



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE CÉLULAS DE CARCINOMA
MAMÁRIO HUMANO T47D APÓS TRANSDUÇÃO COM
ANTI-SENSE PARA A PROTEÍNA CARREADORA DE
CÁLCIO S100P**

BETTINA BEISSEL

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientadora:
Dra. Maria Helena Bellini

**São Paulo
2005**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Avaliação funcional de células de carcinoma mamário humano T47D após transdução com Anti-sense para a proteína carreadora de cálcio S100P

Bettina Beissel



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientadora:

Dra. Maria Helena Bellini

São Paulo

2005

Prece de São Francisco de Assis

Ó Senhor!

Faze de mim um instrumento da Tua Paz:

Onde há ódio, faze que eu leve o Amor;

Onde há ofensa, que eu leve o Perdão;

Onde há discórdia, que eu leve a União;

Onde há dúvidas, que leve a Fé;

Onde há erros, que eu leve a Verdade;

Onde há desespero, que eu leve a
Esperança;

Onde há tristeza, que eu leve a alegria;

Onde há trevas, que eu leve a luz.

Ó mestre! Faze que eu procure menos

Ser consolado, do que consolar;

Ser compreendido, do que compreender;

Ser amado, do que amar...

Pois:

É dando, que se recebe.

É perdoando, que se é perdoado.

É morrendo, que se vive para a vida eterna.

Tradução de Manuel Bandeira

Dedico este trabalho ao Luiz Paulo, por toda paciência, amor e compreensão e aos nossos mais preciosos tesouros: Sofia e Mathias...

e à minha Mãe, que sempre acreditou
nos meus sonhos!

Agradecimentos

Gostaria de agradecer imensamente a todos aqueles que participaram da elaboração deste trabalho, direta ou indiretamente, possibilitando assim que ele pudesse ser concluído. Foram muitas pessoas especiais com as quais convivi e aprendi muito.

À Dra. Maria Helena Bellini, doutora pela UNIFESP e pesquisadora do IPEN que me orientou neste trabalho, dividindo seu conhecimento e dando-me a oportunidade de conhecer o mundo da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva, docente do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM) por ter aberto as portas de seu laboratório e me acolhido sempre pronto para ensinar e colaborar.

Ao Prof. Dr. Nestor Schor, Professor Titular da disciplina de Nefrologia da UNIFESP-EPM e Pró-Reitor de Pós-Graduação e Pesquisa da UNIFESP-EPM, que possibilitou a realização de vários experimentos ao permitir que utilizasse seu laboratório.

Ao Dr. João Bosco Pesqueiro, do Departamento de Biofísica da UNIFESP – EPM, por ter possibilitado a realização da parte de biologia celular, permitindo que utilizasse o seu laboratório.

À Dra. Regina Affonso pelo apoio imensurável, pelo incentivo e principalmente pela amizade sincera.

Ao IPEN e ao CNPq pela concessão de recursos financeiros.

À Naiara, Cristina, Aldrey, Fabíola, Tatiana, Márcio, Paulo, Ana Maria, e todas as pessoas felizes e amigas do laboratório. de Ginecologia Molecular da UNIFESP-EPM.

Ao Alberto, à Regiane, ao Marcelo, aos técnicos do laboratório e a todos os demais que fazem ou fizeram parte do grupo do Dr. João Bosco pelo grande apoio e ensinamentos.

À Dra. Maria Mitzie Brentani Docente do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por ter-nos cedido as células T47D e à toda sua equipe que sempre esteve disposta a nos auxiliar em nossas dúvidas em relação à cultura celular.

Às amigas Enia Coutinho e Michelly França Piccoli pelo apoio e amizade.

Ao Dr. Vicente de Paulo Castro Teixeira, Doutor em medicina, da disciplina de Nefrologia da UNIFESP-EPM pelo apoio constante.

Ao Dr. Esper Georges Kallás e grupo do Laboratório de Imunologia da UNIFESP- EPM pelo uso do citômetro de fluxo e à Dra. Maria Aparecida Dalboni do laboratório de Nefrologia pelo ensinamento da técnica de citometria.

À Dra. Soraya Soubhi Smaili docente do Departamento de Farmacologia, setor de Modo de Ação de Drogas pelo uso do microscópio confocal assim como às técnicas do aparelho.

À Dra. Olga Zazuko do IPEN pelo uso da sala de cultura e eterna simpatia.

À Dra. Mônica Mathor do IPEN e grupo por ter cedido material e pelo apoio constante.

E a todo o grupo do laboratório de Nefrologia que me acolheu e me ajudou muito, principalmente ao Marcos Antonio Cenedize pelo apoio enorme no que se refere ao uso do PCR em tempo real.

Avaliação funcional de células de carcinoma mamário humano T47D após transdução com Anti-sense para a proteína carreadora de cálcio S100P

Bettina Beissel

RESUMO

A proteína S100P é um membro da família carreadora de cálcio S100 e foi isolada, primeiramente, de placenta humana por Emoto e cols., em 1992. Vários estudos apresentaram fortes indícios sobre o seu envolvimento em processos neoplásicos, porém ainda não se conhece sua real função biológica. No tecido mamário, a S100P foi detectada em carcinomas invasivos de células ductais. Sua presença em altas concentrações nestas células foi considerada um forte indicativo de progressão tumoral *in vivo*, e acredita-se que ela tenha um importante papel na imortalização de células epiteliais mamárias *in vitro*. Neste trabalho descrevemos a construção do vetor retroviral pLXSN com o gene da proteína S100P em sentido anti-sense, a transdução deste gene para células de carcinoma mamário T47D e o estudo destas células após a transdução. Para este estudo, utilizamos primeiramente a técnica de PCR em tempo real para a quantificação da expressão gênica. Os resultados demonstraram uma redução de 63% da expressão dos clones T47DS100P-A/S em relação à expressão dos clones T47DLXSN controle. Realizamos então, ensaio de imunofluorescência em Microscópio confocal para avaliar a técnica anti-sense em relação à expressão protéica. Nas imagens notamos uma marcação do anticorpo da proteína S100P bem menos pronunciada nas células T47DS100P-A/S em relação às células controle. Encerramos o trabalho com ensaios de citometria de fluxo para avaliar uma eventual alteração no ciclo celular. Os resultados mostraram que o grupo controle apresentou uma média de 34,04% das células na fase S do ciclo celular enquanto que o grupo das células transduzidas apresentou uma média de 26,40% na mesma fase. Houve, portanto uma redução de 23% de células na fase S entre o grupo de células controle e das que receberam o vetor retroviral com anti-sense. Estes resultados demonstraram que a técnica de anti-sense foi eficiente para diminuir a expressão gênica e protéica da proteína carreadora de cálcio S100P em células T47D, confirmando ser esta uma interessante ferramenta nos estudos de expressão gênica, além de sugerir a continuidade dos estudos com estes clones em ensaios *in vivo*.

Avaliação funcional de células de carcinoma mamário humano T47D após transdução com Anti-sense para a proteína carreadora de cálcio S100P

Bettina Beissel

RESUMO

A proteína S100P é um membro da família carreadora de cálcio S100 e foi isolada, primeiramente, de placenta humana por Emoto e cols., em 1992. Vários estudos apresentaram fortes indícios sobre o seu envolvimento em processos neoplásicos, porém ainda não se conhece sua real função biológica. No tecido mamário, a S100P foi detectada em carcinomas invasivos de células ductais. Sua presença em altas concentrações nestas células foi considerada um forte indicativo de progressão tumoral *in vivo*, e acredita-se que ela tenha um importante papel na imortalização de células epiteliais mamárias *in vitro*. Neste trabalho descrevemos a construção do vetor retroviral pLXSN com o gene da proteína S100P em sentido anti-sense, a transdução deste gene para células de carcinoma mamário T47D e o estudo destas células após a transdução. Para este estudo, utilizamos primeiramente a técnica de PCR em tempo real para a quantificação da expressão gênica. Os resultados demonstraram uma redução de 63% da expressão dos clones T47DS100P-A/S em relação à expressão dos clones T47DLXSN controle. Realizamos então, ensaio de imunofluorescência em Microscópio confocal para avaliar a técnica anti-sense em relação à expressão protéica. Nas imagens notamos uma marcação do anticorpo da proteína S100P bem menos pronunciada nas células T47DS100P-A/S em relação às células controle. Encerramos o trabalho com ensaios de citometria de fluxo para avaliar uma eventual alteração no ciclo celular. Os resultados mostraram que o grupo controle apresentou uma média de 34,04% das células na fase S do ciclo celular enquanto que o grupo das células transduzidas apresentou uma média de 26,40% na mesma fase. Houve, portanto uma redução de 23% de células na fase S entre o grupo de células controle e das que receberam o vetor retroviral com anti-sense. Estes resultados demonstraram que a técnica de anti-sense foi eficiente para diminuir a expressão gênica e protéica da proteína carreadora de cálcio S100P em células T47D, confirmando ser esta uma interessante ferramenta nos estudos de expressão gênica, além de sugerir a continuidade dos estudos com estes clones em ensaios *in vivo*.

Functional evaluation of human breast cancer cell line T47D after anti-sense transduction with S100P calcium-binding protein.

Bettina Beissel

ABSTRACT

S100P is a member of the S100 EF-hand calcium binding protein family and was first purified from human placenta by Emoto and colleagues (1992). There is considerable evidence that S100P is involved in neoplastic processes, but the real function and effect of this molecule are still unknown. In breast tissue, S100P has been detected in ductal invasive carcinoma. Its presence in high concentration in these cells was considered a strong indication of tumor progression *in vivo* and it is believed that S100P might play an important role in the immortalisation of human breast epithelial cells *in vitro*. In this study we describe the construction of the retroviral vector pLXSN with the S100P gene in antisense orientation, the introduction of this gene into T47D cells and the study of this cells after transduction. First we used the real time PCR technique to quantify the gene expression. The results show a reduction of 63% of expression within the T47DS100P-A/S infected population compared with control T47DLXSN clones. To determine the impact of the S100P antisense technique on protein expression in T47D cells, we performed immunofluorescence staining and analysed the resulting images using a confocal microscope. The images showed much less pronounced antibody marking of the S100P protein in the T47DS100P-A/S cells compared with control cells. To evaluate whether the antisense approach could cause any alteration in the cell cycle, we finished the study with flow cytometric analysis of the cell distribution. This cell cycle analysis confirmed a reduction of 23% in the S-phase fraction of the T47DS100P-A/S cell group compared with control group. These results show that the antisense methodology was efficient in decreasing expression of the S100P gene and protein levels in T47D cells *in vitro* and suggest that these clones should be used for *in vivo* studies.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Carreadores de Cálcio.....	1
1.2 Família S100	2
1.3 S100P.....	8
1.4 Câncer de mama.....	11
1.5 Técnica anti-sense	13
2. OBJETIVOS DO TRABALHO.....	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 MATERIAIS	17
3.1.1 Equipamentos e acessórios principais	17
3.1.2 Principais reagentes.....	19
3.1.3 Principais reagentes utilizados para biologia molecular	20
3.1.4 Principais reagentes para cultura celular.....	21
3.1.5 Oligonucleotídeos.....	21
3.1.6 Vetor Retroviral	22
3.1.7 Linhagens celulares.....	24
3.1.7.1 Fibroblastos NIH-3T3.....	24
3.1.7.2 Fibroblastos GP+E86.....	24
3.1.7.3 Fibroblastos GP+env+Am12	24
3.1.7.4 Células T47D	24
3.2 MÉTODOS	25
3.2.1 Construção do vetor retroviral	25
3.2.1.1 Obtenção do cDNA da S100P.....	25
3.2.1.2 Seqüenciamento da S100P	25
3.2.1.3 Construção de Oligonucleotídeos	26
3.2.1.4 Amplificação do cDNA da S100P pelo método de PCR.....	27
3.2.1.5 Extração do Produto de PCR.....	27
3.2.1.6 Preparação do vetor pLXSN	28

3.2.1.7	Ligação da S100P ao vetor retroviral pLXSN.....	28
3.2.2	Transformação em bactérias competentes DH5 α	28
3.2.3	Amplificação dos plasmídeos	29
3.2.4	Extração e purificação dos plasmídeos LS100PSN – Mini Prep	29
3.2.5	Análise de Restrição.....	30
3.2.6	Preparação das células de empacotamento	30
3.2.7	Transfecção transiente em células GP+E86 com cloreto de cálcio	30
3.2.8	Infecção permanente.....	31
3.2.9	Titulação.....	32
3.2.10	Cultura de células de carcinoma mamário T47D.....	34
3.2.11	Infecção das células T47D	34
3.2.12	Extração de RNA das células T47D	35
3.2.13	Análise da pureza do RNA por eletroforese	35
3.2.14	Obtenção de cDNA pelo método de transcrição reversa.....	36
3.2.15	Reação de polimerização em cadeia em tempo real (PCR em tempo real).....	37
3.2.16	Ensaio de Imunofluorescência em Microscopia Confocal	38
3.2.17	Ensaio de Citometria de Fluxo	39
4	Resultados	40
4.1	Seqüenciamento.....	40
4.2	Obtenção do cDNA da S100P.....	41
4.2.1	Amplificação pela técnica de PCR	41
4.2.2	Preparação do cDNA da S100P para o vetor pLXSN	41
4.3	Preparação do vetor pLXSN.....	42
4.4	Ligação do cDNA da proteína S100P ao vetor retroviral pLXSN.....	43
4.5	Análise de restrição	44
4.6	Preparação das células de empacotamento Fibroblastos GP+E86	45
4.6.1	Transfecção Transiente e Infecção permanente	45
4.7	Título viral apresentado pelas células anfotróficas para os clones Am12LS100PSN–anti-sense.....	46
4.8	Cultura de células de carcinoma ductal mamário T47D	48
4.9	Infecção das células de carcinoma mamário T47D.....	48
4.10	Obtenção de RNA	50
4.10.1	Extração de RNA dos clones T47DLS100PSN-A/S e T47DLXSN.....	50

