

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

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.

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 cáinico, 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

DCD sem glicosilação. Tais dados levantaram a questão se o gene DCD é realmente capaz de codificar o PIF em humanos (MONITTO et al., 2004). Atualmente, esses dados que correlacionam a presença da glicoproteína PIF com caquexia neoplásica em humanos estão sendo alvos de muito questionamento (JATOI et al., 2006; WIELAND et al., 2007; STEWART et al., 2008).

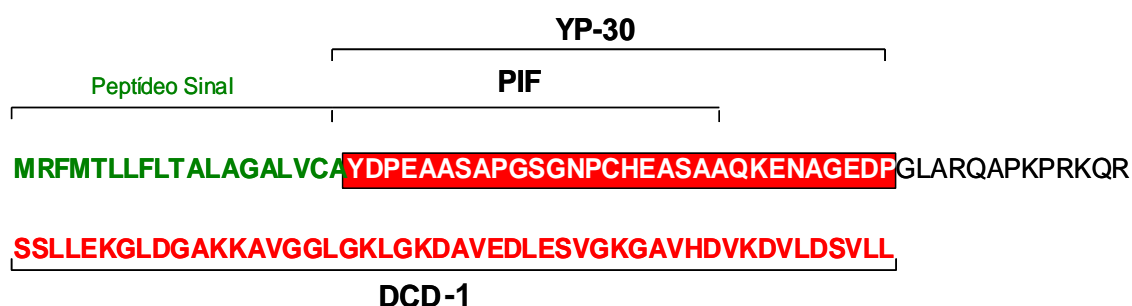


Ilustração 1 – Sequência de aminoácidos da proteína DCD. Em destaque estão as sequências de aminoácidos que dão origem aos diferentes peptídeos resultantes do processamento proteolítico e nomeados de acordo com suas atividades biológicas. PIF – *Proteolysis-Inducing Factor*; Y-P30 ou *Survival Peptide Y*; DCD-1 – peptídeo antibiótico *Dermcidin-1*.

Recentemente, Motoyama et al. (2007) reportaram que a proteína DCD pode exercer a função de protease clivando vários substratos sintéticos e a metalo-proteínase de matriz MMP-9. Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar esta possível função da proteína.

Além de todas essas atividades biológicas descritas até aqui, as que mais nos chamam a atenção são a capacidade de estimular à proliferação e a sobrevivência de células tumorais, que serão descritas em detalhes a seguir.

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- α), 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).

