; LOPES-GARCIA et al., 2010). Embora tenhamos evoluído muito na habilidade de detectar a doença em seu estágio inicial, a nossa compreensão sobre os fatores envolvidos na progressão tumoral e a capacidade de interferir nesse processo está ainda muito limitada (POLYAK, 2007; LOPES-GARCIA et al., 2010).

Diversos estudos têm demonstrado que DCISs são os precursores dos carcinomas invasivos, porém, como eles são um grupo bastante heterogêneo, nem sempre se tornarão invasivos (POLYAK, 2007; LOPES-GARCIA et al., 2010). Diante desse cenário, o principal desafio é determinar se um DCIS irá ou não progredir para uma doença invasiva. Neste sentido, Porter et al. (2003a) realizaram um estudo comparativo de expressão gênica seriada entre amostras de DCISs e carcinomas invasivos da mama a fim de encontrar genes que pudessem diferenciar os dois grupos e assim servirem de marcadores gênicos para um prognóstico mais acurado da doença. No referido trabalho, os autores reportaram que o gene Dermicidina (DCD) estava presente em 78% das amostras de

carcinomas invasivos, porém sua expressão não foi detectada nos DCISs e portanto, poderia servir como um bom marcador para tumores invasivos (PORTER et al. 2003a). Em um trabalho subsequente, o mesmo grupo demonstrou que o gene DCD estava superexpresso em 10% de tumores invasivos de mama (PORTER et al., 2003b).

O DCD é expresso constitutivamente na pele onde parece exercer uma atividade antimicrobiana (SCHITTEK et al., 2001) e em neurônios cerebrais onde exerce um efeito neuroprotetor (CUNNINGHAM et al., 1998, 2000, 2002). Já a expressão ectópica em tumores tem sido relacionada com o aumento da proliferação e sobrevivência celular (PORTER et al., 2003b, MONITTO et al., 2004, GARAY-MALPARTIDA, 2005; PÁDUA-BORGES, 2006, LOWRIE et al., 2006, STEWART et al., 2007, LOWRIE et al., 2011). Entretanto, o mecanismo pelo qual o DCD exerce suas atividades oncogênicas ainda não foi esclarecido. Ao longo deste trabalho, será discutido o potencial oncogênico do gene DCD e sua relação com o câncer de mama. Espera-se avançar um pouco mais na compreensão do mecanismo pelo qual o DCD exerce suas atividades oncogênicas no câncer de mama.

1.1 As diferentes atividades biológicas associadas ao gene Dermicidina

O DCD começou a ser estudado no ano de 2000, quando seu RNA mensageiro (RNAm) foi identificado em uma biblioteca de DNA complementar (cDNA) produzida a partir de um extrato celular derivado da pele, dendrócitos e melanócitos (HIPFEL et al., 2000). Trabalhos posteriores demonstraram que este transcrito codifica um polipeptídeo de 110 aminoácidos que dá origem a uma proteína de 11 kDa (SCHITTEK et al., 2001; CUNNINGHAM et al., 2002). Em seguida, o gene foi mapeado no cromossomo 12, *locus* 12q13.1 (PORTER et al., 2003b). Estudos estruturais da proteína revelaram que ela se encontra no grupo de proteínas intrinsecamente desestruturadas (MAJCZAK et al., 2007). Contudo, quando exposta em condições experimentais ao trifluoroetanol, a região C-terminal, correspondente a DCD-1, apresenta uma estrutura composta por α -hélices e folha β -pregueada (LAI et al., 2005; MAJCZAK et al., 2007; JUNG et al., 2010). Esta aparente falta de estrutura pode ajudar a explicar, em parte, as diferentes atividades biológicas a ela relacionadas, como descritas a seguir.

O nome Dermicidina foi dado por Schitteck et al. (2001) que demonstraram sua expressão na pele humana. Esses autores também descreveram que a proteína codificada por esse gene é processada proteoliticamente no suor dando origem a vários peptídeos, dentre eles, o peptídeo DCD-1L (Ilustração 1) derivado de sua porção C-terminal com atividade microbicida contra *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas putida*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* entérica (SCHITTEK et al. 2001; VOUNG et al., 2004; LAI et al., 2005; CIPAKOVA et al., 2005).

O gene da Dermicidina foi também chamado de *diffusible survival evasion peptide* por Cunningham et al. (2002). Nos primeiros trabalhos desse grupo, os autores encontraram um peptídeo em um meio condicionado por neurônios após estresse oxidativo com propriedades neuroprotetoras (CUNNINGHAM et al., 1998). Em seguida, o grupo demonstrou que a administração do peptídeo

diretamente no cérebro de ratos ou por via endovenosa foi capaz de proteger as células neuronais da morte celular induzida pelo peróxido de hidrogênio, além de evitar a atrofia local após lesão cirúrgica. Por causa dessas propriedades, o grupo o denominou de *Survival peptide Y* ou Y-P30 (CUNNINGHAM et al., 2000). Em 2002, o grupo encontrou em uma base de dados um cDNA que codificava uma proteína que continha em sua porção N-terminal a sequência exata do peptídeo Y-P30 (Ilustração 1). Eles, então, superexpressaram este gene nas células das linhagens de hipocampo de camundongo HN33.1 e de neuroblastoma humano SH-SY5Y e demonstraram que essas células tornaram-se mais resistentes ao estresse oxidativo (CUNNINGHAM et al., 2002). A sequência do cDNA utilizada pelo grupo é idêntica a do DCD, ou seja, tratava-se do mesmo gene. Como Schittek et al. (2001) publicaram primeiro, o nome Dermicidina foi mantido. O nosso grupo também observou que a pré-administração por via endovenosa da proteína DCD recombinante, tanto em ratos quanto em camundongos, previne os efeitos neurotóxicos do ácido cáínico, um potente indutor de morte neuronal e de síndrome epilética, confirmando, assim, a atividade neuroprotetora da Dermicidina (PERSIKE, 2005).

Alguns autores têm sugerido que a proteína pode sofrer processamento pós-traducional, sendo clivada e glicosilada na sua região N-terminal, resultando na produção do fator indutor de proteólise muscular (Proteolysis-Inducing Factor, PIF) uma glicoproteína sulfatada purificada primeiramente no adenocarcinoma murino MAC 16 (TODOROV et al., 1996). A expressão dessa glicoproteína pelo tumor tem sido relacionada à indução da proteólise muscular durante a caquexia neoplásica em camundongos e humanos (BELIZARIO et al., 1991, TODOROV et al., 1996, 1997).

A suspeita de que o gene DCD codifique esse fator em humanos existe porque parte da sequência N-terminal da proteína DCD possui homologia à porção peptídica da glicoproteína murina (Ilustração 1) (TODOROV et al., 1997). No entanto, Monitto et al. (2004), ao superexpressar o gene DCD nas linhagens celulares MCF-7, BT-20, MAC 16, MAC 13 e HEK 293, não detectaram a presença da glicoproteína PIF nessas células, mas demonstraram a expressão da proteína

1.2 Potencial oncogênico do gene Dermicidina

A célula tumoral passa por um processo evolutivo análogo à evolução darwiniana, isto é, ela tem de adaptar-se ao meio ambiente do hospedeiro, de maneira a adquirir certas habilidades que lhe permite crescer e expandir-se. Dentre essas, destacam-se o aumento da capacidade replicativa e a evasão da morte celular (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Essas habilidades estão intimamente ligadas com a ação de oncogenes. Como veremos a seguir, a superexpressão de DCD em células tumorais é capaz de aumentar tanto a proliferação quanto a sobrevivência celular, sugerindo, assim, seu potencial oncogênico.

Desde a descoberta do cDNA codificador da DCD, diversos trabalhos foram realizados em modelos de superexpressão gênica para tentar compreender suas atividades biológicas. Em um dos primeiros trabalhos realizados por Cunningham et al. (2002), os autores mostraram que a superexpressão do DCD em células de um neuroblastoma murino aumentava a sobrevivência contra o estresse oxidativo. Este mesmo efeito foi reportado por Porter et al. (2003b) utilizando células derivadas das linhagens de carcinoma mamário humano 21NT. A expressão de DCD nesta linhagem de células aumentou a resistência ao estresse oxidativo induzido tanto pela redução de glicose no meio quanto pela meladiona, um potente indutor de radicais livres na mitocôndria. Outro trabalho demonstrou que as células hepatocarcinoma humano HuH7 superexpressando DCD foram capazes de reduzir em 26% a morte celular por necrose induzida por glicose oxidase e que os resíduos de asparagina (N³² e N⁴⁴) são importantes para esta atividade (LOWRIE et al., 2006). Stewart et al. (2007) mostraram que a superexpressão tanto da proteína íntegra quanto da porção N-terminal, correspondente ao peptídeo Y-P30 da DCD, é capaz de proteger as células de carcinoma de próstata humano PC-3M do estresse oxidativo induzido por uma atmosfera de 0,2% de oxigênio, meladiona, glicose oxidase e peróxido de hidrogênio.

Além desse aumento na sobrevivência, a superexpressão de DCD é capaz de aumentar a proliferação celular. Porter et al. (2003b) reportaram pela primeira vez esse efeito *in vitro* na linhagem de câncer de mama 21NT. O mais interessante foi que mesmo ao reduzir a concentração de soro do meio de cultura, as células com superexpressão de DCD apresentaram um crescimento significativamente maior que o controle (PORTER et al., 2003b). Tal efeito não ficou restrito à linhagem de câncer de mama, Stewart et al. (2007), ao superexpressar o DCD na linhagem PC-3M de câncer de próstata, observaram o mesmo aumento na proliferação celular. Recentemente, Lowrie et al. (2011), ao tratar as células de carcinoma hepático HuH7 com concentrações crescentes de Dermicidina recombinante, observaram uma curva proliferativa de dose resposta em forma de sino. Os autores também demonstraram que a região da proteína responsável por este efeito é a sequência N-terminal, a mesma responsável pelo aumento da resistência celular observada anteriormente (STEWART et al., 2007).

Em estudos *in vivo*, a superexpressão de DCD na linhagem tumoral de melanoma murino B16-F10 resultou em um aumento do tamanho do tumor quando estas células foram injetadas no dorso de camundongos C57/BL6 (GARAY-MALPARTIDA, 2005; PÁDUA-BORGES, 2006). Além disso, a injeção de células tumorais pela veia caudal desses camundongos resultou em um aumento significativo do número de nódulos tumorais no pulmão quando comparado ao controle (GARAY-MALPARTIDA, 2005). Monitto et al. (2004) também reportaram a formação de tumores maiores que o controle, quando as células de carcinoma mamário MCF-7 superexpressando DCD foram injetadas em camundongos NUDE.

Chang et al. (2010) detectaram por espectrometria de massa a presença de peptídeos derivados da DCD no condensado do ar exalado de pacientes com câncer de pulmão. Os autores também reportaram a expressão de DCD pelas linhagens celulares tumorais PC13 (adenocarcinoma de pulmão) e H520 (carcinoma de células escamosas de pulmão). Além disso, verificaram que o silenciamento gênico de DCD pela expressão de shRNA reduziu o crescimento das células H520 e PC13 em 60 % e 70 %, respectivamente.

Recentemente, Shen et al. (2011) demonstraram que a superexpressão de DCD na linhagem de carcinoma hepatocelular SK-HEP-1 é capaz de ativar as GTPases Rho (GTP-Rac1 e GTP-Cdc42) via interação com o domínio SH2 da proteína adaptadora Nck1, promovendo a migração celular, fato que sugere que o DCD poderia desempenhar algum papel na metástase tumoral. No entanto, estudos mais detalhados nesse sentido precisam ser realizados.

Todos os trabalhos aqui citados sugerem que o DCD possui uma atividade similar a um fator de crescimento, sendo capaz de induzir a proliferação e proteger contra a morte celular.

1.3 A relação entre o câncer de mama e o gene Dermicidina

As lesões cancerígenas na mama podem surgir em qualquer uma de suas estruturas: epiderme, mesênquima e epitélio glandular. No entanto, o câncer de mama mais comum é denominado de carcinoma ductal. A história natural deste tipo de câncer envolve a progressão de uma hiperproliferação no ducto mamário, com conseqüente evolução para um carcinoma ductal *in situ* (DCIS), passando para um carcinoma invasivo (IBC) e resultando, por fim, em um carcinoma metastático (POLYAK, 2007; LOPES-GARCIA et al., 2010). Estudos moleculares, epidemiológicos e patológicos têm mostrado que os DCISs são os precursores dos carcinomas invasivos e metastáticos (POLYAK, 2007; LOPES-GARCIA et al., 2010).

Os DCISs formam um grupo heterogêneo de tumores localizados com grande potencial de tornarem-se invasivos. A sua classificação atual é baseada nas características histológicas e arquiteturais do tecido. Contudo, esse tipo de classificação possui uma consistência moderada e pode ser complicada pela heterogeneidade intratumoral (BADVE et al., 1998). Além disso, ela não é capaz de prever o risco de progressão para uma doença invasiva de forma acurada, o que dificulta o manejo clínico dos pacientes (BADVE et al., 1998). O principal desafio, neste cenário, é determinar o risco de recorrência e progressão para uma doença invasiva.

Na tentativa de solucionar este problema, diversos grupos têm realizados estudos comparativos de expressão e caracterização genética em carcinoma *in situ*, invasivo e metastático, na tentativa de se obter uma assinatura gênica que possa melhorar o diagnóstico e o manejo clínico dos pacientes (PORTER et al., 2001, 2003a; CHIN et al., 2004; YAO et al., 2006). Entre os estudos mais citados dois em particular chamaram nossa atenção. Porter et al. (2001), em um estudo comparativo entre células epiteliais de mama normal, carcinoma de mama *in situ*, invasivo e metastático utilizando a técnica de análise seriada de expressão gênica (do inglês, SAGE) identificaram genes diferencialmente expressos que poderiam estar envolvidos com a iniciação e a progressão de câncer de mama. No referido

trabalho, os autores demonstraram que alguns genes poderiam ser utilizados para o diagnóstico e como possíveis alvos de terapia. Nesta lista, foi descrito o transcrito correspondente a um novo gene, denominado por eles de IBC-1 (*Invasive Breast Cancer-1*), que estava altamente expresso nas amostras de carcinomas invasivos (PORTER et al., 2001). No trabalho seguinte, Porter et al. (2003a) apresentaram dados que comprovaram existência de uma associação entre padrões de expressão gênica de certos genes e características histopatológicas entre DCISs e tumores invasivos (PORTER et al., 2003a). Utilizando a técnica de SAGE, os autores identificaram 5 genes regulados positivamente nos DCISs e 11 nos tumores invasivos. Dentre os genes presentes nos tumores invasivos o que chamou atenção foi transcrito IBC-1, o qual já havia, naquele momento, sido descrito como o transcrito da Dermicidina. Nesse estudo, esse gene estava presente em 78 % das amostras de carcinomas invasivos e zero % das amostras de DCISs, apresentando uma taxa de sensibilidade de 78% e especificidade de 100% na identificação dos tumores invasivos (PORTER 2003a). Utilizando a técnica microarranjo de tecidos (do inglês, *tissue microarrays*, TMA), Porter et al. (2003b) detectaram a expressão da proteína DCD por imunohistoquímica em 48 de 558 amostras (10% dos casos) de carcinoma de mama invasivo. A expressão da DCD correlacionou-se estatisticamente com um estado mais avançado da doença e com a presença de tumores maiores com metástase em linfonodo, ou seja, sua presença sugere um pior prognóstico para as pacientes (PORTER et al., 2003b). Em alguns casos, a expressão da DCD foi correlacionada com uma amplificação gênica no *locus* 12q13.1 do cromossomo 12, onde localiza-se os oncogenes: CDK4 (*cyclin-dependent kinase 4*), MDM2 (homolog of the murine double minute 2 / *p53 binding protein homolog mouse*), GLI1 (*Glioma-associated oncogene homolog 1*) e HER-3 (PORTER et al., 2003b). No mesmo estudo, os autores não detectaram a presença de DCD na mama normal, mas mostraram sua expressão na pele e em duas regiões do cérebro: ponte e córtex cerebral. Por outro lado, estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que o RNA mensageiro de DCD é expresso de forma constitutiva na mama normal (MARKOVIC, 2003). Além disso, a expressão de DCD foi detectada em amostras

de tumores primários da mama com metástase em linfonodos e em várias linhagens de carcinoma mamário (MARKOVIC, 2003).

Recentemente, Moreira (2007) utilizou a técnica silenciamento gênico por expressão estável de shRNA para reduzir a expressão do DCD na linhagem de carcinoma mamário MDA-MB-361, o qual foi identificada pela superexpressão do DCD (MARKOVIC, 2003). Por meio da transdução das células com vetores lentivirais que promovem a expressão de shRNA contra três regiões distintas do RNAm de DCD foram geradas três sublinhagens denominadas de MDA-MB-361 IBC I, IBC II e IBC III e uma sublinhagem controle, MDA-MB-361 pLKO, que foi transduzida com o vetor vazio (MOREIRA, 2007). O silenciamento do DCD provocou uma redução na capacidade de formação de colônias *in vitro* e tornaram essas células mais susceptíveis à morte celular induzida por H₂O₂, estaurosporina e a combinação TNF- α e cicloheximida (MOREIRA, 2007). Ademais, as células da sublinhagem MDA-MB-361 IBC I formaram tumores menores quando injetadas no dorso de camundongos NUDE, sugerindo que a expressão do gene DCD é capaz de aumentar a tumorigenicidade *in vivo* (MOREIRA, 2007).

Os estudos publicados na literatura, até este momento, mostraram que DCD é capaz de induzir o crescimento e sobrevivência celular em tumores, porém o mecanismo pelo qual ele exerce essas atividades é desconhecido. Na tentativa de responder essa questão, Moreira et al. (2008) realizaram ensaios de expressão gênica global utilizando microarranjo de DNA (DNA microarray, Affymetrix) a fim de verificar quais genes foram alterados pelo silenciamento do DCD nas sublinhagens MDA-MB-361 (MOREIRA, 2007). Tais experimentos resultaram em uma lista de 235 genes diferencialmente expressos entre as sublinhagens MDA-MB-361 pLKO e as sublinhagens MDA-MB-361 IBC- I, II e III, sendo que 27 genes tiveram suas expressões aumentadas e 208 genes apresentaram uma redução após o silenciamento gênico do DCD (MOREIRA et al., 2008).

1.4 A família de receptores e fatores de crescimento EGF/ErbB

A família de proteínas EGF/ErbB (nomeadas assim devido a sua homologia com produto do gene do eritoblastoma viral, *v-erb*) é composta de quatro receptores estruturalmente relacionados, denominados de EGFR (Receptor do fator de crescimento da epiderme), também conhecido como HER-1 ou ErbB1, HER-2 ou ErbB2, HER-3 ou ErbB3 e HER-4 ou ErbB4 (YARDEN e SLIWKOWSKI, 2001) (Ilustração 2). Todos os receptores são proteínas transmembranas com uma porção de ligação extracelular contendo quatro domínios (I, II, III e IV), uma hélice transmembrana única, um domínio tirosina quinase na porção citoplasmática e uma calda C-terminal. A porção citoplasmática contém domínios de transfosforilação de tirosina quinase que servem como uma estrutura para a ligação de moléculas adaptadoras e enzimas que facilitam a sinalização intracelular (Ilustração 3) (HYNES e LANE, 2005; CITRI e YARDEN, 2006).

Esses receptores são ativados por diferentes ligantes com certo grau de especificidade ligante-receptor. O Fator de Crescimento Epitelial (EGF), Fator de Crescimento Transformante-alfa ($TGF-\alpha$), Anfiregulina (AREG), Betacelulina (BTC), Fator de Crescimento semelhante ao EGF ligado a Heparina (HB-EGF) e a Epiregulina (EREG) ligam-se preferencialmente ao receptor EGFR. Contudo, o EGF pode ligar-se com menor afinidade aos receptores HER-3 e HER-4 (YARDEN e SLIWKOWSKI, 2001; SCHNEIDER e WOLF, 2008) (Ilustração 2). Ademais, os ligantes HB-EGF e EREG ligam-se também ao receptor HER-4. Já a Neuregulina 1 (NRG1), Neuregulina 2 (NRG2), Neuregulina 3 (NRG3) e Neuregulina 4 (NRG4) são ligantes preferenciais do receptor HER-4, embora o ligante NRG1 possa ligar-se também ao receptor HER-3 (Ilustração 3) (YARDEN e SLIWKOWSKI, 2001; SCHNEIDER e WOLF, 2009).

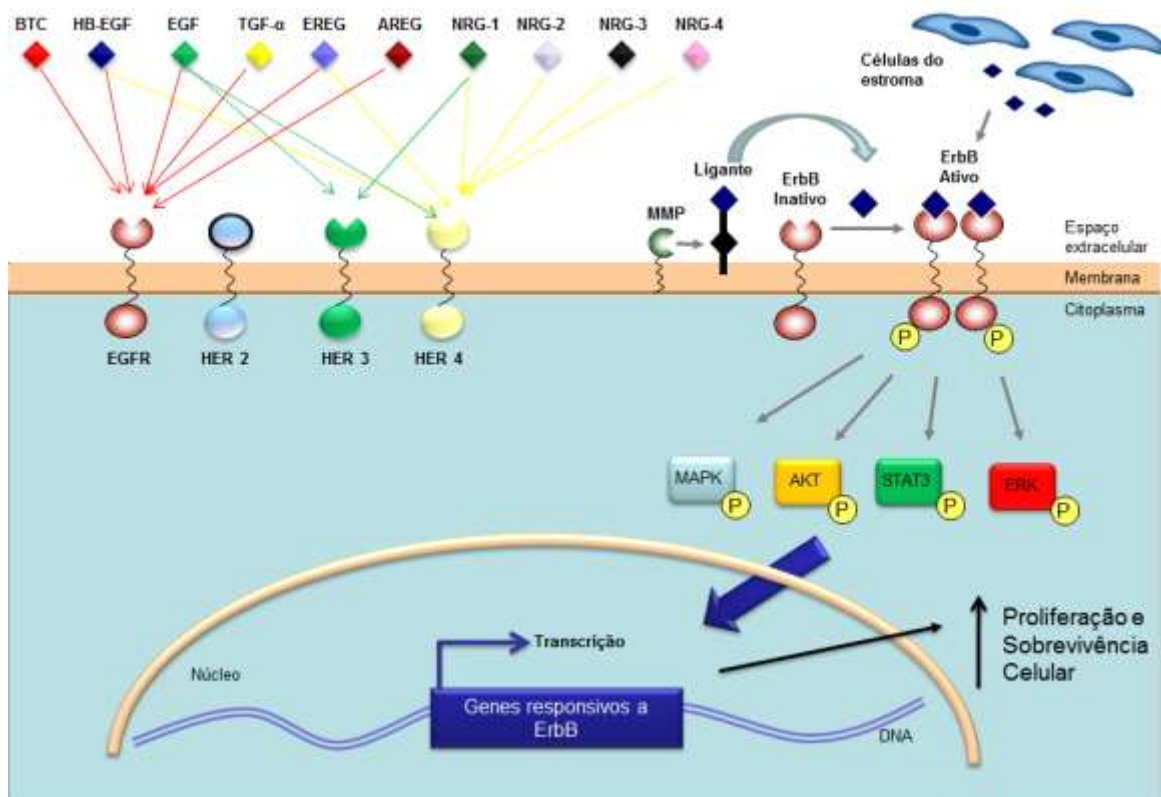


Ilustração 2 – Via de sinalização EGF/ErbB. À esquerda, estão representados os receptores ErbBs e seus ligantes. As setas que saem dos ligantes mostram o receptor ao quais eles têm afinidade. À direita, está representada, de forma extremamente simplificada, a ativação da via EGF/ErbB. Os ligantes são produzidos pelas células do estroma ou pela própria célula e mantêm-se ancorados à membrana, sendo liberados posteriormente para o meio extracelular através da clivagem pelas metaloproteinase de matriz. Uma vez liberados, eles se ligam aos receptores ErbBs inativos induzindo a dimerização desses receptores, que resulta na transfosforilação de seus domínios tirosina quinase. Uma vez fosforidados, eles promovem a ativação de várias vias da sinalização intracelular, incluindo a MAPK, AKT, STAT3 e ERK, que resultam na ativação e em fatores de transcrição que promovem a expressão de genes responsáveis pela proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. *MMP* – metaloproteinase de matriz; *Setas cinzas preenchidas* – ativação por fosforilação; *P* – fosforilação; *Seta azul grossa* – ativação *downstream* da via; *Setas pretas* – resultados da transcrição gênica; *Seta preta ao lado da proliferação e sobrevivência celular* - indica aumento.

O HER-2 é o único receptor para o qual não foi encontrado um ligante. Estudos estruturais deste receptor mostraram que os domínios I e III estão em contato direto fechando o sítio de ligação do receptor. Além disso, os resíduos que compõem o sítio de ligação não estão conservados neste receptor em relação ao resto da família EGF/ErbB, sugerindo que o HER-2 não é capaz de ligar-se diretamente a um fator de crescimento (Ilustração 2) (CITRI e YARDEN, 2006; HYNES e LANE, 2005).

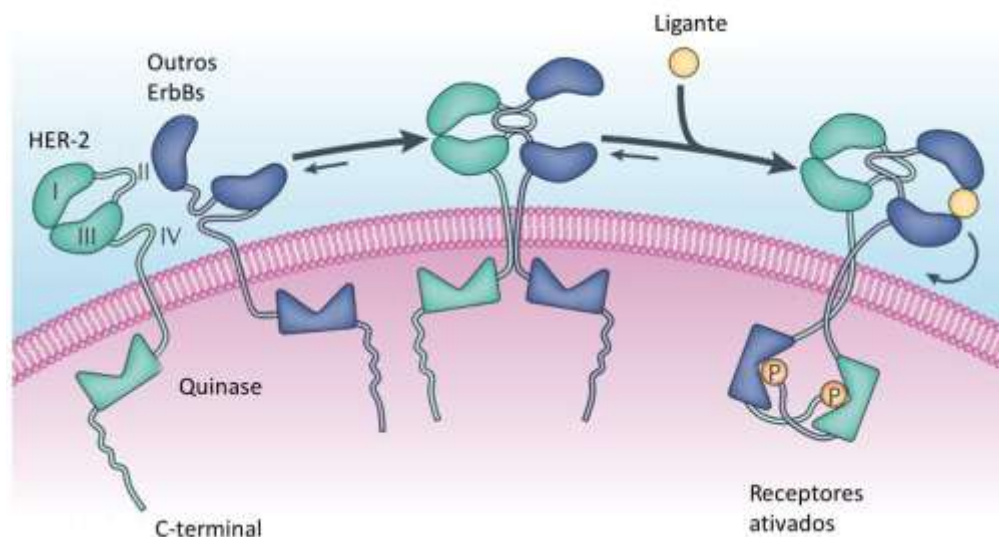


Ilustração 3 - Estrutura básica dos receptores ErbBs, dimerização e ativação. A ilustração acima retrata o estado de equilíbrio entre os monômeros e dímeros dos receptores HER-2 e os outros membros da família. O receptor HER-2 possui os domínios I e III unidos, o que não permite a entrada de um ligante. Os outros receptores ErbBs, ao ligar-se a um dos fatores de crescimento, sofrem uma alteração estrutural que permite sua ligação a outro receptor, formando homodímeros ou heterodímeros (representados acima) e, conseqüente, ativação, o que leva à transfosforilação de seus domínios tirosina quinases, desencadeando sua cascata de sinalização intracelular. *I*, *II*, *III* e *IV*, domínios do receptor ErbB; *P*, fosfato. Modificado de Citri e Yarden, (2006).

Após a associação dos fatores de crescimento específicos aos sítios de ligação, os receptores formam homodímeros ou heterodímeros que levam a uma alteração estrutural no receptor resultando na ativação da função tirosina quinase e assim, na fosforilação de domínios de tirosina quinase (Ilustração 2) (YARDEN e SLIWKOWSKI, 2001; HYNES e LANE, 2005; CITRI e YARDEN, 2006). Essa fosforilação permite a ligação e fosforilação de diversas moléculas adaptadoras e enzimas que ativam várias cascatas de sinalização intracelular que culminam em respostas que vão desde a divisão, diferenciação, sobrevivência e motilidade à adesão celular (Ilustração 3) (YARDEN e SLIWKOWSKI, 2001). É interessante notar que o receptor HER-2 forma somente heterodímeros em situações fisiológicas normais, porém, quando superexpresso por células tumorais, ele pode formar homodímeros e ativar a via de sinalização intracelular resultando em estímulo proliferativo e de sobrevivência (YARDEN e SLIWKOWSKI, 2001; CITRI e YARDEN, 2006).

A rede de sinalização ativada pelas proteínas da família EGF/ErbB está frequentemente envolvida com câncer, sendo alvo de diferentes terapias, que vão desde anticorpos monoclonais até inibidores de quinase (YARDEN, 2001; YARDEN e SLIWKOWSKI, 2001; HYNES e LANE, 2005; CITRI e YARDEN, 2006; NORMANO et al., 2006; FERRER-SOLIER et al., 2007; PEREZ et al., 2011). O exemplo mais notório é o anticorpo monoclonal trastuzumab (Herceptin[®]) que é utilizado atualmente na clínica como tratamento de primeira linha contra câncer de mama metastático com superexpressão de HER-2. Vários estudos clínicos têm demonstrado uma significativa melhora do quadro clínico das pacientes tratadas apenas com Herceptin (monoterapia) ou em combinação com quimioterapia, incluindo aumento da sobrevida acima de 39% em relação com quimioterapia isolada (PEREZ et al., 2011). Mais detalhes do envolvimento da família de proteínas EGF/ErbB com o câncer serão exemplificados ao longo deste estudo.

A proposta inicial do presente trabalho foi avaliar a expressão gênica de uma linhagem de carcinoma mamário após o silenciamento do gene DCD, com o objetivo de identificar os genes que poderiam estar envolvidos nos eventos moleculares associados à superexpressão desse gene.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo Geral

Identificar os mecanismos pelos quais a Dermicidina promove a proliferação e a sobrevivência em linhagens de células de carcinoma da mama.

1.5.2 Objetivos Específicos

1. Identificar os genes diferencialmente expressos nas sublinhagens de câncer de mama MDA-MB-361 após silenciamento do gene Dermicidina;
2. Quantificar a expressão de transcritos e proteínas da família de receptores e ligantes EGF/ErbB, bem a como a atividade funcional desta via de sinalização nas sublinhagens de carcinoma mamário MDA-MB-361 sem e com o silenciamento do gene DCD;
3. Analisar a capacidade da proteína DCD recombinante em induzir a expressão de ligantes e receptores da família de fatores de crescimento EGF/ErbB na sublinhagem de carcinoma mamário MDA-MB-361;
4. Avaliar os efeitos da superexpressão do gene DCD na proliferação da linhagem de carcinoma de mama MCF-7, na expressão dos ligantes e dos receptores da família EGF/ErbB, bem como na ativação desta via de sinalização intracelular.

2 Material e Métodos

2.1 Linhagens celulares e cultivo

As linhagens celulares de carcinoma mamário humano MDA-MB-361 e MCF-7 foram obtidas da ATCC (*American Type Culture Collection*). As células foram cultivadas em garrafas de 25 e 75 cm² em meio DMEM/F-12 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementadas com 10% de soro fetal bovino inativado (SBF) (Cultilab), 2 mM L-glutamina e antibióticos, e mantidas em estufa sobre atmosfera úmida a 5% de CO₂ e 37°C, até atingir a confluência e transferidas para novos frascos após tratamento com a solução de tripsina-EDTA.

Culturas de células MDA-MB-361 foram transduzidas com partículas lentivirais para a obtenção das sublinhagens denominadas MDA-MB-361 pLKO (vetor vazio) e MDA-MB-361 IBC I, II e III que apresentam a expressão constitutiva do shRNA para três regiões específicas do RNAm do DCD conforme descrito (MOREIRA, 2007). Culturas de células MCF-7 foram transfectadas com o vetor pDNA.3.1 para a obtenção das sublinhagens MCF-7 pcDNA (vetor vazio) e MCF-7 DCD com superexpressão do gene DCD conforme descrito anteriormente (MARKOVIC, 2003; GARAY-MALPARTIDA, 2005; FONTES-OLIVEIRA, 2006).