4.10.2 Eletroforese para avaliar a qualidade do RNA	51
4.11 Amplificação e quantificação do cDNA.....	52
4.11.1 Reação em cadeia da Polimerase em tempo real	52
4.11.2 Gel de agarose para confirmação do produto de PCR em tempo real	56
4.12 Microscopia confocal.....	57
4.13 Ensaio de citometria de fluxo	59
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÕES	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 4.1 Título viral apresentado pelas células anfotróficas Am12LS100PSN- Anti-sense	47
Tabela 4.2 Título viral apresentado pelas células anfotróficas Am12LXSN.....	47
Tabela 4.3 Rendimento da extração de RNA total de células T47D após o processo de extração com trizol.	51
Tabela 4.4 Relação de expressão adquirida a partir das médias dos CT's.....	55
Tabela 4.5 Distribuição das células no ciclo celular, valores estão expressos em porcentagem e correspondem à média e erro padrão dos resultados de 4 ensaios em duplicata.....	61

Lista de Figuras

	Página
Figura 1.1 Representação esquemática da estrutura secundária da proteína S100, que apresenta os dois domínios EF de ligação ao cálcio (Donato, 2001).	3
Figura 1.2 Desenho da mão EF	3
Figura 1.3 Representação esquemática do rearranjo de um dímero de proteína S100 após a ligação ao íon cálcio.	5
Figura 1.4 Representação esquemática das vias de ação intra e extracelulares das proteínas S100 (Marenholz I. e cols., 2004).....	6
Figura 1.5 Esquema da técnica de anti-sense	14
Figura 3.1 Vetor retroviral pLXSN com seus elementos principais:	23
Figura 3.2 Esquema da Transfecção transiente em linhagem ecotrófica	32
Figura 3.3 Esquema da titulação em células NIH-3T3.....	33
Figura 4.1 Esquema da amplificação por PCR	41
Figura 4.2 Gel de agarose 1%, com a representação do fragmento do cDNA da S100P, utilizado para a construção do vetor LS100PSN.....	42
Figura 4.3 Gel de agarose 1%, com a representação do fragmento do vetor pLXSN, utilizado para a construção do vetor LS100PSN.	42
Figura 4.4 Esquema da construção do vetor LS100PSN-anti-sense.....	43
Figura 4.5 Desenho da análise de restrição com a enzima SacI	44
Figura 4.6 Gel de agarose 1%	45
Figura 4.7 Clone Am12LS100PSN-anti-sense-6 corado com Rodamina B	46
Figura 4.8 Célula T47D em cultura.	48
Figura 4.9 Célula T47D infectada com o Clone Am12LS100PSN anti-sense/4, 7 dias após o início da seleção com G418	49
Figura 4.10 Células T47D sem vetor LXSN, após 7 dias de seleção com o antibiótico G-418.....	50
Figura 4.11 Gel de agarose com MOPS apresentando as subunidades ribossomais 28S e 18S	51
e demonstrando a integridade e a excelente qualidade do RNA extraído	51

Figura 4.12 Gráfico obtido em um dos ensaios de PCR em tempo real apresentando o padrão de expressão da ciclofilina A em todos os clones.....	53
Figura 4.13 Gráfico obtido em um dos ensaios de PCR em tempo real apresentando o padrão de expressão da S100P.em todas as amostras em triplicata.....	53
Figura 4.14 Gráfico obtido em um dos ensaios de PCR em tempo real apresentando o padrão de expressão das células T47D-LXSN para o gene endógeno e para o gene da S100P.	54
Figura 4.15 Gráfico de PCR em tempo real apresentando a expressão do Clone T47DLS100PSN-A/S 4.....	54
Figura 4.16 Gráfico demonstrando a relação de expressão obtida em PCR em tempo real.	56
Figura 4.17 Gel de agarose 1,5% com produto do PCR em tempo real.	57
Figura 4.19 Gráfico gerado pelo programa ModFit com a representação das fases do ciclo celular	60
Figura 4.20 Gráfico gerado pelo programa ModFit com a representação das fases do ciclo celular do clone T47DLS100PSN-A/S 4 de acordo com a quantidade de DNA marcado.	60
Figura 4.21 Histograma demonstrando a distribuição de fases de ciclo celular das células T47D-LXSN e do clone T47D-LXSN-A/S 4. Resultados expressos como média \pm EP	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carreadores de Cálcio

Uma das mais difundidas vias de sinalização intracelular está baseada no uso de segundos mensageiros, assim como o cálcio, que é um segundo mensageiro extremamente comum e versátil e que controla uma grande variedade de processos celulares.

Desde o início da vida, este íon está envolvido em processos vitais, como mediador da fertilização e regulador de alguns dos processos do ciclo celular da fase embrionária. Já como segundo mensageiro, age na transdução de estímulos extracelulares em respostas intracelulares (Kirby e cols., 1992; Muller, A e cols., 1999). Uma propriedade que o torna um mensageiro intracelular altamente adequado é o fato de se ligar firmemente às proteínas.

O Cálcio intracelular está envolvido no mecanismo de condução e transmissão de impulsos nervosos, contração muscular, motilidade celular, secreção, transcrição, apoptose, diferenciação, expressão gênica, e necrose entre outros (Berridge, 1997; Donato, 2001). Este íon tem portanto um importante papel na regulação do crescimento e diferenciação das células eucariotas, e um desequilíbrio em sua homeostasia pode levar a uma série de processos patológicos, como cardiomiopatias, hipertensão e inclusive contribuir na formação tumoral (Heizmann e Braun, 1995).

O nível de cálcio intracelular deve ser mantido baixo porque os ésteres fosfato são muito abundantes e os fosfatos de cálcio são bastante insolúveis, para isto, todas as células têm sistemas de transporte para remoção de cálcio. O nível citossólico de cálcio em células não excitadas é de aproximadamente $0,1\mu\text{M}$, muitas vezes menor do que a concentração do meio extracelular.

Vários são os mecanismos que atuam na homeostasia do cálcio intracelular, e entre eles destacam-se as proteínas carreadoras de cálcio.

Estas proteínas são as peças chave na transdução da sinalização e interação do cálcio com seus diferentes alvos (Mandinova, A, e cols. 1998). Há um grande número de proteínas carreadoras de cálcio que atuam na sinalização intracelular e na manutenção da homeostasia do cálcio, porém a maior representante é a família de proteínas S100 (Mueller, A. e cols., 1999), parte importante deste estudo.

1.2 Família S100

Os primeiros membros descritos desta família foram as proteínas S100B e S100A1, isoladas de cérebro de bovinos e denominadas S100 por serem solúveis em uma solução 100% saturada de sulfato de amônia (Donato, 2001).

As proteínas carreadoras de cálcio da família S100 estão envolvidas na regulação de uma grande variedade de processos intracelulares e extracelulares. Entre estes processos estão o crescimento celular, a mobilidade celular, a regulação do ciclo celular, a transcrição e diferenciação, a regulação de atividades enzimáticas e a regulação da homeostasia do cálcio (Engelkamp e cols., 1992; Pedrocchi e cols., 1994; Donato, 2003). Essa regulação de diferentes processos celulares é devida à interação com diferentes proteínas alvo (Mueller, A. e cols., 1999) mas não apresentam ação enzimática conhecida (Zimmer e cols. 2003).

Geralmente, essas proteínas formam homodímeros ou heterodímeros, porém também já foram descritas formando hexâmeros (Moroz O.V. e cols., 2002). Todos os membros possuem um arranjo estrutural em comum, com duas regiões que apresentam diferentes afinidades pelo cálcio conhecidas por *EF-hand* ou mãos EF.

Atualmente, a partir da homologia das seqüências de aminoácidos e outras propriedades moleculares, mais de 20 proteínas são consideradas membros desta família, que está presente exclusivamente em vertebrados (Donato, 2001; Girolamo, P., 2003).

Dos mais de 20 genes humanos descritos até agora, 16 encontram-se agrupados no cromossomo 1q21. Sua estrutura gênica é altamente conservada, geralmente compreendendo três exons e dois introns. Elas possuem entre 22% e 57% de homologia na seqüência de aminoácidos e variam entre 79 e 114 aminoácidos (Marehnoz, I. e cols., 2004; Engelkamp, D. e cols. 1993). São proteínas de baixa massa molecular variando entre 9 e 13 kDa (Donato, 2003).

O que caracteriza esta família é sua estrutura altamente conservada formada por duas regiões que apresentam diferentes afinidades pelo cálcio conhecidas por *EF-hand* ou mãos EF. Cada região é formada por uma α hélice, uma alça de ligação ao cálcio e uma outra α hélice. Portanto, a maioria destas proteínas possui dois centros de ligação ao cálcio conforme pode ser visualizado na figura 1.1. Cada um dos centros é formado pelas hélices E e F dessa proteína, que são posicionadas como o dedo indicador e o polegar da mão direita, formando um ângulo de 90 graus (Fig. 1.2), daí a denominação mão EF. O centro de ligação ao cálcio é formado por uma alça entre essas hélices.

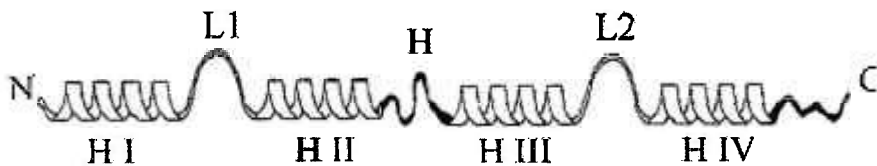


Figura 1.1 Representação esquemática da estrutura secundária da proteína S100, que apresenta os dois domínios EF de ligação ao cálcio (Donato, 2001).

L1 e L2:	centros de ligação ao cálcio
H:	alça de ligação dos dois domínios EF
H I, H III, H III e H IV:	α hélices
N:	região N terminal
C:	região C terminal

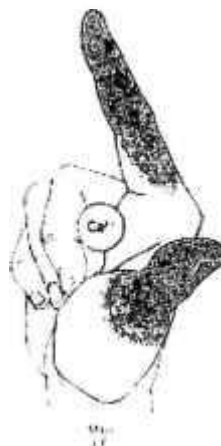


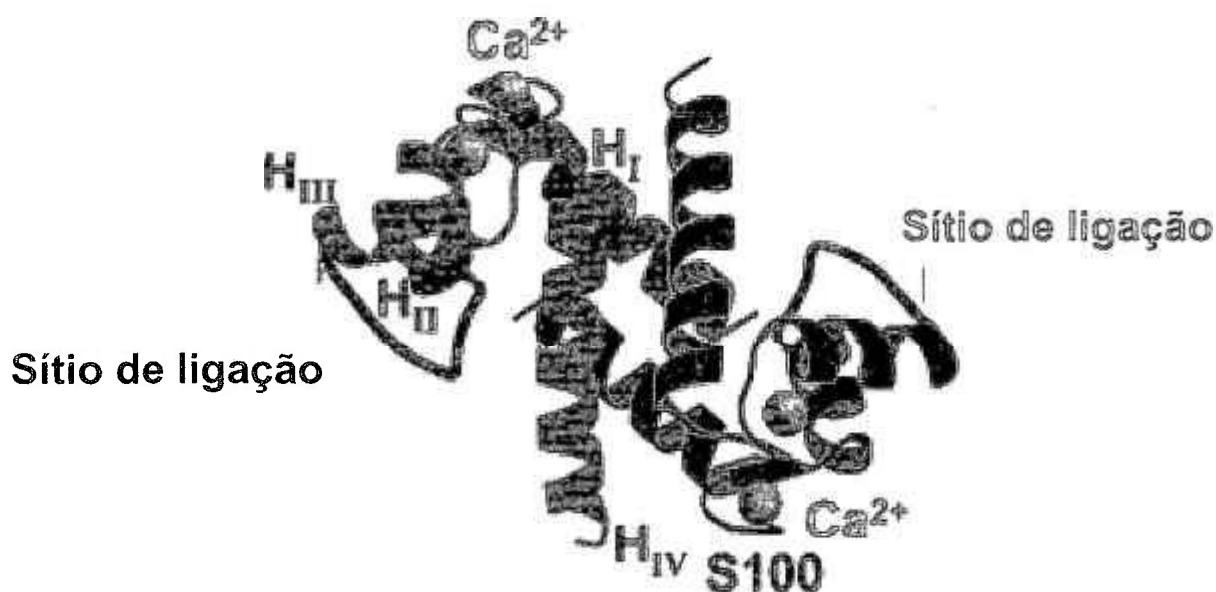
Figura 1.2 Desenho da mão EF

O modelo de interação entre as proteínas S100 e as proteínas alvo ou receptores de proteínas já foi exaustivamente proposto. Foi demonstrado para uma série de proteínas S100 que, ao se ligarem ao cálcio sua forma apo-inativa, sofre uma mudança conformacional que expõe importantes resíduos hidrofóbicos ao solvente. De acordo com o modelo atual, esse aumento hidrofóbico leva a uma mudança estrutural da superfície da proteína permitindo a interação com a proteína alvo (Gribenko, A. e cols. 1998; Girolamo, P., 2003; Zhang e cols., 2003).

Portanto, após a ligação ao Cálcio ocorre uma mudança conformacional, tratando-se normalmente de um rearranjo da hélice III (Marenholz, I. e cols., 2004) que expõem resíduos hidrofóbicos na região da dobradiça, responsável pela ligação da proteína S100 à proteína alvo (Fig. 1.3). Porém, o modo de interação com os diferentes alvos entre os distintos membros da família é bem variado (Marenholz, I. e cols., 2004).