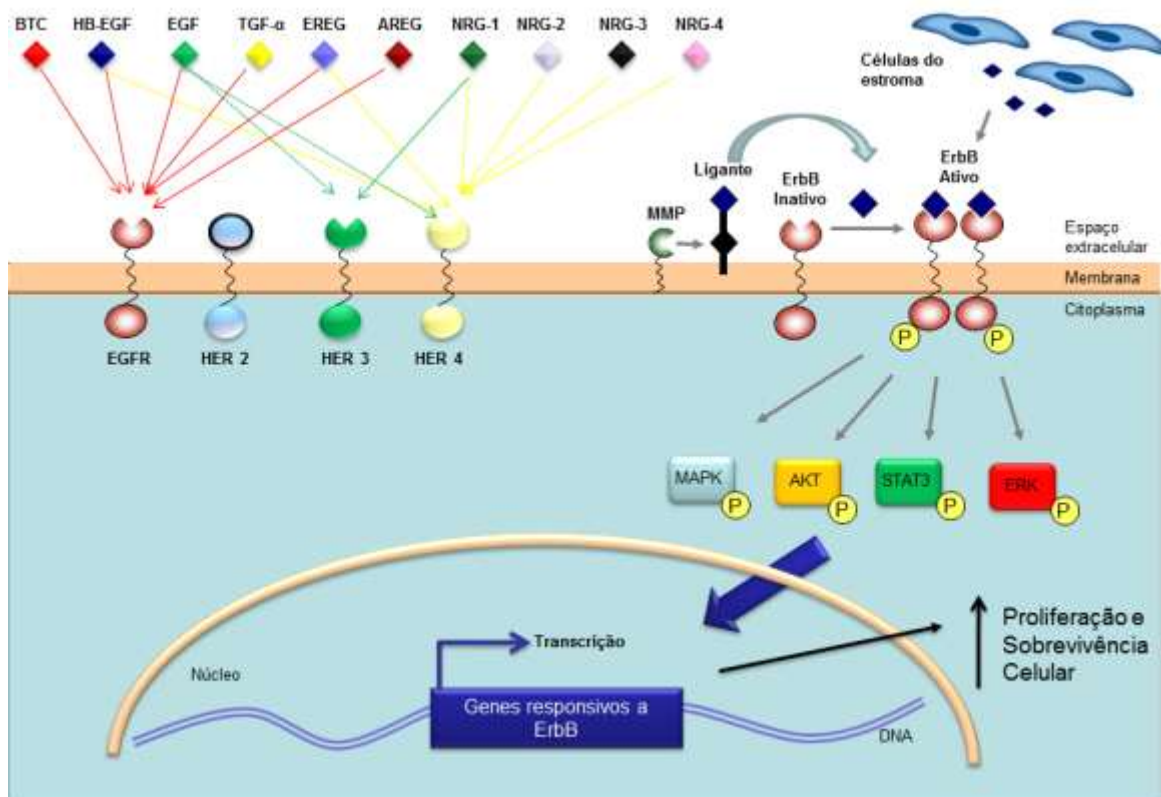


Ilustração 2 – Via de sinalização EGF/ErbB. À esquerda, estão representados os receptores ErbBs e seus ligantes. As setas que saem dos ligantes mostram o receptor ao quais eles têm afinidade. À direita, está representada, de forma extremamente simplificada, a ativação da via EGF/ErbB. Os ligantes são 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).

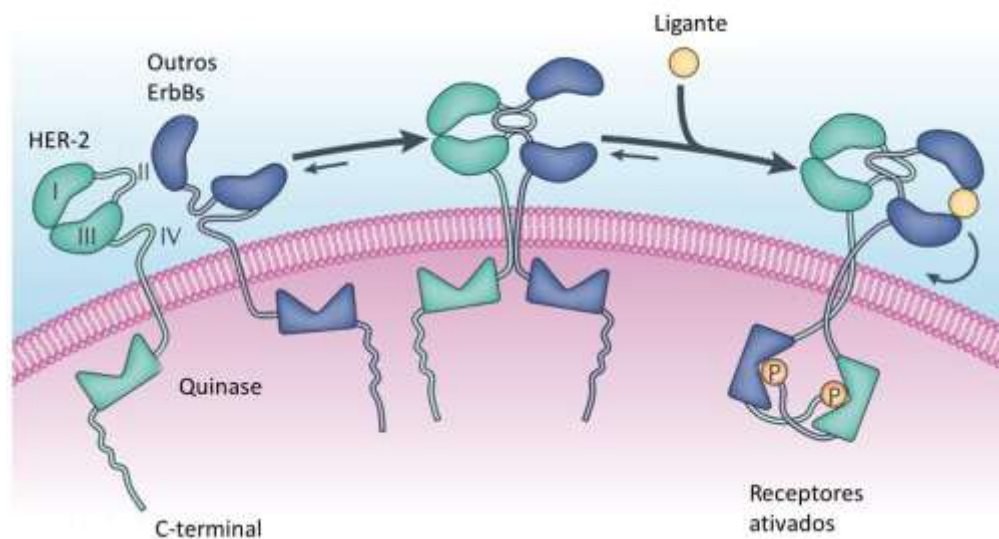


Ilustração 3 - Estrutura básica dos receptores ErbBs, dimerização e ativação. A ilustração acima retrata o estado de equilíbrio entre os monômeros e dímeros dos receptores HER-2 e os outros membros da família. O receptor HER-2 possui os domínios I e III unidos, o que não permite a entrada de um ligante. 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.

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.

CARMELIET, 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.

HANAHAN, 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 capase 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.; NEBREDA, 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.