2.2 Análise da expressão global de genes diferencialmente expressos

2.2.1 Ensaio de Microarranjo de oligonucleotídeos (DNA microarray)

Os experimentos de microarranjo de oligonucleotídeos foram realizados com a plataforma e kits da Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). O genechip utilizado foi o *U133 Plus 2.0 array* que contém sondas para mais de 47.000 transcritos de genes humanos. A extração do RNAm total, síntese,

purificação e marcação do cRNA das sublinhagens MDA-MB-361 pLKO, MDA-MB-361 IBC I, II e III, bem como a fragmentação, hibridização, captura, normalização e transformação dos dados e a seleção dos genes diferencialmente expressos foram feitos em colaboração com o grupo da Dra. Kornelia Polyak (Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA). Nestas análises foram considerados apenas os genes que apresentaram uma diferença de expressão superior a três vezes tanto para cima quanto para baixo e com significância estatística de $p < 0.05$.

2.2.2 Plataformas e softwares de análise de dados de expressão gênica

A lista de genes diferencialmente expressos identificada no experimento de microarranjo de oligonucleotídeos foi analisada quanto ontologia gênica e funcional, vias e redes regulatórias, processos e doenças usando as plataformas de bioinformática abaixo:

DAVID Bioinformatics Resources (The database for annotation, visualization and integrated discoveries) do “*National Institutes of Health, USA*” (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>).

DAVID é uma ferramenta de bioinformática que consiste de uma base de conhecimento biológico integrado e ferramentas analíticas com o objetivo de extrair sistematicamente o significado biológico de uma grande lista de genes e proteínas. Nesta plataforma, realizamos as análises de anotação funcional que classifica os genes da lista dentro de grupos funcionais. Nesse módulo, o programa faz um enriquecimento dos dados de anotação e ranqueia os grupos de genes de acordo com sua importância e estatística. Dentro dessa análise, exploramos a ontologia gênica (*gene ontology*), anotação de categoria funcional e análise de vias (HUANG et al., 2009a, 2009b)

GeneGo Metacore pathways analysis software

(<http://www.genego.com/metacore.php>).

MetaCore™ é um banco de dados de conhecimentos integrados e um pacote de software para análise de dados experimentais e listas de genes. O escopo dos tipos de dados incluem microarranjos e dados de expressão gênica, polimorfismo de único nucleotídeos (SNPs), microarranjos de heterocromatina (CGH), proteômica, lista de co-imunoprecipitação (Co-IP) e outros. Ele é baseado em bando de dados alimentado manualmente com informações de interação de proteína-proteína, proteína-DNA e interações proteínas-compostos e vias metabólicas e de sinalização de humanos, camundongos e ratos (NIKOLSKY et al., 2005a, 2005b; EKINS et al., 2006). Nesta plataforma fizemos a análise de enriquecimento de vias e redes regulatórias, processos e doenças.

2.3 Extração de RNA e síntese de cDNA pelo método da Transcriptase reversa

As extrações de RNA foram realizadas pelo método de TRIZOL® (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) segundo instruções do fabricante. Após a extração, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0.8 % para confirmar a integridade do RNAm. Para evitar contaminação com DNA genômico, as amostras foram tratadas com DNase antes da reação de transcriptase reversa propriamente dita. Para tanto, 2 µg de RNA total foi incubada em um volume final de 10 µL contendo 1 µL do tampão da enzima e 1 µL da enzima DNase (50 U/µl) (Invitrogen - Life Technologies). As amostras foram incubadas por 15 minutos a 37 °C e, em seguida, por 15 minutos a 75 °C para inativação da enzima. Posteriormente, foi realizada a transcrição reversa. Essa reação foi feita em volume final de 20 µL na presença dos seguintes reagentes: 1.5 µL de dNTPs mix 10 mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 4 µL de tampão de reação 5X (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl e 3 mM MgCl), 2 µL de DTT 100 mM, 0.5

μL de inibidor de RNase (RNase OUT[®], Invitrogen - Life Technologies) 40 U/ μL , 0.5 μL do primer OLIGO dT 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0.5 μL de random primer, 1 μL da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen - Life Technologies) e 10 μL da reação de tratamento do RNA total com DNase. As etapas da reação de transcrição reversa foram: síntese do cDNA a 42 °C, 60 minutos, seguida pela inativação da enzima transcriptase reversa a 75°C, 15 minutos e resfriamento das amostras a 4°C. As amostras foram armazenadas a -20 °C até seu uso na reação de qPCR.

2.4 Amplificação gênica por RT-PCR em tempo real (qPCR)

A cada reação foi adicionado um microlitro de cDNA diluído (1:10) a 11.5 μL PCR Master mix, contendo 6.25 μL de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG[®] (Invitrogen - Life Technologies) e 250 nM de cada primer (senso e antisenso). A tabela 1 apresenta lista das sequências de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e eficiência dos pares na reação. A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de amplificação a 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a amplificação, foram obtidas as curvas de dissociação dos produtos, os quais foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2 % a fim de verificar a especificidade da amplificação da reação.

Cada amostra foi analisada em triplicada, junto com controle negativo em paralelo, para avaliar a presença de possíveis contaminantes ou a formação de dímeros de primers na reação. Todos os ensaios foram realizados no termoclicador Mx3005P[®] qPCR System (Stratagene, La Jolla, CA, USA) e as análises foram realizadas com software MxPro versão 3.0, que estima o *threshold* (Ct) para cada amostra. Os valores de Ct dos genes de interesse foram normalizados pela expressão gênica do HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) (controle endógeno). A expressão relativa dos transcritos nas células-alvo foi determinada em relação à expressão obtida nas

células controle usando o software REST 2008[®] (PFAFFL et al., 2002) (disponível em: <http://www.gene-quantification.de>). Os dados são expressos como média \pm erro padrão.

Tabela 1 - Lista dos primers utilizados nos ensaios de qPCR.

<i>Gene</i>		<i>Seqüência</i>	<i>Tm</i> (°C)	<i>Produto</i> (pb)	<i>Eficiência</i>
DCD	Senso	5'-CACCAAAGCCAAGGAAGCAG-3'	60	173	0,95
	Antisenso	5'-CAGCTATAGTACTGAGTCAAGG-3'			
TXINP	Senso	5'-ACTCGTGTCAAAGCCGTTAGG-3'	60	67	0,98
	Antisenso	5'-TCCCTGCATCCAAAGCACTT-3'			
VEGF A	Senso	5'-ATCTTCAAGCCATCCTGTGTGC-3'	60	223	0,9
	Antisenso	5'-TGCGCTTGTACATTTTTCTTG-3'			
VEGF B	Senso	5'-AGTCCGGATGCAGATCCTC -3'	60	80	0,92
	Antisenso	5'-CACACTGGCTGTGTTCTTCC -3'			
EGFR	Senso	5'-GGGCCGACAGCTATGAGAT -3'	60	88	0,97
	Antisenso	5'- CCTATTCCGTTACACACTTTGC-3'			
HER-2	Senso	5'-CCACCAAGTGAGGCAGGTCC -3'	60	101	0,97
	Antisenso	5'-GGTCTCCATTGTCTAGCACGG -3'			
HER-3	Senso	5'-GGGAGCCGCTTCCAGACT -3'	60	98	0,93
	Antisenso	5'- TTGAGGCCGGTGATCAGAAA-3'			
HER-4	Senso	5'-TGTTCCGGAACCCATGGCCT -3'	60	167	1
	Antisenso	5'-AGCATCTGCCGTACATTGTTCT -3'			
EGF	Senso	5'-CAGGTAATGGAGCGAAGCTTTCA -3'	60	199	0,93
	Antisenso	5'-GTGCATCGACATAGTTCATTCTTCTTG -3'			
BTC	Senso	5'-TTCAGTGTGTGGTGGCAGATGG -3'	60	111	1
	Antisenso	5'-TCCGCTTTGATTGTGTGGTGG -3'			
TGF-α	Senso	5'-TTAATGACTGCCAGATTCCCA -3'	60	133	1
	Antisenso	5'- GGAGTCCGCATGCTCACA-3'			
EREG	Senso	5'-ATCATGTATCCCAGGAGAGTCCAG -3'	60	207	1
	Antisenso	5'-AAGTGTTACATCGGACACCAGT -3'			

AREG	Senso	5'-CCAAAACAAGACGGAAAAGTGA -3'	60	175	1
	Antisenso	5'- TGTTACTGCTTCCAGGTGCTC-3'			
HB-EGF	Senso	5'-CCTCCTCTCGGTGCGGG -3'	60	86	1
	Antisenso	5'-AGTCACCAGTGCCGAGAGAACTG-3'			
NGR 1	Senso	5'-CCATTAGAATATCAGTATCCACAGAAGG -3'	60	99	1
	Antisenso	5'-CCTTCTCCGCAGATTTTACAAGA -3'			
NGR 2	Senso	5'-TTCCCAGCCTTCTACCGTT -3'	60	102	1
	Antisenso	5'-TGTAGTCGTGAGTTCTTTCTGCCG -3'			
NGR 3	Senso	5'-CGAGGACAGTGCAAGCGAAA -3'	60	117	1
	Antisenso	5'-TTGGTCAATGCAGAGTCTCTTTGTATT -3'			
NGR 4	Senso	5'- AACAGATCACGAAGAGCCCTGT-3'	60	86	0,99
	Antisenso	5'-TGGGAATAGTAGGTATCACATAACAAAGC - 3'			
HPRT	Senso	5'- TGAGGATTTGGAAAGGGTGT-3'	60	105	0,98
	Antisenso	5'- CCTCCCATCTCCTTCATCAC -3'			

T_m, temperatura de anelamento (melting) do primer. Eficiência – Eficiência de amplificação do casal de primers em ensaio de diluição seriada; pb - pares de base. Os primers foram desenhados com auxílio do software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) e sua especificidade foi avaliada usando a ferramenta BLAT do *USCS Genome Browser website* da Universidade da Califórnia Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/>).

2.5 Western blot

Para os ensaios de Western blot, as células foram cultivadas como descrito no item 2.1. Em seguida o meio foi descartado e as células foram lavadas em solução salina fosfato (PBS) (137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄-7H₂O, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.4) e foi adicionado o tampão de lise RIPA (125 mM NaCl, 0.5% ácido deoxicolato, 50 mM Tris.HCl, 1% SDS e 1% NP40, pH 7.4) com inibidor de protease Mix G (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Alemanha). As amostras foram mantidas no gelo por 20 minutos para lise e centrifugadas a 12.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e a concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford utilizando Kit comercial (Bio-

Rad, Hercules, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante. 50 µg de proteína total foram submetidas à eletroforese em um sistema de gel de poliacrilamida. As concentrações dos géis variaram de acordo com a proteína que seria analisada. Para as proteínas de alto peso molecular como EGFR, pEGFR e pSTAT3 foi utilizado um gel com 7.5 % de poliacrilamida, para as demais, a eletroforese foi realizada em um gel de 15 %. O padrão de peso molecular utilizado foi o PageRuler™ Prestained Ladder (Fermentas, Inc., Maryland, USA). A transferência das proteínas do gel para a membrana de PVDF de 0.2 µm Hybond-P (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL, USA) foi realizada por eletrotransferência úmida utilizando o tampão transferência (48 mM Tris Base; 39 mM Glicina; 20 % Metanol; pH 8.3). Para as proteínas de alto peso a transferência foi realizada a 250 mA a 35 volts por uma noite e para as proteínas de baixo peso a transferência foi realizada com os mesmos padrões por 2-3 horas.

Após a transferência, as membranas foram coradas com *Ponceau* para avaliar a transferência e, em seguida, lavadas em solução TBS (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) acrescida de 0.2% de Tween (TBS-t), até a total remoção do corante. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado incubando as membranas em uma solução de 0.2% de caseína diluída em TBS-t por no mínimo 3 horas. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário por uma noite. No outro dia, as membranas foram lavadas por 3 vezes em TBS-t por 10 minutos e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase, de acordo com o isotipo do anticorpo primário, por 2 horas e depois lavado por 3 vezes em TBS-t por 10 minutos. Tabela 2 apresenta a lista de anticorpos usados, diluições e procedência.

Para a revelação do ensaio, as membranas foram incubadas por 3 minutos com o reagente Luminata Forte Western HRP substrate (Millipore, Billerica, MA, USA). Após este período, o excesso da solução foi removido e as membranas foram expostas ao filme de raios-X (IBF, Rio de Janeiro, RJ). Em seguida, o filme foi revelado, analisado e digitalizado.

Tabela 2 - Lista de anticorpos utilizados nos ensaios de Western Blot (WB) e imunofluorescência (IMF).

Anticorpo (número catálogo)	Diluição (WB)	Diluição (IMF)	Procedência
DCD	-	1:20	Lab Dr. Polyak, DFCI, USA
DCD (AP6718b)	1:100	-	Abgent, Inc, USA
EGFR (sc-03)	1:300	1:50	Santa Cruz Biotec, USA
pEGFR - Try 1173 (sc-12351)	1:300	-	Santa Cruz Biotec, USA
pTry (sc-56968)	-	1:50	Santa Cruz Biotec, USA
p-ERK - Thr 981 (sc-32577)	-	1:20	Santa Cruz Biotec, USA
c-Myc (sc-9E10)	1:100	1:20	Santa Cruz Biotec, USA
α -Tubulina B7 (sc-5286)	1:100	-	Santa Cruz Biotec, USA
pAKT - Tyr 450 (07-1643)	1:1000	-	Millipore, USA
pAKT - Thr 308 (4058)	-	1:20	Cell Signaling Tech, USA
pAKT - Ser 473 -(2965)	-	1:20	Cell Signaling Tech, USA
pSTAT3 - Try 705 (9131)	1:500	1:50	Cell Signaling Tech, USA
p38 MAPK - Thr 180/Tyr 182 (12F8)	1:500	1:50	Cell Signaling Tech, USA
Ciclina B1 (Ab-2 2H1-H6)	1:100	1:50	Calbiochem-Merck, USA
p27 (Ab-2 DS S72)	1:100	-	Calbiochem-Merck, USA
Herceptin [®] anti-HER-2	-	1:20	Genentech, Inc, USA
β -actin (A-5316)	-	1:25000	Sigma-Aldrich, USA

DFCI - Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

2.6 Imunofluorescência

Nos ensaios de imunofluorescência, 1-2 x 10⁴ células foram semeadas em placa de 24 poços contendo lamínulas circulares. Após dois dias, as células foram lavadas em PBS gelado e fixadas por 10 minutos com metanol absoluto à temperatura ambiente. Em seguida, elas foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos em PBS e bloqueadas com uma solução de PBS acrescido de 5% de soro de burro por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse procedimento, foi retirado o

excesso da solução de bloqueio e foi adicionado o anticorpo primário diluído nessa solução. Os anticorpos primários e as respectivas diluições estão descritas na Tabela 2.

As lamínulas foram mantidas em câmara úmida a 4 °C por uma noite. No dia seguinte, as lamínulas foram lavadas por 3 vezes por 10 minutos em PBS e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente protegidas da luz com um dos seguintes anticorpos secundários conjugados com FITC: goat anti-rabbit conjugado com FITC (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology), goat anti-mouse IgG conjugado com FITC (1:1000) (Abnova, Taipei, Taiwan) ou com estreptavidina conjugada FITC (1:2000) (Calbiochem/Merck), de acordo com o isotipo do anticorpo primário ou com sua marcação com biotina.

Logo após, as lamínulas foram lavadas por 3 vezes de 10 minutos em PBS e incubadas por 15 minutos com solução DAPI diluída 1:50.000 em PBS. As lamínulas foram então lavadas por 2 vezes de 10 minutos em PBS e montadas sobre lâminas novas com Prolong[®]Gold (Invitrogen - Life Technologies). As lâminas foram examinadas em um microscópio Nikon de fluorescência Eclipse 80i (Nikon, Tóquio, Japão).

As imagens digitais foram obtidas através do equipamento de captura de imagem do microscópio que permitia ajuste do tempo de exposição de cada campo das lâminas. Para cada experimento, o tempo de exposição máximo era ajustado através do software de captura de imagem utilizando a amostra controle (sem anticorpo primário). Este procedimento foi realizado para evitar a captura de fluorescência inespecífica e permitir uma análise comparativa da expressão das proteínas analisadas entre sublinhagens celulares utilizadas em cada ensaio. Uma vez que o tempo máximo de exposição foi obtido, ele foi utilizado na captura das imagens das outras lâminas do mesmo experimento. A sobreposição (*merge*) das imagens obtidas com filtro verde e com o filtro azul foi feita em computador PC com a ferramenta “*difference*” do software Adobe Photoshop CS3 versão 10.0 (Adobe System, Inc, San Jose, CA, USA).

2.7 Tratamento das sublinhagens celulares com EGF

Para os ensaios de tratamento das linhagens celulares com EGF recombinante (Sigma-Aldrich), as células foram cultivadas como descrito no item 2.1. Após atingirem 70-80 % de confluência, foram lavadas em PBS e tripsinizadas. Em seguida, as células foram centrifugadas a 500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e 1×10^6 células foram ressuspensas DMEM/F-12 (Cultilab) suplementado com 1% de soro fetal bovino em uma placa de 6 poços e retornaram para a incubadora por 2 horas. Ao fim desse período, as células foram tratadas com 10 ng/mL de EGF por 30 minutos. Em seguida, elas foram lavadas em PBS e foi adicionado o tampão de lise RIPA contendo coquetel de inibidores de proteases Mix G contendo EBSF, Aprotinina, E-64, Leupeptina e EDTA (Serva Electrophoresis) e inibidores de enzimas quinases e fosfatases. Seguiu-se com a extração das proteínas como descrito no item 2.5. Uma parte desse material foi utilizada no ensaio de Western blot para a análise da fosforilação das proteínas da via EGF/ErbB e a outra parte no ensaio de imunoprecipitação.

2.8 Imunoprecipitação

A imunoprecipitação foi realizada com o anticorpo policlonal EGFR sc-03 (Santa Cruz). Nesse ensaio, 100 µg do extrato foi incubado com 2 µg do anticorpo e os tubos mantidos sob agitação rotacional na geladeira por uma noite. Em seguida, adicionou-se 200 µL da mistura de proteína A e G Sepharose (GE LifeScience) e as amostras incubadas novamente na geladeira por mais uma noite. No dia seguinte, as amostras foram coletadas por centrifugação a 2.000 rpm por 5 minutos a 4 °C e lavadas cinco vezes em PBS com 0.1% de Tween e uma vez com PBS. Em seguida, foram adicionados 100 µL do tampão de eluição (200 mM de Glicina, 0.1% de SDS, 1% de Tween 20) e mantido em gelo por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos a 4 °C e o

sobrenadante utilizado nos ensaios de Western blot para detecção do EGFR na forma fosforilada e total.

2.9 Ensaio de proliferação celular pela incorporação de BrdU

Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo do *kit BrdU Cell Proliferation Assay* (Oncogene, Cambridge, MA, USA). Aproximadamente 1×10^4 células foram semeadas em placas de 96 poços em meio DMEM/F-12 suplementado com 1% SBF (Cultilab) ou com 1% SFB contendo as seguintes concentrações de Dermicidina recombinante (DCDr): 0.1 nM, 1nM, 10 nM e 100 nM, e placas incubadas por 3-5 dias. Após esse período, foram acrescentados 20 μ L de uma solução 1:2000 de BrdU a cada poço e as placas foram retornadas à incubação por mais uma noite. No outro dia, o meio foi removido e a solução fixadora adicionada. A placa, então, foi mantida por 30 minutos em temperatura ambiente. Após remoção da solução fixadora, foram adicionados 100 μ L da solução bloqueadora e, em seguida, o anticorpo anti-BrdU (1:100). Após 2-3 horas de incubação, as placas foram lavadas por 3 vezes com solução de lavagem proveniente do kit. Logo após, adicionou-se 100 μ L de anticorpo secundário IgG anti-mouse conjugado à peroxidase. Após 30 minutos de incubação, as amostras foram lavadas por 3 vezes com solução de lavagem, e, por final, água destilada. Em seguida, foram adicionados 50 μ L do substrato de peroxidase TMB (tetra-metilbenzidine) (Oncogene). Uma alíquota de 50 μ L da solução foi transferida para placas de 96 poços contendo 50 μ L da solução 2 M de H_2SO_4 . A leitura da placa foi feita em espectrofotômetro de placa Bio-Rad modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories) ajustado para os comprimentos de onda 595 nm (referência) e 450/490 nm (leitura). A DCDr utilizada neste estudo foi produzida em nosso laboratório seguindo o protocolo descrito por GARAY-MALPARTIDA, (2005).

2.10 Ensaio de crescimento celular e formação de colônias

Em torno de 1×10^2 de células das sublinhagens MCF-7 pcDNA e MCF-7 DCD foram semeadas em garrafas de 25 cm² e cultivadas em meio completo por período de 2 semanas. Em seguida, as células foram fixadas em metanol 100%, lavadas e coradas com solução de COOMASSIE Blue G-250 (Sigma-Aldrich) com 1% em metanol. As colônias visíveis (>50 células por colônia) foram demarcadas e contadas a olho nu. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

2.11 Análise de viabilidade celular pelo método do MTT

As sublinhagens celulares foram cultivadas em placas de 96 poços até a confluência. Em seguida, as células foram tratadas com concentrações crescentes dos agentes citotóxicos: estaurosporina (0.05 - 1 μ M) por 16 horas, combinação de TNF- α (10-200 ng/mL) e 5 μ g/mL de cicloheximida por 12-16 horas e peróxido de hidrogênio (0.0005 % - 0.01 %) por 12-16 horas. Após esse período, o meio foi retirado e foram adicionados 10 μ L uma solução de 5 mg/mL de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] preparado em tampão PBS e a placa foi incubada por 2-4 horas. Logo após, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente de cada poço. Em seguida, foi adicionado 100 μ L de álcool isopropílico para a solubilização do MTT. A solução formada foi mensurada a 595 nm em um espectrofotômetro Bio-Rad Modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories). Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

2.12 Análise estatística

Os dados apresentados como média \pm erro padrão foram comparados entre si pelo teste *t* Student ou por análise de variância (*One Way ANOVA*), quando conveniente, utilizando software *InStat* versão 3.05 (GraphPad, San Diego, CA,

USA). Os resultados de expressão relativa obtidos por PCR em tempo real (qPCR) foram analisados pelo teste de randomização e recolocação *Pair Wise P(H1)* (PPAFFL et al., 2002). Os valores foram considerados significantes quando $p < 0.05$.

3 Resultados

3.1. Análise dos genes alterados pelo silenciamento do gene DCD nas sublinhagens de células MDA-MB-361

A tabela 3 mostra a lista dos 235 genes cuja expressão foi suprimida ou induzida nas sublinhagens de células MD-MB-361 IBC- I, II e III em relação à linhagem controle MDA-MB-361 pLKO. Dessa lista, 27 genes tiveram suas expressões aumentadas entre 3 a 29 vezes enquanto 208 genes apresentaram uma redução de 2.5 a 12 vezes. A lista foi submetida à plataforma DAVID para análise quanto à ontologia gênica, a anotação de categoria funcional e formação de vias e redes de sinalização. Como podemos observar na tabela 4, a atividade de fator de crescimento foi o principal grupo de enriquecimento da ontologia gênica, seguido por um termo geral de ligação à proteína e, em terceiro lugar, ligação ao EGFR. A anotação de categoria funcional teve como resultado mais significativo o termo fator de crescimento, seguido pelo domínio EGF-like e outros termos relacionados com o metabolismo, sinalização, divisão celular e atividade oxidoreductase (Tabela 5).

Como podemos observar na tabela 6 e na figura 1, a principal via de sinalização alterada é da família EGF/ErbB, que apresentou o maior número de genes envolvidos e o valor estatístico mais significativo. Além dessa via, a redução da expressão da DCD alterou os genes relacionados ao metabolismo do folato, frutose e manose (Tabela 6).

A modulação da via do folato e do metabolismo de frutose e manose pode ser um efeito secundário resultante da ação de DCD sobre o crescimento celular. O folato é essencial para a produção de bases nitrogenadas necessárias para duplicação do DNA durante a divisão celular para a proliferação celular (DUTHIE et al., 2004; BOHNSACK e HIRSCHI, 2004). Além disso, alterações nesta via já foram descritas em vários tipos de tumores (GIROIX et al., 1985; ELLWOOD et al., 1993).

Tabela 3 – Lista de genes diferencialmente expressos em células MDA-MB-361 expressando shRNA contra o DCD.

Identificação da Sonda (Affymetrix)	Gene	Intensidade de expressão			Taxa de supressão / indução
		MDA-MB-361 pLKO	MDA-MB-361 IBCs	MDA-MB-361 IBCs	
212698_s_at	septin 10	532	130	130	-4,10
1554452_a_at	hypoxia-inducible protein 2	2836	929	929	-3,05
213432_at	mucin 5, subtype B, tracheobronchial	830	195	195	-4,27
218162_at	olfactomedin-like 3	635	176	176	-3,60
208796_s_at	cyclin G1	310	100	100	-3,09
224996_at	Hypothetical protein MGC34646	1286	419	419	-3,07
201848_s_at	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	2317	529	529	-4,38
214658_at	transmembrane emp24 protein transport domain containing 7	666	241	241	-2,77
223058_at	chromosome 10 open reading frame 45	250	67	67	-3,71
241412_at	betacellulin	213	46	46	-4,60
201037_at	phosphofructokinase, platelet	801	243	243	-3,30
227034_at	chromosome 2 open reading frame 26	380	123	123	-3,10
212397_at	radixin	473	126	126	-3,74
204437_s_at	folate receptor 1 (adult)	407	110	110	-3,68
213011_s_at	triosephosphate isomerase 1	5488	1360	1360	-4,03
200822_x_at	triosephosphate isomerase 1	5872	1538	1538	-3,82
223565_at	proapoptotic caspase adaptor protein	217	44	44	-4,91
205477_s_at	alpha-1-microglobulin/bikunin precursor	1543	135	135	-11,44
225155_at	chromosome 6 open reading frame 160	2803	1069	1069	-2,62
201983_s_at	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	417	97	97	-4,30
208612_at	protein disulfide isomerase-associated 3	2119	777	777	-2,73
231233_at	hypothetical LOC388727	311	122	122	-2,54
209457_at	dual specificity phosphatase 5	698	180	180	-3,87
222411_s_at	signal sequence receptor, gamma (translocon-associated protein gamma)	1100	403	403	-2,73
230563_at	RasGEF domain family, member 1A	469	135	135	-3,46

(Continua)

(Continuação)

200632_s_at	N-myc downstream regulated gene 1	4064	743	-5,47
224999_at	Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	529	127	-4,16
206724_at	chromobox homolog 4 (Pc class homolog, Drosophila)	698	154	-4,54
219118_at	FK506 binding protein 11, 19 kDa	480	160	-2,99
200890_s_at	signal sequence receptor, alpha (translocon-associated protein alpha)	543	203	-2,67
205150_s_at	KIAA0644 gene product	424	112	-3,80
208658_at	protein disulfide isomerase-associated 4	1093	393	-2,78
227337_at	ankyrin repeat domain 37	528	96	-5,51
225008_at	Hypothetical protein MGC34646	452	139	-3,26
205350_at	cellular retinoic acid binding protein 1	236	65	-3,66
212689_s_at	jumonji domain containing 1A	880	347	-2,54
211754_s_at	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; peroxisomal membrane protein, 34kDa), member 17 /// solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; peroxisomal membrane protein, 34kDa), member 17	292	85	-3,43
215930_s_at	CTAGE family, member 5	881	288	-3,05
211936_at	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	6583	1523	-4,32
203574_at	nuclear factor, interleukin 3 regulated	282	78	-3,60
209321_s_at	adenylate cyclase 3	225	80	-2,81
202375_at	SEC24 related gene family, member D (S, cerevisiae)	838	235	-3,56
202833_s_at	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	616	123	-5,01
205652_s_at	tubulin tyrosine ligase-like family, member 1	213	75	-2,84
200705_s_at	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	3555	1023	-3,48
212292_at	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	242	59	-4,08
209635_at	adaptor-related protein complex 1, sigma 1 subunit	337	110	-3,07
229067_at	Similar to Formin binding protein 2 (srGAP2)	212	68	-3,12
204744_s_at	isoleucine-tRNA synthetase	1955	555	-3,53
210269_s_at	DNA segment on chromosome X and Y (unique) 155 expressed sequence	258	87	-2,97
220161_s_at	erythrocyte membrane protein band 4,1 like 4B	524	193	-2,72
203208_s_at	likely ortholog of chicken chondrocyte protein with a poly-proline region	1012	400	-2,53
226400_at	Cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	1369	297	-4,61
216806_at	RPL10 (ribosomal protein L10)	271	101	-2,69

(Continua)

(Continuação)

226628_at	THO complex 2	186	70	-2,67
204029_at	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 2 (flamingo homolog, Drosophila)	315	105	-3,00
201481_s_at	phosphorylase, glycogen; brain	352	96	-3,68
203683_s_at	vascular endothelial growth factor B	364	121	-3,00
212327_at	KIAA1102 protein	367	97	-3,78
222116_s_at	TBC1 domain family, member 16	422	153	-2,76
210896_s_at	aspartate beta-hydroxylase	1326	215	-6,16
214437_s_at	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	1365	169	-8,07
206081_at	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 1	145	40	-3,66
224241_s_at	protein for MGC:8393	170	51	-3,34
228523_at	nanos homolog 1 (Drosophila)	346	113	-3,07
207668_x_at	protein disulfide isomerase-associated 6	2833	876	-3,24
212085_at	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 6	3623	1042	-3,48
205480_s_at	UDP-glucose pyrophosphorylase 2	1749	570	-3,07
200935_at	calreticulin	1379	435	-3,17
201897_s_at	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B	646	179	-3,61
228222_at	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	2529	621	-4,07
208639_x_at	protein disulfide isomerase-associated 6	2631	775	-3,40
203165_s_at	solute carrier family 33 (acetyl-CoA transporter), member 1	152	40	-3,75
216640_s_at	protein disulfide isomerase-associated 6	1824	433	-4,21
213315_x_at	chromosome X open reading frame 40 /// hypothetical LOC541578 protein	1650	479	-3,45
224570_s_at	interferon regulatory factor 2 binding protein 2	1741	450	-3,87
227021_at	amine oxidase (flavin containing) domain 1	212	66	-3,21
200737_at	phosphoglycerate kinase 1	1982	422	-4,69
209357_at	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	440	131	-3,35
213660_s_at	topoisomerase (DNA) III beta	199	58	-3,41
228597_at	chromosome 21 open reading frame 45	325	120	-2,71
202087_s_at	cathepsin L	748	197	-3,80
222646_s_at	ERO1-like (S, cerevisiae)	439	136	-3,23
229969_at	Transcribed locus, moderately similar to XP_508230.1 zinc finger protein 195 [Pan troglodytes]	240	82	-2,93
228041_at	2-aminoacidipic 6-semialdehyde dehydrogenase	492	165	-2,98

(Continua)

(Continuação)