Várias análises bioquímicas e estruturais demonstraram que as proteínas S100 formam dímeros e esta dimerização parece ser crucial para a interação da S100 ao cálcio (Koltzsch e Gerke, 2000). Apenas um membro da família ocorre na forma de monômero, trata-se de calbindin 3 (Marenholz, I. e cols., 2004).

Normalmente são isolados na forma de homodímeros, porém a diversidade de suas funções biológicas provavelmente aumenta pelas formações de heterodímeros com subunidades de outros membros da família S100 (Wang, G. e cols., 2004).



adaptado de Marenholz e cols. 2004

Figura 1.3 Representação esquemática do rearranjo de um dímero de proteína S100 após a ligação ao íon cálcio.

Em azul claro e azul escuro aparece um monômero com a região de ligação à proteína alvo em azul turquesa e o outro monômero aparece em tons de vermelho. O cálcio está representado em amarelo mostrando que cada subunidade de S100 possui dois sítios de ligação ao cálcio. Após a ligação ao cálcio, as S100 expõem resíduos hidrofóbicos, responsáveis pela ligação à proteína alvo.

A região carboxi-terminal tem alta afinidade pelo cálcio, aproximadamente 100 x superior (Donato, 2003) em relação à região amino-terminal que apresenta baixa afinidade ao cálcio (Heizmann e Braun, 1995; Schäfer e Heizmann, 1996).

A região C terminal contém a seqüência clássica, comum a todas as proteínas carreadoras de cálcio EF. Consiste em uma seqüência de 12 aminoácidos. Já na região N terminal há uma seqüência diferente da seqüência típica da EF, porém específica para os membros da subfamília S100, consistindo em uma seqüência composta por 14 aminoácidos (Schäfer e Heizmann, 1996; Marenholz, I. e cols., 2004).

Além de formarem homodímeros e heterodímeros alguns membros da família também formam estruturas multiméricas que parecem estar envolvidas com a ação extracelular destas proteínas. Algumas destas formações foram descritas com S100A12 (Moroz, O. V. e cols., 2002), S100A4 (Novitskaya, V. e cols., 2000) e S100B (Barger, S. W. e cols., 1992; Huttunen, H. E cols. 2000). Foi proposto que estas formações desencadeiam a ligação ao receptor RAGE (receptor for advanced glycation end product ou em português: receptor para o produto final glicosilado) que por sua vez ativa a cascata de sinalização intracelular (Fig. 1.4) (Marenholz, I. e cols. 2004).

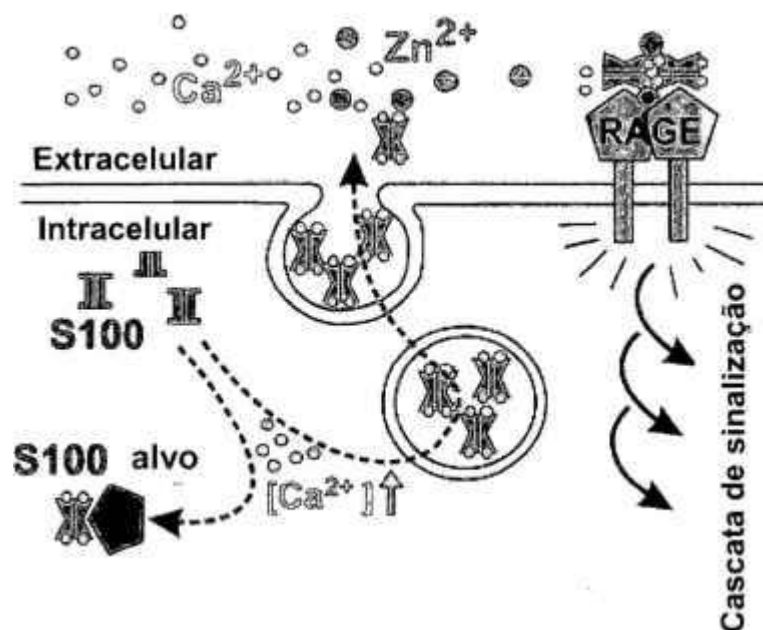


Figura 1.4 Representação esquemática das vias de ação intra e extracelulares das proteínas S100 (Marenholz I. e cols., 2004)

O mecanismo de sinalização intracelular ativado pelo RAGE ainda não está completamente elucidado, mas sabe-se que a ligação ao RAGE leva a estimulação de Erk, Jak/Stat e Rho e à ativação do fator de transcrição NF- κ B (Arumugam, T, e cols. 2004) e parece induzir a ativação de Cdc42/Rac e MAP Quinase (Hsieh, HL e cols. 2004). No caso de células cancerosas, a ativação do RAGE foi relacionada com a estimulação da proliferação, sobrevivência e motilidade celular (Arumugam, T. e cols, 2004).

A primeira interação de um membro da família S100 com este receptor foi relatada por Hoffmann e cols., em 1999, onde a ligação da S100A12 com o RAGE sugere estar envolvida em processos inflamatórios.

A maioria dos membros da família apresenta alta especificidade por diferentes tecidos, por exemplo, Calbindin3, por células intestinais; S100A8 e S100A9, células granulomatosas e monócitos; S100A2, tecido renal e pulmonar; S100A7, células epiteliais (Girolamo, P., 2003) e S100P, pelo tecido mamário.

Os componentes da família S100 apresentam diferentes padrões de expressão nos diversos tecidos humanos, tanto em condições normais como em patológicas (Gribenko, A.V. e Makhatadze, G.I, 1998). O interesse por essas proteínas vem crescendo nos últimos anos em decorrência da sua expressão diferenciada em tecidos neoplásicos, mesmo em estágios iniciais, e do seu envolvimento em processos metastáticos (Ilg, E.C. e cols., 1996; Gribenko, A.V, e Makhatadze, G.I, 1998; Heizmann, C. 2002).

Alterações nas expressões gênicas de membros da família S100 foram descritas em doenças como síndromes de Down e Alzheimer, inflamação crônica, fibrose cística, psoríase, epilepsia e cardiomiopatias (van Eldik e Griffin, 1994; Nacken W. e cols. 2003; Heizmann, C. 2002), bem como uma série de neoplasias do pâncreas, próstata (Cmogorac-Jurcevic, T. e cols. 2003; Amler, L.C. e cols. 2000; Iacobuzio-Donahue, C.A. e cols. 2002; Sato, N. e cols. 2004) e mama (Da Silva, I.D.C.G. e cols. 2000; Mackay, A. e cols. 2003; Emberley, E.D. e cols. 2004).

Já a S100A2, foi encontrada pouco expressa em células tumorais, sugerindo ser uma candidata para supressão gênica (Lee e cols., 1992). A S100A6 foi encontrada sendo super expressa em uma série de tecidos tumorais (Schäfer, B.W. e Heizmann, C.W. 1996) e a S100A4 está associada a uma baixa taxa de sobrevida em pacientes com câncer de mama além de induzir metástases em ratos (Rudland, P. e cols. 2000).

Como nos últimos anos têm-se descoberto vários processos patológicos relacionados a uma alteração da concentração de cálcio devido a alterações de expressão de seus carreadores, esses fatos têm aumentado muito o interesse científico em relação a essa classe de proteínas (Mandinova, A. e cols, 1998; Heizmann, C.W. e Braun, K. 95). A tabela 1.1 foi construída a partir de um trabalho de Schäfer e Heizmann (1996) que correlaciona diferentes membros da família S100 com diversas patologias.

Tabela 1.1 Correlação de alguns membros da família S100 com patologias.

Proteína	Patologias associadas
S100A1	Cardiomiopatias
S100A2	Câncer de mama
S100A3	Câncer
S100A4	Câncer de mama, Metástases
S100A5	Câncer
S100A6	Melanomas
S100A7	Câncer de Mama
S100A7L1/A15	Psoríase
S100A8	Fibrose cística e processo inflamatório
S100A9	Processos inflamatórios
S100A10	Câncer
S100B	Mal de Alzheimer e síndrome de Down
S100P	Câncer de mama, próstata, pâncreas

Anticorpos anti-S100 vêm sendo empregados em hospitais para classificação do tipo tumoral pela técnica de imunohistoquímica tanto em adultos como em crianças, incluindo tumores neuroendócrinos benignos como malignos, carcinoma de tireóide, melanoma e carcinoma renal sendo os principais alvos de estudo as S100A1 e S100B (Pedrocchi, M. e cols., 1994; Ilg, E.C. e cols., 1996).

Segundo Mueller, A. e cols., as proteínas S100 provavelmente têm um papel crucial na regulação da homeostasia do cálcio em células tumorais.

1.3 S100P

A S100P é uma proteína carreadora de cálcio, pertencente à família S100, originalmente isolada a partir de placenta humana (Emoto, Y. e cols., 1992). Possui 95 aminoácidos, massa molecular de 10,4 kDa, e é o único membro da família S100 cujo gene está localizado no cromossomo 4p16 (Becker, T. e cols., 1992).

Até pouco tempo, acreditava-se que se apresentava apenas na forma homodimérica, porém, Wang, G. e colaboradores, 2004, mostraram que a S100P

pode formar heterodímeros com a S100A1. A S100A1 é uma proteína de 93 aminoácidos e apresenta 50% de similaridade com a S100P. Ambas estão envolvidas em diferentes patologias humanas.

A estrutura molecular da S100P já foi minuciosamente descrita e a proteína foi cristalizada por Zhang e cols., em 2002, porém ainda não se conhece a real função da S100P. Existem várias especulações sobre seu mecanismo de ação dentro das células normais, bem como nas células tumorais. Vários são os estudos que levam a considerações muito fortes sobre a participação da S100P em processos neoplásicos. A expressão da S100P foi descrita em várias linhagens celulares de câncer (Arumugam, T. e cols, 2004).

Acredita-se que a S100P seja uma das moléculas envolvidas no controle do ciclo celular cujo desequilíbrio leva a célula a se tornar imortal. Outra especulação está relacionada com sua atuação em relação ao acúmulo de cálcio extracelular ou microcalcificações, o que por sua vez auxilia no diagnóstico clínico precoce do câncer de mama (Da Silva, I.e cols., 2000).

A expressão da S100P foi descrita em células epiteliais do esôfago em diferenciação, indicando que provavelmente participe normalmente desse processo (Sato,N. e Hitomi,J. 2002).

Foi observado também que a S100P pode interagir com a proteína do citoesqueleto ezrina de uma maneira dependente de cálcio, trata-se de uma ligação altamente específica, e com isso influenciar sua habilidade de se ligar à actina e os autores postularam haver uma possível ligação com o poder de metástase em células cancerosas (Koltzschher,M. e cols., 2003).

No tecido mamário, a S100P foi detectada em células de carcinoma ductal invasivo. A presença dessa proteína em altas concentrações, nas células neoplásicas mamárias, é um forte indicativo de progressão tumoral *in vivo*. Além disso, acredita-se que a S100P tenha um importante papel na imortalização de células epiteliais mamárias *in vitro* (Da Silva,I e cols., 2000). As proteínas carreadoras de cálcio S100 vêm despertando interesse por sua expressão diferenciada em tecidos neoplásicos, mesmo em estágios iniciais e por seu envolvimento em processos metastáticos (Ilg,E.C. e cols., 1996; Gribenko,A.V. e Makhatadze, G.I.,1998; Heizmann,C, 2002).

Há indícios de que a S100P participe também do processo carcinogênico da próstata humana onde tem sido associada ao carcinoma não

dependente de hormônio e ao processo metastático (Gribenko, A.V. e cols., 1998; Averboukh, L. e cols., 1996, Mousses, S. e cols., 2002; Amler, L.C. e cols., 2000; Diederichs, S., e cols. 2004). Sua expressão também foi detectada no epitélio pancreático no qual havia se formado um adenocarcinoma (Logsdon, C.D. e cols., 2003). Além disso, a expressão da S100P também foi relacionada com a diminuição da sobrevida de pacientes com câncer de pulmão (Beer, D.G. e cols., 2002).

Arumugam e cols., em 2004, observaram que a adição de S100P exógeno em células da linhagem de camundongos NIH-3T3 aumenta a proliferação celular e a sobrevivência das células após estímulos apoptóticos.

Comparando-se células tumorais com células normais adjacentes *in vivo*, Da Silva e cols., 2000, detectaram que o gene da S100P encontrava-se de 2 a 20 vezes mais expresso no tecido tumoral. O mesmo resultado foi obtido a partir de células de linfonodos de pacientes com diagnóstico positivo para carcinoma mamário intraductal invasivo, onde a S100P também aparecia 20 vezes mais aumentada (Da Silva, I.D.C.G e cols, 2000).

Em tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 2004, Ana P. T. Shor, demonstrou haver forte associação entre a S100P e o receptor de estrogênio na distinção do potencial de risco das lesões histológicas, confirmando o papel importante da S100P no processo de transformação maligna. Observando ainda que a ausência da proteína torna praticamente nula a possibilidade de progressão tumoral, e mais ainda que sua ação depende também do receptor de estrogênio.

No tecido mamário, a S100P foi detectada em situações que vão desde hiperplasia ductal atípica, até carcinoma *in situ* e carcinoma intraductal invasivo, porém não em tecido de mama normal, o que levou a crer que a S100P tem um papel importante no processo tumoral (Da Silva, I., e cols. 2000).

O papel funcional da S100P na imortalização e transformação de células epiteliais mamárias não está elucidado. Tudo indica que ela está envolvida em múltiplos processos biológicos, como, por exemplo, na ativação de enzimas envolvidas na progressão do ciclo celular. Por todos estes motivos e acreditando na importância desta proteína nos processos neoplásicos, principalmente relacionados ao câncer de mama, resolvemos estudar um pouco mais sobre esta proteína.

1.4 Câncer de mama

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), do Ministério da Saúde, o câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o primeiro entre as mulheres depois do câncer de pele não melanoma. A incidência por câncer de mama feminina apresentou um crescimento contínuo na última década, o que pode ser resultado de mudanças sócio-demográficas. Seu prognóstico é relativamente bom, se diagnosticado nos estádios iniciais. Estima-se que a sobrevida média geral cumulativa após cinco anos seja de 65% nos países desenvolvidos, e de 56% para os países em desenvolvimento.

Apesar de ser considerado um câncer relativamente de bom prognóstico, se diagnosticado e tratado nas fases iniciais, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é normalmente diagnosticada em estádios avançados. Com base nas informações disponíveis dos Registros Hospitalares do INCA, no período 2000/2001, 50% dos tumores de mama foram diagnosticados nos estádios III e IV o que diminui a sobrevida da paciente.

O número de casos novos de câncer de mama esperados para o Brasil em 2005 é de 49.470, com um risco estimado de 53 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2005).

Na região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres com um risco estimado de 73 casos novos por 100 mil.

Se considerarmos que as estimativas de casos novos de câncer de mama em 2003 eram de 41.610, já podemos notar um aumento de quase 16% em relação as estimativas de 2005, o que significa um dado muito preocupante.

Não existem medidas práticas específicas de prevenção primária do câncer de mama aplicável à população, embora estudos observacionais tenham sugerido que a prevenção do tabagismo, alcoolismo, obesidade e sedentarismo reduzam o risco de câncer de mama.

O que se sabe é que durante as diferentes fases da vida da mulher como crescimento, puberdade, gestação, lactação e regressão pós-menopausal a mama sofre várias mudanças em relação ao tamanho, forma e função (Russo, J. e cols. 2001) e essas mudanças poderiam levar a alguma forma de mutação ou ao desenvolvimento do câncer por diferentes motivos.

Foi postulado também que uma primeira gestação a termo em mulheres jovens exerce um efeito protetor em relação ao câncer de mama. Porém não está totalmente elucidada a relação do mecanismo reprodutivo em relação ao desencadeamento do câncer de mama ou com sua progressão (Russo, J, e cols. 2001).

O câncer de mama é uma doença extremamente heterogênea, com uma grande variabilidade clínica e histopatológica. Essa variabilidade reflete a sua etiologia complexa, que sofre a influência de vários fatores exógenos, assim como endógenos. Dentre os fatores que aumentam o risco encontramos a dieta, uso de contraceptivos orais, agentes virais, nuliparidade, idade da primeira gestação, duração do período reprodutivo, taxas hormonais e a predisposição genética. (Silva, R.L.A., 2001).

Além destes, destacamos alguns outros fatores de risco considerados importantes pela Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina em 2001:

- Risco pouco elevado
- Menarca precoce (≤ 12 anos)
- Menopausa tardia (≥ 55 anos)
- Primeira gestação a termo depois dos 34 anos
- Obesidade, dieta gordurosa e sedentarismo
- Terapia de reposição hormonal por mais de 5 anos
- Ingestão alcoólica excessiva

- Risco mediamente elevado
- Mãe ou irmã com câncer de mama na pós-menopausa
- Antecedentes de hiperplasia sem atipia ou macrocistos apócrinos

- Risco muito elevado
- Mãe ou irmã com câncer de mama na pré-menopausa
- Antecedentes de hiperplasia epitelial atípica ou neoplasia lobular in situ

- Suscetibilidade genética comprovada (mutação de BRCA1-2)

Com relação aos padrões histológicos dos cânceres de mama, cerca de 80% são carcinomas ductais e 10% são carcinomas lobulares; os 10% restantes apresentam características variadas, como o tipo medular e os tumores raros como os cistos-sarcoma filóide e os angiosarcomas. O carcinoma ductal *in situ* e o carcinoma lobular *in situ* estão associados a um maior risco de desenvolver câncer de mama invasivo (Nascimento, P. A., 2000).

1.5 Técnica anti-sense

A metodologia anti-sense é uma poderosa ferramenta, não só para o estudo da regulação e função gênica, mas, também, para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Hélène, C. e Toulmé, J.J. 1990).

O princípio da técnica de anti-sense é a regulação da expressão gênica de uma proteína alvo. Há algumas abordagens diferentes nesta técnica: uma delas tem o DNA como alvo, e o bloqueio da transcrição como objetivo, isso é conseguido pela formação de uma tripla hélice de DNA formada pela ligação de oligonucleotídeos sintéticos, a triple-hélice é formada pela ligação de uma adeni9na a duas timinas pela formação das pontes de hidrogênio, seguindo o modelo de pareamento de Watson e Crick. Outra abordagem tem o RNA mensageiro como alvo e o bloqueio da tradução como objetivo pela formação de uma dupla hélice de RNA (Hélène, C. e Toulmé, J.J. 1990).

Considerando-se o RNA mensageiro como alvo, há novamente duas abordagens distintas que podem ser utilizadas, uma delas utiliza um par de oligonucleotídeos sintéticos, formados por uma seqüência determinada do RNA mensageiro, estes oligonucleotídeos normalmente não passam de 20 pb. Outra é introduzindo-se a seqüência codificadora inteira em sentido invertido na célula alvo. Essa abordagem é conhecida como estratégia de *antisense gene* (Hélène, C. e Toulmé, J.J. 1990).

No nosso caso optamos pela segunda abordagem, onde realizamos a introdução da fita molde do DNA complementar do gene alvo no sentido invertido e espelhado na célula alvo, com a intenção de que esta se ligasse ao RNA

mensageiro formando uma dupla fita de RNA e resultando na inibição parcial da tradução pelos ribossomos.(Fig. 1.5).

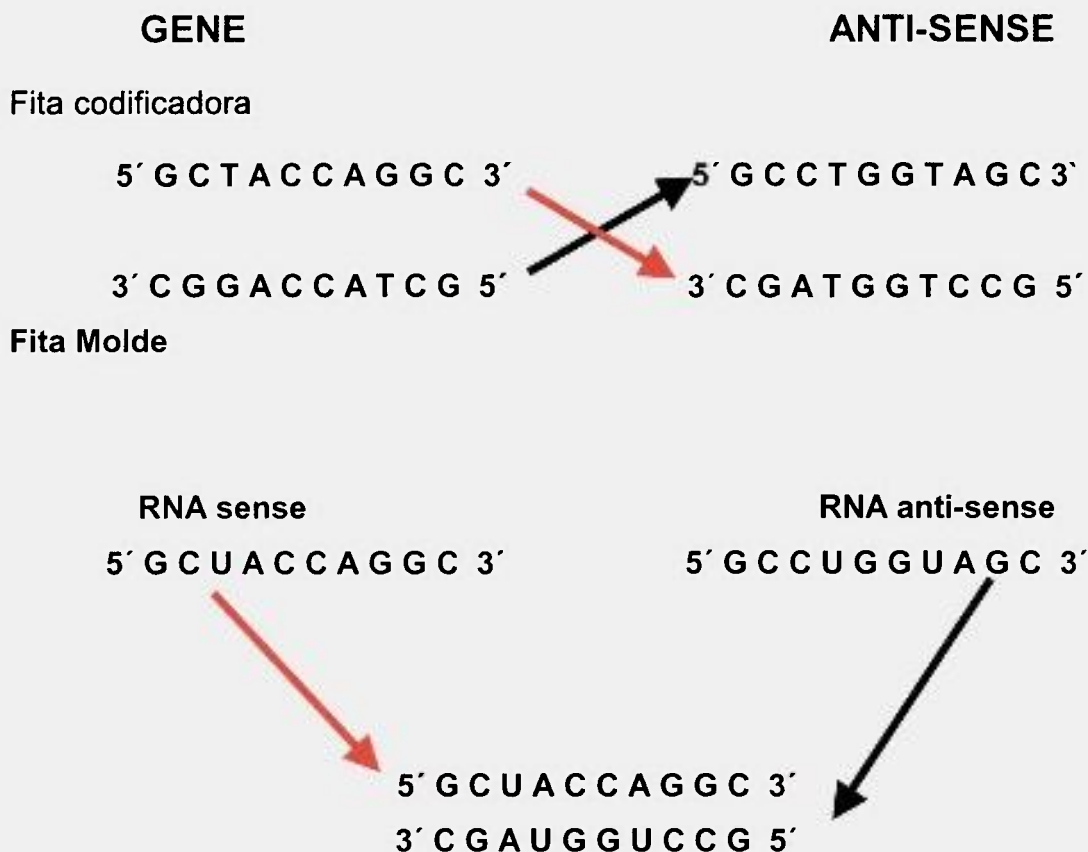


Figura 1.5 Esquema da técnica de anti-sense

A alta especificidade dessa ligação faz com que a técnica de anti-sense seja uma estratégia atrativa para modular seletivamente a expressão de genes envolvidos na patogênese de diversas doenças (Tamm,I. e cols., 2001).

Essa modulação pode-se dar por dois mecanismos distintos: competição com o mecanismo de tradução ou clivagem do RNA mensageiro (Hélène,C. e Toulmé,J.J. 1990). A degradação da dupla fita de RNA ocorre principalmente pela ativação da RnaseH. Este é provavelmente o mecanismo mais importante da técnica de anti-sense, a RnaseH corta a fita heteroduplex DNA-RNA, porém este mecanismo ainda não está totalmente elucidado (Olie,R.A. e Zangemeister-Wittke, 2001).

Para introduzir o gene no sentido anti-sense nas células alvo, utilizamos um vetor retroviral. O vetor pLXSN foi escolhido para a transferência gênica, pois esses vetores são altamente eficientes e integrativos (Miller, A.D. e cols., 1993). São vetores relativamente seguros, com risco mínimo de mutagênese e oncogênese. Os retrovírus recombinantes são produzidos pela introdução do vetor em linhagens de células especializadas, conhecidas como células de empacotamento viral (Markowitz, D. e cols., 1988a). As partículas recombinantes são anfotróficas, podendo infectar uma grande variedade de células de mamíferos. A proliferação celular é necessária para a infecção (transdução) e a eficiência de transdução das células alvo pode chegar a 100% em alguns sistemas (Mulligan, R.C. 1993).

Neste trabalho descrevemos a construção de um vetor retroviral com o gene da proteína carreadora de cálcio S100P em sentido anti-sense, a transfecção deste gene para células endoteliais humanas e a diminuição da expressão dessas células.

2 OBJETIVOS DO TRABALHO

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar uma eventual alteração na função de células de carcinoma ductal mamário humano T47D após transdução da proteína carreadora de cálcio S100P em sentido anti-sense, valendo-se da transferência gênica com vetor retroviral.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Equipamentos e acessórios principais

- Agitador-aquecedor, modelo 258, FANEM Ltda., São Paulo, SP, Brasil;
- Agitador de tubos (tipo vórtex), QUIMIS Ap. Científicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil;
- Aparelho de eletroforese Electrophoresis Power Supply – modelo 250, Life Technologies, Gibco BRL, EUA;
- Aparelho Milli-Q-plus, purificador de água – MILLIPORE, Bedford, MA, EUA;
- Autoclave vertical, modelo 415, FANEM Ltda., São Paulo, SP, Brasil;
- Balança Ohaus, modelo NCT 200, Ohaus Co. Florham Park, NJ, EUA;
- Banho-maria, modelo 100 – FANEM Ltda., São Paulo, SP, Brasil;
- Banho-maria, modelo Type 16500 Dri-Bath, Barnstead/Thermolyne; Dubugne, Iowa, EUA;
- Banho-maria, QUIMIS Ap. Científicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil;
- Centrífuga Marathon 8k, Fischer Scientific, EUA;
- Centrífuga refrigerada automática eppendorf Centrifuge 5810R, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha;
- Centrífuga refrigerada automática, MSE Micro Centaur – Sanyo, São Paulo, SP Brasil;

- Centrífuga refrigerada automática, Superspeed RC2-B, SORVALL, Newton, Connecticut, EUA;
- Citômetro de Fluxo modelo FACSCalibur, BD Biosciences, NJ, EUA;
- Espectrofotômetro, JEWA, 6.500 U.V.V, Inglaterra;
- Espectrofotômetro, modelo LKB Ultrospec III, Pharmacia Biotech, EUA;
- Estufa retilínea, FANEM Ltda., São Paulo, SP, Brasil;
- Estufa de cultura de células, Revco habitat, GS Laboratory Equipment, Asheville, NC, EUA;
- Fluxo laminar horizontal , classe II, modelo BBF – 4SS, Biological Safety Cabinet – Germfree Lab. Inc, Miami, EUA;
- Lâminas para microscopia confocal, Lab Tek II Chamber slide w/cover RS Glass slides, Nalge NUNC Int., Naperville, EUA;
- Material plástico estéril para cultura celular – CORNING COSAR CORP., Cambridge, MA, EUA;
- Microscópio confocal Zeiss Axiovert 100M, Alemanha;
- Microscópio invertido, modelo eclipse TS 100, Nikon; Japão;
- Software ABI Prism 7700 Sequence Detection Systems version 1,6, Applied Biosystems, EUA;
- Termociclador ABI Prism™ 7700 Sequence Detector, Applied Biosystems, EUA;
- Termociclador modelo M J Research PTE-200, Peltier Thermal Cyler, EUA;
- Termociclador, PTC – 100 Programmable Thermal Controller MJ Research, INC, EUA;
- Termociclador Gene Amp® PCR System 9700, PE Applied Biosystem, EUA;