231955_s_at	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	169	35	-4,88
230795_at	Full open reading frame cDNA clone RZPD0834C0824D for gene HIST2H4, histone 2, H4; complete cds, incl. stopcodon	1159	300	-3,86
231298_at	Transcribed locus	402	153	-2,63
222849_s_at	secernin 3	408	146	-2,78
213750_at	Full length insert cDNA YH77E09	324	104	-3,12
229867_at	BTB (POZ) domain containing 9	223	60	-3,70
226835_s_at	transaldolase 1 /// similar to RPE-spondin	1746	674	-2,59
213591_at	aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1	225	55	-4,12
238248_at	Uromodulin (uromucoid, Tamm-Horsfall glycoprotein)	204	66	-3,12
202557_at	stress 70 protein chaperone, microsome-associated, 60kDa	339	135	-2,50
225018_at	spire homolog 1 (Drosophila)	236	78	-3,02
202162_s_at	CCR4-NOT transcription complex, subunit 8	367	133	-2,77
202842_s_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	1263	274	-4,62
236302_at	protein phosphatase 1E (PP2C domain containing)	301	74	-4,10
1561423_at	CDNA clone IMAGE:5277089, partial cds	311	73	-4,25
225698_at	TIGA1	315	107	-2,93
205151_s_at	KIAA0644 gene product	387	137	-2,81
202887_s_at	DNA-damage-inducible transcript 4	3994	683	-5,84
207300_s_at	coagulation factor VII (serum prothrombin conversion accelerator)	173	58	-2,97
226743_at	hypothetical protein FLJ34922	139	27	-5,13
203619_s_at	Fas apoptotic inhibitory molecule 2	111	1	-75,93
215995_x_at	CDNA FLJ12226 fis, clone MAMMA1001143	213	52	-4,08
219920_s_at	GDP-mannose pyrophosphorylase B	170	66	-2,58
236445_at	Homo sapiens, clone IMAGE:4796912, mRNA	3190	1275	-2,50
201998_at	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1	198	76	-2,59
202481_at	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	324	56	-5,76
221050_s_at	GTP binding protein 2	539	69	-7,75
202655_at	arginine-rich, mutated in early stage tumors	1861	484	-3,85
214096_s_at	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	3245	978	-3,32
230248_x_at	Full-length cDNA clone CS0CAP004YK15 of Thymus of Homo sapiens (human)	281	80	-3,51
219963_at	dual specificity phosphatase 13	625	176	-3,55
234367_x_at	transmembrane protease, serine 6	457	154	-2,96

(Continua)

(Continuação)

1558654_at	Protein phosphatase 1H (PP2C domain containing)	670	190	-3,53
58916_at	potassium channel tetramerisation domain containing 14	486	143	-3,40
1565358_at	Retinoic acid receptor, alpha	1218	334	-3,65
211527_x_at	vascular endothelial growth factor	344	67	-5,10
203234_at	uridine phosphorylase 1	176	30	-5,94
237320_at	hypothetical protein LOC346653	146	29	-4,96
200802_at	seryl-tRNA synthetase	1534	540	-2,84
230281_at	chromosome 16 open reading frame 46	210	72	-2,91
221195_at	PTD016 protein	165	37	-4,41
224367_at	brain expressed X-linked 2 /// brain expressed X-linked 2	496	115	-4,32
225520_at	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like	686	204	-3,36
1564066_at	spermatogenesis associated, serine-rich 1 /// similar to expressed sequence AW125688	174	63	-2,77
1558233_s_at	Activating transcription factor 1	306	82	-3,73
215920_s_at	hypothetical protein LOC283970	403	123	-3,28
220283_at	hypothetical protein FLJ13840	172	50	-3,41
210074_at	cathepsin L2	454	136	-3,35
216652_s_at	down-regulator of transcription 1, TBP-binding (negative cofactor 2)	423	123	-3,43
226077_at	hypothetical protein FLJ31951	188	40	-4,72
209017_s_at	protease, serine, 15	1259	508	-2,48
40148_at	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 2 (Fe65-like)	388	150	-2,59
205905_s_at	MHC class I polypeptide-related sequence A /// MHC class I polypeptide-related sequence B	392	127	-3,08
206245_s_at	influenza virus NS1A binding protein	575	202	-2,85
232661_s_at	hypothetical protein DKFZp564O0523	246	61	-4,02
241669_x_at	protein kinase D2	363	116	-3,12
224817_at	SH3 multiple domains 1	362	111	-3,27
229868_s_at	Growth differentiation factor 15	226	41	-5,46
214023_x_at	tubulin, beta polypeptide paralog	239	55	-4,33
219049_at	chondroitin beta1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase	136	32	-4,20
208892_s_at	dual specificity phosphatase 6	2648	600	-4,42
201170_s_at	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	149	32	-4,69
208891_at	dual specificity phosphatase 6	1873	347	-5,40

(Continua)

(Continuação)

208893_s_at	dual specificity phosphatase 6	1887	351	-5,38
207076_s_at	argininosuccinate synthetase	3109	772	-4,03
1553972_a_at	cystathionine-beta-synthase	748	231	-3,24
1555407_s_at	FGD1 family, member 3	324	105	-3,09
210512_s_at	vascular endothelial growth factor	3369	636	-5,30
226899_at	unc-5 homolog B (C, elegans)	301	59	-5,11
212501_at	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	2673	840	-3,18
221827_at	chromosome 20 open reading frame 18	3985	954	-4,18
218136_s_at	mitochondrial solute carrier protein	222	58	-3,84
1562792_at	Hypothetical protein LOC152519	290	116	-2,50
202859_x_at	interleukin 8	188	33	-5,65
1570561_at	Homo sapiens unknown sequence /DEF=Homo sapiens unknown sequence	2680	293	-9,15
202431_s_at	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	278	80	-3,46
212171_x_at	vascular endothelial growth factor	1368	244	-5,60
210263_at	potassium voltage-gated channel, subfamily F, member 1	335	62	-5,37
201324_at	epithelial membrane protein 1	255	76	-3,36
202364_at	MAX interactor 1 /// MAX interactor 1	1590	612	-2,60
230406_at	Transcribed locus	270	76	-3,56
210244_at	cathelicidin antimicrobial peptide	433	91	-4,73
221577_x_at	growth differentiation factor 15	6091	581	-10,49
202464_s_at	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	733	250	-2,94
226452_at	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1	436	76	-5,77
239231_at	CDNA FLJ41910 fis, clone PEBLM2007834	194	80	-2,44
220134_x_at	hypothetical protein FLJ10647	167	49	-3,39
224657_at	mitogen-inducible gene 6	2472	305	-8,10
230466_s_at	Mesenchymal stem cell protein DSC96	558	155	-3,61
230746_s_at	Stanniocalcin 1	348	53	-6,59
227167_s_at	Mesenchymal stem cell protein DSC96	535	182	-2,93
201761_at	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase	3909	1581	-2,47
221286_s_at	proapoptotic caspase adaptor protein	379	69	-5,48
230421_at	similar to hypothetical protein 9630041N07	242	98	-2,47
221489_s_at	sprouty homolog 4 (Drosophila)	453	96	-4,71

(Continua)

(Continuação)

227404_s_at	Early growth response 1	2340	403	-5,81
202376_at	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3	2324	143	-16,25
214413_at	Tyrosine aminotransferase	1302	108	-12,09
206793_at	phenylethanolamine N-methyltransferase	268	46	-5,80
225612_s_at	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5	230	68	-3,40
224826_at	hypothetical protein KIAA1434	355	80	-4,43
205239_at	amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	3974	781	-5,09
215189_at	keratin, hair, basic, 6 (monilethrix)	485	114	-4,24
201656_at	integrin, alpha 6	1588	304	-5,22
206916_x_at	tyrosine aminotransferase	3275	512	-6,39
223172_s_at	mitochondrial protein 18 kDa	551	236	-2,34
228754_at	glutamate receptor interacting protein 2	253	101	-2,51
202847_at	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	1609	494	-3,26
225165_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1B (dopamine and cAMP regulated phosphoprotein, DARPP-32)	706	92	-7,67
209135_at	aspartate beta-hydroxylase	3289	1378	-2,39
214385_s_at	mucin 5, subtypes A and C, tracheobronchial/gastric	440	97	-4,53
243806_at	ST8 alpha-N-acetylneuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 6	425	101	-4,22
207543_s_at	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide 1	1853	362	-5,12
219572_at	Ca2+-dependent activator protein for secretion 2	467	133	-3,52
215215_s_at	exonuclease NEF-sp	140	36	-3,90
214303_x_at	mucin 5, subtypes A and C, tracheobronchial/gastric	721	97	-7,43
201631_s_at	immediate early response 3	2722	920	-2,96
204348_s_at	adenylate kinase 3-like 1	543	123	-4,40
201694_s_at	early growth response 1	1999	350	-5,71
225342_at	Adenylate kinase 3	371	135	-2,74
204595_s_at	stanniocalcin 1	155	52	-3,01
224997_x_at	H19, imprinted maternally expressed untranslated mRNA	144	37	-3,84
236545_at	Protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform (calcineurin A alpha)	113	537	4,76
202457_s_at	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform (calcineurin A alpha)	276	1321	4,78

(Continua)

(Continuação)

225283_at	alpha	36	267	7,46
201010_s_at	arrestin domain containing 4	42	1220	29,07
226067_at	thioredoxin interacting protein	17	206	11,84
201009_s_at	chromosome 20 open reading frame 114	98	1955	20,01
216687_x_at	thioredoxin interacting protein	69	748	10,84
204364_s_at	UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B15	36	221	6,23
224851_at	chromosome 2 open reading frame 23	78	244	3,14
201008_s_at	cyclin-dependent kinase 6	47	1743	37,27
219582_at	thioredoxin interacting protein	28	133	4,71
233223_at	opioid growth factor receptor-like 1	36	179	4,98
240458_at	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	49	200	4,06
227955_s_at	Family with sequence similarity 20, member C	52	330	6,37
213954_at	CDNA: FLJ22256 fis, clone HRC02860	41	154	3,74
238715_at	KIAA0888 protein	11	158	14,70
244443_at	Hypothetical protein MGC40489	37	144	3,86
1554260_a_at	LOC440309	75	291	3,87
216804_s_at	KIAA0826	122	481	3,94
244474_at	PDZ and LIM domain 5	54	200	3,74
229086_at	RAN binding protein 9	15	121	8,01
204863_s_at	hypothetical protein BC007899	69	318	4,62
200727_s_at	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	411	1387	3,37
213089_at	ARP2 actin-related protein 2 homolog (Yeast)	78	278	3,56
226764_at	hypothetical protein LOC153561	63	226	3,59
238884_at	hypothetical protein LOC152485	21	299	14,24
1559949_at	Catenin (cadherin-associated protein), delta 1	47	216	4,56
	Trichorhinophalangeal syndrome I			

A figura 2 mostra os resultados obtidos quando da análise de formação de vias e redes entre os 235 genes usando a plataforma Metacore. A via que apresentou o maior valor estatístico foi o desenvolvimento da sinalização EGFR. Dentre os genes afetados nessa via estão o EGFR, C-myc, BTC e AREG (Figura 3 e Figura 4) Juntos, estes dados sugerem que o DCD promove seus efeitos na proliferação e sobrevivência celular através da modulação da expressão de fatores da via de sinalização da família EGF/ErbB.

Tabela 4 - Análise de ontologia gênica pela plataforma DAVID

Banco de dados	Categoria	Genes envolvidos	%	Valor de p	Benjamini
GOTERM_MF_ALL	Atividade de fator de crescimento	13	5,8	1,10E-06	3,30E-03
GOTERM_MF_ALL	Ligação à proteínas	104	46,6	1,20E-05	1,80E-02
GOTERM_MF_ALL	Ligação ao EGFR	4	1,8	1,20E-04	1,10E-01
GOTERM_MF_ALL	Ligação à vitamina	9	4	1,30E-04	8,90E-02
GOTERM_MF_ALL	Atividade de proteína serina/treonina fosfatase	5	2,2	1,30E-03	5,30E-01
GOTERM_MF_ALL	Ligação ao fosfato piridoxal	5	2,2	3,30E-03	7,90E-01
GOTERM_MF_ALL	Atividade proteína disulfeto isomerase	3	1,3	4,60E-03	8,50E-01
GOTERM_MF_ALL	Atividade de fosfoproteína fosfatase	7	3,1	8,60E-03	9,60E-01
GOTERM_MF_ALL	Atividade éster fosfórico isomerase	10	4,5	9,30E-03	9,50E-01
GOTERM_MF_ALL	Ligação de cofator	8	3,6	1,20E-02	9,70E-01
GOTERM_MF_ALL	Ligação (Binding)	149	66,8	1,20E-02	9,60E-01
GOTERM_MF_ALL	Atividade de oxido-redutase intramolecular	4	1,8	1,60E-02	9,80E-01
GOTERM_MF_ALL	Atividade hidrolase monoéster fosfórico	8	3,6	1,70E-02	9,80E-01
GOTERM_MF_ALL	Atividade catepsina L	2	0,9	2,10E-02	9,90E-01

Categoria - refere-se ao enriquecimento funcional; % - porcentagem dos genes da lista envolvidos; *Benjamini* - teste estatístico para corrigir os valores de enriquecimento e evitar falso positivo.

Tabela 5 - Anotação funcional obtida na plataforma DAVID.

Bando de dados	Categoria	Genes envolvidos	%	Valor de p	Benjamini
SP_PIR_KEYWORDS	Fator de crescimento	13	5,8	2,60E-08	2,70E-05
SP_PIR_KEYWORDS	Domínio EGF-like	12	5,4	3,50E-05	1,90E-02
SP_PIR_KEYWORDS	Retículo endoplasmático	17	7,6	2,10E-04	7,20E-02
SP_PIR_KEYWORDS	Proteína fosfatase	7	3,1	1,30E-03	2,40E-01
SP_PIR_KEYWORDS	Atividade redox disulfeto	3	1,3	2,10E-03	3,10E-01
SP_PIR_KEYWORDS	Fosfotransferase	8	3,6	3,60E-03	4,30E-01
SP_PIR_KEYWORDS	Secreção	26	11,7	5,50E-03	5,20E-01
SP_PIR_KEYWORDS	Oxido-redutase	3	1,3	6,30E-03	5,30E-01
SP_PIR_KEYWORDS	Atividade mitogênica	4	1,8	7,10E-03	5,30E-01
SP_PIR_KEYWORDS	Duplicação	8	3,6	7,70E-03	5,30E-01
SP_PIR_KEYWORDS	Isomerase	6	2,7	9,10E-03	5,60E-01
SP_PIR_KEYWORDS	Centro ativo redox	4	1,8	9,90E-03	5,60E-01
SP_PIR_KEYWORDS	Gluconeogenese	3	1,3	1,10E-02	5,70E-01
SP_PIR_KEYWORDS	ATP	8	3,6	1,30E-02	6,00E-01
SP_PIR_KEYWORDS	Transdução de sinal	42	18,8	1,60E-02	6,50E-01
SP_PIR_KEYWORDS	Divisão celular	7	3,1	1,60E-02	6,40E-01
SP_PIR_KEYWORDS	Metabolismo de carbono	3	1,3	1,70E-02	6,40E-01
SP_PIR_KEYWORDS	Biossíntese de aminoácidos	3	1,3	1,90E-02	6,60E-01

A anotação funcional foi obtida agrupando-se os genes alterados pelo silenciamento do gene DCD por categoria funcional, utilizando a base de dados SP_PIR_KEYWORDS como referência. *Categoria* - refere-se ao enriquecimento funcional; % - porcentagem dos genes da lista envolvidos; *Benjamini* - teste estatístico para corrigir os valores de enriquecimento e evitar falso positivo.

Tabela 6 - Anotação funcional obtida na plataforma DAVID das vias alteradas pelo silenciamento do gene DCD utilizando as base de dados KEGG_Pathway.

Bando de dados	Categoria	Genes envolvidos	%	Valor de P	Benjamini
KEGG_PATHWAY	Sinalização da via ErbB	11	4,9	3,40E-06	6,80E-04
KEGG_PATHWAY	Câncer de bexiga	6	2,7	8,50E-04	8,20E-02
KEGG_PATHWAY	Câncer de pâncreas	6	2,7	1,20E-02	5,50E-01
KEGG_PATHWAY	Metabolismo do folato	3	1,3	3,60E-02	8,40E-01
KEGG_PATHWAY	Metabolismo de frutose e manose	4	1,8	4,50E-02	8,40E-01

Categoria - refere-se ao enriquecimento funcional; % - porcentagem dos genes da lista envolvidos; *Benjamini* - teste estatístico para corrigir os valores de enriquecimento e evitar falso positivo.

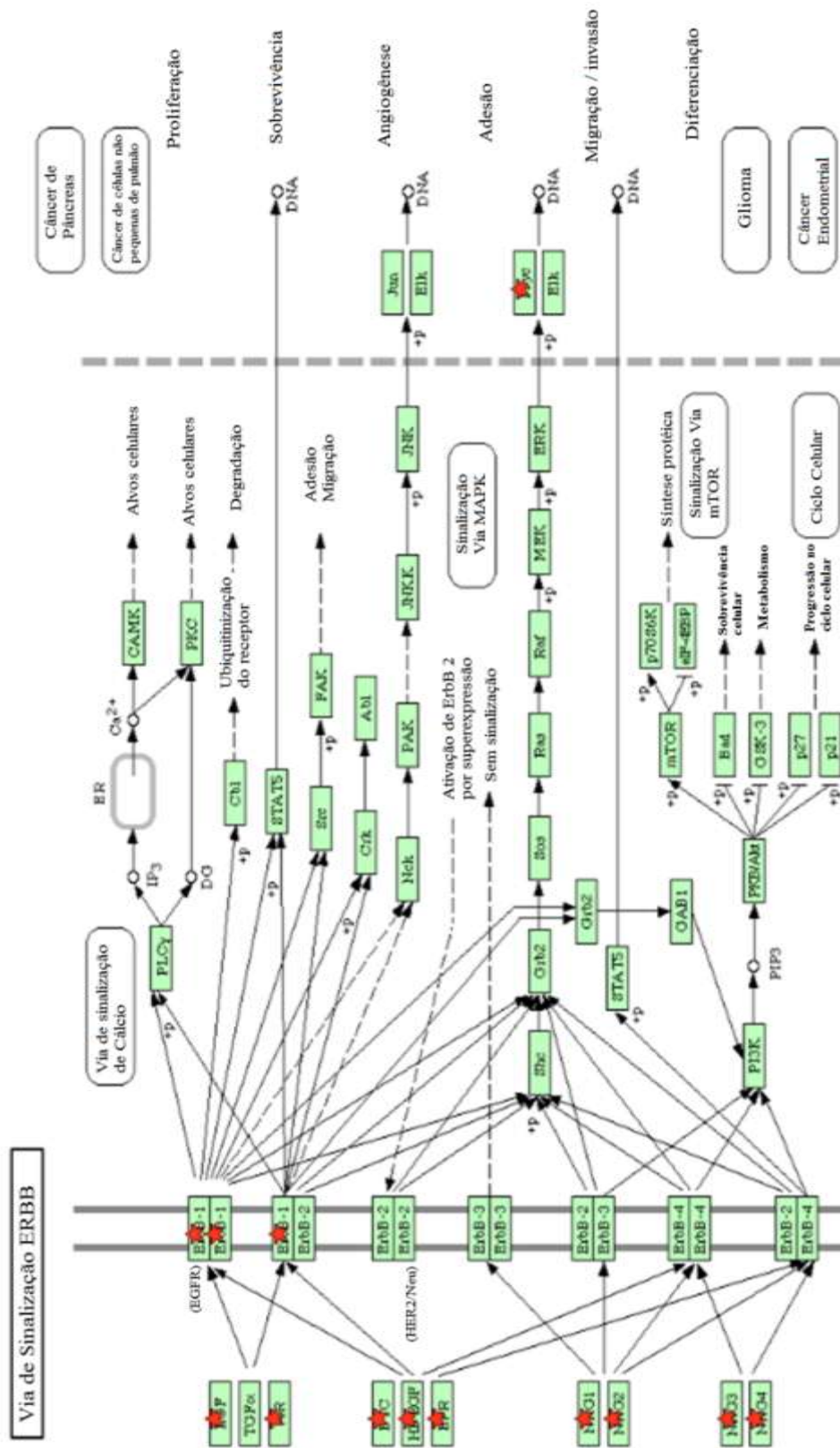


Figura 1 - Diagrama da via de sinalização EGF/ErbB induzida pelo silenciamento do gene DCD obtida através da análise de anotação funcional na plataforma DAVID base de dados KEGG_Pathway. As estrelas vermelhas indicam os genes que foram alterados pelo silenciamento do gene DCD na célula MDA-MB-361. Os quadrados representam os genes envolvidos na sinalização, \uparrow p indica fosforilação, Ca^{2+} indica ativação da via pela liberação do cálcio.

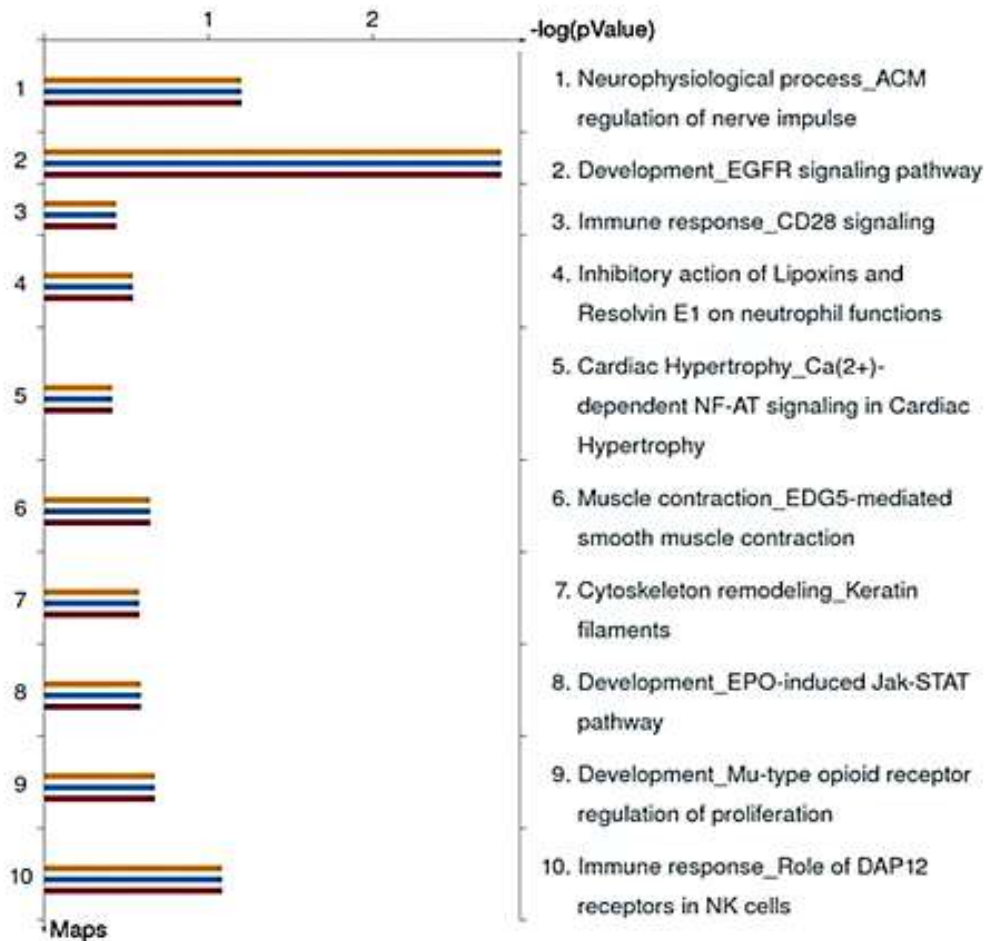


Figura 2 - Análise de enriquecimento de vias e processos alterados pelo silenciamento do gene DCD nas células MDA-MB-361. As barras representam o valor estatístico da via de sinalização nas sublinhagens celulares MDA-MB-361 IBC I (laranja), IBC II (Azul), IBC III (vermelha) em relação à sublinhagem controle, MDA-MB-361 pLKO. Dados obtidos com a plataforma GeneGo Metacore.

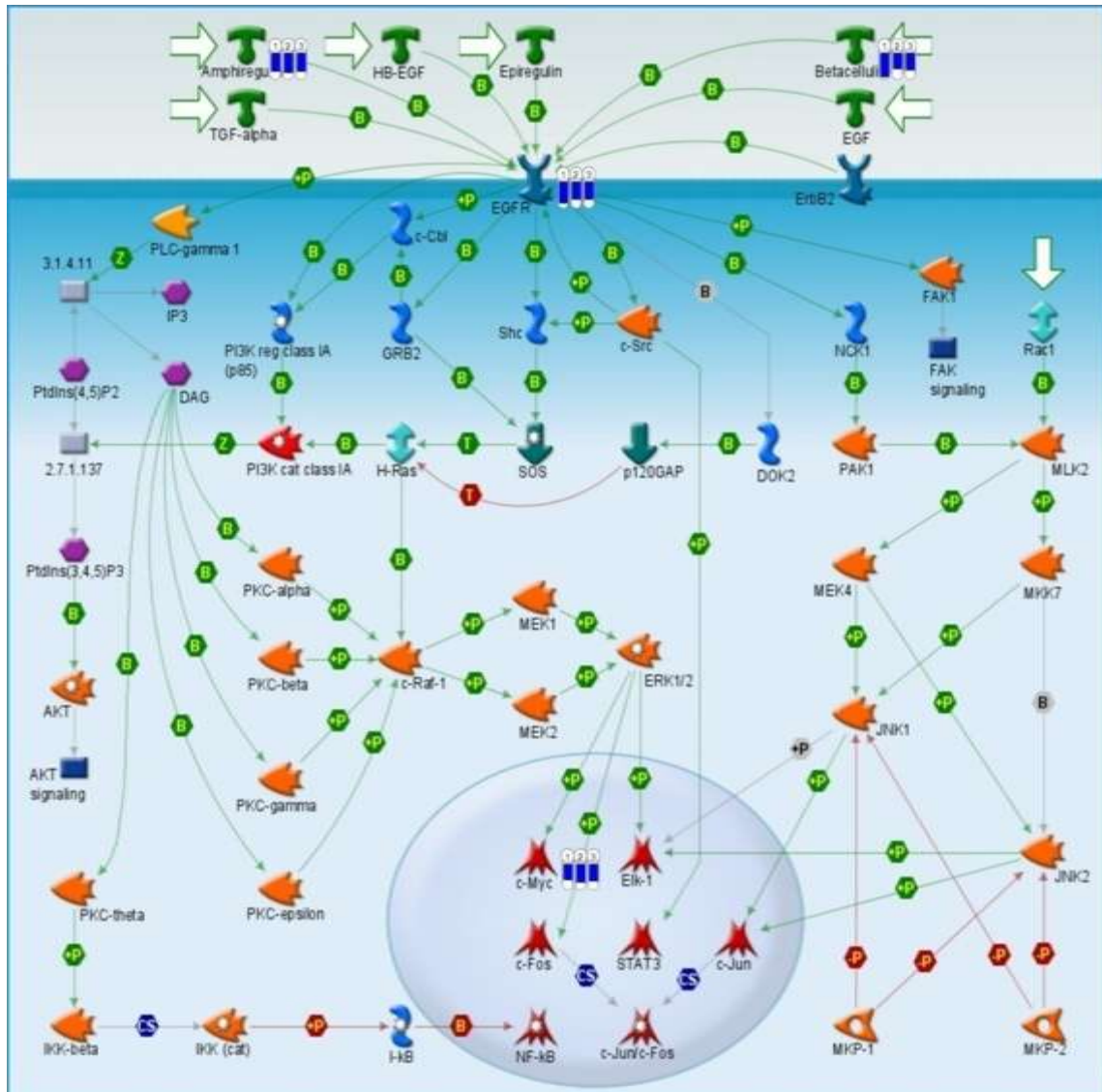


Figura 3 - Via de sinalização da família EGFR/ErbB com genes diferencialmente regulados pelo silenciamento do gene DCD na célula MDA-MB-361. As barras azuis representam índices de regulação negativa dos genes nas sublinhagens celulares MDA-MB-361 IBC I (1) IBC II (2) e IBC III (3). O significado dos símbolos e setas usados nesta figura são apresentados no Anexo II. Dados obtidos com a plataforma Metacore Genego.

3.2 DCD modula a expressão dos membros da família EGF/ErbB e seus ligantes nas células MDA-MB-361

Para confirmar as predições indicadas pelos programas de bioinformática, foram realizados ensaios de qPCR para validar os genes diferencialmente expressos entre as sublinhagens MDA-MB-361 IBC I e a controle, MDA-MB-361 pLKO. Para melhor entendimento dos resultados, as variações na expressão relativa de transcritos serão descritas em percentagem, considerando o valor do controle igual 100%. Como podemos observar na Figura 5A, a supressão da expressão de DCD via shRNA na sublinhagem MDA-MB-361 IBC I provocou uma redução na taxa de expressão dos seus transcritos em cerca de 77% quando comparado ao controle ($p < 0.001$). Nós também avaliamos a expressão proteica de DCD nessas sublinhagens. O silenciamento reduziu expressivamente a presença da proteína na sublinhagem MDA-MB-361 IBC quando comparada à sublinhagem controle (Figura 5B), confirmando, portanto, os resultados anteriores obtidos em nosso laboratório (MOREIRA, 2007).

O silenciamento do gene DCD na sublinhagem MDA-MB-361 IBC I reduziu a taxa de expressão de EGFR em mais de 68% em relação ao valor observado no controle ($p < 0.01$) (Figura 5C). O efeito oposto foi observado na expressão do receptor HER-4 que teve sua taxa de expressão aumentada em 58% quando comparada ao controle ($p < 0.05$) (Figura 5C). Por outro lado, não foi observada diferença estatística na expressão dos receptores HER-2 e HER-3 após o silenciamento gênico (Figura 5C). Esses dados sugerem que o DCD é capaz de regular diferencialmente a expressão dos receptores EGFR e HER-4, que apresentam atividades distintas com relação ao crescimento e susceptibilidade a agentes citotóxicos (YARDEN, 2001; BARNES et al., 2005; NORMANNO et al., 2006; KARAMOUZIS et al., 2007; BURGESS, 2008).

Após confirmar os efeitos do silenciamento do DCD sobre a expressão dos receptores da família EGF, a próxima questão que surgiu foi se a expressão dos ligantes também havia sido alterada. Para tanto, as expressões relativas de todos os ligantes da família EGF/ErbB foram avaliados nas sublinhagens MDA-MB-361 pLKO e MDA-MB-361 IBC I.

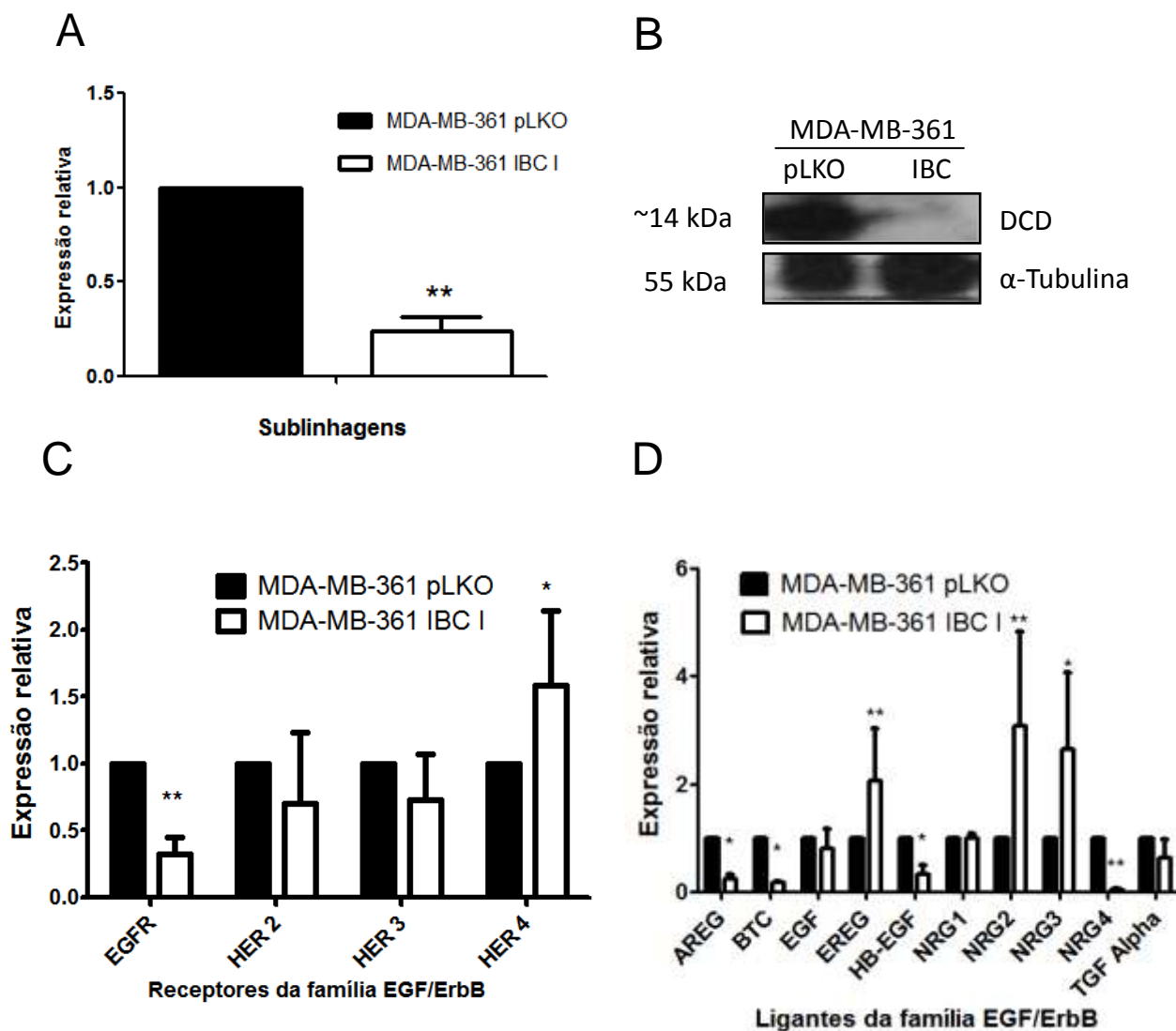


Figura 5 - Expressão dos receptores e ligantes da família EGF/ErbB após o silenciamento do gene Dermicidina na linhagem MDA-MB-361. (A) Expressão relativa de transcritos do gene DCD e (B) expressão da proteína DCD nas amostras das sublinhagens MDA-MB-361 pLKO e MDA-MB-361 IBC. Em (C) expressão gênica dos receptores EGF/ErbB e em (D) dos ligantes da família EGF/ErbB nas duas sublinhagens. A expressão relativa de cada gene foi determinada por RT-PCR em tempo real. *Colunas*, média; *barras*, erro padrão; ** $p < 0.001$; * $p < 0.05$, pelo teste *Pair Wise P(H1)*.

Como podemos observar na figura 5D, o silenciamento do DCD reduziu a expressão relativa de transcritos para AREG em 75%, BTC em 82%, HB-EGF em 67% e NRG4 em 95%, quando comparada ao valor detectado no controle ($p < 0.05$). O silenciamento também provocou um efeito oposto na expressão de alguns ligantes, aumentando a expressão de EREG, NRG2 e

NRG3 em cerca de 100%, 284% e 163%, respectivamente, em relação ao controle ($p < 0.05$) (Figura 5D). Porém, o silenciamento não afetou a expressão de EGF, TGF- α e NRG1 (Figura 5D).

Os resultados acima descritos sugerem que o DCD é capaz de induzir a expressão de alguns ligantes da família EGF/ErbB, os quais, possivelmente, atuariam de forma autócrina promovendo o crescimento tumoral de forma sinérgica ao aumento da expressão do receptor EGFR. Por outro lado, o DCD reduziria a expressão de alguns ligantes, dentre eles o NRG2 e o NRG3 que são dois ligantes conhecidos do receptor HER-4 (KARAMOUZIS et al., 2007). A inibição desses ligantes contribuiria, juntamente com a redução da expressão desse receptor, para uma diminuição do efeito inibitório do crescimento e sobrevivência celular induzida pela ativação do mesmo (KARAMOUZIS et al., 2007).

Estes estudos mostraram que silenciamento de DCD nas células MDA-MB-361 reduziu a expressão de mensageiros para o receptor de EGFR, sem, no entanto, afetar a expressão para o receptor HER-2. Para confirmar estes dados ao nível proteico, foram feitos ensaios de detecção por imunofluorescência com anticorpos específicos para essas duas proteínas. Como pode ser observada na figura 6, a intensidade de expressão dos receptores de EGFR foi reduzida quase que completamente nas células da sublinhagem MDA-MB-361 IBC I. Em relação ao receptor HER-2, percebe-se claramente uma distribuição espacial mais difusa da marcação em todos os compartimentos celulares, porém, com intensa marcação em torno da membrana celular (Figura 6), uma característica típica da superexpressão das moléculas de receptor HER-2, como a que ocorre na linhagem de células MDA-MB-361 (LACROIX e LECLERCQ, 2004). Na imagem de sobreposição, percebe-se que a distribuição e intensidade da fluorescência foram pouco alteradas na sua distribuição intracelular nas células da sublinhagem MDA-MB-361 IBC I com silenciamento da DCD (Figura 6).

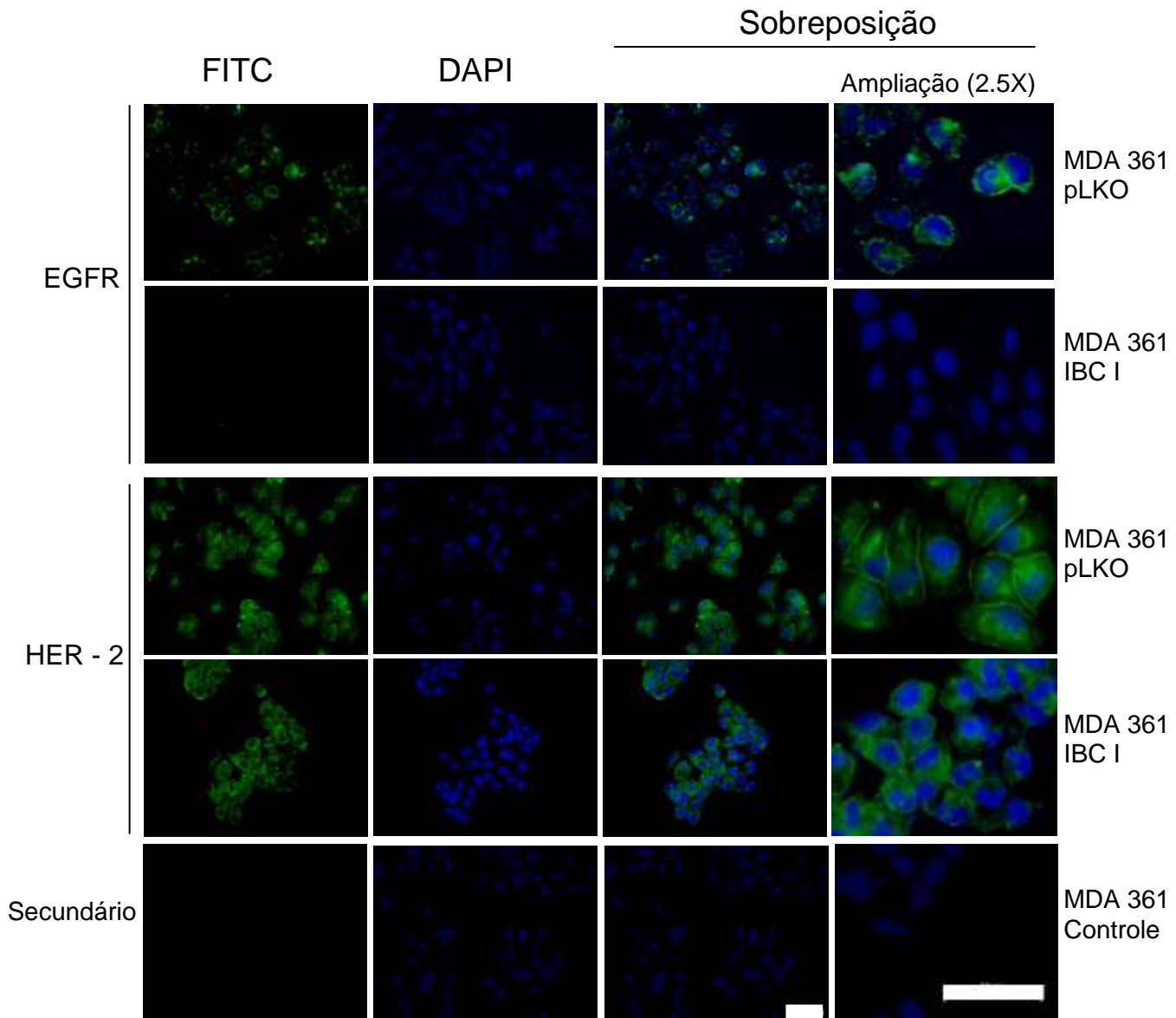


Figura 6 - Expressão dos receptores EGFR e HER-2 nas sublinhagens MDA-MB-361 pLKO e MDA-MB-361 IBC I. Imagens representativas de imunofluorescência utilizando os anticorpos primários SC-03 (EGFR) e Herceptin® (HER-2) (verde). As células do controle foram incubadas apenas com secundário conjugado com FITC. Os núcleos evidenciados com DAPI (azul). Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos em três ensaios independentes.

3.3 O silenciamento do DCD nas células MDA-MB-361 reduz a ativação das vias de sinalização mediadas pelo EGFR

Como podemos observar na figura 7, a ativação do receptor EGFR, mensurada pela sua fosforilação no resíduo de tirosina 1173, mostrou-se visivelmente reduzida na sublinhagem MDA-MB-361 IBC I quando comparada à sublinhagem controle, MDA-MB-361 pLKO. Mesmo após a adição do ligante EGF, a fosforilação do receptor na sublinhagem com o DCD silenciado mostrou-se inferior ao controle (Figura 7).

Ao analisar a fosforilação das proteínas da cascata de sinalização ativada pelo receptor EGFR, observamos que a AKT apresentou-se constitutivamente fosforilada na sublinhagem MDA-MB-361 pLKO, contudo, esse estado reduziu significativamente após o silenciamento do DCD, mesmo após o estímulo com EGF (Figura 7). Notavelmente, a linhagem controle mostrou-se mais responsiva ao EGF no tocante à fosforilação da AKT (Figura 7).

Com relação à STAT3, a sublinhagem controle não apresentou essa proteína fosforilada sem a presença de EGF no meio, entretanto, quando a sublinhagem foi estimulada os níveis de fosforilação foram significativamente aumentados (Figura 7). Por outro lado, as células MDA-MB-361 IBCI apresentaram uma porção da proteína fosforilada mesmo sem EGF. Após o estímulo, houve um aumento perceptível do seu estado de fosforilação, porém, em um nível inferior ao observado na sublinhagem MDA-MB-361 pLKO (Figura 7). Já a fosforilação da MAPK foi somente observada na linhagem MDA-MB-361 após estímulo com EGF (Figura 7).

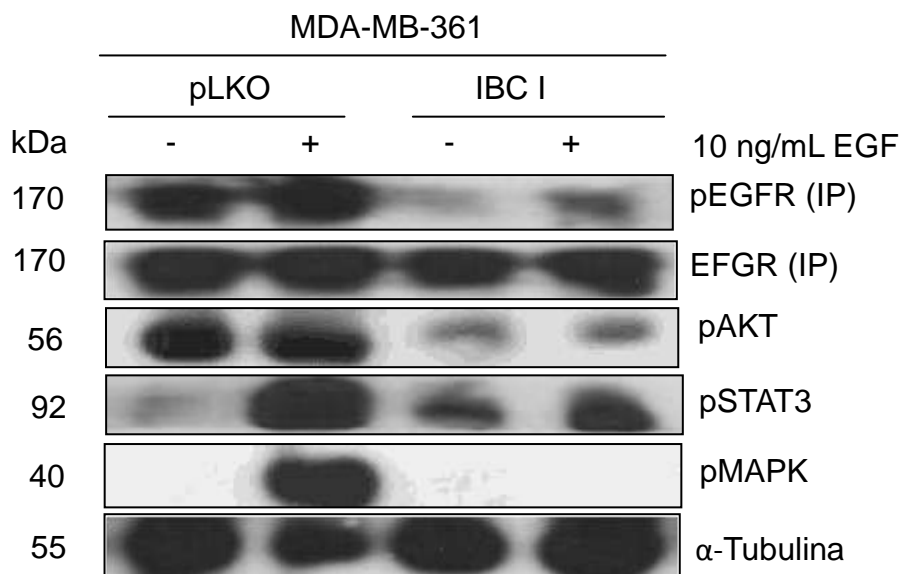


Figura 7 – Ensaios de Western blot mostrando o efeito do silenciamento do gene DCD na linhagem MDA-MB-361 na ativação do receptor EGFR, STAT3, AKT e MAPK. Células MDA-MB-361 pLKO e IBC I foram tratadas (+) ou não (-) com 10 ng/mL com EGFR por 30 minutos, como indicado. O receptor EGFR foi imunoprecipitado do extrato celular utilizando o anticorpo policlonal de coelhos SC-03 e a proteína fosforilada pEGFR com o anticorpo SC-12351. A α-tubulina foi utilizada como controle do ensaio. Imagens representativas de dois ensaios independentes. *IP*, imunoprecipitação.

3.4 O silenciamento do DCD na linhagem MDA-MB-361 reduz a expressão de C-myc e ciclina B

Os dados gerados pela plataforma Metacore GeneGo indicaram que a ativação da via de sinalização EGFR/ErbB poderia causar um aumento da expressão de C-myc (Figuras 3 e 4). Ao avaliar a expressão dessa proteína na sublinhagem MDA-MB-361 IBC I, nós observamos uma redução expressiva da proteína quando comparada a sua expressão no controle (Figura 8). A expressão de C-myc está intrinsecamente relacionada à progressão no celular (COLLER, et al., 2000). Tendo isso em vista, analisamos a expressão de ciclina B nas duas sublinhagens. Ela mostrou-se reduzida na sublinhagem MDA-MB-361 IBC quando comparada à MDA-MB-361 pLKO (Figura 8). Os resultados sugerem que a presença de DCD é capaz de promover a proliferação através do aumento da expressão de genes relacionados com a progressão do ciclo celular, dentre eles C-myc e Ciclina B.

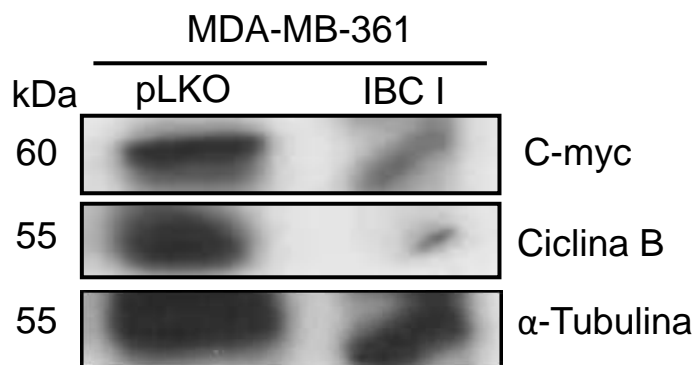


Figura 8 – Expressão de Ciclina B e C-myc nas sublinhagens MDA-MB-361 pLKO e MDA-MB-361 ICB obtida em ensaio de Western blot. Imagem representativa de dois ensaios independentes.

3.5 Silenciamento de DCD aumenta a expressão de VEGFA e VEGFB e reduz a expressão de TXNIP nas células MDA-MB-361

O câncer é uma doença de origem multifatorial na qual ocorre um somatório de mutações no genoma de uma célula normal que progressivamente a transforma em uma célula neoplásica. Como são vários genes que participam desse processo de forma sinérgica (HANAHAN e WEINBERG, 2000), avaliamos a expressão de outros genes que não estão diretamente envolvidos na sinalização mediada pela família EGF/ErbB, mas que respeitassem dois critérios: expressão bastante alterada no ensaio de microarranjo de DNA e envolvimento no desenvolvimento tumoral. Dentro desses critérios, avaliamos a expressão de dois genes regulados negativamente e um regulado positivamente pelo silenciamento do DCD.

A expressão dos fatores de crescimento epitelial vascular A e B (VEGFA e VEGFB) apresentaram uma redução em mais de 60% em comparação com o controle ($p < 0.05$) (Figura 9). Já a expressão do gene TXNIP (*Thioredoxin interacting protein*) apresentou um aumento em torno de 200% quando comparado com o controle ($p < 0.001$) (Figura 9).

Esses dados sugerem que o DCD é capaz de induzir a expressão de outros fatores envolvidos no crescimento e na progressão tumoral. Além disso, o DCD foi capaz de inibir a expressão da TXNIP cuja atividade anti-proliferativa é bem conhecida (KIM et al., 2007; CADENAS et al., 2010).

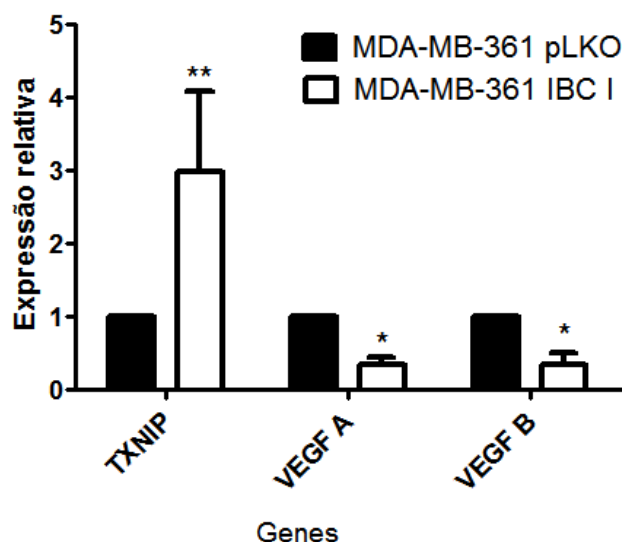


Figura 9 - Efeito do silenciamento do gene DCD sobre a expressão do fator de crescimento endotelial vascular A e B (VEGFA e B) e do gene TXNIP. A expressão relativa de cada gene foi determinada por RT-PCR em tempo real. Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos em três ensaios independentes. *Colunas*, média; *barras*, erro padrão; ** $p < 0.001$; * $p < 0.05$, pelo teste *Pair Wise P(H1)*.

3.6 Tratamento das células MDA-MB-361 com a proteína DCD recombinante modula a expressão de EGF/ErbB, C-myc e p21

Na figura 10 estão apresentados os resultados dos experimentos para verificar se a estimulação de células MDA-MB-361 com a adição exógena de DCD recombinante influenciaria a proliferação celular e a expressão gênica da família EGF/ErbB, C-myc e p21. Como podemos observar na figura 10A, a DCDr induziu uma curva dose-resposta de crescimento celular em forma de sino. A concentração de 0.1 nM foi a que mais estimulou a proliferação em cerca de 68%, em comparação com o controle ($p < 0.001$). Na dose 1 nM, o estímulo mitogênico ainda foi significativamente maior que no controle, em torno de 37% ($p < 0.001$), porém, de forma menos pronunciada (Figura 10A).

Por outro lado, as concentrações de 10 e 100 nM não foram capazes de estimular a proliferação celular (Figura 10A).

Já expressão dos transcritos de EGFR apresentou um padrão similar à curva dose-resposta em forma de sino observada no ensaio de proliferação (Figuras 10A e 10B). Entretanto, houve uma diferença na dose capaz de induzir a expressão de EGFR em comparação com a resposta mitogênica. Enquanto a maior resposta proliferativa ocorreu com o tratamento com 0.1 nM de DCDr, a expressão de EGFR mais acentuada foi observada com 0.25 nM o qual causou um aumento de 278% em relação ao controle ($p < 0.001$) (Figura 10B). Por outro lado, a dose de 0.1 nM não foi capaz de induzir a expressão de EGFR (Figuras 10B). Apesar dessa diferença, a concentração de 1 nM foi aparentemente menos eficiente em induzir a expressão de EGFR que a de 0.25 nM. Nessa concentração, a DCDr foi capaz de induzir um aumento de 144% em comparação com o controle ($p < 0.001$). Já a dose de 10 nM não foi capaz de alterar a expressão de EGFR, o que está de acordo com o experimento de proliferação (Figuras 10A e 10B).

Como observamos que a presença de DCDr no meio aumentou a proliferação celular, decidimos avaliar de que modo se comportava a expressão de dois genes que regula esse processo, um positivamente, C-myc, e outro negativamente, p21 (COLLER, et al., 2000; GARTEL e RADHAKRISHAN, 2005). A figura 10C mostra que o DCDr foi capaz de aumentar em 130% e 64% a expressão de C-myc nas concentrações de 0.25 nM e 1 nM, respectivamente, em comparação com o controle ($p < 0.001$). Uma das principais funções do fator de transcrição C-myc é regular a expressão de genes que controlam o ciclo celular positivamente, como as ciclinas, e negativamente, como exemplo, a proteína p21, um inibidor do ciclo celular. Nesse sentido, avaliamos se a estimulação com a DCDr teria algum impacto na expressão de transcritos do gene p21. Como se pode observar na figura 10D, as concentrações de 0.25 nM e 1 nM de DCDr reduziram significativamente em 65% e 51%, respectivamente, a expressão de transcritos de p21 ($p < 0.05$) em relação ao controle. Contudo, a concentração de 10 nM não teve nenhuma influência sobre a expressão desse gene (Figura 10D).

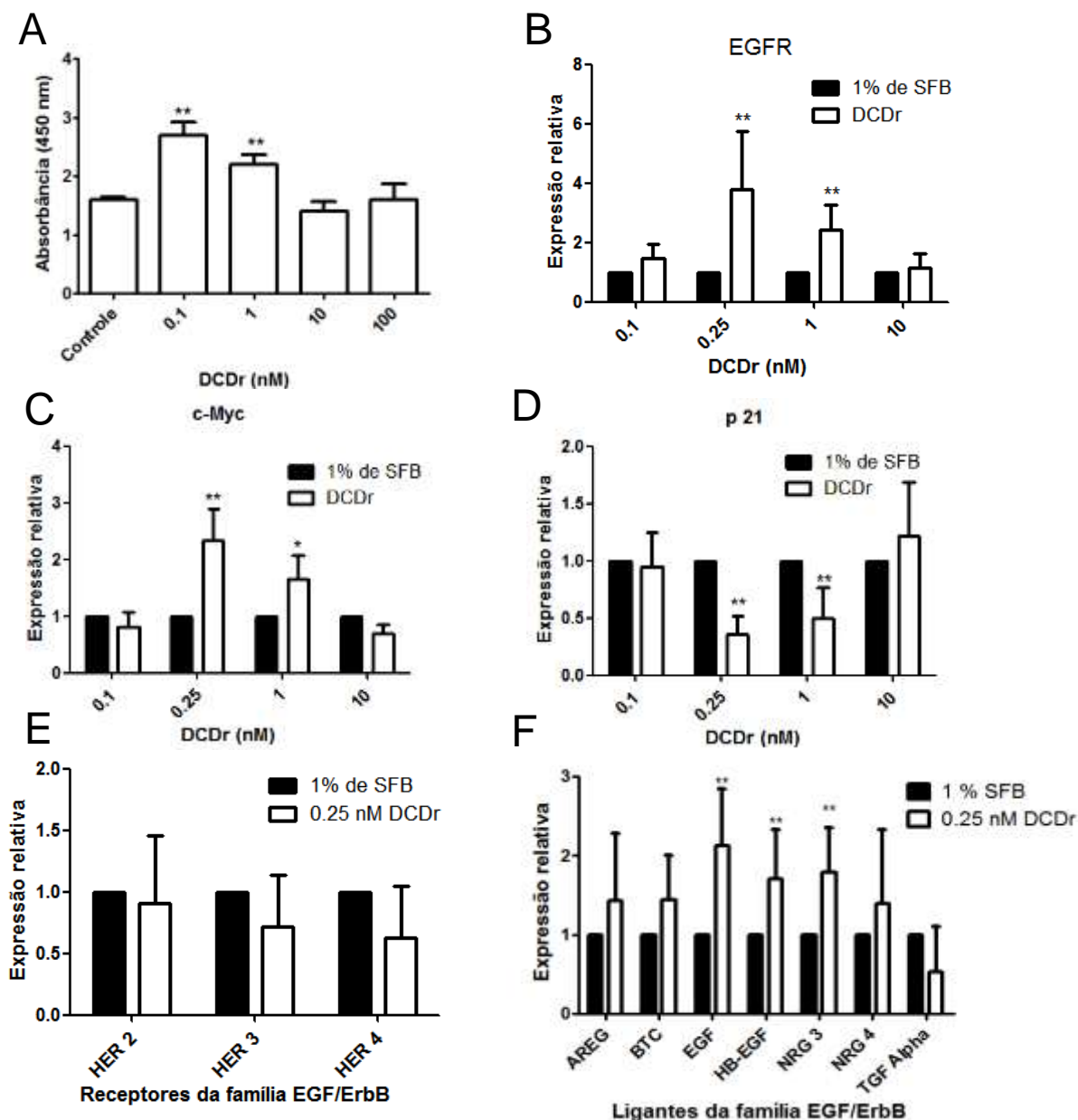


Figura 10 – Efeito do tratamento com DCDr na proliferação de células MDA-MB-361. Curva dose-resposta de proliferação celular (A), expressão relativa de transcritos de EGFR (B), C-myc (C) e p21 (D) por qPCR. Em (E) expressão dos receptores da família ErbB/HER-2, -3 e -4 e de seus ligantes em (F), nas células com estímulo de 0.25 nM de DCDr. Em todos os experimentos, $1-2 \times 10^4$ células foram incubadas com 1% SFB ou com 1% SFB e as concentrações de DCDr indicadas. Em (A) o tratamento foi realizado por 3-4 dias, nos demais por 12-16 horas. A proliferação celular foi estimada pela incorporação de BrdU ao DNA. Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos em três ensaios independentes. *Colunas*, média; *barras*, erro padrão; ** $p < 0.001$; * $p < 0.05$, pelo teste *Pair Wise P(H1)* (ensaios de qPCR) e análise de variância (*One-Way Anova*) seguido de Tukey (ensaio de proliferação).

3.7 A superexpressão de DCD nas células MCF-7 aumenta a proliferação e resistência celular

A linhagem MDA-MB-361 foi derivada de uma metástase do cérebro de um carcinoma mamário luminal. Esta linhagem apresenta expressão positiva do receptor para estrógeno e progesterona (ADAMS et al., 1989; HEVIER et al., 2011) e também possui uma amplificação gênica do receptor HER-2 (CALLIAU et al., 1976; ADAMS et al., 1989; LACROIX e LECLERCQ, 2004). A partir dessas observações, surgiu uma nova questão: Qual seria a influência de DCD sobre a expressão dos receptores e ligantes da família EGF/ErbB em uma linhagem de carcinoma de mama que não apresenta amplificação de HER-2? Para respondê-la, utilizamos a linhagem MCF-7 o qual possui expressão positiva para os receptores de estrógeno e progesterona, mas não superexpressam o gene HER-2 (ADAMS et al., 1989; LACROIX e LECLERCQ, 2004; HEVIER et al., 2011). Além disso, a expressão de DCD não foi detectada nessa linhagem através de ensaios de RT-PCR e Northern blot (MARKOVIC, 2003).

Em estudos anteriores do nosso laboratório, foram geradas duas sublinhagens derivadas das células MCF-7, uma com expressão estável de DCD, MCF-7 DCD e outra, controle, com o vetor vazio, MCF-7 pcDNA (MARKOVIC, 2003, GARAY-MALPARTIDA, 2005, FONTES-OLIVEIRA, 2005). Neste trabalho, verificamos se a superexpressão de DCD influenciava o crescimento, a resistência ao estresse oxidativo e a expressão dos membros da família EGF/ErbB. Como pode ser visto na figura 11A, os níveis de expressão gênica de Dermicidina na sublinhagem MCF-7 DCD apresentaram-se cerca de 300% superiores aos detectados na sublinhagem MCF-7 pcDNA ($p < 0.001$) (Figura 11A). Um aumento significativo na expressão da proteína DCD também foi confirmado pelos ensaios de Western blot (Figura 11B) e imunofluorescência (Figura 11C). Este último ensaio também mostrou uma localização citoplasmática da proteína (Figura 11C).

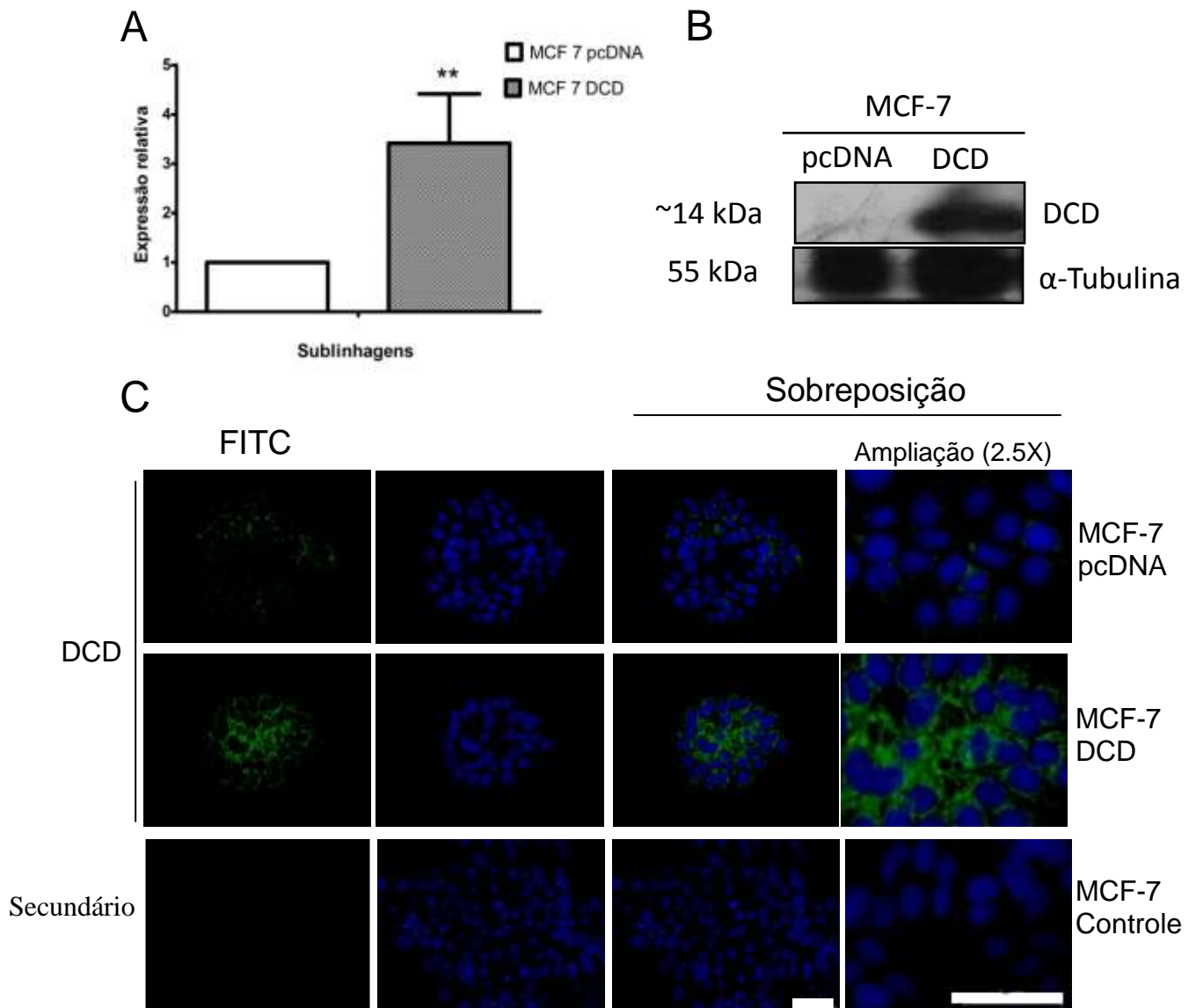


Figura 11 - Efeitos da superexpressão de DCD na linhagem MCF-7. (A) Expressão relativa do gene DCD por PCR em tempo real e em (B; C) da proteína por Western blot (B) e por imunofluorescência (C). DCD em (verde) e em (azul) os núcleos evidenciados com DAPI. As células do controle foram incubadas apenas o anticorpo estreptavidina com FITC. Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos em três ensaios independentes. *Barras horizontais* indicam a escala 50 μ m. *Colunas*, média; *barras verticais*, erro padrão; ** $p < 0.001$; * $p < 0.05$, pelo teste de randomização recolocação *Pair Wise P(H1)*.