3.1.2 Principais reagentes

- Acrilamida, Siga Aldrich fine Chemicals, St. Louis, Missouri, EUA;
- Agar-ágar purificado para bacteriologia – MERCK, São Paulo, Brasil;
- Agarose – GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- Álcool etílico absoluto p.a. , Labsynth prod p/ Lab. Ltda., São Paulo, Brasil;
- Alcool Iso-propílico – MERCK, São Paulo, Brasil;
- Ampicilina – Sigma Aldrich fine Chemicals, St. Louis, Missouri, EUA;
- Anticorpo S100P – BD Transduction Laboratories, EUA;
- Anticorpo secundário Anti mouse polyvalent immunoglobulins FITC conjugate – Sigma Aldrich fine Chemicals, St. Louis, Missouri, EUA;
- Ac. Acético Glacial. p.a , Labsynth Prod. para Laboratório Ltda., SP, Brasil;
- Bacto-triptona – DIFCO INTERLAB, São Paulo, Brasil;
- Cloreto de Cálcio – Sigma Aldrich fine Chemicals, St. Louis, Missouri, EUA;
- Cloreto de Sódio, p.a , Labsynth Prod. para Laboratório Ltda., SP, Brasil;
- Clorofórmio p.a. – MERCK, São Paulo, Brasil;
- Dimetilsulfóxido (DMSO), MERCK, São Paulo, Brasil;
- Etanol p.a. - MERCK, São Paulo, Brasil;
- Extrato de levedura , select yeast extract, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- Fenol p.a. MERCK, São Paulo, SP, Brasil;
- Formaldeído – Sigma Aldrich fine Chemicals, St. Louis, Missouri, EUA;
- Glicose p.a. MERCK, São Paulo, SP, Brasil;
- HEPES – Sigma Aldrich fine Chemicals, St. Louis, Missouri, EUA ;
- Isopropanol, MERCK ,São Paulo, Brasil;
- Penicilina-estreptomicina – GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- Saponina, Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg, Alemanha;

3.1.3 Principais reagentes utilizados para biologia molecular

- Agarose Low Melting, LMP - Low Melting Point, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, EUA;
- *Big Dye Terminator* versão 2, Applied Biosystem, EUA;
- BSA (Bovine serum albumine) – Promega, EUA;
- Brometo de etídeo – Pharmacia Biotech, EUA;
- Cloreto de Magnésio MgCl₂, Promega, EUA;
- Dnase I, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, EUA;
- Deoxynucleotídeo trifosfato (dNTP) mix (10mM) Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, EUA;
- Diethyl Pyrocarbonate (DEPC) - Sigma Aldrich fine Chemicals, St. Louis, Missouri, EUA;
- EDTA 25mM, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, EUA;
- Enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* (Promega) *SAC I* (Promega). – GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA), PHARMACIA (Uppsala, Suécia), NEW ENGLAND BIOLABS (Beverly, MA, EUA); PROMEGA
- Formamida – Amresco, Solon, Ohio, EUA;
- GFX Genomic Blood DNA Purification kit para extração de DNA, Amersham Pharmacia Biotech INC, EUA;
- Improm II M-MLV Transcriptase reversa, Promega, EUA;
- Iodeto de propídeo, Sigma Aldrich fine Chemicals, St. Louis, Missouri, EUA;
- Kit Eppendorf Perfect Prep Gel Cleanup – Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha;
- Marcador de peso molecular λ , 100bp DNA Ladder, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, EUA;
- Máster Mix, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha;
- MOPS (3-[N-Morpholino] propanesulfonic acid) Sigma Aldrich fine Chemicals, St. Louis, Missouri, EUA;
- Oligo(dT), Promega, EUA;
- Platinum Pfx DNA Polimerase e seu tampão PFX Amplification Buffer 10x, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, EUA;

- Syber Green, Applied Biosystems, EUA;
- Trizol®, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, EUA;

3.1.4 Principais reagentes para cultura celular

- Cloreto de Cálcio – Sigma Aldrich fine Chemicals, St. Louis, Missouri, EUA;
- Dimetilsulfóxido (DMSO), MERCK, São Paulo, Brasil;
- Geneticina (G418), *Geneticin*® GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- Glutamina – GIBCO-BRL Gaithersburg, MD, EUA;
- HEPES, Sigma Aldrich fine Chemicals, St. Louis, Missouri, EUA;
- Meio de cultura EAGLE modificado por Dulbecco (DMEM), GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- Penicilina-estreptomicina – GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- Polibreno (0,8mg/mL) Brometo de hexadimetrina – ALDRICH, Milwaukee, EUA;
- Rodamina B – Sigma Aldrich fine Chemicals, St. Louis, Missouri, EUA;
- Soro Fetal Bovino, (SFB) Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, EUA;
- Tripsina - GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA
- Trypan blue 0,4% (corante vital) – GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;

3.1.5 Oligonucleotídeos

S100P: Sintetizado pela empresa Invitrogen™, baseado no trabalho de Becker e cols., de 1992 com as seqüências a seguir e utilizado para a construção do vetor retroviral:

P1: C2NBSP 5' – CTA CTC GAG CAT ATG ACG GAA CTA G – 3' sense

P2: 2NBSP 5' – TTA GAA TTC GGA TCC AGG GCA TCA T – 3' anti-sense

S100P: Este par de primers foi desenhado pelo sistema de software *Primer Express oligo design software* da Applied Biosystems, sintetizado por IDT Integrated DNA Technologies, Inc. e utilizado para os ensaios de PCR em tempo real:

P3: 5' - AAT TGC TCA AGG ACC TGG ACG 3' – sense

P4: 5' - GCATCA TTT GAG TCC TGC CTT C 3' – anti-sense

Ciclofilina A: Sintetizado por IDT Integrated DNA Technologies, Inc. e utilizado para os ensaios de PCR em tempo real como gene endógeno.

P1: 5' CAA ATG CTG GAC CCA ACA CA 3' – sense

P2: 5' TTG CCA AAC ACC ACA TGC TT 3' – anti-sense

3.1.6 Vetor Retroviral

Como vetor para a transferência gênica utilizamos o vetor retroviral pLXSN, que contém elementos derivados de retrovírus murino, do vírus da leucemia murina de Moloney (MoMuLV) e do vírus de sarcoma murino de Moloney (MoMuSV), e é designado para transferência e expressão gênica. Por meio de técnicas de DNA recombinante, os genes no genoma viral necessários para a reprodução do MoMuLV, genes *gag*, *pol* e *env*, foram removidos e no sítio de policlonagem é inserido o gen de interesse (Fig.3.1). O que sobra do retrovírus são seus elementos regulatórios: as repetições terminais longas (LTR), que funcionam como sinais de integração do provírus e promotores da transcrição, e um sinal de empacotamento para permitir que o RNA transcrito seja acomodado em uma partícula viral. Para a produção dos vetores retrovirais contendo o gen de interesse, é utilizada uma *linhagem celular de empacotamento* contendo os genes *gag*, *pol* e *env* incorporados ao genoma destas células. O vetor retroviral desprovido dos genes para a replicação viral não é competente para a replicação, e por isso não é capaz de produzir mais vírus competentes dentro da célula-alvo. Portanto, o vetor age como um agente final de transferência gênica, deixando uma cópia de sua seqüência no genoma da célula-alvo.

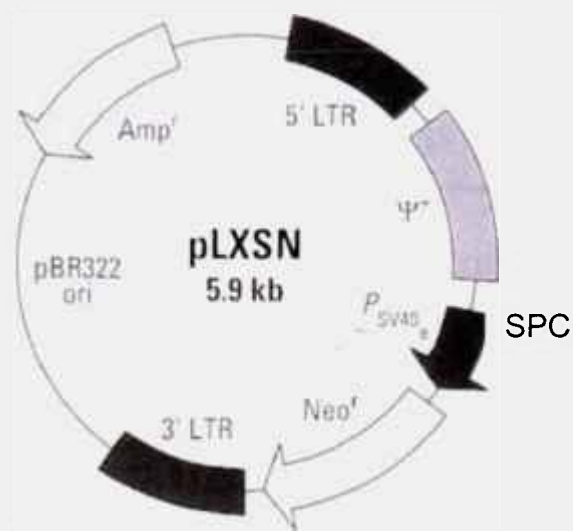


Figura 3.1 Vetor retroviral pLXSN com seus elementos principais:

- 3'LTR e 5'LTR seqüências de DNA do vírus da leucemia murina (moMuLV)
- neo^r gene que confere resistência à neomicina
- Amp^r gene que confere resistência à ampicilina
- SV40 promotor do "Simian virus"
- Ψ Psi+ sinal de empacotamento viral
- SPC sítio de policlonagem 5'- EcoRI, Hpa I, XHO I, Bam HI – 3'

3.1.7 Linhagens celulares

3.1.7.1 Fibroblastos NIH-3T3

Fibroblastos derivados de camundongos da linhagem NIH-3T3, utilizados no ensaio de titulação viral.

3.1.7.2 Fibroblastos GP+E86

Células de empacotamento ecotróficas são fibroblastos derivados de camundongos da linhagem NIH3T3, construídos por Markowitz e cols. em 1988 e contém os genes *gag* e *pol* em um plasmídeo e o gene *env* em outro. Essa linhagem é muito segura e eficiente para transferência gênica para células murinas.

3.1.7.3 Fibroblastos GP+env+Am12

Outra linhagem de células de empacotamento, também construída por Markowitz e cols., em 1988b, e possui igualmente os genes *gag* e *pol* e *env* em plasmídeos separados, porém são células anfitróficas podendo ser utilizadas para transferência gênica segura para células humanas.

3.1.7.4 Células T47D

Células epiteliais, de carcinoma ductal mamário humano. Foram originalmente derivadas de efusão pleural de uma paciente com tumor de mama. Escolhemos a linhagem celular T47D para receber o vetor com o anti-sense da proteína S100P, pois é uma linhagem celular que superexpressa essa proteína (Da Silva, I.D.C.G. e cols. 2000).

As células foram doadas pela Dra. Maria Mitzie Brentani do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Construção do vetor retroviral

3.2.1.1 Obtenção do cDNA da S100P

O cDNA da proteína S100P humana foi obtido a partir do vetor pET3^A, o qual já continha o inserto, e foi gentilmente cedido pelo Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva, docente do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), pesquisador e chefe do laboratório de Ginecologia Molecular do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM.

3.2.1.2 Seqüenciamento da S100P

Para o seqüenciamento foram utilizados 100ng do vetor pET3^A diluídos em 16µL de H₂O milliQ. A partir desta solução foram preparadas as seguintes diluições 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40 e 1:50, e uma amostra permaneceu na proporção de 1:1, completando com isso um total de 8 amostras. Para a reação utilizamos 1µL das diluições com 1µL de *Big Dye Terminator* versão 2 (Applied Biosystem), 1µL dos primers sense ou antisense (na concentração de 3,2 pmol/µL), 2µL de tampão de seqüenciamento e 5µL de H₂O milliQ autoclavada. Esta solução foi colocada em aparelho termociclador Gene Amp® (PE Applied Biosystem, PCR System 9700) nas seguintes condições: 92°C por dois minutos; 92°C por dez segundos; 50°C por dez segundos; 60°C por quatro minutos e 4°C ∞. Sendo os passos 2, 3 e 4 repetidos por 25 ciclos.

A seguir foi realizada a precipitação do DNA, adicionando-se ao volume total do seqüenciamento 80µL de isopropanol 75%, mantendo esta solução em ambiente escuro e a temperatura ambiente por 15 minutos. Após este período os tubos foram centrifugados por 30 minutos a uma velocidade de 14000rpm e a temperatura de 20°C. Em seguida os tubos foram invertidos para descarte do

sobrenadante, deixando-os sobre papel toalha para absorção completa. Foram acrescentados 150µL de etanol 70% para lavagem, seguida de nova centrifugação por 10 minutos a 14000rpm a 20°C. Novamente os tubos foram invertidos para descartar o sobrenadante e os mesmos permaneceram secando a temperatura ambiente em local escuro *overnight*.

No dia seguinte, o material foi ressuspendido e desnaturado. Para isto foram acrescentados 15µL de formamida em cada amostra, e as mesmas então foram colocadas no termociclador por 5 minutos a 96°C para a desnaturação. Os tubos foram imediatamente retirados do aparelho e colocados no gelo para choque térmico. As amostras então foram aplicadas nas placas para seqüenciamento e encaminhadas ao ABI 3100®, (PE Applied Biosystem), onde obtivemos a seqüência completa das bases contidas neste material (Costa, A.M.M. 2003).

O resultado do seqüenciamento foi analisado pelo programa Cromas e comparado a seqüências conhecidas em bancos de dados.

3.2.1.3 Construção de Oligonucleotídeos

Solicitamos a construção de um par de oligonucleotídeos à empresa Invitrogen™ com as seguintes seqüências:

Sense

P1 5' – CTA CTC GAG CAT ATG ACG GAA CTA G– 3'

XhoI *NdeI*

Anti-sense

P2 5' – TTA GAA TTC GGA TCC AGG GCA TCA T – 3'

EcoRI *Bam HI*

Estes oligonucleotídeos foram construídos baseados no trabalho de Becker e cols. (1992), porém nós adicionamos as seqüências reconhecidas pelas enzimas de restrição *XhoI*, *NdeI*, *EcoRI* e *BamHI*. Este par de “primers” foi utilizado no ensaio de PCR para amplificação do cDNA da S100P com os sítios de restrição necessários para cloná-lo no vetor retroviral pLXSN.

3.2.1.4 Amplificação do cDNA da S100P pelo método de PCR

O cDNA da S100P foi amplificado pela técnica da reação em cadeia da polimerase. Utilizamos 1 μL (52ng) do vetor pET 3^A, 1 μL de Platinum Pfx DNA Polimerase (Invitrogen), 5 μL do tampão PFX Amplification Buffer 10x (Invitrogen), 1,5 μL de dNTP mix (10mM) (Invitrogen), 1 μL de MgSO_4 (50mM) (Invitrogen), 1 μL de cada "primer" (seqüência mencionada anteriormente) (Invitrogen), 38,5 μL de H_2O MilliQ autoclavada, terminando com um volume total de 50 μL . Este procedimento foi repetido, no dia seguinte, para aumentar o rendimento de cDNA.