Ao avaliar a capacidade de formação de colônias, observamos que as células da sublinhagem MCF-7 DCD formaram em média 123.5 ± 10.87 colônias, enquanto as células da sublinhagem MCF-7 pcDNA em torno de 43.25 ± 1.9 colônias após de uma semana de cultivo ($p < 0.001$) (Figura 12A). Esse dado sugere que a expressão de DCD estimula a proliferação e o crescimento dessas células.

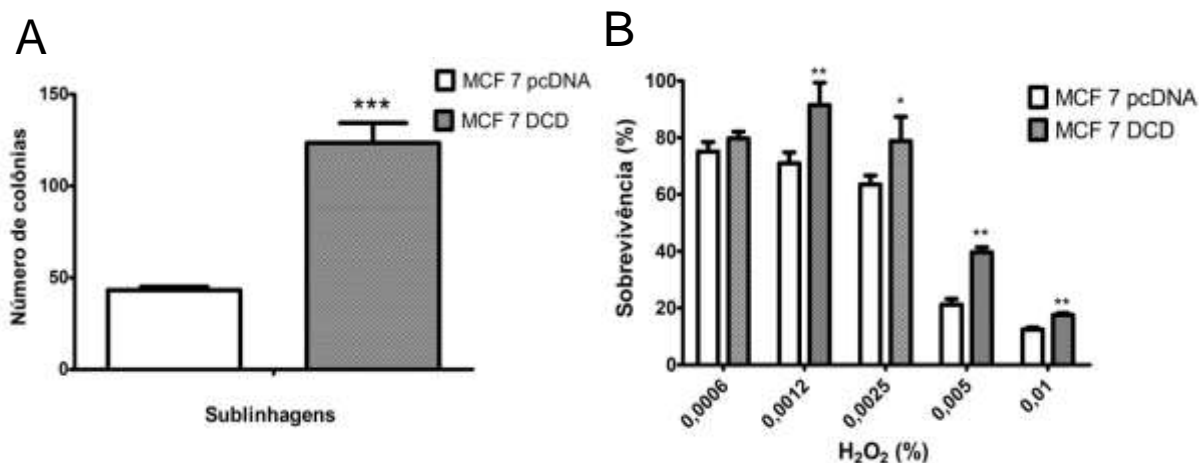


Figura 12 - Efeitos da superexpressão do gene Dermicidina na capacidade de células MCF-7 na formação colônia (A) e sobrevivência ao estresse oxidativo induzido pela H₂O₂ (B). O número de colônias (>50 células) foi determinado após duas semanas em cultura. A sobrevivência celular foi determinada pelo método de MTT. Os dados são apresentados como porcentagem de sobrevivência celular em relação ao controle não tratado. Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos em três ensaios independentes. *Colunas*, média; *barras*, erro padrão; ** $p < 0.001$; * $p < 0.05$, pelo teste *t* de Student.

Em estudos anteriores foi demonstrado que as células da linhagem MDA-MB-361 expressando shRNA contra a DCD são mais susceptíveis ao estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio, a estaurosporina e uma combinação de TNF- α e cicloheximida (MOREIRA, 2007). Como esperado, a superexpressão de DCD na linhagem MCF-7 aumentou a sobrevivência ao estresse oxidativo provocado pelo peróxido de hidrogênio ($p < 0.001$) (Figura 12B). Porém, não foi observada nenhuma diferença na sobrevivência entre as duas sublinhagem quando tratadas com estaurosporina ou com uma combinação de TNF- α e cicloheximida (dados não mostrados). Esses dados confirmam que a superexpressão de DCD nas células MCF-7 é capaz de aumentar a sobrevivência ao estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio.

3.8 A superexpressão de DCD nas células MCF-7 aumenta a expressão de receptores EGF/ErbBs e de seus ligantes

Ao analisar a expressão dos transcritos para a proteína EGFR nas células da sublinhagem MCF-7 DCD foi constatado um aumento em torno de 700% superior ao controle ($p < 0.001$) (Figura 13A). A expressão de HER-2 também foi aumentada em cerca de 400% em relação ao controle, MCF-7 pcDNA ($p < 0.001$) (Figura 13A). Os outros receptores não tiveram sua expressão significativamente alterada, porém, o receptor HER-4 teve uma tendência não estatisticamente significativa à regulação negativa (Figura 13A).

Ao analisar a expressão proteica dos receptores EGFR e HER-2 nessas células por meio dos ensaios de Western blot e imunofluorescência, nós observamos um aumento expressivo de EGFR na sublinhagem MCF-7 DCD quando comparada à sublinhagem controle (Figura 13B e 13C). A expressão de HER-2 também foi aumentada, porém, aparentemente, em menor intensidade que a observada para o EGFR (Figura 13C). O anticorpo trastuzumab (Herceptin[®] - Genentech), usado nos ensaios de imunofluorescência (Figura 13C), foi utilizado também em ensaios de Western blot para verificar a expressão de HER-2 nessas sublinhagens. Entretanto, o anticorpo não foi apropriado para o ensaio (dados não mostrados). Tais resultados mostram que a superexpressão de DCD na linhagem MCF-7 é capaz de induzir um aumento na expressão do receptor EGFR e, aparentemente, do HER-2. Além disso, esses estudos mostram que o DCD é capaz de induzir a expressão de EGFR em outra linhagem de câncer de mama, portanto, o evento não está restrito à linhagem MDA-MB-361.

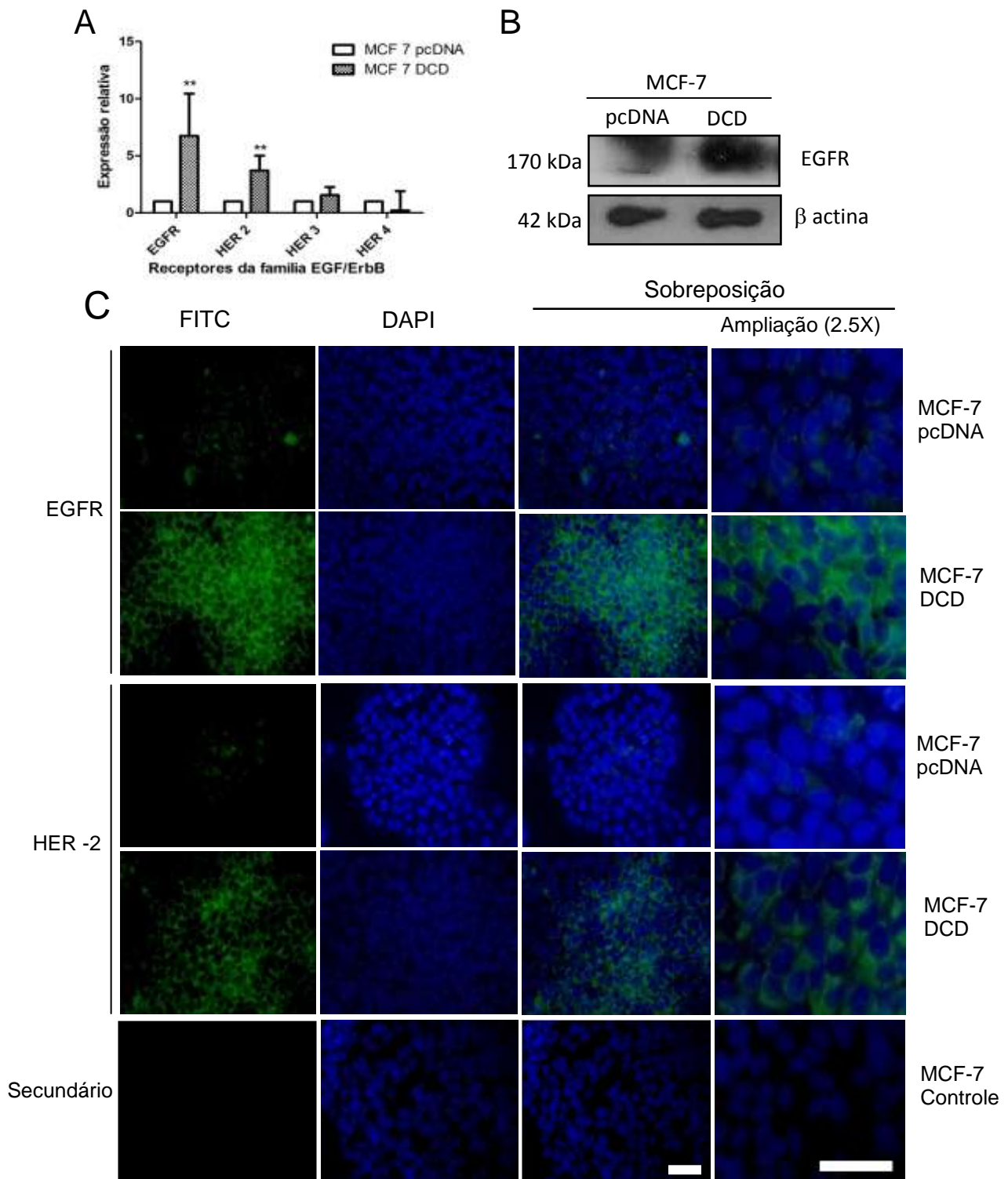


Figura 13 - Expressão dos receptores de EGF/ErbB após superexpressão de DCD nas células MCF-7. Em (A) expressão do RNAm para receptores EGF/ErbB por pPCR, (B) expressão proteica do receptor EGFR por Western blot e em (C) expressão dos receptores EGFR e HER-2 (verde) por imunofluorescência. Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos em três experimentos independentes. As células do controle foram incubadas apenas com anticorpos secundários e o núcleo foi evidenciando com DAPI (azul). Barras indicam a escala 50 μ m. ** $p < 0.001$; * $p < 0.05$, pelo teste *Pair wise P(H1)*.

Nos estudos de expressão dos ligantes da família EGF/ErbB nas células da sublinhagem MCF-7 DCD, notamos que a expressão de AREG, EGF, HB-EGF, NRG3 e NRG4 foi regulada positivamente, encontrando-se níveis que variaram em torno de 850%, 1000%, 223%, 336% e 488%, respectivamente, em relação ao controle ($p < 0,05$) (Figura 14). Apenas o TGF- α foi regulado negativamente em 44% em relação à sublinhagem MCF-7 pcDNA ($p < 0,001$) (Figura 14). Esses dados sugerem que o DCD é capaz de modular a expressão dos ligantes da família EGF/ErbB tanto na linhagem MDA-MB-361 como na linhagem MCF-7.

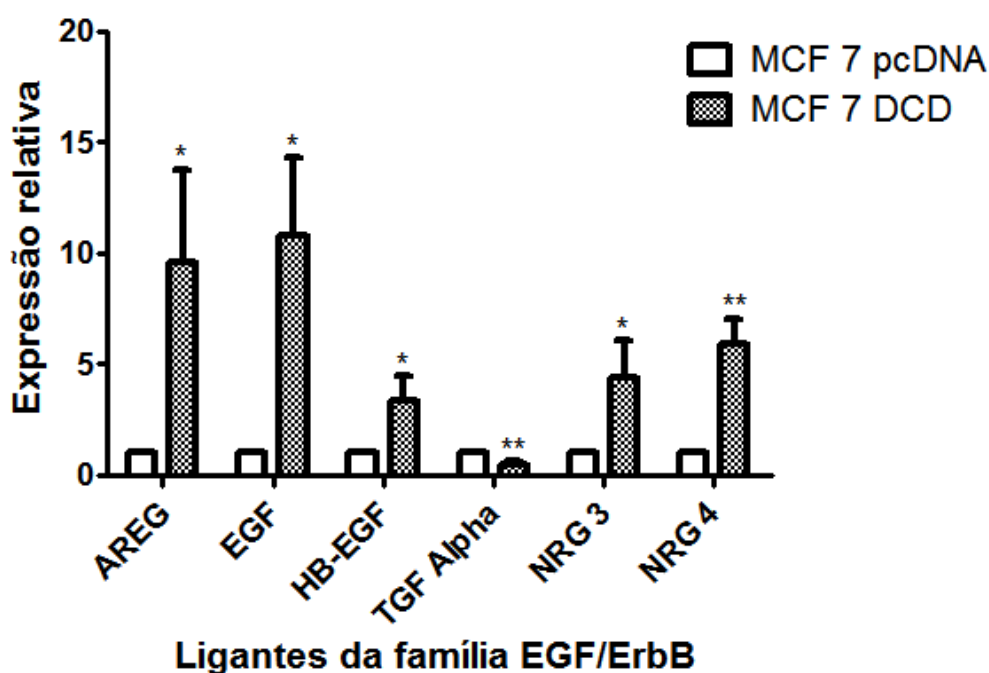


Figura 14 - Expressão dos ligantes da família EGF/ErbB nas células MCF-7-pcDNA e MCF-DCD. A expressão relativa de cada gene foi determinada por RT-PCR em tempo real. Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos em três ensaios independentes. ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$, pelo teste de randomização e recolocação *Pair Wise P(H1)*.

3.9 A superexpressão do gene DCD na células MCF-7 inibe a expressão de TXNIP

Quando avaliamos a expressão do gene TXNIP na sublinhagem celular MDA-MB-361 IBC I, verificamos que o silenciamento do DCD promoveu um aumento na expressão desse gene, sugerindo que a presença do DCD é capaz de inibir a expressão deste supressor tumoral (Figura 9). Para confirmar esse achado, nós avaliamos a expressão de TXNIP na sublinhagem MCF-7 DCD. A figura 14 mostra que a superexpressão de DCD reduziu a expressão de TXNIP em 98% quando comparado com o controle ($p < 0.001$) (Figura 15).

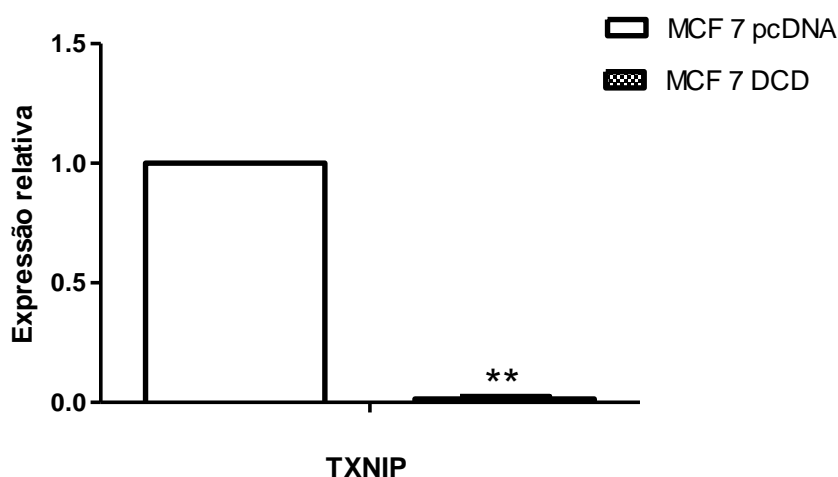


Figura 15 - Expressão do gene do TXNIP na sublinhagem MCF-7 DCD. A expressão relativa foi determinada por RT-PCR em tempo real. Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos em três ensaios independentes. *Colunas*, média; *barras*, erro padrão; ** $p < 0.001$, pelo teste de randomização e recolocação *Pair Wise P(H1)*.

3.10 DCD ativa a via de sinalização mediada pelo EGFR nas células MCF-7

Uma vez constatado o aumento na expressão de EGFR e HER-2 na sublinhagem MCF-7 DCD, avaliamos se a via de sinalização induzida por estes receptores apresentava-se ativada. Para tal, utilizamos anticorpos que reconhecem as formas fosforiladas de algumas proteínas envolvidas na cascata de sinalização intracelular ativadas por esses receptores. A figura 16

mostra que o receptor EGFR apresentou um aumento na sua fosforilação quando comparado com a sublinhagem controle. Esse aumento foi observado tanto na ausência quanto na presença do ligante EGF (Figura 16A). No ensaio de imunofluorescência foi possível observar um aumento discreto na fosforilação das tirosinas totais, principalmente de proteínas transmembranas (Figura 16B).

Ao analisar a fosforilação das proteínas da via de sinalização ativada por este receptor, observamos que a proteína STAT3 mostrou-se muito pouco fosforilada na sublinhagem controle sem o estímulo com EGF, porém, quando ela foi estimulada, os níveis de fosforilação foram significativamente aumentados (Figura 16A). Por outro lado, foi possível detectar a forma fosforilada de STAT3 na sublinhagem MCF-7 DCD com ou sem o tratamento com EGF (Figura 16A). Nos ensaios de imunofluorescência foi observado, além do aumento na fosforilação na sublinhagem MCF-7 DCD, uma presença maior dessa proteína no núcleo (Figura 17).

A proteína AKT, por sua vez, não se mostrou fosforilada na sublinhagem MCF-7 pcDNA sem estímulo, entretanto, apresentou uma discreta ativação após tratamento com o EGF (Figura 16A). Já a sublinhagem MCF-7 DCD apresentou uma fosforilação constitutiva da AKT, mesmo sem a ativação do receptor (Figura 16A). Além disso, mostrou-se muito mais responsiva ao tratamento com EGF que a MCF-7 pcDNA (Figura 16A). Nos ensaios de imunofluorescência podemos observar um aumento significativo na fosforilação dessa proteína em dois sítios distintos, serina 473 (Ser 473) e treonina 308 (Thr 308) e uma localização citoplasmática própria dessa proteína (Figura 17). Com relação à proteína quinase ativada por mitógeno, MAPK, nos ensaios de Western blot ela se apresentou discretamente fosforilada na sublinhagem MCF-7 pcDNA com ou sem o estímulo com EGF (Figura 16A). Contudo, a sublinhagem MCF-7 DCD apresentou uma acentuada fosforilação de MAPK, mediada pela ativação do receptor na presença de EGF (Figura 16A). Todavia, nos ensaios de imunofluorescência a referida proteína mostrou-se mais fosforilada na sublinhagem MCF-7 DCD com uma localização nuclear típica da proteína ativada (Figura 18). A superexpressão de DCD na linhagem MCF-7 também induziu uma maior fosforilação do transdutor de sinalização ERK

(Figura 18). Esses resultados sugerem que a superexpressão de DCD aumenta as vias de sinalização ativadas por membros da família EGF/ErbB.

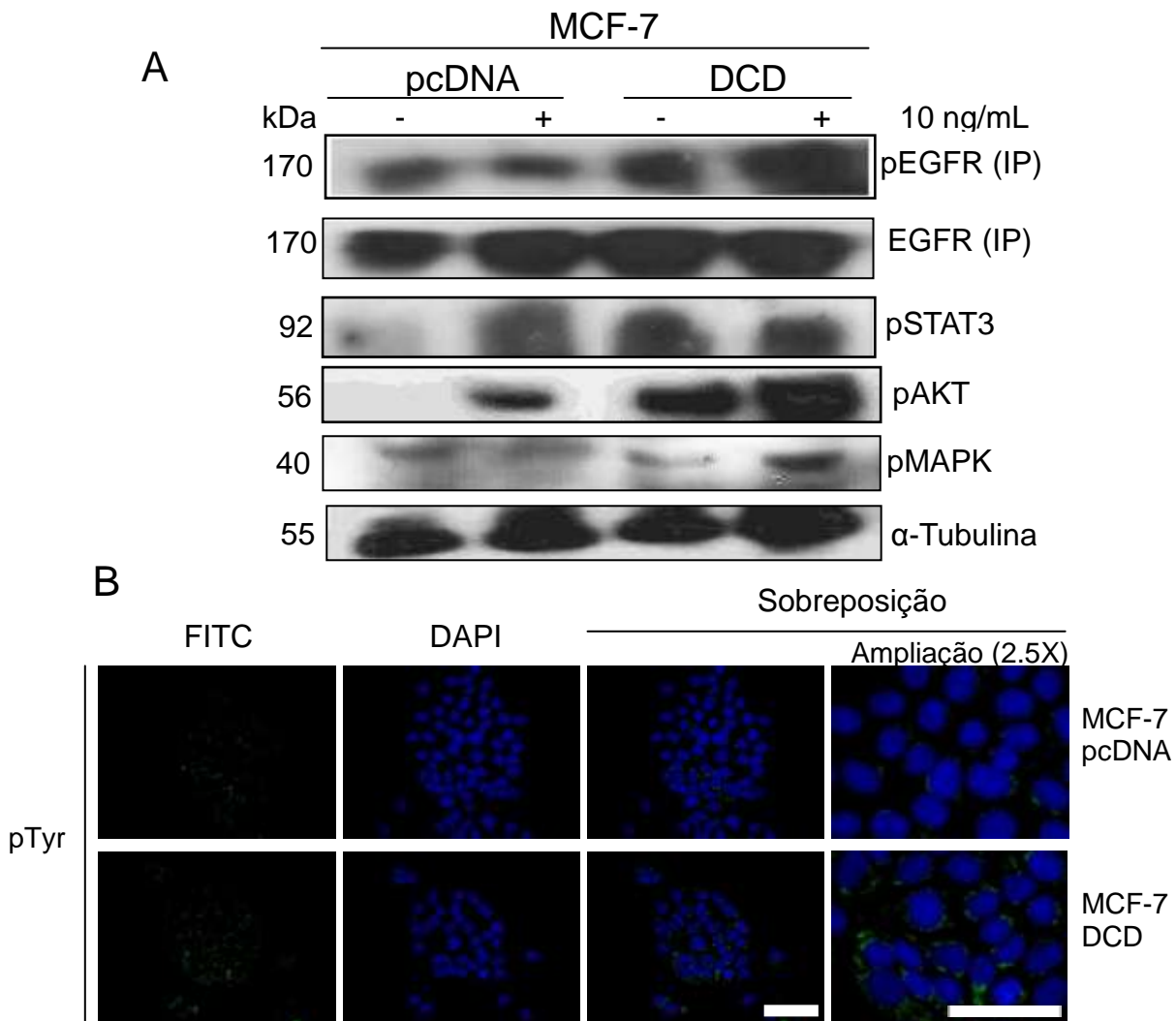


Figura 16 - Efeito da superexpressão do gene DCD na ativação do receptor EGFR e sua via de sinalização. Células MCF-7 pcDNA e MCF-7 DCD foram tratadas (+) ou não (-) com 10 ng/mL com EGFR por 30 minutos, como indicado. (A) O receptor EGFR foi imunoprecipitado do extrato celular utilizando o anticorpo policlonal e sua ativação foi analisada pelo ensaio de Western blot. A fosforilação de STAT3, AKT e MAPK foi analisada por Western blot. A α -tubulina foi utilizada como controle do ensaio. Imagens representativas de dois ensaios independentes. (B) Imunofluorescência de resíduos fosfotirosina em proteínas celulares (verde) nas sublinhagens MCF-7 pcDNA e MCF-7 DCD. Núcleo corado com DAPI (azul), *IP* – Imunoprecipitação.

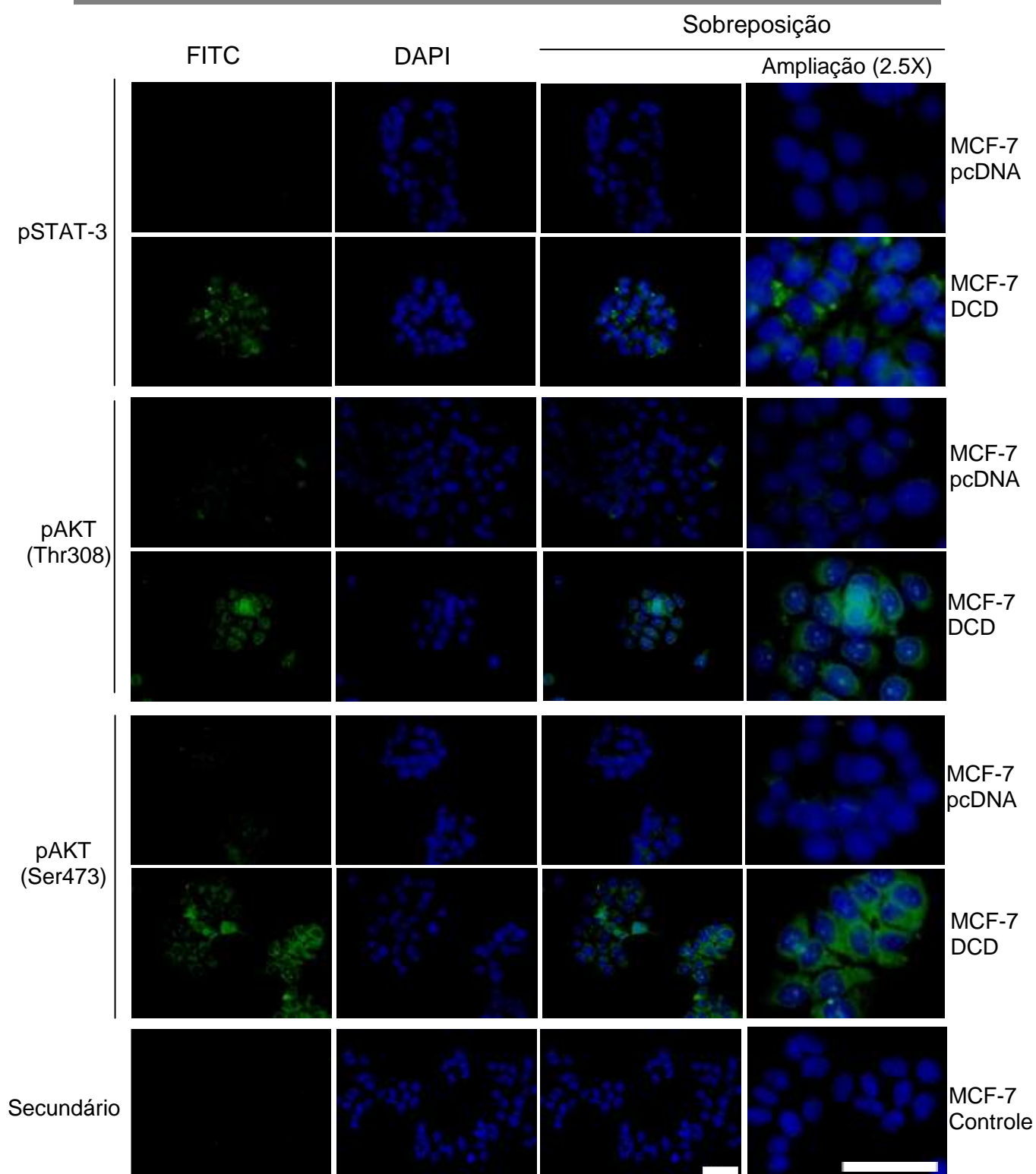


Figura 17 – A superexpressão do gene DCD nas células MCF-7 ativa a via de sinalização do receptor EGFR. Imagens representativas de um ensaio de imunofluorescência mostrando a fosforilação de STAT3 e AKT (Thr 308 e Ser 473) (verde). As células do controle foram incubadas apenas com anticorpos secundários. O núcleo foi evidenciado com DAPI (azul).

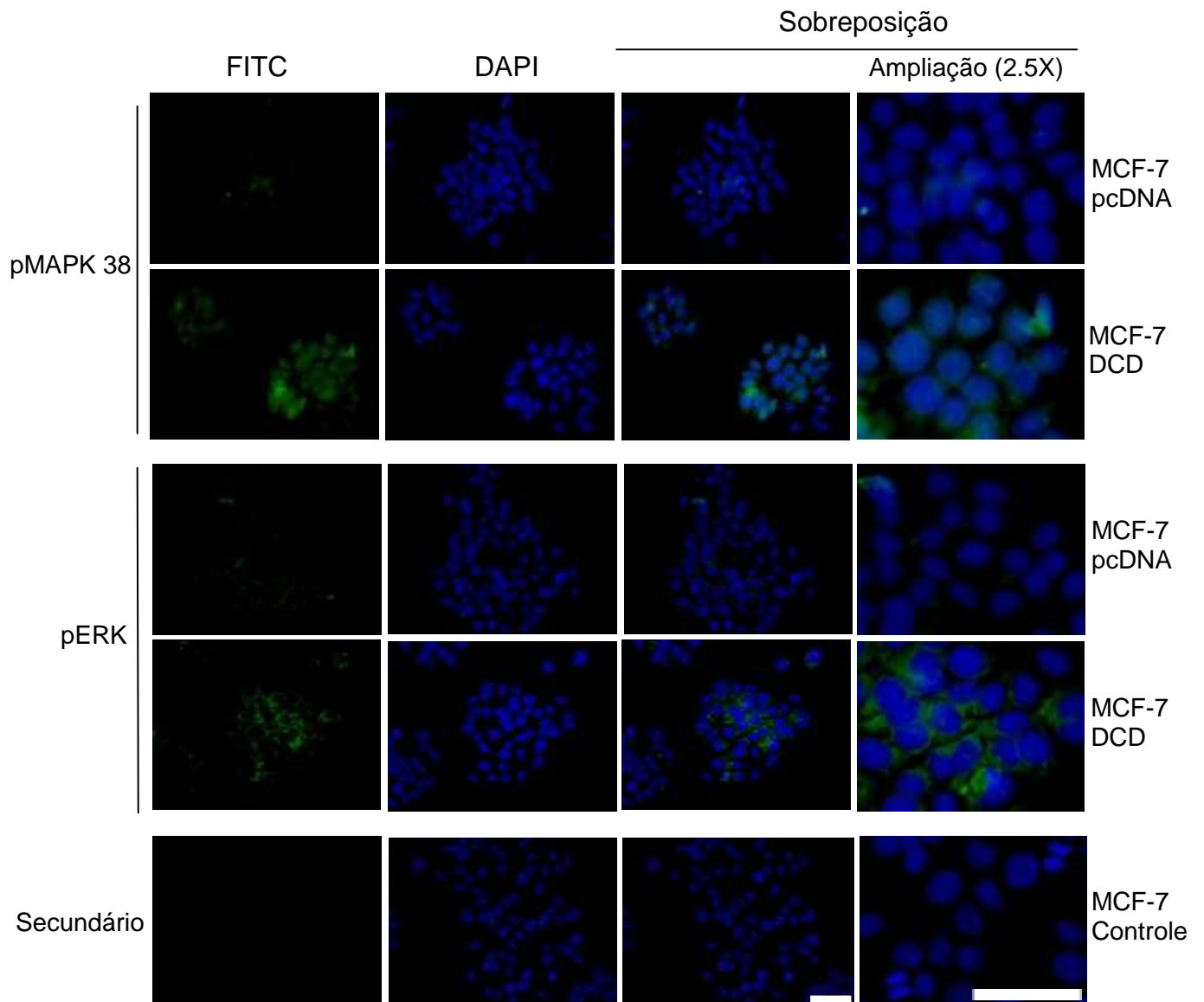


Figura 18 - Ativação da via de sinalização do receptor EGFR nas células MCF-7 pcDNA e MCF-7 DCD. Imagens representativas de um ensaio de imunofluorescência mostrando a fosforilação de MAPK e ERK (verde). As células do controle foram incubadas apenas com anticorpos secundários. O núcleo foi evidenciado com DAPI (azul).

3.11 A superexpressão de DCD nas células MCF-7 aumenta a expressão C-myc, Ciclina B e reduz a expressão de p27

O C-myc é um dos fatores de transcrição que é ativado pela via de sinalização EGF/ErbB (CITRI e YARDEN et al., 2006). Como era esperado, a sublinhagem MCF-7 DCD apresentou uma maior expressão de C-myc quando comparada ao controle MCF-7 pcDNA (Figura 19) por ensaios de Western blot. Estes dados foram confirmados com os ensaios de imunofluorescência que mostraram uma localização nuclear própria desse fator de transcrição (Figura 20).