A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 92°C, por 5 minutos (desnaturação do DNA), 92°C, por 30 segundos, 55°C, por 30 segundos (anelamento) e 68°C, por 30 segundos (extensão dos "primers"). Esses três últimos ciclos foram repetidos por mais 39 vezes. Depois, mais um ciclo a 68°C, por 5 minutos (Becker e cols., 1992).

A análise dos fragmentos gerados foi realizada mediante eletroforese, em gel de agarose 1% (GIBCO-BRL) e corado com 1 μL de Brometo de etídeo (100mg/mL).

3.2.1.5 Extração do Produto de PCR

Para a extração do cDNA da S100P do vetor pET 3a foi preparado um gel de agarose Low Melting (LMP - Low Melting Point Invitrogen) a 1,5%, e a extração e purificação foram realizadas com o kit Eppendorf Perfect Prep Gel Cleanup[®] seguindo o protocolo do fabricante.

A quantificação dos fragmentos gerados foi realizada mediante eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,5 % (GIBCO-BRL) em TEB 1x e corado com Brometo de etídeo. Foram utilizados 7 μL de marcador de peso molecular EcoRI/HindIII, 7 μL de marcador de peso molecular Puc *Haell*III, e 3 μL do resultado da purificação.

O DNA foi precipitado, adicionando-se 200 μL de Etanol 100% e 10% de Acetato de Na 1M (ph 5,2). Permaneceu por uma hora a -20°C, sendo então centrifugado por 20 minutos, a 12.500 rpm a 4°C (centrífuga Eppendorf[®]). O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 100 μL de Etanol 70% para reidratação. Foi, novamente centrifugado por 5 minutos, a 12.500 rpm, em centrífuga refrigerada a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado, o *pellet* permaneceu

secando a temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos e ressuspendido em 20 μ L de H₂O Milli Q autoclavada.

3.2.1.6 Preparação do vetor pLXSN

O plasmídeo LXSN foi linearizado com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* (Promega) para se tornar compatível com o cDNA anti-sense da S100P. Para a digestão foram utilizados 7 μ L (200ng) do vetor pLXSN, 0,2 μ L de cada enzima de restrição, 1 μ L de tampão 2 da Promega e 1,6 μ L de H₂O Milli Q autoclavada. A solução permaneceu por 2 horas no banho-maria a uma temperatura de 37°C.

Após a digestão com as enzimas de restrição ocorreu a purificação com fenol/clorofórmio na proporção de 1:1, e o produto foi submetido à análise quantitativa e qualitativa em gel de agarose 1% (Bellini, M.H. 2001; Yang, L. e cols. 1999; Quan, S, e cols., 2001).

3.2.1.7 Ligação da S100P ao vetor retroviral pLXSN

A ligação do vetor retroviral com o cDNA da S100P foi realizada com a enzima T₄ DNA ligase (Promega). A relação molar entre o vetor e o inserto foi de 1:3, portanto foram utilizados 2 μ L de LXSN (100ng), 1 μ L de S100P (25ng), 1 μ L de T₄ DNA Ligase, 1 μ L de tampão específico e 5 μ L de H₂O Milli Q autoclavada. A reação de ligação permaneceu incubando por 16 horas a 4°C (Affonso, R. 2000).

3.2.2 Transformação em bactérias competentes DH5 α

As bactérias competentes DH5 α foram transformadas pelo método do cloreto de cálcio. Para isso adicionamos todo o conteúdo da reação de ligação (10 μ L) em 200 μ L de bactérias competentes DH5 α . A solução permaneceu por 20 minutos no gelo. Após este período foi colocada por 1 minuto a uma temperatura de 42°C e imediatamente retornada ao gelo.

Foram acrescentados 800 μ L de meio SOC (Tryptona, extrato de levedura, NaCl, KCl e H₂O destilada), 16 μ L de Glicose 1M e 4 μ L de Cloreto de Magnésio 2M. A solução permaneceu incubando por 1 hora a 37°C sob agitação máxima de 220 rpm (Mathor, M.B. 1994).

Foram aplicados 200µL desta suspensão em placas de LB-agar com Ampicilina e deixadas na estufa a 37°C overnight.

3.2.3 Amplificação dos plasmídeos

Os clones resistentes à Ampicilina, foram amplificados em meio LB líquido (Bacto-triptona, Extrato de levedura e NaCl) com Ampicilina (100µg/mL), por aproximadamente 16 horas a temperatura de 37°C sob agitação de 200 rpm.

3.2.4 Extração e purificação dos plasmídeos LS100PSN – Mini Prep

Da suspensão bacteriana foram centrifugados 3mL por 1 minuto a 12.000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspendido em 1 mL de TE (10mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM Na EDTA). Após homogeneizar a amostra com o auxílio do vórtex, houve nova centrifugação por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. As bactérias foram ressuspendidas em 100µL de Solução I (50mM de glicose, 10mM Na EDTA e 25mM Tris-HCL, pH 8,0), a solução foi agitada e permaneceu incubando por 5 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se 200µL da Solução II (0,2M NaOH e 1% de SDS) para efetuar a lise, misturando-se por inversão e a amostra permaneceu por 5 min. no gelo. Foram então adicionados 150µL da Solução III gelada (60 ml Acetato de K 5M, pH 5,5; 11,5 mL de Ac. Acético Glacial e 28,5 mL de H₂O) misturados por inversão e deixados por 5 min. no gelo. Após centrifugação a 13.000 rpm por 5 min. a 4 °C, 400µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo novo. Adicionou-se 400µL de fenol/clorofórmio na proporção de 1:1, homogeneizado, centrifugado por mais 3 min., a 13.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos novos, e foi adicionado 1 mL de Etanol 100%, permanecendo por 5 min. a temperatura ambiente. Novamente centrifugado por outros 5 min. nas mesmas condições descritas anteriormente e o sobrenadante foi desprezado. O DNA precipitado foi lavado por duas vezes com 1 ml de etanol 70%. O precipitado foi ressuspendido em 50µL de TE/RNase (100µg/mL) e incubado por meia hora em banho-maria a 37°C.

3.2.5 Análise de Restrição

A análise de restrição foi realizada com a enzima S_{AC}I (Promega). Para isso foram utilizados 8 μ L de DNA, 0,5 μ L da enzima de restrição S_{AC}I, 1 μ L de tampão específico J (Promega) e 0,5 μ L de BSA (Bovine serum Albumin – Promega).

Foi preparado um gel de agarose a 1% com TAE 1%, corado com Brometo de etídeo e submetido a corrente elétrica em aparelho de eletroforese.

Como o vetor pLXSN contém dois sítios de reconhecimento para a enzima S_{AC}I e o inserto contém um sítio, devem ser encontradas três fragmentos no gel de agarose.

3.2.6 Preparação das células de empacotamento

As duas linhagens de células de empacotamento foram mantidas em cultura com meio de EAGLE modificado por Dulbelcco (DMEM), soro fetal bovino (SFB) 10%, penicilina/estreptomicina (100 UI/mL) e glutamina (4mM). As células foram mantidas a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ (Markowitz e cols., 1988a e b).

3.2.7 Transfecção transiente em células GP+E86 com cloreto de cálcio

Primeiramente introduzimos a construção retroviral nas células de empacotamento ecotróficas, GP+E86 (gag, pol + env), por meio de transfecção transiente com cloreto de cálcio (Maniatis, T. e cols., 1989).

Quatro dias antes da transfecção, as células foram descongeladas, foram colocadas em garrafas de 75cm² com 15 mL de meio EAGLE modificado por Dulbelcco (DMEM) com 10% de soro fetal bovino e permaneceram na estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Vinte e quatro horas antes da transfecção, as células foram tripsinizadas e foram plaqueadas 2 garrafas de 25cm² com 1x10⁶ células (sendo uma garrafa para controle).

Para a transfecção foram ressuspensos 10 μ g de cDNA em 300 μ L de água MilliQ autoclavada, e adicionados 100 μ L de cloreto de cálcio (2,5M) diluídos em 600 μ L de água MilliQ autoclavada. Essa solução foi adicionada por gotejamento em 1 mL de HEPES PO₄ (NaCl 280mM, KCL 10mM, Na₂HPO₄2H₂O 1,5mM e HEPES 50mM) enquanto este recebia um borbulhamento de ar com

pipeta. Após incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, a solução foi pipetada sobre as placas com as células GPE-86, e mantidas por 20 minutos para incubação em estufa de CO₂. Depois deste período as placas receberam 8 mL de meio DMEM-10 e foram mantidas a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 16 horas, o meio foi trocado e as células permaneceram por 48 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ para se restabelecerem (Bellini, M.H. 2001; Mathor, M.B. 1994).

3.2.8 Infecção permanente

Para a infecção permanente foram utilizadas células anfotróficas GP+envAm12 (Markowitz, D. e cols., 1988b). As células foram descongeladas quatro dias antes da infecção, e cultivadas em garrafas de 75cm² com 15 mL de meio EAGLE modificado por Dulbecco (DMEM) com 10% de soro fetal bovino e permaneceram na estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Vinte e quatro horas antes da infecção, as células foram tripsinizadas e foram plaqueadas em 2 placas de 100mm com 1x 10⁶ células.

O sobrenadante das células GPE-86 contendo partículas virais foi utilizado para a infecção permanente das células anfotróficas GP+envAm12, que consiste no contato por um determinado período do vírus com as células alvo (Figura 3.2).

O meio das placas contendo as células Am12 foi retirado e foram pipetados 5 mL do sobrenadante das placas que continham as células GPE-86 com 500µL de Polibreno (brometo de hexadimetrina 0,08mg/mL), que aumenta a permeabilidade da membrana celular. As placas foram colocadas na estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 3 horas para inoculação, com leve agitação de meia em meia hora. Após este período foram adicionados mais 5 mL de meio DMEM-10 com a mesma concentração de polibreno e voltaram para a estufa sob as condições anteriormente citadas. O restante do meio retirado das placas com as células GPE-86 e contendo partículas virais foi imediatamente congelado a uma temperatura de -80°C.

No dia seguinte iniciou-se a seleção com Geneticina G418 (0,8mg/mL) (se liga a subunidade ribossomal) que durou 12 dias, com duas trocas de meio no período. Os clones resistentes foram amplificados e congelados e o sobrenadante foi posteriormente utilizado na titulação (Mathor, 1994; Bellini, M.H. 2001).

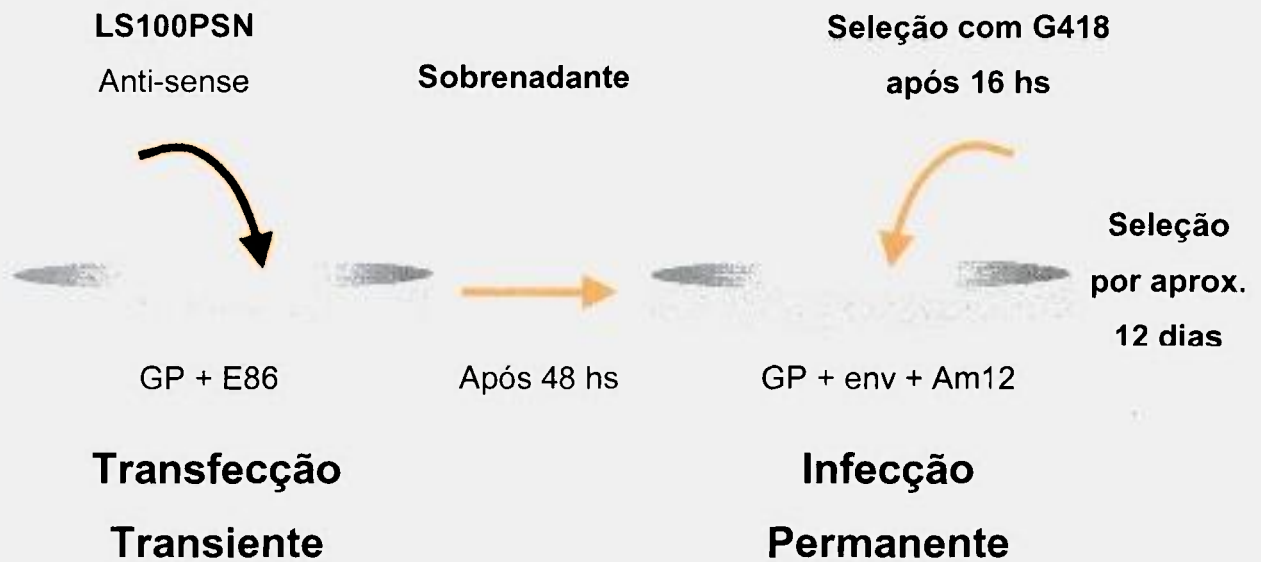


Figura 3.2 Esquema da Transfecção transiente em linhagem ecotrófica GP+86, pelo método do cloreto de cálcio e da infecção permanente, em linhagem anfotrófica GP+env+Am12.

3.2.9 Titulação

Os clones Am12LS100PSN-Anti-sense resistentes à Geneticina (G-418) foram amplificados em garrafas de 25cm² contendo meio de cultura EAGLE modificado por Dulbelcco (DMEM), contendo 10% de soro fetal bovino e Glutamina (4mM) e foram congelados em meio especial de congelamento contendo 10% de DMSO e 50% de soro fetal bovino. Os sobrenadantes também foram imediatamente congelados a - 80°C para posterior uso na titulação.

Os clones resistentes à Geneticina foram titulados para determinar a capacidade de infecção do sobrenadante em fibroblastos NIH-3T3 (Bignon, Y.J. e D'Incan, C, 1996; Mann, R. e cols. 1983).

Foram semeadas 5X10⁴ células NIH-3T3 em placas de 28cm² com 2mL de meio EAGLE modificado por Dulbelcco (DMEM), com 10% de soro fetal bovino e Glutamina (4mM), mantidas a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. No dia seguinte, foram adicionados 0,5mL do sobrenadante de cada clone, em diluições de 10⁻³ e 10⁻⁴, com a adição de 8µg/mL de polibreno. Após uma hora a 37°C, com agitação a cada 15 minutos, foram adicionados mais 1,5 mL de meio

de cultura EAGLE modificado por Dulbecco (DMEM – Gibco) e incubados por mais 18 horas. Após este período houve a troca do meio por meio de cultura sem polibreno e após 24 horas foi iniciada a seleção com G-418 (Fig. 3.3).

A seleção levou 12 dias, as placas foram então coradas com Rodamina B numa concentração de 2% em uma solução de 4% de formaldeído, sendo então lavados em água corrente até a eliminação do excesso do corante e os clones foram contados. Cada colônia corresponde a uma célula que foi infectada e contém o gene de resistência NeoR formando um clone. A Eficiência de Formação de Colônias (EFC) é calculada pelo número de colônias obtidas e o número de células semeadas (Mathor, M.B.1994).

O resultado foi expresso em unidades de formação de colônias por mililitro (ufc/mL) (Byun, J. e cols., 1996).

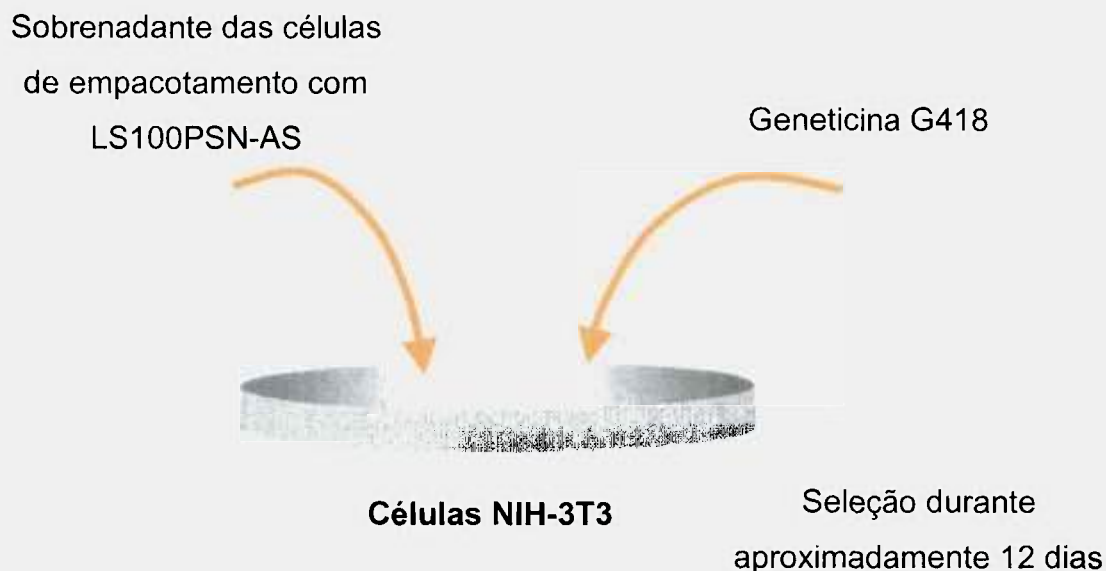


Figura 3.3 Esquema da titulação em células NIH-3T3

3.2.10 Cultura de células de carcinoma mamário T47D

T47D é uma linhagem celular de carcinoma mamário humano que apresenta alta expressão da proteína S100P (Da Silva e cols., 2000). As células foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani do Departamento de Radiologia, da Faculdade de Medicina da USP.

A manutenção dessa linhagem celular em cultura foi feita em meio de EAGLE modificado por Dulbecco (DMEM), soro fetal bovino (SFB) 10%, penicilina/estreptomicina (100UI/mL-100µg/mL) e glutamina (4mM). As células foram mantidas a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Para congelamento as células foram tripsinizadas e ressuspensas em meio EAGLE modificado por Dulbecco (DMEM), com alta concentração de glicose (4,5g/L), 20% SFB (Invitrogen) e 10% de Dimethylsulfoxido (DMSO)(Bagatell,R. e cols., 2001).

3.2.11 Infecção das células T47D

Para a infecção foram escolhidos os clones das células de empacotamento AM12S100PSN-anti-sense, com os maiores títulos virais.

Foram semeadas 5×10^4 células T47D em garrafas de 25cm², mantidas com meio de cultura EAGLE modificado por Dulbecco (DMEM) com 10% a 20% de soro fetal bovino, Glutamina (4mM) e mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, por 24 horas.

No dia seguinte foi adicionado 1 mL de meio contendo partículas virais com polibreno (8µg/mL) em cada placa. Após uma hora na estufa de CO₂ a 37°C e com agitação a cada 15 minutos, foram adicionados mais 3 mL de meio DMEM-10 com polibreno (8 µg/mL). Após 24 horas de incubação foi trocado o meio de cultura e deixado por mais 24 horas na estufa.

A seleção com geneticina iniciou-se 48 horas após a infecção. O meio das placas foi substituído por meio DMEM-10 com 500µg/mL de Geneticina. Essa concentração de geneticina foi baseada em dados da literatura (Sartorius,C.A. e cols., 2003; Chisamore, M.J. e cols., 2001), e durou 12 dias com uma troca de meio no período.

Como controle foi utilizado um clone de célula T47D infectada apenas com o vetor retroviral pLXSN sem cDNA da S100P, mas que passou pelos mesmos processos (Quan,S. e cols., 2001).

3.2.12 Extração de RNA das células T47D

Para a realização da extração de RNA das células T47D, assim como dos clones T47D-LS100PSN-AS, foram semeadas 5×10^4 células e mantidas sob as condições anteriormente mencionadas, até atingirem a sub-confluência (80% de confluência).

As garrafas foram lavadas com PBS 1x, as células foram ressuspendidas em 1 mL de Trizol[®] (Invitrogen) e permaneceram incubando por 5 minutos em temperatura ambiente. A solução foi transferida para tubos estéreis de 1,5 mL e foram adicionados 200 μ L de clorofórmio, seguido de vigorosa agitação manual por 15 segundos.

Após incubação a temperatura ambiente por 3 minutos, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante contendo RNA foi cuidadosamente pipetado e passado para novos tubos de 1,5 mL. O RNA foi precipitado com 500 μ L de Isopropanol e após incubação de 10 minutos a temperatura ambiente, foi centrifugado a 12.000 rpm, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de Etanol 75%, preparado com água DEPC (diethyl pyrocarbonate). Após nova centrifugação o RNA foi ressuspendido e armazenado a -80°C. (Chomczynski,P. e Sacchi,N., 1987, e Chomczynski, P, 1993).

A concentração do RNA foi determinada por leitura da absorbância a 260nm em espectrofotômetro e para avaliar o grau de pureza foi realizada leitura da absorbância a 280nm e calculada a relação.

3.2.13 Análise da pureza do RNA por eletroforese

Para avaliar a pureza e integridade do RNA extraído das células realizamos um ensaio de eletroforese em gel de agarose com formaldeído 37%.

Antes de colocar o RNA no gel de agarose, foi preparada uma solução que impede a degradação do mesmo. Todo o material utilizado foi devidamente autoclavado e todas as soluções foram preparadas com água DEPC.

Para cada amostra de RNA utilizamos 5,5µL de formamida, 1 µL de MOPS (3-[N-Morpholino] propanesulfonic acid) 10x, 2 µL de formaldeído, 1 µL de Loading Buffer para RNA e 0,5 µL de brometo de etídeo. A esta solução foi adicionado 1 µg de RNA. A solução foi aquecida a 65°C também para desnaturar o RNA, seguido de choque frio por 3 min. no gelo e colocado no gel de agarose 3% preparado com formaldeído 37% e MOPS e submetido a corrente elétrica em aparelho de eletroforese.

3.2.14 Obtenção de cDNA pelo método de transcrição reversa

Padronizamos este ensaio para utilizar sempre 2µg de RNA total de cada amostra. A primeira etapa deste ensaio foi a eliminação de DNA contaminante com DnaseI (Invitrogen 1U/µL) para não interferir no resultado final. As amostras permaneceram incubando por 15 minutos a 25°C com a DnaseI e seu tampão, após este período foi adicionado 1µL de solução de EDTA 25mM para inibir a ação da DnaseI.

Para linearizar a cadeia de RNA foram acrescentados 2µL de Oligo(dT) Primer (0,1µg/µL), as amostras permaneceram incubando por 10 minutos a 65°C.

Para a síntese de DNA complementar, acrescentaram-se BSA (Bovine Serum Albumin - 20µg/mL), deoxynucleotídeo trifosfato (dNTP) 10mM, MgCl₂ e a enzima transcriptase reversa M-MLV *Reverse Transcriptase* (200U/µL) com seu respectivo tampão, as amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C. Após este período os tubos foram transferidos para o gelo picado, aonde permaneceram por 5 minutos. Depois foram colocados outra vez no termociclador a 65°C por 10 minutos e transferidos para o gelo. As amostras foram estocadas a - 20°C. (D'Alessio, J.M., e Gerard, G.F., 1988; Kotewicz, M.L. e cols. 1988).

3.2.15 Reação de polimerização em cadeia em tempo real (PCR em tempo real)

Para a determinação quantitativa da expressão de S100P foi realizada a técnica de PCR em tempo real.

O par de primers utilizado neste ensaio foi desenhado pelo sistema de software *Primer Express oligo design software* da Applied Biosystems (Ginzinger, D.G., 2002).

Para a reação de polimerização em cadeia em tempo real utilizamos 0,8µL de cDNA de cada amostra, 5µL de SYBR[®] Green I (Applied Biosystems), 0,4µL (4pmol) de cada primer (seqüência informada nos Materiais) e 3,4µL de H₂O DEPC, terminando com um volume total de 10µL por reação. Cada amostra foi realizada em triplicata.

A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 1º estágio: 95°C, por 10 minutos, 2º estágio: 94°C, por 15 segundos, 55°C, por 30 segundos (anelamento) e 72°C, por 30 segundos (extensão dos primers). Esses três últimos ciclos foram repetidos por mais 35 vezes.

Depois da reação de amplificação foi realizada a curva de dissociação seguindo-se o seguinte padrão: 95°C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos e 95°C por 20 segundos, sendo que a passagem da temperatura dos 95°C para os 60°C levou 20 minutos.

Como gene endógeno para validar o ensaio e servir de padrão interno foi utilizado um par de primers da Ciclofilina A (seqüência informada nos Materiais) (Thellin, O. e cols., 1999; Peinnequin, A. e cols., 2004).

A reação foi realizada em um termociclador ABI Prism 7700 Sequence Detector, as condições foram programadas em um computador Power Macintosh 7100 (Apple Computer, Santa Clara, CA). Os dados foram analisados neste mesmo computador. Tanto a coleta como a análise dos dados foi realizada por software criado pela PE Applied Biosystems, Abi Prism 7700 Sequence Detection System version 1.6.

A análise dos fragmentos gerados foi realizada mediante eletroforese, em gel de agarose 1% (GIBCO-BRL) e corado com 1µL de Brometo de etídeo.

3.2.16 Ensaio de Imunofluorescência em Microscopia Confocal

Para avaliar a expressão protéica da S100P nos clones transfectados realizamos o ensaio de imunofluorescência. As células foram tripsinizadas e plaqueadas em câmaras apropriadas sobre lâminas de microscopia, para cada clone foi plaqueada uma lâmina com 5×10^4 células por câmara. As células foram mantidas em meio de cultura EAGLE modificado por Dulbelcco (DMEM) com 10% de soro fetal bovino e Glutamina (4mM), permanecendo em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

No dia seguinte, as células foram fixadas com formol 4% gelado e permaneceram por 10 minutos a 4°C. As células foram então lavadas duas vezes com PBS 1%, seguida de uma lavagem com PBS com glicina 0,1M, nova lavagem com PBS 1%, e outra lavagem com PBS e BSA 1%. Após todas as lavagens, as células foram incubadas com anticorpo monoclonal primário para a proteína S100P (BD Transduction Laboratories,), a uma diluição de 1:50 em PBS e BSA 1%, permanecendo overnight a 4°C.

Após incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e BSA 1%, e durante 30 minutos foram repetidamente lavadas com PBS 1% para ser retirado todo excesso de anticorpo.

Foi adicionado o Anticorpo secundário (Anti mouse polyvalent immunoglobulins FITC conjugate – Sigma), a uma diluição de 1:250 em PBS e o DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) para corar o núcleo das células (Yang, E.S e Burnstein, K.L, 2003). As células permaneceram incubando por 30 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luz.

Após este período as células foram lavadas 8 vezes com PBS 1%, depois foram rapidamente lavadas com água destilada e as lamínulas foram montadas com glicerina tamponada.

As lâminas foram observadas primeiramente em microscópio de fluorescência e campo claro convencional Olympus BX60 e posteriormente em microscópio de fluorescência Zeiss LSM 510.

3.2.17 Ensaio de Citometria de Fluxo

O ciclo celular foi analisado pela coloração do DNA por iodeto de propídeo e adquirido em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences), equipado com laser de argônio de 15mW, 488 nm, refrigerado a ar, com expensor prismático e lentes esféricas, criando um feixe elíptico de 20x64 μ m. As mensurações foram realizadas em câmara retangular de quartzo de 430x180 μ m, com fluxo de aproximadamente 100 cel/segundo. As dispersões de luz frontal e lateral foram detectadas com fotomultiplicadores, com valores obtidos em escala logarítmica. Os sinais luminosos foram captados por filtros de 600/650 para iodeto de propídeo. O citômetro é acoplado a um microcomputador que realiza a aquisição dos parâmetros e armazenamento de dados em disco rígido.