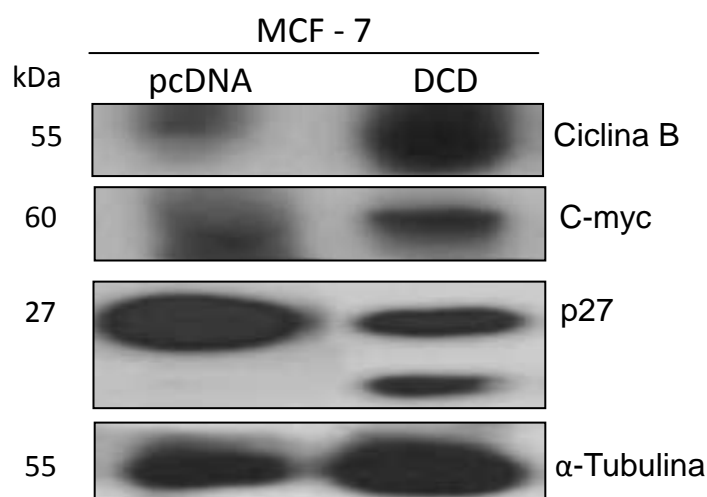


Figura 19 – Expressão de Ciclina B, c-Myc e p27 nas sublinhagens MCF-7 pcDNA e MCF-7 DCD por ensaios de Western blot realizados com anticorpos específicos para estas proteínas. Imagem representativa de dois ensaios independentes.

Como a expressão de C-myc está intimamente relacionada à progressão no ciclo celular (COLLER et al., 2000; PELENGARIS et al., 2002) decidimos analisar a expressão da ciclina B1, uma proteína cuja expressão ocorre durante a transição da fase G2 para mitose do ciclo celular (LINDQVIST et al., 2009). A sublinhagem MCF-7 DCD apresentou um aumento considerável

dessa proteína quando comparada ao controle, tanto nas análises por Western blot (Figura 19) quanto nos ensaios de imunofluorescência (Figura 20). Além da ciclina B1, avaliamos também a expressão de p27 que é um inibidor do ciclo celular. Como podemos observar na figura 19, a superexpressão de DCD inibiu a expressão de p27.

Em resumo, os dados apresentados com as células da linhagem MDA-MB-361 e MCF-7 sugerem que o DCD é capaz de modular a transcrição dos receptores e ligantes da via canônica do EGF/ErbB bem como a ativação das proteínas AKT, STAT3 e MAPK, que são os principais transdutores e enzimas quinases desta via. A expressão forçada de DCD ou sua adição ao meio de cultura causa um aumento na síntese do fator de transcrição C-myc que, por sua vez, induz a expressão de fatores que são promotores do ciclo celular, como a ciclina B1. Por outro lado, a expressão de DCD inibe a expressão de supressores do ciclo, como a proteína p27, tendo como resultado final um aumento da atividade proliferativa, como foi observado no experimento de proliferação e formação de colônias (Figura 12A).

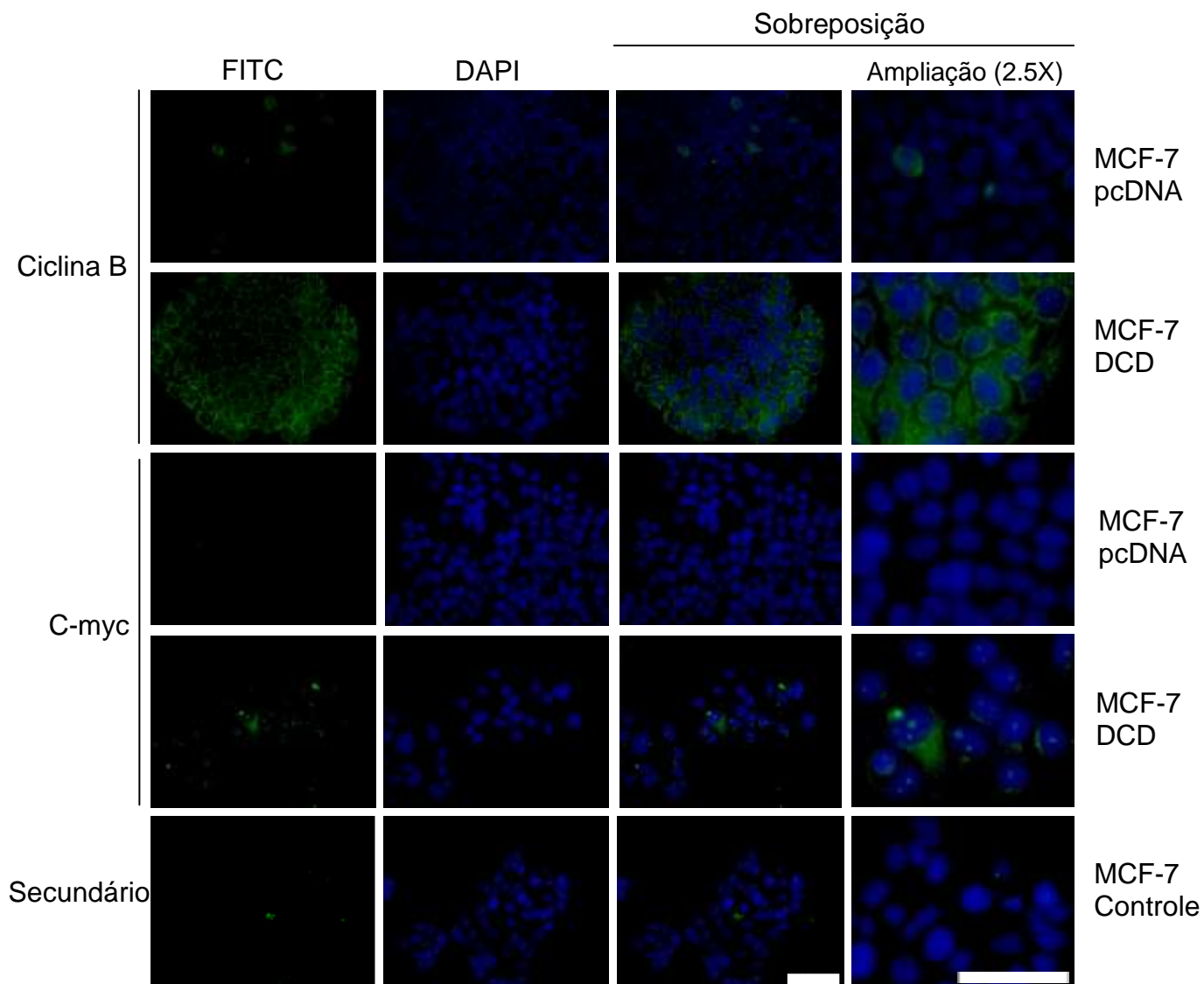


Figura 20 – Expressão de C-myc e Ciclina B nas células MCF-7 pcDNA e MCF-7 DCD. Imagens representativas de um ensaio de imunofluorescência localização das proteínas C-myc e Ciclina B (verde). As células do controle foram incubadas apenas com anticorpos secundários. O núcleo foi evidenciado com DAPI (azul).

4 Discussão

As evidências do papel relevante da Dermicidina como um gene-chave na progressão do carcinoma mamário invasivo surgiram primeiramente com os estudos de expressão gênica de análise seriada (SAGE) publicados em 2003 pelo grupo da Dra Kornelia Polyak (PORTER et al., 2003a). No estudo posterior ficou demonstrado que expressão de DCD estava presente em 10% das pacientes com carcinoma de mama invasivo e com grandes volumes além de metástases em linfonodo (PORTER et al., 2003b). Em seguida, vários estudos foram realizados demonstrando que o DCD promove um aumento no crescimento celular *in vitro* e *in vivo*, além de um aumentar a resistência à morte celular induzida por diversos agentes citotóxicos (PORTER et al., 2003b; WANG et al., 2003; MONITTO et al., 2004; GARRAY-MALPATIDA et al., 2005; MOREIRA, 2007; STEWART et al., 2007, 2008; LOWRIE et al., 2011). O mecanismo pelo qual o DCD exerce seus efeitos biológicos ainda permanece desconhecido. Em um estudo realizado pelo nosso grupo utilizando a técnica de microarranjo de DNA (*DNA microarray*) para analisar a expressão global de genes alterados pelo silenciamento gênico do DCD foram identificados 235 genes alterados pelo “*knockdown*” de DCD na linhagem de carcinoma mamário MDA-MB-361 (MOREIRA et al., 2008). A presente tese apresenta em mais detalhes os resultados dos estudos nos quais foram evidenciadas as possíveis conexões entres estes genes e seus mecanismos moleculares e os eventos biológicos que são afetados pelo DCD nesta linhagem celular.

Os estudos de anotação funcional, utilizando plataforma de análise DAVID, revelaram que o DCD poderia atuar como um fator de crescimento, segundo a ontologia gênica (*gene ontology*) e categoria funcional (Tabelas 3 e 4). De acordo com a descrição apresentada no NCI (*National Institute of Cancer, USA*), fator de crescimento é uma substância produzida pelo corpo cuja função é regular a divisão e sobrevivência celular. Os efeitos dos fatores de crescimento dependem de um receptor próprio. No entanto, nos diversos estudos publicados

até o momento, não se chegou a caracterização bioquímica do receptor da DCD e sua via de sinalização intracelular (PORTER et al., 2003b; GARAY-MALPATIDA, 2005; LOWRIE et al., 2006; STEWART et al., 2007; MOREIRA, 2007; LOWRIE et al., 2011).

Lowrie et al. (2011) identificaram, por ontologia funcional, várias redes de sinalização que poderiam ser ativadas por grupo de genes cuja expressão foi modificada na linhagem de carcinoma hepático HuH7 após o tratamento com um peptídeo de 20 aminoácidos derivado da DCD. Esta porção foi identificada na cadeia polipeptídica do PIF, uma glicoproteína envolvida na proteólise intracelular de proteínas (TODOROV et al., 1996). Os genes identificados participam em processos e vias importantes, como morte celular, câncer e ciclo celular. Provavelmente, os genes alterados diferiram dos nossos devido a três fatores. Primeiro, nesse estudo os autores realizaram o ensaio de microarranjo de DNA após o tratamento das células com um peptídeo derivado da porção N-terminal da proteína DCD, enquanto que os nossos estudos foram realizados através do silenciamento gênico do DCD, ou seja, a metodologia empregada foi completamente diferente. Segundo, a linhagem celular utilizada por Lowrie et al. (2011) foi derivada de carcinoma hepático, enquanto o nosso estudo foi realizado com uma linhagem de carcinoma de mama. Terceiro, nossas análises foram feitas nas plataformas DAVID e Metacore. Lowrie et al. (2011) utilizaram a plataforma Ingenuity (Ingenuity® Systems Redwood City, CA, USA).

O tratamento das células MDA-MB-361 com a DCDr confirmou nossas expectativas acerca do potencial mitogênico da DCD na indução de proliferação de células epiteliais da mama. Sob o estímulo de concentrações crescentes de DCDr, observou-se uma curva de proliferação em forma de sino (Figura 10A). O mesmo efeito foi observado por Lowrie et al. (2011) ao tratar as células HuH7 com o peptídeo derivado da região N-terminal do DCD (LOWRIE et al., 2011), porém a concentração na qual foi observado o maior estímulo proliferativo diferiu dos nossos ensaios. Enquanto Lowrie et al. (2011) mostraram que o maior estímulo ocorreu com uma concentração de 10 ng/mL, ou seja, 10nM, os nossos resultados com a proteína íntegra demonstraram que o estímulo proliferativo mais intenso

ocorreu 0.1 nM (Figura 10C). Não sabemos ainda como explicar essa diferença, provavelmente refletem a presença e afinidade de receptores específicos nas linhagens celulares utilizadas nos dois experimentos. Outra possível explicação é que em nossos ensaios a proteína recombinante utilizada apresenta a forma nativa da DCD, ou seja, proteína não processada, que pode adquirir uma conformação estrutural que facilite a ligação e ativação de um possível receptor. No outro estudo as células foram tratadas com um peptídeo derivado da região N-terminal de DCD, ou seja, apenas uma parte da proteína (LOWRIE et al., 2011). Entretanto, no mesmo trabalho os autores demonstraram através de mutação sítio dirigidas que a porção C-terminal da proteína correspondente a DCD-1 não é necessária para estimular a proliferação celular (LOWRIE et al., 2011). Mais estudos a esse respeito são necessários para se compreender melhor estes dados. A curva de dose resposta em forma de sino é característica da resposta biológica a diversas citocinas e fatores de crescimento incluindo, IFN- γ , IL-6, IL-8, TNF- α (TALMADGE et al., 1987; UTSUNOMIYA et al., 1996; BEN-BARUCH et al., 1999; TSIGOS et al., 1999), *Sonic Hedgehog*, VEGF, FGF, PDGF (CHANG et al., 2004) e a lacritina, uma proteína muito similar a DCD (WANG et al., 2006). Uma hipótese que poderia ser levantada é a de que o excesso de DCD no meio poderia dessensibilizar o receptor levando a perda da resposta proliferativa.

Neste trabalho nós demonstramos que a supexpressão de DCD nas células MCF-7 aumentou a proliferação celular (Figura 8C). Esta linhagem é derivada de um carcinoma ductal invasivo com metástase na pleura e que expressa o receptor de estrógeno (ER+) e receptor de progesterona (PgR+), mas não apresenta amplificação do HER-2 (ADAMS et al., 1989; LACROIX e LECLERCQ, 2004). Os efeitos biológicos da superexpressão de DCD nessas células foram descritos anteriormente por Monitto et al. (2004). Os autores observaram um aumento no crescimento tumoral quando as células foram inoculadas em camundongos NUDE, porém, eles não fizeram nenhum estudo para desvendar o mecanismo molecular.

Porter et al. (2003b) também superexpressaram o DCD na linhagem de carcinoma mamário 21NT e observaram um aumento na taxa de proliferação

celular tanto na presença quanto na ausência de soro. Tal efeito não é restrito somente às linhagens de tumores de mama. A expressão de DCD estimulou o crescimento de células das linhagens neuronais (CUNNINGHAM et al., 2002), câncer de próstata PC-3M (STEWART et al., 2007), melanoma murino B16F10 (GARAY-MALPARTIDA, 2005) e células da linhagem de mioblasto murino C2C12 (FONTES-DE-OLIVEIRA, 2005). Por outro lado, o silenciamento gênico de DCD pela expressão de shRNA reduziu o crescimento de células das linhagens de carcinoma de pulmão H520 e PC13 em 60% e 70%, respectivamente (CHANG et al., 2010).

A superexpressão de DCD nas células MCF-7 também aumentou a sobrevivência celular aos efeitos citotóxicos do peróxido de hidrogênio (Figura 9A), porém não protegeu contra a morte celular induzida por estaurosporina e TNF- α (dados não mostrados). A proteção contra o estresse oxidativo está de acordo com os estudos iniciais de Cunningham et al. (1998, 2000, 2002) com o peptídeo YP-30, um peptídeo derivado da região N-terminal de DCD, que protege células neuronais dos efeitos citotóxicos do peróxido de hidrogênio tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Porter et al. (2003b), por sua vez, demonstraram que a linhagem de carcinoma de mama 21NT superexpressando 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. Lowrie et al. (2006) demonstraram que a transfecção de células hepáticas com o cDNA do 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, contudo, os resíduos de asparagina (N³² e N⁴⁴) são de grande importância, pois quando esses foram substituídos pela alanina, através de mutações sítio dirigida, o efeito protetor foi perdido. Em outro trabalho, os autores demonstraram através de mutação sítio dirigida, que a região N-terminal de DCD, correspondente ao YP-30 (CUNNINGHAM et al., 1998) e a parte polipeptídica do PIF (TODOROV et al., 1996) são as responsáveis pela proteção observada contra o estresse oxidativo induzido por meladiona, peróxido de hidrogênio e hipóxia celular induzida pela incubação a 0.2% de oxigênio

(STEWART et al., 2007). As células MCF-7 mostraram-se resistentes ao tratamento com estaurosporina ou a combinação de TNF- α e ciclohexemida, não permitindo observar nenhuma alteração na sobrevivência entre as sublinhagens MCF-7 DCD e MCF-7 pcDNA (dados não mostrados). A resistência das células MCF-7 poderia ser explicada, em parte, pela ausência da caspase 3 funcionalmente ativa, uma vez que essas drogas ativam principalmente a morte celular via apoptose (BUROW et al., 1998; KUROKAWA et al., 1999; BRUSCH et al., 2008, FAZI et al., 2008). Entretanto, recentemente foi demonstrado que radicais livres podem induzir apoptose nas células MCF-7 (KANG et al., 2010) como observado no presente estudo.

A análise da lista de genes diferencialmente expressos pelos programas das plataformas DAVID e Metacore sugeriram a participação da via EGF/ErbB na cascata de sinalização de proliferação modificada pela DCD (Tabela 5, Figuras 1 e 2). A plataforma DAVID não identificou um receptor específico, apenas a categoria de sinalização da via ErbB (Tabela 5). Já o Metacore sugeriu a via de sinalização mediada pelo EGFR (Figura 3). Além disso, a análise de vias canônicas, feita na plataforma Metacore, sugeriu que a principal rede de expressão gênica alterada centrava-se nos genes BTC, EGFR e C-myc (Figura 4). Quando comparamos esses dados e os apresentados no estudo publicado por Lowrie et al. (2011), encontramos algumas divergências e concordâncias que serão discutidas a seguir. No trabalho em questão, os autores mostram que as vias de sinalização alteradas pelo tratamento com o peptídeo derivado do DCD foram à sinalização do óxido nítrico no sistema cardiovascular, síntese de ubiquinona e sinalização de receptor de morte celular (LOWRIE et al., 2011). Estes dados são muito diferentes dos nossos resultados na qual a família dos fatores de crescimento EGF/ErbB parece ser o componente mais importante da cascata de sinalização (Tabela 5 Figuras 1, 2 e 3). Por outro lado, ao analisar as redes de interações gênicas, os autores sugerem quatro redes cujos centros envolvem genes que também foram alterados no nosso estudo. As redes gênicas alteradas são: rede 1: TNF, TGF- β 1 e IL-4 (nenhum gene regulado positivamente); rede 2: TP53, THRB e MYOD1 (nenhum gene regulado positivamente); rede 3: FOS, LIF, VEGFB, ErbB2 e HRAS

(com apenas o VEGFB alterado pelo tratamento; rede 4: HGF e C-Myc (nenhum gene regulado positivamente) (LOWRIE et al., 2011). Comparando esses resultados com os nossos, vemos que o C-myc mostrou-se alterado na via de sinalização mediada pelo EGFR (Figuras 1 e 3) e foi um dos centros da nossa via de sinalização canônica (Figura 4). Além disso, a expressão de C-myc foi induzida nas células MDA-MB-361 após o tratamento com a DCDr (Figura 10C) e após a superexpressão do gene na linhagem MCF-7 (Figuras 19 e 20). Por outro lado, o silenciamento do gene DCD também reduziu a expressão de C-myc nas sublinhagens MDA-MB-361 (Figura 8). Outro dado dos estudos de Lowrie et al. (2011) que está de acordo com os nossos é o aumento da expressão de VEGFB, que foi observado nos ensaios de microarranjo de DNA (MOREIRA et al., 2008) e confirmado pelo ensaio de qPCR nas sublinhagens de células MDA-MB-361 (Figura 9). Ademais, segundo Lowrie et al. (2011), a rede 3 teve com um de seus centros o gene HER-2, porém este gene não teve sua expressão alterada no ensaio de microarranjo de DNA. É interessante notar que ao superexpressar o gene DCD na linhagem MCF-7, observamos um aumento na expressão desse gene (Figura 13), porém esse gene não foi alterado na linhagem MDA-M-361 (Figuras 6, 5 e 10).

A análise da expressão dos transcritos dos receptores e dos ligantes da família EGF/ErbB na sublinhagem MDA-MB-361, após o silenciamento do gene DCD indicaram que o silenciamento da DCD foi capaz de modular a expressão dos receptores EGFR negativamente e dos HER-4 positivamente, sem alterar a expressão dos demais receptores da família (Figura 5B). Ao avaliar a expressão proteica dos receptores EGFR e HER-2 por ensaios de imunofluorescência, nós notamos que o padrão de expressão de EGFR apresentou-se reduzido nas células com silenciamento do DCD, entretanto, não foi observada nenhuma alteração significativa na expressão de HER-2 (Figura 6). A capacidade de induzir a expressão de EGFR pelo DCD foi comprovada pela exposição das células da linhagem MDA-MB-361 ao DCDr (Figura 7B). No entanto, a curva dose resposta da proliferação foi diferente da curva de expressão do EGFR (Figura 7). Ainda não compreendemos este evento, a nossa hipótese é a de que as células MDA-MB-

361 possuam receptores de baixa e de alta afinidade, conforme mostrado nos estudos de Porter et al. (2003) e Torodov et al. (2007), respectivamente, e que esses apresentam respostas distintas. O receptor de alta afinidade, provavelmente, está relacionado com o estímulo proliferativo à ação do DCD (Figura 10A) e o segundo module a expressão dos membros da família EGF/ErbB (Figura 10B e 10D), porém, são necessários mais estudos para se comprovar essa tese.

O fato de não observamos nenhuma alteração na expressão de HER-2 após o silenciamento não eliminou a possibilidade de que o DCD poderia interferir na expressão desse receptor, uma vez que essa célula superexpressa HER-2 devido a uma amplificação gênica (amplificação da região cromossômica 17q1-q21) (CAILLEAU et al., 1976; KRAUS et al., 1987; ADAMS et al., 1989). Para responder essa questão, superexpressamos DCD na linhagem MCF-7 que não possui amplificação para nenhum dos dois receptores (KRAUS et al., 1987; ADAMS et al., 1989). Quando analisamos as expressões do RNAm para os receptores EGFR e HER-2, observamos que a expressão de ambos foi regulada positivamente pelo DCD, sendo que o primeiro foi alterado de forma mais expressiva (Figuras 13A). Ao analisar a expressão proteica pelo ensaio de imunofluorescência, o mesmo padrão é observado (Figura 13C). Embora não tenha sido possível verificar a expressão do receptor HER-2 por Western blot, o aumento da expressão do EGFR foi confirmado por este ensaio (Figura 13B). A expressão de EGFR nessa linhagem já foi documentada pela literatura, porém, em níveis muito baixos, como também pode ser observado na Figura 13 (HOEFLICH et al., 2009; KRAUSS et al., 1987).

O HER-2 é incapaz de interagir diretamente com os ligantes da família EGF/ErbB, todavia, sua porção intracitoplasmática interage e forma heterodímeros com receptores EGFR e HER-3, levando à ativação da sua atividade quinase (KARAMOUZIS et al., 2007; YARDEN e SLIWKOWSKI, 2001). Apesar de ter sido demonstrada a ativação constitutiva de HER-2 em linhagens celulares e tumores que superexpressam esse receptor, ele tem preferência em formar heterodímeros que possuem uma ação mitogênica mais potente (YARDEN e SLIWKOWSKI,

2001, CITRI e YARDEN, 2006). Dentro desse cenário, Moulder et al. (2001) demonstraram que a presença de EGFR é importante para a ativação de HER-2 nas células que superexpressam esse receptor. Os autores mostraram que ao bloquear a fosforilação do EGFR com o inibidor específico de tirosina-quinase ZD1839 (Iressa) em linhagens de carcinoma de mama conhecidas pela superexpressão de HER-2 (BT-474, SKBR-3 e MDA-MB-361), a fosforilação desse receptor foi inibida, o que resultou em diminuição do crescimento e sobrevivência celular (MOULDER et al., 2001). Essa hipótese é suportada por outro estudo no qual o bloqueio da atividade do receptor EGFR pelo AG1478 foi capaz de suprimir a formação de tumores de mama em um modelo de camundongos transgênicos híbridos MMTV/TGF- α x MMTV/neu (camundongo que apresenta a superexpressão do gene homólogo ao HER-2 humano) (LENFERINK et al., 2000). Portanto, é possível que essas interações estejam ocorrendo mais intensamente com expressão da constitutiva da DCD, uma vez que a presença desse fator promove a expressão de EGFR, como foi observado nas células da linhagem MCF-7-DCD e MDA-MB-361, resultando, assim, em uma maior ativação de sua via de sinalização (Figuras 7 e 16). Notavelmente, o EGFR mostrou-se mais fosforilado na presença da DCD, tanto nas células MDA-MB-361 antes do silenciamento quanto nas células MCF-7 após superexpressão do gene (Figuras 7 e 16).

Ao analisar a expressão dos outros receptores após o silenciamento, deparamo-nos com um dado muito interessante que não havia sido identificado pelas análises de expressão gênica global. O receptor HER-4 e três de seus ligantes (EREG, NRG2 e NGR3) foram regulados positivamente pelo silenciamento do DCD (Tabela 6). Embora a presença de DCD tenha modulado a expressão de EGFR nas células MDA-MB-361, o mesmo não ocorreu com os outros receptores da família EGF/ErbB (Figura 10). Entretanto, o receptor HER-4 apresentou uma tendência à regulação negativa. Tais fatos levam-nos a crer que a expressão desse receptor pode ser reduzida na presença endógena da DCD, por isso não fomos capazes de detectar uma nova redução pelo tratamento com DCDr. A ativação do HER-4 tem sido relacionada a um efeito inibitório do

crescimento tumoral, indução de diferenciação e diminuição da sobrevivência celular (KARAMOUSIS et al., 2007; CHUU et al., 2008; MURAOKA-COOK et al., 2008; SUNDVALL et al., 2008).

Tabela 6 - Modulação da expressão dos receptores e ligantes da família EGF/ErbB pelo DCD em três condições experimentais avaliadas neste estudo por ensaios de qPCR.

Receptores e ligantes	Silenciamento do DCD	Tratamento com DCDr	Superexpressão de DCD
	Células MDA-MB-361	Células MDA-MB-361	Células MCF-7
EGFR	↓	↑	↑
HER-2	-	-	↑
HER-3	-	-	-
HER-4	↑	-	↓ NS
BTC	↓	↑ NS	-
AREG	↓	↑ NS	↑
HB-EGF	↓	↑	↑
EREG	↑	-	-
EGF	-	↑	↑
TGF- α	-	↓ NS	↓
NRG1	-	-	-
NRG2	↑	-	-
NRG3	↑	↑	↑
NRG4	↓	↑ NS	↑

↑ Regulação positiva da expressão; ↓ regulação negativa da expressão; NS, não estatisticamente significativa; - expressão gênica não alterada.

A Dermicidina foi capaz não só de modular a expressão dos receptores EGF/ErbB, mas, também, de seus ligantes. A redução de DCD via shRNA na linhagem MDA-MB-361 reduziu a expressão da AREG, HB-EGF e NRG4 (Figura 5D e Tabela 6). Esses fatores foram regulados positivamente tanto pela adição de

DCDr ao meio de cultura das células MDA-MB-361 (Figura 10F), quanto pela superexpressão de DCD na linhagem MCF-7 (Figura 14 e Tabela 6), sugerindo que são os principais ligantes da família EGF/ErbB alterados pelo DCD. Por outro lado, a indução da expressão da AREG pelo DCD pode ter ocorrido de forma indireta, uma vez que já foi demonstrado que a ativação de EGFR é capaz de induzir a expressão desse ligante (NORMANNO et al., 1994; KANSRA et al., 2005), portanto, não é possível saber qual dos fatores que é responsável pela indução observada. Ambos os fatores de crescimento, HB-EGF e a AREG, ligam-se ao EGFR ativando a via de proliferação celular (SCHINEIDER e WOLF, 2009). Estudos clínicos têm apontado que AREG exerce um papel importante na progressão do câncer de mama, sendo a sua expressão associada com um pior prognóstico clínico para o paciente (WILLMARTH & EITHIER, 2008; McBRYAN et al., 2008).

Révillion et al. (2008) estudaram amostras de 363 pacientes com câncer de mama e demonstraram que a expressão de HB-EGF estava associada com tumores mais agressivos. Yotsumoto et al. (2008) analisaram várias linhagens celulares tumorais quanto à expressão de HB-EGF e AREG e mostraram que a expressão de HB-EGF estava predominantemente elevada em tumores de ovário, gástricos, mama, melanoma e glioblastoma, enquanto a expressão de AREG estava aumentada em tumores de pâncreas, próstata, cólon e carcinoma renal. Eles também demonstraram que a expressão de siRNAs contra HB-EGF ou AREG aumentou significativamente o número de células apoptóticas, e que este evento ocorreu com uma atenuação na ativação da via de sinalização do EGFR e ERK.

O HB-EGF tem sido apontado como um alvo promissor para a terapia contra câncer de ovário (MIYAMOTO et al., 2004). A expressão de HB-EGF, juntamente com outros genes, pode induzir a passagem de células metastáticas de câncer de mama para o cérebro (BOS et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que exossomos contendo AREG aumentaram o fenótipo invasivo de células cancerígenas (HIGGINBOTHAM et al., 2011). A linhagem MDA-MB-361 é derivada de uma metástase de carcinoma mamário no cérebro e o silenciamento

do DCD diminuiu a expressão HB-EGF, sugerindo que o DCD poderia ter algum papel na metástase. Mas essa hipótese ainda precisa ser investigada.

A BTC foi regulada negativamente pelo silenciamento de DCD (Figura 5D e Tabela 6) e apresentou uma tendência de regulação positiva pelo tratamento das células MDA-MB-361 com DCDr (Figura 10F e Tabela 6), mas sua expressão não foi detectada na linhagem MCF-7 superexpressando DCD (Figura 14 e Tabela 6), embora a literatura tenha demonstrado sua expressão endógena por esta célula (SASADA et al., 1993; TADA et al., 1993). A BTC também foi um dos centros da rede de vias canônicas obtida com os dados dos ensaios de microarranjo de DNA na plataforma Metacore (Figura 4). Esses dados sugerem que a expressão desse fator pode ser induzida pelo DCD na linhagem MDA-MB-361, porém, o mesmo não acontece com a MCF-7. A expressão de BTC ocorre na maioria dos casos de câncer de mama (RÉVILLION et al., 2008) e sua expressão é concomitante com a expressão de EGFR e HER-2 (McINTYRE et al., 2010). Beerli e Hynes (1996) demonstraram que a BTC é mais eficiente em ativar os receptores HER-3 e HER-4 que os outros ligantes e que essa ativação é dependente de EGFR. Portanto, não seria muito improvável que a expressão de DCD nas células MDA-MB-361 seria capaz de estimular a fosforilação de HER-3 através de uma produção autócrina da BTC. Contudo, seriam necessários mais estudos para se comprovar essa tese.

A NRG1 parece não ser afetada pela presença do DCD, uma vez que sua expressão não foi alterada em nenhuma das condições experimentais analisadas. Já a NRG2 e a EREG tiveram suas expressões aumentadas pelo silenciamento do DCD (Figura 5D e Tabela 6). Ambos são ligantes preferenciais do receptor HER-4/ErbB4 cuja ativação causa um efeito inibitório do crescimento tumoral, indução de diferenciação e diminuição da sobrevivência celular (CHUU et al., 2008; MURAOKA-COOK et al., 2008; SUNDVALL et al., 2008; NAGASHIMA et al., 2007). Além disso, o ligante EREG pode influenciar diretamente com diferenciação celular via indução de fatores de diferenciação específicos (NAGASHIMA et al., 2007; SAEKI et al., 2009).

A expressão do fator de crescimento e transformação alfa (TGF- α) foi regulada negativamente pela superexpressão de DCD nas células MCF-7 (Figura 14 e Tabela 6) e apresentou uma tendência não significativa de regulação negativa quando às células MDA-MB-361 foram estimuladas com DCDr (Figura 10F e Tabela 6), mas sua expressão não foi afetada pelo silenciamento do DCD (Figura 5D e Tabela 6). O TGF- α possui alta similaridade estrutural com o EGF e produz um forte estímulo proliferativo ao se ligar ao EGFR (BOOTH e SMITH, 2007; HUMPHREYS e HENNIGHAUSEN, 2000). A diminuição da expressão do TGF- α pelo silenciamento do DCD na linhagem MDA-MB-361, embora não estatisticamente significativa, reflete os efeitos biológicos observados. Contudo, não temos uma explicação para a redução da expressão de TGF- α induzida pela superexpressão de DCD pela linhagem MCF-7. Esses dados precisam ser investigados com mais profundidade.

O EGF teve sua expressão induzida pela DCDr quando a proteína foi adicionada à cultura de células MDA-MB-361 ou o gene foi superexpresso na linhagem MCF-7 (Figuras 10F e 14 e Tabela 6). O receptor preferencial de EGF é o receptor EGFR (SWEENEY et al., 2001; NAGASHIMA et al., 2007; SAEKI et al., 2009), o que explica a maior ativação dessa via de sinalização induzida pela ativação desse receptor (Figuras 7 e 16).

A NRG3, por sua vez, teve sua expressão reduzida pelo silenciamento do DCD na linhagem MDA-MB-361 (Figura 5D e Tabela 6). Este ligante atua principalmente via receptor HER-4, um receptor envolvido com a diferenciação celular de células epiteliais da mama (MURAOKA-COOK et al., 2008; SUNDVALL et al., 2008). O aumento na expressão desse ligante, juntamente com o aumento na expressão do receptor HER-4, provocado pelo silenciamento do DCD (Figura 5C e 5D), sugere que, na ausência da Dermicidina, essas células permanecem em um estado mais diferenciado, ou seja, menos proliferativo. Por outro lado, o NRG3 teve sua expressão aumentada tanto pela adição de DCD exógena na linhagem MDA-MB-361 quanto pela superexpressão na linhagem MCF-7 (Figuras 10F e 14 e Tabela 6). Uma possível explicação para esse fato é que existe uma forma

variante de NRG3 que promove um aumento de sobrevivência de oligodendrócitos (CARTERON et al., 2006). Como não podemos distinguir entre as duas formas da mensagem de NRG3, não podemos afirmar ao certo qual isoforma estaria sendo expressa. Todavia, observamos um aumento na sobrevivência celular indicando a expressão da isoforma envolvida na proteção celular. Tomados em conjunto, estes dados sugerem que o DCD é capaz de modular diferencialmente a expressão dos receptores e ligantes da família EGF/ErbB, e que estes poderiam atuar de forma sinérgica ativando as vias principais de sinalização celular que promovem o aumento na proliferação e sobrevivência celular.

Além dos genes da família EGF/ErbB, outros genes se mostraram bastante alterados durante as análises de expressão global da linhagem MDA-MB-361. Dentre eles o VEGFA, VEGFB e a TXNIP (thioredoxin-interacting protein). O VEGF é um dos principais fatores de indução da angiogênese (CARMILLET e JAIN, 2000; BOUDREAU e MYERS, 2003). A neovascularização tumoral está intrinsecamente relacionada com o crescimento de tumores sólidos, uma vez que as células tumorais precisam de um suprimento adequado de nutrientes e oxigênio através de vasos dentro da massa tumoral para o crescimento superior 1-2 mm³ (CARMILLET e JAIN, 2000; ROSEN et al., 2005). Dada à importância desse fator no desenvolvimento tumoral, o VEGF é um alvo promissor de terapias que utilizam seus inibidores específicos e anticorpos monoclonais (ROSEN et al., 2005; BENEST e AUGUSTIN, 2009). No contexto do câncer de mama, Guidi et al. (1997) demonstraram que o nível de expressão do mRNA para VEGF estava, significativamente, associado com o grau de angiogênese nos tumores de pacientes com carcinoma ductal *in situ* de mama (GUIDI et al., 1997). Os dados da figura 9 sugerem que o DCD pode regular positivamente a expressão das duas formas de VEGF (A e B), contribuindo, assim, para o crescimento mais pronunciado do tumor *in vivo*, como observado por Moreira (2007). Além disso, Lowrie et al. (2011) comprovaram que o VEGFB é regulado positivamente pelo tratamento das células hepáticas HuH7 com o peptídeo derivado da porção N-terminal da DCD (LOWRIE et al., 2011).

O silenciamento do DCD nas células MDA-MB-361 induziu um aumento significativo da expressão de TXNIP (também conhecido com VDUP1) (Figura 9). Já a superexpressão na linhagem MCF-7 reduziu significativamente a expressão desse gene (Figura 14). As células transformadas geram mais espécies reativas de oxigênio (ROS) que, em excesso, são danosas ao tumor (ARNER e HOLMGREN, 2006). Nas células existem alguns mecanismos de proteção contra esse estresse oxidativo, dentre eles os mediados pela tioredoxina (TXN), uma oxido-redutase contendo um sítio tiol-sulfeto ativo, o qual reduz cisteínas oxidadas das proteínas celulares e promove a captura de radicais livres, protegendo a célula contra o estresse (ARNER e HOLMGREN, 2006). Além disso, ela estimula a síntese de DNA, ativa fatores de transcrição, promove a angiogênese via HIF-1 α e VEGF e inibe a apoptose (ARNER e HOLMGREN, 2006). Todos esses eventos promovem o crescimento e sobrevivência tumoral (ARNER e HOLMGREN, 2006). A TXNIP liga-se e inibe a TXN. A TXNIP também se liga a fatores nucleares de transcrição, inibe a expressão de ciclina A2 e aumenta os níveis proteicos de p16 e p27, levando a uma diminuição do crescimento celular (KIM et al., 2007). Foi demonstrado que a expressão desse gene estava significativamente reduzida em câncer de mama e pulmão (KIM et al., 2007; HAN et al., 2003). Dados clínicos mostraram que existe uma forte correlação entre essa redução e o desenvolvimento tumoral, sugerindo que o gene atue como supressor tumoral (KIM et al., 2007; HAN et al., 2003). Estudos de superexpressão desse gene demonstraram que a TXNIP inibe a proliferação e progresso no ciclo celular de células tumorais (KIM et al., 2007; JUNN et al., 2000; HAN et al., 2003). Além disso, camundongos deficientes de TXNIP (*knockout*) são mais susceptíveis a carcinogênese (KIM et al., 2007; SHETH et al., 2006). Goldberg et al. (2003) mostraram que a superexpressão de TXNIP é capaz de inibir o processo de metástase em células de melanoma. Recentemente, um estudo com 778 pacientes com câncer de mama revelou que a expressão de TXNIP está associada com um melhor prognóstico clínico (CADENAS et al., 2010). Além disso, os autores mostraram que a superexpressão de HER-2 nas células MCF-7

induziu uma forte regulação negativa na expressão de TXNIP (CADENAS et al., 2010). Levando em conta o papel de supressor tumoral da TXNIP, pode-se assim especular que o aumento da expressão de DCD e consequente supressão da expressão desse gene promove a manutenção do fenótipo tumoral.

Os nossos resultados apresentados nas figuras 6 e 16 mostraram que o DCD é capaz de modular a ativação de proteínas adaptadoras e transdutoras de sinais das vias mitogênicas desencadeadas pela a ativação dos receptores EGFR/ErbBs. A proteína AKT revelou-se constitutivamente fosforilada nas células MDA-MB-361, o que já foi demonstrado também pela literatura (HOEFLICH et al., 2009; JUNTILLA et al., 2009; NORMANO et al., 2007 SWEENEY et al., 2001). O silenciamento do DCD nessa linhagem reduziu a expressão e a ativação dessa proteína, sugerindo que o DCD pode ter alguma influência nesta ativação constitutiva (Figura 7). Embora Hoeflich et al. (2009) tenham mostrado que a linhagem MDA-MB-361 possui uma mutação na PI3KCA (E545K), o que poderia ativar constitutivamente a AKT, esse fato por si só não explica esta ativação, porque a linhagem MCF-7 também possui a mesma mutação e tem níveis de fosforilação muito baixos (HOEFLICH et al., 2009; YUSTE et al., 2005). O mais interessante foi observar que, ao superexpressar o DCD na linhagem MCF-7, a fosforilação da AKT aumentou significativamente (Figuras 16 e 17). A AKT é uma das principais proteínas fosforiladas pela ativação dos receptores da família EGF/ErbB e está intrinsecamente relacionada com aumento da proliferação e sobrevivência celular (CITRI e YARDEN, 2006; NORMANNO et al., 2006,).

A via da p38 MAPK também se mostrou mais ativa nas células com a expressão de DCD (Figuras 7, 16 e 18). Esta proteína é fosforilada por estresse celular, incluindo choque osmótico, citocinas inflamatórias, luz ultravioleta e fatores de crescimento (HAN et al.; 1994; LEE et al., 1994; FRESHNEY et al., 1994; ROUSE et al., 1997). As células MCF-7 apresentaram uma fosforilação muito baixa da p38 MAPK, mesmo com o estímulo com EGF, porém mostram-se muito responsivas ao EGF após a superexpressão de DCD (Figura 16). Já nas células MDA-MB-361, a fosforilação de p38 MAPK foi observada somente na sublinhagem

controle após o estímulo com o fator de crescimento (Figura 7), sugerindo que o silenciamento, aparentemente, aboliu a capacidade de tais células de ativar a via de sinalização mediada por essa proteína. O aumento da fosforilação da MAPK pela DCD foi observado também em queratinócitos ativados pelo tratamento com um peptídeo derivado da região C-terminal da DCD, DCD 1L (NIYONSABA et al., 2009). Esses autores também mostram que esta ativação é mediada por um receptor acoplado à proteína G (NIYONSABA et al., 2009).

Ao analisar a fosforilação da proteína STAT3, observamos um aumento na sua ativação nas duas linhagens com a expressão de DCD, principalmente após o estímulo com EGF (Figura 7 e 16). A ativação dessa proteína também foi observada com o tratamento de células de Kuffer, hepatócitos e monócitos com a glicoproteína PIF, que possui a parte proteica similar ao DCD (WATCHORN et al., 2001, 2005). A STAT3 ativada é frequentemente encontrada em diversos tipos de tumorais, incluindo câncer de mama EGFR positivo (QUESNELLE et al., 2007) e sua ativação é mediada por esse receptor (GRANDIS et al., 1998; BOWMAN et al., 2000; HARURA et al., 2005). Nos nossos ensaios de imunofluorescência, também observamos um aumento de STAT3 fosforilada e uma localização nuclear dessa proteína na célula MCF-7 com superexpressão de DCD (Figura 17). Uma vez fosforilada, a STAT3 é ativada e liga-se a outra molécula de STAT3 e migra do citoplasma para o núcleo, induzindo a transcrição de diversas proteínas relacionadas com a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (QUESNELLE et al., 2007), o que está de acordo os nossos dados experimentais (Figuras 10 e 12).

As células que superexpressavam DCD apresentaram uma maior fosforilação de ERK. Essa proteína é o último membro da cascata de sinalização da via Raf/MEK/ERK que é ativada pela família de proteínas quinases Src associadas aos receptores de crescimento da família EGF/ErbB (CITRI e YARDEN, 2006; McCUBREY et al., 2007). A ativação de ERK leva fosforilação de fatores de transcrição relacionados com o crescimento e sobrevivência celular (MCCUBREY et al., 2007). A ativação dessas vias de sinalização culmina no

estímulo da transcrição de vários genes envolvidos na proliferação e ciclo celular (CITRI e YARDEN, 2006; NORMANNO et al., 2007; QUESNELLE et al., 2007). Dentre esses genes destacam-se o C-myc. A modulação da expressão desse gene pelo DCD foi observada nos ensaios de microarranjo de DNA (Figuras 1, 3 e 4) e foi comprovada através dos ensaios de Western blot nas células MDA-MB-361 após o silenciamento gênico (Figura 8). Já a superexpressão do DCD na linhagem MCF-7 resultou no aumento da expressão desse fator de transcrição (Figuras 19 e 20). Além disso, o tratamento com DCDr, além de induzir a expressão de EGFR, foi capaz aumentar a expressão de C-myc de forma bifásica na linhagem MDA-MB-361 (Figura 10B e 10C). As análises dos dados de microarranjo de DNA realizadas por Lowrie et al. (2011) após o tratamento das células HuH7 com o peptídeo derivado da DCD também evidenciaram a alteração na expressão de C-myc. Os autores mostraram que o C-myc foi um dos centros de uma rede de interações gênicas alteradas após o tratamento, reforçando a tese de que o DCD é capaz de estimular a expressão de C-myc.

A função biológica principal de C-myc é promover a síntese de genes associados à progressão no ciclo celular e metabolismo (COLLER et al., 2000; PELENGARIS et al., 2002). O gene C-myc é um protooncogene cuja expressão é desregulada em diversos tipos de células tumorais (PELENGARIS et al., 2002). A expressão de C-myc ocorre após estímulo por fatores de crescimento e, uma vez expresso, atua na transcrição de centenas de genes, incluindo da ciclina E e CDK2 (*Cyclin Dependent Kinase 2*) no início da fase G1 e progressão para a fase S do ciclo celular (PELENGARIS et al., 2002). Portanto, uma vez expresso, ele estimula a mitose e, conseqüentemente, leva a um aumento na expressão da ciclina B, que é expressa durante a transição da fase G2 para mitose (LINDQVIST et al., 2009). Isso de fato ocorreu, quando verificamos a expressão da Ciclina B nas células MDA-MB-361, após o silenciamento, observamos uma redução significativa de sua expressão (Figura 8). O oposto foi encontrado nas células MCF-7 com a superexpressão de DCD (Figuras 19 e 20), sugerindo que as células apresentam uma atividade proliferativa maior na presença dessa proteína. Além

de estimular a progressão no ciclo celular, o C-myc também regula negativamente genes relacionados com inibição do ciclo, como p21 e p27 (GARTEL e SHCHORS, 2003; GARTEL e RADHAKRISHNAN, 2005). A expressão de p21 foi reprimida nas mesmas concentrações de DCDr que induziram a expressão de EGFR e C-Myc nas células MDA-MB-361 (Figura 10). Já a expressão de p27 foi sensivelmente reduzida nas células MCF-7 com a expressão de DCD (Figura 19). A nossa hipótese é que a presença da DCD induz a expressão de EGFR, o que aumenta a presença desse receptor na membrana da célula, resultando, assim, em uma maior ativação de sua via de sinalização. Uma vez ativada, esta via promove a indução da expressão de C-myc que, por sua vez, suprime a expressão de p21 e p27 e, provavelmente, outros inibidores do ciclo celular, favorecendo a proliferação celular.

Tomados em conjunto, os dados sugerem que o DCD é capaz de aumentar a proliferação celular modulando a expressão dos fatores de crescimento da família EGF/ErbB, de modo a promover a fosforilação das proteínas de suas cascatas de sinalização intracelular, o que resulta na ativação de fatores de transcrição e na expressão de genes, como exemplo, C-myc e a Ciclina B1, que atuam na progressão do ciclo celular e mitose.

Ainda é desconhecido o mecanismo exato pelo qual o DCD produz suas atividades proliferativas nas células tumorais, bem como sua possível interação com um receptor próprio. Baseado em nossos dados e os da literatura descrevemos a seguir algumas hipóteses para explicar este mecanismo. Diversos trabalhos têm demonstrado que a proteína DCD pode ser processada em fragmentos derivados de suas porções N-terminal e C-terminal. Esses fragmentos apresentam diferentes atividades biológicas (TODORV et al., 1996, CUNNINGHAM et al., 1998, 2000, 2002; SCHITTEK et al., 2001). Os estudos recentes do nosso grupo a respeito da biologia estrutural de DCD indicam que esta proteína é intrinsecamente desestruturada, podendo assumir várias conformações estruturais e, dessa forma, atuar em diferentes sítios ou receptores

conectados a várias vias de sinalização (TROMPA et al., 2005; MAJCZAK et al., 2007).

Um estudo recente demonstrou a que parte N-terminal do DCD correspondente à região do peptídeo YP-30 pode se ligar tanto a sindecan-2 como a sindecan-3 (LANDGRAF et al., 2008). Niyonsaba et al. (2008), por sua vez, demonstraram que o peptídeo DCD 1L, derivado da região C-terminal da Dermicidina, é capaz de ativar queratinócitos humanos e que esta habilidade é, aparentemente, controlada por uma via dependente da atividade da proteína G. Um outro fato interessante é que a lacritina, que tem similaridade estrutural com a DCD, também exerce atividade mitogênica em células epiteliais (WANG et al., 2006). O possível mecanismo descrito para esta molécula é através de sua ligação à proteína a sindecan-1 e ativação de um receptor ligado à proteína G, porém, o receptor exato ainda não foi descrito (WANG et al., 2006). Possivelmente, o mecanismo de ação da DCD pode ser similar ao da lacritina. Nesse sentido, verificamos pelos dados da literatura que existe um intenso *crosstalk* entre receptores acoplados à proteína G e os receptores EGFR/ErbB (YARDEN e SLIWKOWSKI, 2001; CITRI e YARDEN, 2006). A ativação desses receptores é capaz de estimular, por meio de mecanismo pouco compreendido, as metaloproteases de matriz, as quais clivam os ligantes da família EGF/ErbB ancorados na membrana, liberando-os para se ligar aos seus receptores (YARDEN e SLIWKOWSKI, 2001; CITRI e YARDEN, 2006). Além disso, tais receptores podem ativar de forma indireta a proteína Src que fosforila os domínios intracelular tirosino-quinase dos receptores EGFR/ErbBs resultando, assim, na ativação dessa via de sinalização (YARDEN e SLIWKOWSKI, 2001, CITRI e YARDEN, 2006).

Dentro desse cenário, nós propomos duas hipóteses para tentar explicar o possível mecanismo de ação pelo qual a Dermicidina exerce sua atividade mitogênica (Figura 21). A primeira é que a DCD possa desencadear seus efeitos biológicos de forma semelhante à da lacritina, ou seja, ela se ligaria a sidecan-2 ou 3 promovendo a estabilização da sua estrutura, o que permitiria a sua ligação a

um receptor acoplado à proteína G. Uma vez ligada ao receptor, a DCD poderia induzir a ativação dos receptores da família EGFR/ErbBs, por uma via indireta, levando à ativação da Src concomitantemente com a ativação e ampliação das vias de sinalização intracelular sob o comando dos ligantes de receptores EGF/ErbB (Figura 21). A nossa segunda hipótese é que depois de se ligar a receptor próprio, a DCD ativaria uma via paralela à via dos EGF/ErbB, que culminaria na ativação de fatores de transcrição que, por sua vez, induziria expressão dos receptores EGFR/ErbBs e seus ligantes. Tal efeito causaria um aumento na presença dos receptores na membrana celular e na secreção de ligantes, o que resultaria em uma maior ativação desses receptores e, conseqüentemente, na maior ativação dessa via de sinalização, que, por fim, resultaria nos seus efeitos biológicos. Estas são algumas das hipóteses que precisam ser testadas no futuro.

Lowrie et al. (2011) também levantaram a hipótese de que a DCD produziria seus efeitos proliferativos através da sinalização mediada pela proteína calcineurina, após observar que a mutação na histidina 35 aboliu a atividade proliferativa. Segundo os autores, esse aminoácido é parte do domínio de fosfatase semelhante à calcineurina, o qual está presente na proteína DCD, e nas famílias de proteína com esse domínio. Assim, a remoção da histidina 35 causaria uma diminuição na atividade fosfatase da DCD (LOWRIE et al., 2011). Esse dado é controverso, porque a mutação em outros dois aminoácidos desse suposto domínio não alterou a capacidade proliferativa da proteína. Além disso, a remoção da histidina pode possivelmente alterar a atividade de protease, descrita por Motoyama et al. (2007), ou alterar a conformação estrutural da proteína, dificultando sua ligação às sindecans-2 ou 3, conforme descrito por Landgraf et al. (2008). Ademais, tanto os dados de microarranjo de DNA apresentados no referido estudo quanto no nosso não mostraram nenhuma relação entre o DCD e a via de sinalização ligada à calcineurina (LOWRIE et al., 2011 e Figuras 1, 2 e 3).

Em resumo, este trabalho demonstra por estudos de silenciamento, superexpressão do gene e tratamento com a proteína recombinante que a Dermicidina pode promover o aumento na proliferação e sobrevivência celular no câncer de mama pela ativação da via de sinalização mediada por membros da família EGF/ErbB. Nossos dados também sugerem que outros genes e mecanismos possam colaborar na indução destes efeitos biológicos.

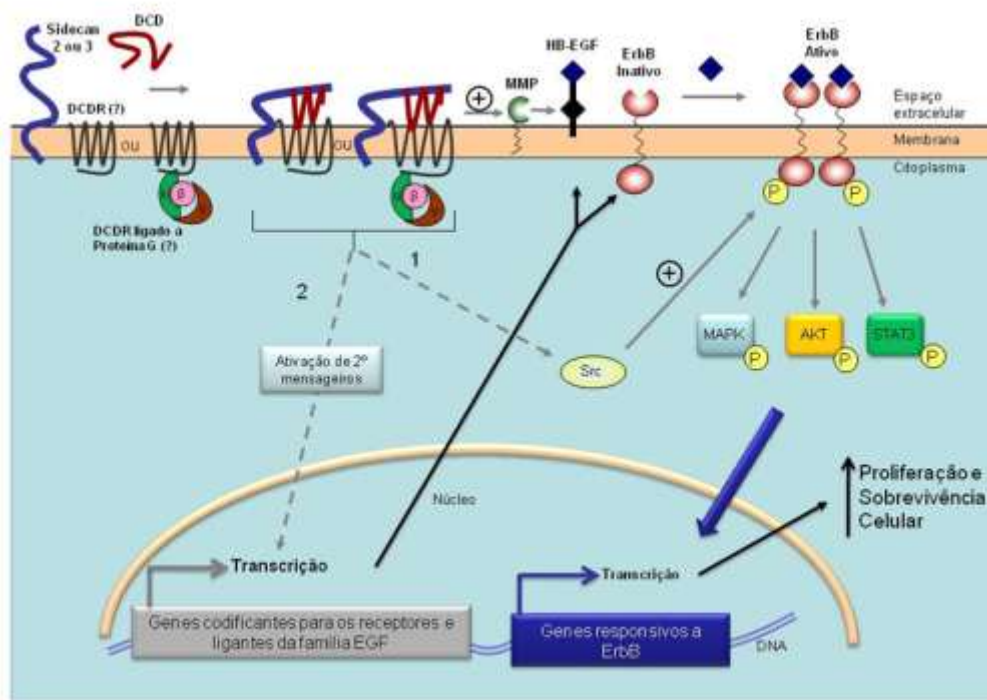


Figura 21 – Diagrama representativo dos mecanismos de ação mitogênica da Dermicidina. A primeira hipótese (1), a DCD poderia atuar de forma semelhante à lacritina, ligando-se a sidecan-2 ou 3, estabilizando sua estrutura, e a sua ligação a um possível receptor específico (DCDR) acoplado à proteína G (GPCR). Uma vez ligada, a DCD induziria a ativação dos receptores da família EGF/ErbB, por uma via indireta, através da ativação da proteína Src que fosforilaria os domínios intracelular tirosinoquinase dos receptores ErbB, resultando na ativação dessa via de sinalização, aumentando, assim, a proliferação e sobrevivência celular. Além disso, uma vez ativados os receptores DCDR, eles poderiam aumentar a atividade de metaloproteinases da matriz, liberando assim mais ligantes da família EGF, como já foi demonstrado para outros receptores acoplados à proteína G, resultando em uma maior ativação dessa via EGF/ErbB. Na segunda hipótese (2) a DCD ligaria ao receptor DCDR, associado à proteína G (GPCR), culminando na ativação de uma via própria que promoveria a ativação de fatores de transcrição que induziriam expressão dos receptores EGF/ErbB e seus ligantes. Isso levaria a um aumento na presença dos receptores na membrana celular e na secreção de ligantes, o que resultaria em uma maior ativação dessa via de sinalização, aumentando a proliferação e sobrevivência celular. DCDR – possível receptor da proteína DCD; α , β , γ subunidades da proteína G; MMP – metaloproteinase de matriz; HB-EGF – ligante da família EGF; + - estimulação positiva; Setas cinzas preenchidas – ativação por fosforilação; P – fosforilação; Setas cinzas tracejadas – possíveis mecanismos de ação da DCD; Seta azul grossa – ativação da via; Setas pretas – ativação da transcrição gênica; Seta preta - aumento da proliferação e sobrevivência celular.

5 Conclusões

Considerando os resultados deste estudo podemos concluir que:

1. A Dermicidina é capaz de modular a expressão dos receptores e ligantes da família EGF/ErbB tanto nas células da linhagem MDA-MB-361 quanto nas células MCF-7;
2. A presença da proteína Dermicidina no meio extracelular é capaz de estimular a proliferação celular das células MDA-MB-361, além de modular a expressão gênica dos receptores e ligantes da família EGF/ErbB de forma bifásica;
3. A superexpressão do gene DCD pela linhagem MCF-7 induz um aumento na proliferação e na sobrevivência celular;
4. A expressão do gene DCD pelas linhagens de carcinoma de mama resulta na ativação da via de sinalização mediada pelos receptores e ligantes da família EGF/ErbB ;
5. A atividade oncogênica da Dermicidina no câncer de mama pode ser mediada pela modulação da expressão dos receptores e ligantes da família EGF/ErbB com consequente ativação da rede de sinalização intracelular induzida por estes receptores.

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. 4, p. 637-642, 1989.

ARNER, E. S; HOLMGREN A. The thioredoxin system in cancer. **Semin. Cancer Biol.**, v. 16, p. 420-426, 2006.

ASHBY, B. Novel mechanism of heterologous desensitization of adenylate cyclase: prostaglandins bind with different affinities to both stimulatory and inhibitory receptors on platelets. **Mol. Pharmacol.**, v. 38, p. 46-53, 1990.

BADVE, S.; A'HERN, R. P. I; WARD, A. M.; MILLIS, R. R.; PINDER, S. E.; ELLIS, I. O.; GUSTERSON, B. A.; SLOANE, J. P. Prediction of local recurrence of ductal carcinoma in situ of the breast using five histological classifications: a comparative study with long follow-up. **Hum. Pathol.**, v. 29, p. 915-923, 1998.

BARNES, N. L. P.; KHAVARI, S.; BOLAND, G. P.; CRAMER, A.; KNOX, F.; BUNDRED, N. J. Absence of HER4 expression predicts recurrence of ductal carcinoma *in situ* of the breast. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, p. 2163-2168, 2005

BASELGA, M. A.; ARTEAGA, C. L. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 23, n. 11, p. 2445-2459, 2005.

BEERLI, R. R.; HYNES, N. E. Epidermal Growth Factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 11, p. 6071-6076, 1996.

BELIZARIO, 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.

BEN-BARUCH, A.; BENGALI, K.; TANI, K.; XU, L.; OPPENHEIM, J. J.; WANG, J. M. IL-8 and NAP-2 differ in their capacities to bind and chemoattract 293 cells transfected with either IL-8 receptor type A or type B. **Cytokine**, v 19, p. 1271-1276, 1999.

De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

-
- BENEST, A. V.; AUGUSTIN, H. G. Cancer: Blood vessels kept quiet. **Nature**, v. 458, p. 41-42, 2009.
- BIANCO, R.; GELARDI, T.; DAMIANO, V.; CIARDIELLO, F.; TORTORA, G. Rational bases for the development of EGFR inhibitors for cancer treatment. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, p. 1416-1431, 2007.
- BOHNSACK, B. L.; HIRSCHI, K. K. Nutrient regulation of cell cycle progression. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 24, p. 433-453, 2004.
- BOOTH, B. W.; SMITH, G. H. Roles of transforming growth factor- α in mammary development and disease. **Growth Factors**, v. 25, p. 227-235, 2007.
- BOS, P. D.; ZHANG, X. H. F.; NADAL, C.; SHU, W.; GOMIS, R. R.; NGUYEN, D.; MINN. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. **Nature**, v. 459, p. 1005-1009, 2009.
- BOUDREAU, N.; MYERS, C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. **Breast Cancer Res.**, v. 5, n. 3, p. 140-146, 2003.
- BOWMAN, T.; GARCIA, R.; TURKSON, J.; JOVE, R. STATs in oncogenesis. **Oncogene**, v. 19, p. 2474-2488, 2000.
- BRUSCH, W.; KARWAN, A.; MAYER, M.; DORNETSHUBER, J.; FROHWEIN, U.; SCHULTE-HERMANN, R.; FAZI, B.; SANO, F.; PIREDDA, L.; PIACENTINI, M.; PETROVSKI, G.; FÉSUS, L.; GERNE, C. Cell death and autophagy: cytokines, drugs and nutritional factors. **Toxicology**, v. 254, n. 3, p. 147-157, 2008.
- BURGESS, A. W. EGFR family: structure physiology signaling and therapeutic targets. **Growth Factors**, v. 25, n. 5, p. 263-274, 2008.
- BUROW, M. E.; WELDON, C. B.; TANG, Y.; NAVAR, G. L.; KRAIEWSKI, S.; REED, J. C.; HAMMOND, T. G.; CLEAN, S.; BECKMAN, B. S. Differences in susceptibility to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. **Cancer Res.** v. 58, n. 21, p. 4940-4946, 1998.
- CADENAS, C.; FRANCKENSTEIN, D.; SCHMIDT, M.; GEHRMANN, M.; HERMES, M.; GEPPERT, B.; SCHOMANN, W.; MACCOUX, L. J.; SCHUNG, M.; SCHUMANN, A.; WILHELM, C.; FREINS, E.; ICKSTADT, K.; RAHNENHFUHRER, J.; BAUMBACH, J. L.; SICKMANN, A.; HENGSTLER, J. G. Role of thioredoxin reductase 1 and thioredoxin interacting protein in prognosis of breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v. 12, n. 3, p. R44 1-15, 2010.

CAILLEAU, R.; CRUCIGER, Q.; HOKANSON, K. M.; OLIVE, M.; BLUMENSCHNEIN, G. Morphological, biochemical and chromosomal characterization of breast tumor lines from pleural effusions. **In Vitro**, v. 72, p. 331-335, 1976.

CARMELET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v. 14, n. 407, p. 249-257, 2000.

CARTERON, C.; FERRER-MONTLEL, A.; CABELO, H. Characterization of a neural-specific splicing the human neuregulin 3 gene involved in oligodendrocyte survival. **J. Cell Sci.**, v. 119, p. 898-909, 2006.

CHANG, C. P.; NEILSON, J. H.; BAYLE, J. E.; GESTWICKI, A.; KUO, K.; STANKUNAS, I. A.; GRAEF; CRABTREE, G. R. A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis. **Cell**, n. 3, v. 118, p. 649-663, 2004.

CHANG, W. C.; HUANG, M. S.; YANG, C. J.; LAI, T. C.; HASIAO, M.; CHEN, C. H. Dermcidin identification from exhaled air for lung cancer diagnosis. **Eur. Respir. J.**, v. 35, n. 5, p. 1182-1185, 2010.

CHIN K.; DE SOLORZANO, C. O.; KNOWLES, D.; JONES, A.; CHOU, W.; RODRIGUEZ, E. G.; KUO, W. L.; LJUNG, B. M.; CHEW, K.; MYAMBO, K.; MIRANDA, M.; KRIG, S.; GARBE, J.; STAMPFER, M.; YASWEN, P.; GRAY, J. W., LOCKETT, S. J. In situ analyses of genome instability in breast cancer. **Nat. Genet.**, v. 36, n. 9, p. 984-988, 2004.

CHUU, C.; CHEN, R.; BARKINGE, J. L.; CIACCIO, M. F.; JONES, R. B. System-level analysis of ErbB4 signaling in breast cancer: a laboratory to clinical perspective. **Mol. Cancer Res.**, v. 6, n. 6, p. 855-891, 2008.

CIPAKOVA, I.; GASPERIK, J.; HOSTINOVA. Expression and purification of human antimicrobial peptide, dermcidin in *Escherichia coli*. **Protein Expr Purif.**, v. 45, p. 269-274, 2005.

CITRI, A.; YARDEN, Y. EGF-ERBB signaling: towards the system level. **Nature Rev. Mol. Cell Bio.**, v. 7, p. 505-516, 2006.

COLLER H. A.; GRANDORI C.; TAMAYO P.; COLBERT, T.; LANDER, E. S.; EISENMAN, R. N.; GOLUB, T. R. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 3260-3265, 2000.

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.; AKERBLOM 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

DAUB, H.; WALLASCH, C.; LANKENAU, A.; HERRLICH, A.; ULLRICH, A. A signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. **EMBO J.**, v. 16, p. 7032-7044, 1997.

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.

DUTHIE, S. J.; NARAYANAN, S.; SHARP, P.; LITTLE, J.; BASTEN, G.; POWERS, H. Folate, DNA stability and colo-rectal neoplasia. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 63, n. 4, p. 571-578, 2004.

EKINS, S.; ANDREYEV, S.; RYABOV, A.; KIRILLOV, E.; RAKHMATULIN, E. A.; SOKINA, S.; BUGRIM, A.; NIKOLSKAYA. A combined approach to drug metabolism and toxicity assessment. **Drug Metab. Dispos.**, v. 34, 495-503, 2006.

ELLWOOD, K. C.; CHATZIDAKIS, C.; FAILLA, M. L. Fructose utilization by the human intestinal epithelial cell line. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 202, n. 4, p. 440-446, 1993.

FAZI, B.; BURSCH, W.; FIMIA, G. M.; NARDACCI, R.; PIACENTINI, M.; SANO, F.; PIREDDA, L. Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells. **Autophagy**, v. 4, p. 435-441, 2008.

FERLAY J.; PARKIN D. M.; STELIAROVA-FOUCHER, E. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. n. 10, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>. Acesso em: 20 jun. 2011.

FERRER-SOLIER, L.; VAZQUEZ-MARTIN, A.; BRUNET, J.; MENENDEZ, J. A.; LLORENS, R.; COLOMER, R. An update of the mechanisms of resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in breast cancer: Gefitinib (Iressa)-induced

changes in the expression and nucleo-cytoplasmic trafficking of HER-ligands. *Int. J. Mol. Med.*, v. 20, p. 3-10, 2007.

FONTES-DE-OLIVEIRA, C. C. **Efeitos biológicos do PIF/DCD (proteolysis-inducing factor/dermcidin) durante o crescimento e diferenciação celular.** 2005. f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

FRENHNEY, M. W.; RAWLINSON, L.; GUESDON, F.; JONES, E.; COWLEY, S.; HSUAN, J.; SAKLATVALA, J. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*, v. 23, p. 1039-1049, 1994.

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

GARTEL, A. L.; SHCHORS, K. Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp. Cell Res.*, v. 283, n. 2, p. 17-21, 2003.

GARTEL, A. L.; RADHAKRISHNAN, S. K. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res.*, v. 65, p. 3980-3985, 2005.

GIROIX, M. H.; SENER, A.; DUFRANE, S. P.; MALEISSE-LAGAE, E.; MALEISSE W. J. Glucose metabolism in insulin-producing tumoral cells. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 241, n. 2, p. 561-570, 1985.

GOLDBERG, S. F.; MIELE, M. E.; HATTA, N.; TAKATA, M.; PAQUETTE-STRAUB, C.; FREEDMAN, L. P.; WELCH, R. Melanoma metastasis suppression by chromosome 6: Evidence for a pathway regulated by CRSP3 and TXNIP. *Cancer Res.*, v. 63, p. 432-440, 2003.

GRANDIS, J. R.; DRENNING, S. D.; CHAKRABORTY, A.; ZHOU, M.; ZENG, Q.; PITT, A. S.; TWEARDY, D. J. Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth in vitro. *J. Clin. Invest.*, v. 102, p. 1385-1392, 1998.

GUIDI, A. J.; SCHNITT, S. J.; FISCHER, L.; TOGNAZZI, K.; HARRIS, J. R.; DVORAK, H. F.; BROWN, L. F. Vascular permeability factor (Vascular Endothelial Growth Factor) expression and angiogenesis in patients with ductal carcinoma in situ of breast. *Cancer*, v. 80, p. 1945-1953, 1997.

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

HAN, J.; LEE, J. D.; BIBBS, L.; ULEVITCH, R. J. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. **Science**, v. 5, p. 808-811, 1994.

HAN, S. H.; JEON, J. H.; JU, H. R. VDPU1 up-regulated by TGF- β 1 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits tumor cell growth by blocking cell-cycle progression. **Oncogene**, v. 22, p. 1035-4046, 2003.

HAURA, E. B.; ZHENG, Z.; SONG, L.; CANTOR, A.; BEPLER, G.; Activated epidermal growth factor receptor-Stat-3 signaling promotes tumor survival in vivo in non-small cell lung cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, p. 8288-8894, 2005.

HEVIER, N.; TROST, N.; DEBELIJAK, N.; LANISNISK, R. T. Expression of estrogen and progesterone enzymes in different breast cancer cell lines. **Chem Biol. Interact.**, v. 30, n. 191, p. 206-216, 2011.

HIGGIBOTHAM, J. N.; BECKLER, M. D.; GEPHART, J. D.; FRANLIN, J. L.; BOGATCHEVA, G.; KREMERS, G.; PISTON, D. W.; AYERS, G. D.; McCONNEL, R. E.; TYSKA, M. J.; COFFEY, R. J. Amphiregulin exosomes increase cancer cell invasion. *Cell*, v. 21, p. 779-786, 2011.

HIPFEL, R.; SCHITTEL, B.; BODINGBAUER, Y.; GARBE, C. Specifically regulated genes in malignant melanoma tissues identified by subtractive hybridization. **Br J Cancer**, p. 82, n. 6, p. 1149-1157, 2000.

HOEFLICH, K. P.; O'BRIEN, C.; BOYD, Z.; CAVET, G.; GUERRERO, S.; JUNG, S.; JANUARIO, T.; SAVAGE, H.; PUNNOOSE, E.; TRUONG, T.; ZHOUR, W.; BERRY, L.; MURRAY, L.; AMLER, L.; BELVIN, M.; FRIEDMAN, L. S.; LACKNER. In vivo antitumor activity of MEK and phosphatidylinositol kinase inhibitor in basal-like breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 15, n. 14, 4649-4664, 2009.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. **Nat. Protoc.**, v. 4, n. 1, p. 44-57, 2009a.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, n. 1, p. 1-13, 2009b.

HUMPHREYES, R. C.; HENNINGAHUSEN, L. Transforming growth factor alpha and mouse models of human breast cancer. **Oncogene**, v. 19, p. 1085-1091, 2000.

HU, M; POLYAK, K. Microenvironmental regulation of cancer development. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 18, p. 27-34, 2008a.

HU, M.; POLYAK, K. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. **Cancer Cell**, v. 44, p. 2760-2765, 2008b.

HUMPHREYS, R. C.; HENNIGHAUSEN, L. Transforming growth factor alpha and mouse models of human breast cancer. **Oncogene**, v. 21, n. 19, p. 1085-1091, 2000.

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.

HYNES, N. E.; LANE, H. A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, n. 7 p. 341-554, 2005.

JATOI, A.; FOSTER, N.; WIELAND, B.; MURPHY, B.; NIKCEVICH, D.; LAPLANT, 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.

JUNG, H. H.; YANG, S.; SIM, J.; LEE, S.; LEE, J. Y.; SHIN, S. Y.; KIM, J. I. Analysis of the solution structure of the human antibiotic peptide dermcidin and its interaction with phospholipid vesicles. **BMB Rep.**, v. 43, n. 5, p. 362-368, 2010.

JUNN, E.; HAN, S. H.; IM, J. Y. Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. **J. Immunol.** v. 164, p. 6287-6295, 2000.

JUNTTILA, T. T.; AKITA, R. W.; PARSONS, K.; FIELDS, C.; LEWIS-PHILLIPS, G. G.; FRIEDMAN, L. S.; SAMPATH, D.; SLIWKOWSKI, M. X. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by PI3K inhibitor GDC-0941. **Cancer Cell**, v. 5, n. 15, p. 429-440, 2009.

KANSRA, S.; STOLL, S. W.; JOHNSON, J. L.; ELDER, J. T. Src family kinase inhibitors block amphiregulin-mediated autocrine ErbB signaling in normal human keratinocytes. **Mol. Pharmacol.**, v. 67, p. 1145-1157, 2005.

KANG, K. S.; WANG, P.; YAMABE, N.; FUKUI, M.; JAY, T.; ZHU, B. T. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in MCF-7 cells in vitro and in vivo via reactive oxygen species formation and caspase 8 activation. **PLoS One**, v. 22, n. 5, p. e10296, 2010.

KARAMOUZIS, M. V.; BADRA, F. A.; PAPAVALASSILIOU, A. G. Breast cancer: the upgraded role of HER-3 and HER-4. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, p. 851-856, 2007.

-
- KIM, S. Y.; SUH, H.; CHUNG, J. W.; YOON, S. CHOI, I. Diverse functions of VDP1 in cell proliferation, differentiation, and diseases. **Cell Mol. Immunol.**, v. 4, n. 5, p. 345-351, 2007.
- KRAUS, M. H.; POPESCU, N. C.; AMSBAUGH, S. C.; KING, C. R. Overexpression of the EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. **EMBO J.** 1987 n. 6, p. 605-610, 1987.
- KUROKAWA, H.; NISHIO, K.; FUKUMOTO, H.; TOMONARI, A.; SUZUKI, T.; SAIJO, N. Alteration of caspase-3 (CPP32/Yama/apopain) in wild/type MCF-7 breast cancer cells. **Oncol. Rep.**, v. 6, n. 1, p. 33-37, 1999.
- LACROIX, M.; LECLERCQ, G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumors: an update. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 83 p. 249-289, 2004.
- LAI, Y. P.; PENG, Y. F.; ZUO, Y.; LI, J.; HUANG, J.; WANG, L. F.; WU, Z. R. Functional and structural characterization of recombinant dermcidin-1L, a human antimicrobial peptide. **Biochem. Biophys Res.**, v. 328, n. 1, p. 243-250, 2005.
- LANDGRAF, P.; WAHLE, P.; PAPE, H.; GUNDELFINGER, E. D.; KREUTZ, M. R. The survival-promoting peptide Y-P30 enhances binding of pleiotrophin to syndecan-2 and 3 and supports its neuritogenic activity. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 25036-25045, 2008.
- LEE, J. C.; LAYDON, J. T.; McDONNELL, P. C.; GALLAGHER, T. F.; KUMAR, S.; GREEN, D.; McNULTY, D.; BLUMENTHAL, M. J.; HEYS, J. R.; LANDVATTER, S. W. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. **Nature**, v. 22-29, p. 739-746, 1994.
- LENFERINK, A. E., SIMPSON, J. F., SHAWVER, L. K., COFFEY, R. J., FORBES, F. T., ARTEAGA, C. L. Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase suppress tumorigenesis in MMTV/Neu + MMTV/TGF- α bigenic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 9609-9614, 2000.
- LINDQVIST, A.; RODRIGUESZ-BRAVO, V.; MEDEMA, M. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. **J. Biol. Chem.**, v. 185, n. 2, p. 193-202, 2009.
- LOPES-GARCIA, M. J.; GEYER, F. C.; LACROIX-TRIKI, M.; MARCHIÓ, C.; REIS-FILHO, J. S. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. **Histopathology**, v. 57, n. 2, p. 171-192, 2010.
- 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.

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

LOWRIE, A. G.; DICKINSON, P.; WHEELHOUSE, N.; STEWART, G. D.; ROSS, A. J.; FORSTER, T.; ROSS, J. A. Proteolysis-inducing factor core peptide mediates dermcidin-induced proliferation of hepatic cells through multiple signaling networks. **Int. J. Oncol.**, v. 39, p. 709-718, 2011.

MAJCZAK, G.; LILLA, S.; GARAY-MALPARTIDA, H. M.; MARKOVIC, J.; MEDRANO F. J.; DE NUCCI, G.; BELIZÁRIO, J. E. Prediction and biochemical characterization of intrinsic disorder in the structure of proteolysis-inducing factor/dermcidin. **Genet. Mol. Res.**, v. 6, p. 1000-1011, 2007.

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

MA, X. J.; SALUNGA, R.; TUGGLE J. T.; GAUDET, J.; ENRIGHT, E.; MCQUARY, P.; PAYETTE, T.; PISTONE, M.; STECKER, K.; ZHANG, B. M.; ZHOU, Y. X.; VARNHOLT, H.; SMITH, B.; GADD, M.; CHATFIELD, E.; KESSLER, J.; BAER, T. M.; ERLANDER, M. G.; SGROI, D. C. Gene expression profiles of human breast cancer progression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.100, p. 5974-5479, 2003.

McBRYAN, J.; HOWLIN, J.; NAPOLETANO, S.; MARTIN, F. Amphiregulin: role in mammary gland development and breast cancer. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, v. 13, 159-169, 2008.

McCUBREY, J. A.; STEELMAN, L. S.; CHAPPEL, W. H.; ABRAMS, S. L.; WONG, E. W. T.; CHANG, F.; LEHMANN, B.; TERRIAN, D. M.; MILELLA, M.; TAFURI, A.; STIVALA, F.; LIBRA, M.; BASECKE, J.; EVANGELISTI, C.; MARTELLI, A. M.; FRANKLIN, R. A. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1773, p. 1263-1284, 2007.

McINTYRE, E.; BLACKBURN, E.; BROWN, P. J.; JOHNSON, C. G.; GULLICK, W. J. The complete family of epidermal growth factor receptor and their ligands are coordinately expressed in breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 122, p. 105-110, 2010.

MIYAMOTO, S.; HIRATA, M.; YAMAZAKI, A.; KAGEYAMA, T.; HASUWA, H.; MIZUSHIMA, H.; TANAKA, Y.; YAGI, H.; SONODA, K.; KAI, M.; KANO, H.; NAKANO, H.; MEKADA, E. Heparin-binding EGF-like growth factor is a promising target for ovarian cancer therapy. **Cancer Res.**, v. 64, p. 5720-5727, 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.

MOREIRA D. F. **Redução do crescimento e resistência celular de carcinoma mamário após silenciamento do gene PIF/DCD (proteolysis-inducing-factor/dermicidin) via expressão shRNA.** 2007. f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MOREIRA, D. F.; VANNIER, E.; STRAUSS, B.; BELIZÁRIO, J. E. Genes up and down regulated by dermicidin in breast cancer: a microarray analysis. **Genet. Mol. Res.** v. 29, p. 158-162, 2008.

MOTOYAMA J. P. L.; KIM-MOTOYAMA H.; KIM P.; NAKAGAMA H.; MIYAGAWA K.; SUZUKI K. Identification of dermicidin in human gestational tissue and characterization of its proteolytic activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 357 n. 4, p. 828-837, 2007.

MOULDER, S. L.; YAKES, F. M.; MUTHUSWAMY, S. K.; BIANCO, R.; SIMPSON, J. F.; ARTEAGA, C. L. Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase Inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Res.**, v. 16, p. 8887-8895, 2001.

MURAOKA-COOK, R. S.; FENG, S.; STRUNK, K. E.; EARP-III, S. ErbB4/HER4: Role mammary gland development differentiation and growth inhibition. *J. Mammary Gland Biol.* **Neoplasia**, v. 13, p. 235-246, 2008.

NAGASHIMA, T.; SHIMODAIRA, H.; IDE, K.; NAKAKUKI, T.; TANI, Y.; TAKAHASHI, K.; YUMOTO, N.; HATAKEYAMA, M. Quantitative transcriptional control of ErbB receptor signaling undergoes graded to biphasic response for cell differentiation. **J. Cell Biochem.**, v. 282, p. 4045-4056, 2007.

NIKOLSKY, Y.; EKINS, S.; NIKOSKAYA, T.; BUGRIM, A. A novel method for generation of signature networks as biomarkers from complex high throughput data. **Toxicol. Lett.**, v. 158, p. 20-29, 2005a.

NIKOLSKY, Y.; NIKOSKAYA, T.; BUGRIM, A. Biological networks and analysis of experimental data in drug discovery. **Drug Discov. Today**, v. 10, p. 653-662, 2005b.

NIYONSABA, F.; SUZUKI, A.; USHIO, H.; NAGAOKA, I.; OGAWA, H.; OKUMURA, K. The human antimicrobial peptide dermcidin activates normal human keratinocytes. **Br. J. Dermatol.**, v. 160, p. 243-249, 2009.

NORMANNO, N.; SELVAM, M. P.; QI, C. F.; SAEKI, T.; JOHNSON, G.; KIM, N. Amphiregulin as an autocrine growth factor for c-Ha-ras and c-erbB-2-transformed human mammary epithelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 2790-2794, 1994.

NORMANNO, N.; DE LUCA, A. D.; BIANCO, C.; STRIZZI, L.; MANCINO, M.; MAIELLO, M. R.; CAROTENUTO, A.; DE FEO, G.; CAPONIGRO, F.; SALOMON, D. S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. **Gene**, v. 366, p. 2-16, 2006.

OLYAIIOYE, M. A.; NEVE, R. M.; LANE, H. A.; HYNES, N. E. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. **EMBO J.**, v 19, n. 13, p. 3159-3167, 2000.

PÁDUA-BORGES J. **Avaliação das alterações morfológicas e bioquímicas no músculo esquelético durante a caquexia induzida pelo tumor B61-PIF**. 2006. f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

PELENGARIS, S.; KHAN, M.; EVAN, G. c-MYC: more than just a matter of life and death. **Nature**, v. 2, p. 764-776, 2002.

PEREZ, E. A.; ROMOND, E. H.; SUMAN, V. J.; JEONG, J. H.; DAVIDSON, N. E.; GEYER C. E. J. R.; MARTINO, S.; MAMOUNAS, E. P.; KAUFMAN, P. A; WOLMARK N. Four-Year Follow-Up of Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31. **J. Clin. Oncol.**, In press, 2011.

PERSIKE, D. **Ativação de enzimas caspases e proteassoma em sistemas neurais**. 2005. f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, n. 9, p. 1-10, 2002.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 11, p. 3155-3163, 2007.

POLYAK, K.; HAVIV, I.; CAMPBELL, I. G. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. **Trends Genetics**, v. 25, p. 30-38, 2008.

PORTER D.; KROP, I. E.; NASSER, S.; SGROI, D.; KAELIN, C. M.; MARKS, J. R.; RIGGINS, G.; POLYAK, K. A SAGE (serial analysis of gene expression) view of breast tumor progression. **Cancer Res.**, v. 61, n. 15, p. 5697-56702, 2001.

PORTER D.; LAHTI-DOMENICI J.; KESHAVIAH A.; BAE, Y. K.; ARGANI, P.; MARKS, J.; RICHARDSON, A.; COOPER, A.; STRAUSBERG R.; RIGGINS, G. J.; SCHINITT, S.; GABRIELSON, E.; GELMAN, R.; POLYAK, K. Molecular markers in ductal carcinoma in situ of breast. **Mol. Cancer Res.**, v. 5, p. 362-375, 2003a.

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. USA**, v. 100, n. 19, p. 10931-10936, 2003b.

QUESNELLE; K. M.; BOEHM; A. L.; GRANDIS, J. R. STAT-mediated EGFR signaling in cancer. **J. Cell. Biochem.**, v. 102, 311-319, 2007.

REIG, S.; GARBE, B.; SAUER, H.; KALBACHER, H.; SCHITTEK, B. Dermicidin 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.

RÉVILLION, F.; LHOTELLIER, V.; HORNEZ, L.; BONNETERRE, J.; PEYRAT, J. P. ErbB/HER ligands in human breast cancer, and relationships with their receptors, the bio-pathological features and prognosis. **Ann. Oncol.**, v. 19, p. 73-80, 2008.

ROSEN, L. S. VEGF-targeted therapy: Therapeutic potential and recent advances. **Oncologist**, v. 10, p. 382-391, 2005.

ROUSE, J.; COHEN, P.; TRIGON, S.; MORANGE, M.; ALONSO-LIAMAZARES, A.; ZAMANILLO, D.; HUNT, T.; NEBRED, A. R. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. **Cell**, v. 23, p. 1027-1037, 1994.

SAEKI, Y.; ENDO, T.; IDE, K.; NAGASHIMA, T.; YUMOTO, N.; TOYODA, T.; SUZUKI, H.; HAVASHIZAKI, Y.; SAKAKI, Y.; OKADA-HATAKEYAMA, M. Ligand-specific sequential regulation of transcription factors for differentiation of MCF-7 cells. **BMC genomics**, v. 10, p. 545-561, 2009.

SASADA, R.; ONO, Y.; TANIYAMA, Y.; SHING, Y.; FOLKMAN, J.; IGARASHI, K. Cloning and expression of cDNA encoding human betacellulin, a new member of the EGF family. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 190, p. 1173-1179, 1993.

SCHNEIDER, M. E.; WOLF, E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. **J. Cell. Physiol.**, v. 218, p. 460-466, 2009.

SCHNEIDER, M. R.; WOLF, E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. **J. Cell Physiol.**, v. 218, n. 3, p. 460-466, 2009.

SCHITTEK, B.; HIPFER, R.; SAUER, B.; BAUER, J.; KALBACHER, H.; STEVANOVIC, S.; SCHIRLE, M.; BLIN, N.; MEIER, F.; RASSNER, G.; GARBE, C. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 12, p. 1133-1137, 2001.

SERGINA, N. V.; RAUSCH, M.; WANG, D.; BLAIR, J.; HANN, B.; SHOKAT, K. M.; MOASSER, M. M. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by kinase-inactive HER3. **Nature**, v. 445, p. 437-441, 2007.

SHEN, S.; QIU, F.; DAYRATHANA, T. K.; WU, J.; KUANG, M.; LI, S. S. C.; PENG, B.; NEI, J. Identification of dermcidin as a novel protein of Nck1 and characterization of its role in promoting cell migration. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1812, p. 703-710, 2011.

SHETH, S. S.; BODNAR, J. S.; GHAZALPOUR, A.; THIPPHAVONG, C. K.; TSUTSUMI, S.; TWARD, A. D.; DEMANT, P.; KODAMA, T.; ABURATANI, H.; LUSIS, A. J. Hepatocellular carcinoma in Txnip-deficient mice. **Oncogene**, v. 15, n. 25, p. 3528-3536, 2006.

STEWART, G. D.; LOWRIE, A. G.; RIDDICK, A. C.; FEARON, K. C.; ROSS, J. A. Dermcidin expression confers a survival advantage in prostate cancer cells subjected to oxidative stress or hypoxia. **Prostate**, v. 67, n. 12, p. 1308-1317, 2007.

STEWART, G. D.; SKIPWORTH, R. J.; ROSS, J. A.; FEARON, K. C.; BARACOS, V. E. The dermcidin gene in cancer: role in cachexia, carcinogenesis and tumor cell survival. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 11, n. 3, p. 208-213, 2008.

SWEENEY, C.; FAMBROGUGH, D.; HUARD, C.; DIAMONTI, J.; LANDER, E. S.; CANTLEY, L. C.; CARRAWAY III, K. L. Growth factor-specific signaling pathway stimulation and gene expression mediated by ErbB receptors. **J. Cell Biochem.**, v. 276, p. 22685-22698, 2001.

SUNDEVALL, M.; ILJIN, K.; KILPINEN, S.; SARA, H.; KALLIONIEMI, O.; ELENIOUS, K. Role of ErbB4 in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol.* **Neoplasia**, v. 13, p. 259-268, 2008.

TADA, H.; SASADA, R.; KAWAGUCHI, Y.; KOJIMA, I.; GULLICK, W. J.; SALOMON, D. S.; IGARASHI, K.; SENO, M.; YAMADA, H. Processing and juxtacrine activity of membrane-anchored betacellulin. **J. Cell Biochem.**, v. 72, p. 423-434, 1999.

-
- TALMADEG, J. E.; TRIBBLE, H. R.; PENNINGTON, R. W.; PHILLIPS, H.; WILTROULT, T. H. Immunomodulatory and immunotherapeutic properties of recombinant gamma-interferon and recombinant tumor necrosis factor in mice. **Cancer Res.**, v. 17, 2563-2570, 1987.
- TODOROV, P. T.; CARIUK, P.; MCDEVIT, T.; COLES, B.; FEARON, K.; TISDALE M. J. Characterization of cancer cachectic factor. **Nature**, v. 379, p. 739-742, 1996.
- TODOROV, P. T.; 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.; WYKE, S. M.; TISDALE, M. J. Identification and characterization of a membrane receptor for proteolysis-inducing factor on skeletal muscle. **Cancer Res.**, v. 38, p. 46-53, 2007.
- TROMPA, P.; SZÁSZ, C.; BUDAY, L. Structural disorder throws new light on moonlighting. **Trends Biochem. Sci.**, v. 30, n, 9, p. 484-4489, 2005.
- TSIGOS, C.; PAPANICOLAOU, D. A.; KYROU, I.; RAPTIS, S. A.; CHROUSOS, G. P. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on the pituitary-testicular axis. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 19, p. 1276-1276, 1999.
- UTSUNOMIYA, I.; ITO, M.; WATANEBE, K.; TSURUFUJI, S.; MATSUSHIMA, K. OH, S. Infiltration of neutrophils by intrapleural injection of tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-8 in rats, and its modification by actinomycin D. **Br. J. Pharmacol.**, v, 117, p. 611-614, 1996.
- 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 Microbol.**, 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.
- WANG, J.; WANG, N.; XIE, J.; WALTON, S. C.; McKOWN, R. L.; RAAB, R. W.; MA, P.; BECK, S. L.; CAFFAMAN, G. L.; HUSSAINI, I. M.; LAURIE, G. W. Restricted epithelial proliferation by lacritin via PKC α -dependent NFAT and mTOR pathways. **J. Cell Biochem.**, v. 174, p. 689-700, 2006.

-
- WATCHORN, T. M.; WADDELL, I. D.; DOWIDAR, N.; ROSS J. A. Proteolysis-inducing factor regulates hepatic gene expression via the transcription factors NFkB and STAT3. **FASEB J.**, v. 15, p. 562-564, 2001.
- WATCHORN, T. M.; DOWIDAR, N.; DEJONG, C. H.; WADDELL, I. D.; GARDEN, O. J.; ROSS J. A. The cachectic mediator proteolysis-inducing factor activates NF-kB and STAT3 in human kupffer cells and monocytes. **Int. J. Oncol.**, v. 27, p. 1105-1111, 2005.
- WIELAND, B. M.; STEWART, G. D.; SKIPWORTH, R. J.; SANGSTER, K.; FEARON, K. C.; ROSS, J. A.; REIMAN, T. J.; EASAW, J.; MOURTAZAKIS, M.; KUMAR, V.; PAK, B. J.; CALDER, K.; FILIPPATOS, G.; KREMASTINOS, D. T.; PALCIC, M.; BARACOS, V. E. Is there a human homologue to the murine proteolysis-inducing factor? **Clin. Cancer Res.**, v.13. n. 17, 4984-4992, 2007.
- WILLMARTH, N. E.; EITHIER, S. P. Amphiregulin as a novel target for breast cancer therapy. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, v. 13, 171-179, 2008.
- YAO, J.; WEREMOWICZ, S.; FENG, B.; GENTLEMAN, R. C.; MARKS, J. R.; GELMAN, R.; BRENNAN, POLYAK, K. Combined cDNA array comparative genomic hybridization and serial analysis of gene expression analysis of breast tumor progression. **Cancer Res.**, v. 66, n. 8, 4065-4078, 2006.
- YARDEN, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signaling mechanisms and therapeutic opportunities. **Eur. J. Cancer**, v. 37, p. S3-S8, 2001.
- YARDEN, Y.; SLIWKOWSKI, M. X. Untangling the ErbB signalling network. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 2, n. 2, p. 127-137, 2001.
- YOTSUMOTO, F.; YAGI, H.; SUZUKI, S. O.; OKI, E.; TSUJIOKA, H.; HACHISUGA, T.; SONODA, K.; KAWARABAYASHI, T.; MEKADA, E.; MIYAMOTO, S. Validation of HB-EGF and amphiregulin as targets for human cancer therapy. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 365, p. 555-561, 2008.
- YUSTE, L.; ESPARÍS-OGANDO, A.; SANTOS, E.; PANDIELLA, A. Overexpression of RasN17 fails to neutralize endogenous Ras in MCF7 breast cancer cells. **J. Biochem.**, v. 137, n. 6, p. 731-739, 2005.
- ZANG, L.; LAU, Y.; XIA, W.; HORTOGAGYI, G. N.; HUNG. Tyrosine kinase inhibitor emodin suppresses growth of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells in athymic mice and sensitizes these cells to the inhibitory effect of paclitaxel. **Clin. Cancer Res.**, v. 5, p.343-353, 1999.

Anexo I

Legenda detalhada das figuras 3 e 4.

Enzymes	G protein Adaptor/regulators	Generic classes	Localization	Mechanisms
<p> Generic Enzyme</p> <p>Kinase</p> <p> Generic kinase</p> <p> Protein kinase</p> <p> Lipid kinase</p> <p>Phosphatase</p> <p> Generic phosphatase</p> <p> Protein phosphatase</p> <p> Lipid phosphatase</p> <p>Phospholipase</p> <p> Generic phospholipase</p> <p>Protease</p> <p> Generic protease</p> <p> Metalloprotease</p> <p>GTPase</p> <p> G-alpha</p> <p> RAS - superfamily</p>	<p> G beta/gamma</p> <p> Regulators (GDI, GAP, GEF)</p> <p>Channels/ Transporters</p> <p> Generic channel</p> <p> Ligand-gated ion channel</p> <p> Voltage-gated ion channel</p> <p> Transporter</p> <p>Blocks</p> <p> Normal process</p> <p> Pathological process</p> <p>Link legend</p> <p> Positive effect</p> <p> Negative effect</p> <p> Unspecified effect</p> <p> Technical link</p> <p> Disrupts in disease</p> <p> Emerges in disease</p> <p> Enhances in disease</p> <p> Weakens in disease</p> <p> Organism specific interaction</p>	<p> Protein</p> <p> Generic binding protein</p> <p> Receptor ligand</p> <p> Cell membrane glycoprotein</p> <p> Transcription factor</p> <p> DNA</p> <p> RNA</p> <p> Compound</p> <p> Inorganic ion</p> <p> Predicted metabolite or user's structure</p> <p> Reaction</p> <p>Receptors</p> <p> Generic receptor</p> <p> GPCR</p> <p> Receptors with enzyme activity</p>	<p> Mitochondria</p> <p> EPR</p> <p> Golgi</p> <p> Nucleus</p> <p> Lysosome</p> <p> Peroxisome</p> <p> Cytoplasm</p> <p> Extracellular</p> <p>Comments</p> <p> Note</p> <p> Normal process</p> <p> Pathological process</p> <p> A complex or a group</p> <p> Organism specific object</p>	<p>Physical interactions</p> <p>B Binding</p> <p>C Cleavage</p> <p>CM Covalent modifications</p> <p>+P Phosphorylation</p> <p>-P Dephosphorylation</p> <p>T Transformation</p> <p>Th Transport</p> <p>Z Catalysis</p> <p>TR Transcription regulation</p> <p>M MicroRNA binding</p> <p>Functional interactions</p> <p>Cn Competition</p> <p>IE Influence on expression</p> <p>? Unspecified interactions</p> <p>PE Pharmacological effect</p> <p>TE Toxic effect</p> <p>Logical relations</p> <p>GR Group relation</p> <p>CS Complex subunit</p> <p>SR Similarity relation</p>

Path start

Anexo II



Genes up- and down-regulated by dermcidin in breast cancer: a microarray analysis

D.F. Moreira¹, B.E. Strauss², E. Vannier³ and J.E. Belizário¹

¹Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

²Laboratório de Genética Molecular e Cardiologia/LIM-13,

Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

³New England Medical Center, Tufts University, Boston, MA, USA

Corresponding author: J.E. Belizário

E-mail: jebeliza@usp.br

Genet. Mol. Res. 7 (3): 925-932 (2008)

Received June 2, 2008

Accepted August 11, 2008

Published September 30, 2008

ABSTRACT. Dermcidin (DCD) is a human gene mapped to chromosome 12q13 region, which is co-amplified with multiple oncogenes with a well-established role in the growth, survival and progression of breast cancers. Here, we present a summary of a DNA microarray-based study that identified the genes that are up- and down-regulated in a human MDA-361 pLKO control clone and three clones expressing short hairpin RNA against three different regions of DCD mRNA. A list of 235 genes was differentially expressed among independent clones (>3-fold change and $P < 0.005$). The gene expression of 208 was reduced and of 27 was increased in the three DCD-RNAi clones compared to pLKO control clone. The expression of 77 genes (37%) encoding for enzymes involved in amino acid metabolism, glucose metabolism and oxidoreductase activity and several genes required for cell survival and DNA repair were decreased. The expression of EGFR/ErbB-1 gene, an important predictor of outcome in breast cancer, was reduced together with the genes for betacellulin and amphiregulin, two known ligands of EGFR/ErbB