Para a aquisição das amostras foi utilizado o programa CellQuest, e para análise, o programa ModFit LT (Verity Software House, Topsham, Memphis, EUA). Foram adquiridos 10.000 eventos de cada amostra, cada um correspondendo a uma célula, através de dois parâmetros, dispersões frontal e lateral de luz, que representam, respectivamente, tamanho e complexidade da célula (Chaves, M.M.S., 2004).


De cada clone T47DLS100PSN-A/S 1, 4, 8 e das células T47DLXSN foram semeados 1×10^6 células em garrafas de cultura de 25cm² e mantidas sob as mesmas condições anteriormente citadas. Após vinte e quatro horas, as células foram tripsinizadas, lavadas duas vezes com 1 mL de PBS gelado e fixadas em 1 mL de etanol gelado 70% por 30 min. Esta suspensão de células foi armazenada, protegida da luz a temperatura de 4°C até o dia do ensaio. No dia da leitura no citômetro, as células foram centrifugadas em centrífuga eppendorf, a 12000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante aspirado, e as células foram ressuspendidas em 1mL de PBS 1% gelado, passadas para tubos especiais de 12mm x 75mm em polietileno (BD Discovery Labware) e coradas com solução de iodeto de propídeo (50 μ g/mL em PBS) e Rnase A (50 μ g/mL) por 30 min, à temperatura ambiente, no escuro. A análise foi feita por citometria de fluxo, em citômetro FACSCalibur equipado com um computador Macintosh Power PC, modelo 7300/200 (Apple Computer Inc., Cupertino, CA, EUA) utilizando o programa CellQuest (BDIS) (Vindelov, L.L e Christensen, I.J., 1990; Michea L., e cols.2000).

4 Resultados

4.1 Seqüenciamento

O cDNA da S100P foi seqüenciado no seqüenciador ABI 3100® (PE Applied Biosystem), analisado pelo programa Cromas e comparado com seqüências de banco de dados que demonstraram que a seqüência da S100P por nós apresentada contém 100% de similaridade com a S100P conhecida, conforme demonstrado a seguir e este cDNA foi então utilizado em nossos ensaios.

```

Γ >gi|30583416|gb|BT007289.1|  Homo sapiens S100 calcium binding protein P mRNA, complete cds
Length = 288

```

```

Score = 563 bits (284), Expect = e-157
Identities = 284/284 (100%)
Strand = Plus / Minus

```

```

Query: 1   ttgagtctctgccttctcaaagtacttgtgacaggcagacgtgattgcagccacgaacacg 60
          |||
Sbjct: 284 ttgagtctctgccttctcaaagtacttgtgacaggcagacgtgattgcagccacgaacacg 225

Query: 61   atgaactcactgaagtccacctgggcatctccattggcgtccaggtccttgagcaattta 120
          |||
Sbjct: 224 atgaactcactgaagtccacctgggcatctccattggcgtccaggtccttgagcaattta 165

Query: 121  tccacggcatccttgtcttttccactctgcaggaagcctggtagctccttctccatcagc 180
          |||
Sbjct: 164 tccacggcatccttgtcttttccactctgcaggaagcctggtagctccttctccatcagc 105

Query: 181  accttgagctcccccttggtcagggctctgcgtgctgccctcgctgcccgaatatcgggaa 240
          |||
Sbjct: 104 accttgagctcccccttggtcagggctctgcgtgctgccctcgctgcccgaatatcgggaa 45

Query: 241  aagacgtctatgatcatgcccatggctgtctctagttccggtcat 284
          |||
Sbjct: 44   aagacgtctatgatcatgcccatggctgtctctagttccggtcat 1

```

4.2 Obtenção do cDNA da S100P

4.2.1 Amplificação pela técnica de PCR

O vetor pET3a contendo o cDNA da proteína S100P foi amplificado pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com um par de “primers” por nós desenhado que lhe forneceu o sítio reconhecido pela enzima de restrição *XhoI* na extremidade 5’ da S100P, e da enzima *EcoRI* na extremidade 3’ da S100P (Fig. 4.1).

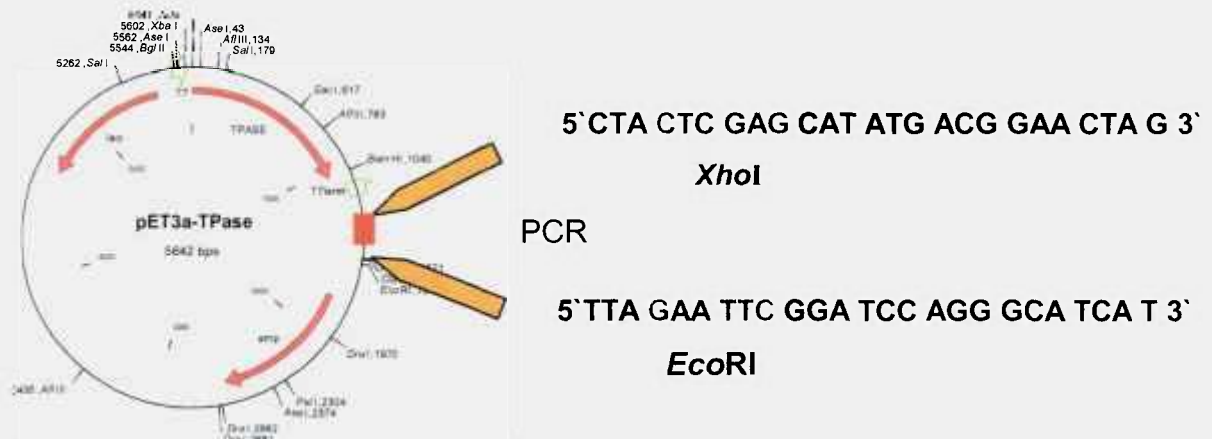


Figura 4.1 Esquema da amplificação por PCR

4.2.2 Preparação do cDNA da S100P para o vetor pLXSN

Após a amplificação do cDNA pelo método de PCR, o fragmento gerado foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *XhoI*. Depois este foi precipitado, purificado e submetido à análise quantitativa e qualitativa em gel de agarose 1% (Figura 4.2). A análise do gel confirmou o tamanho do fragmento (299pb) como também sua pureza. Confirmando portanto a possibilidade de uso do cDNA para a continuidade do trabalho.

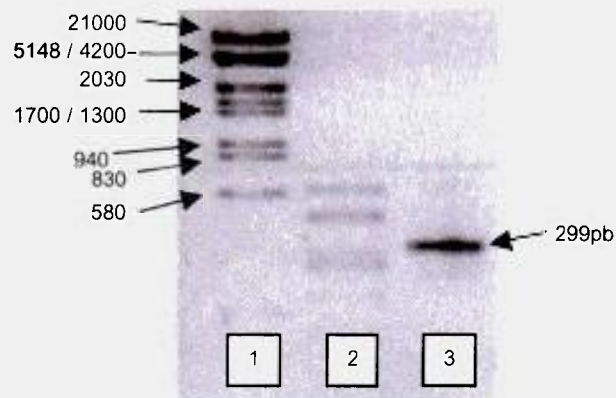


Figura 4.2 Gel de agarose 1%, com a representação do fragmento do cDNA da S100P, utilizado para a construção do vetor LS100PSN.

- 1) marcador de peso molecular *EcoRI/HindIII* (21000pb a 580pb)
- 2) marcador de peso molecular 100pb (2000pb a 100pb)
- 3) cDNA da S100P com 299 pb

4.3 Preparação do vetor pLXSN

Para linearizar o vetor e prepará-lo para receber o fragmento da S100P, o plasmídeo pLXSN foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *XhoI*, foi precipitado, purificado e submetido à análise qualitativa em gel de agarose 1% (Figura 4.3). A análise do gel confirmou não só o tamanho do fragmento (5874pb) como também sua pureza. Neste ponto tínhamos o cDNA e o vetor com as extremidades condizentes para a ligação no sentido anti-sense.

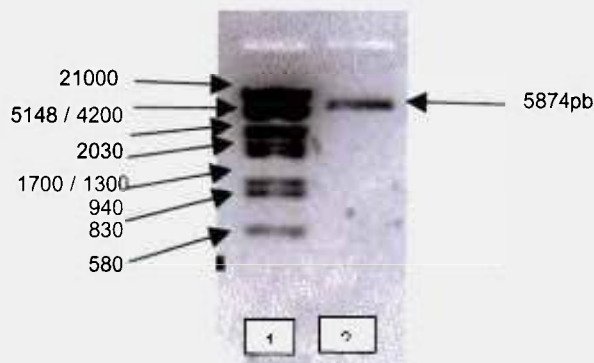


Figura 4.3 Gel de agarose 1%, com a representação do fragmento do vetor pLXSN, utilizado para a construção do vetor LS100PSN.

- 1) Marcador de peso molecular *EcoRI/HindIII*
- 2) vetor pLXSN com 5874pb

4.4 Ligação do cDNA da proteína S100P ao vetor retroviral pLXSN

O cDNA da S100P foi inserido no vetor pLXSN previamente linearizado com as mesmas enzimas (*Xho*I e *Eco*RI), utilizando-se a enzima T4 Ligase (Figura 4.4), no sentido anti-sense da proteína S100P.

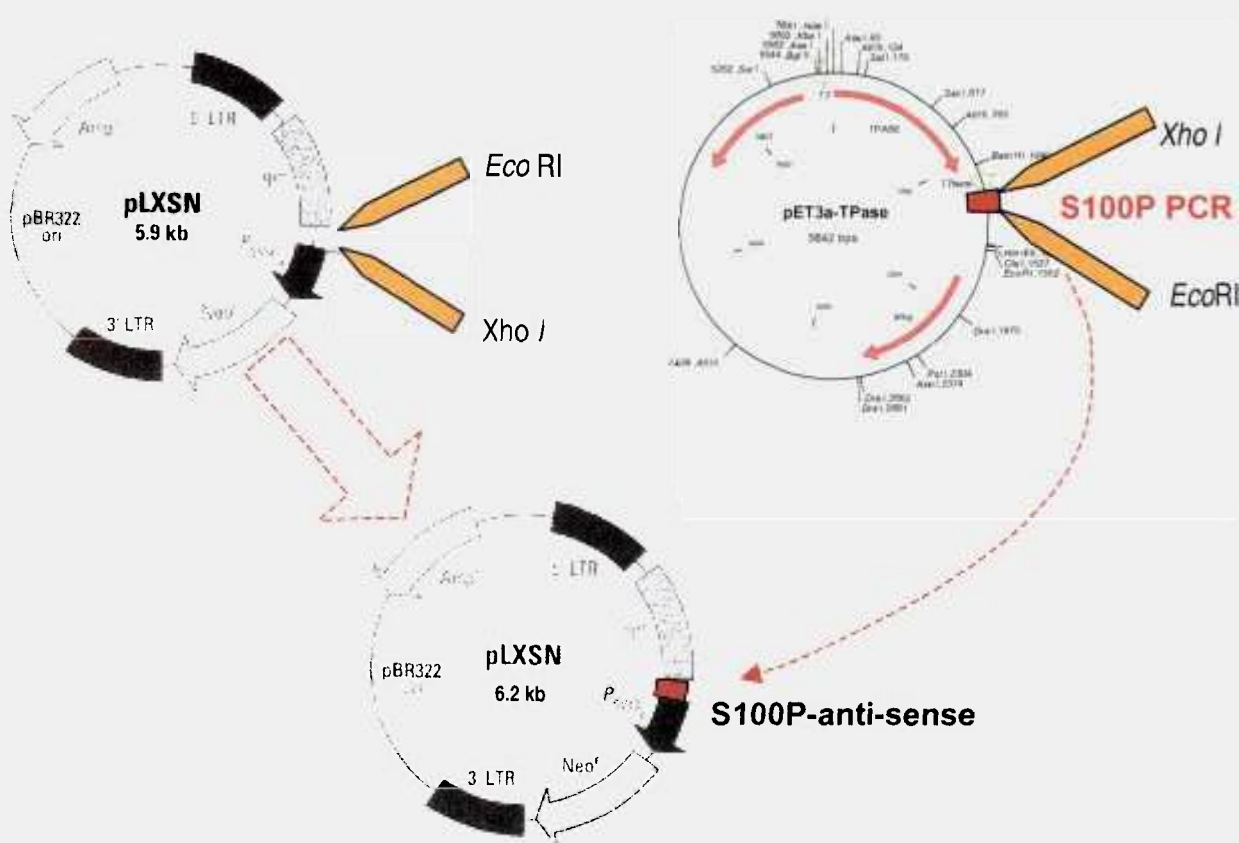


Figura 4.4 Esquema da construção do vetor LS100PSN-anti-sense.

O vetor pLXSN foi digerido com as enzimas *Eco*RI e *Xho*I. O cDNA da S100P, com os mesmos sítios, foi obtido por PCR e inserido no vetor pLXSN no sentido anti-sense.

As bactérias DH5 α foram transformadas pelo produto da ligação e obtivemos quatro clones positivos, ou seja, resistentes ao antibiótico Ampicilina.

4.5 Análise de restrição

A confirmação da ligação foi realizada por análise de restrição, os fragmentos foram digeridos com as enzimas *XhoI* e *EcoRI*, para analisar o tamanho dos fragmentos resultantes e com a enzima *SacI* para avaliar a posição do inserto (Fig. 4.5). Na figura 4.6 podemos confirmar o resultado das digestões em gel de agarose 1%.

Escolhemos a enzima de restrição *SacI* para a análise de restrição pois o vetor pLXSN possui apenas dois sítios de restrição para esta enzima, localizados nas posições 3164 e 414, e a S100P possui apenas um sítio, localizado na posição 99. Com isso, no caso de inserto positivo encontraríamos três fragmentos.

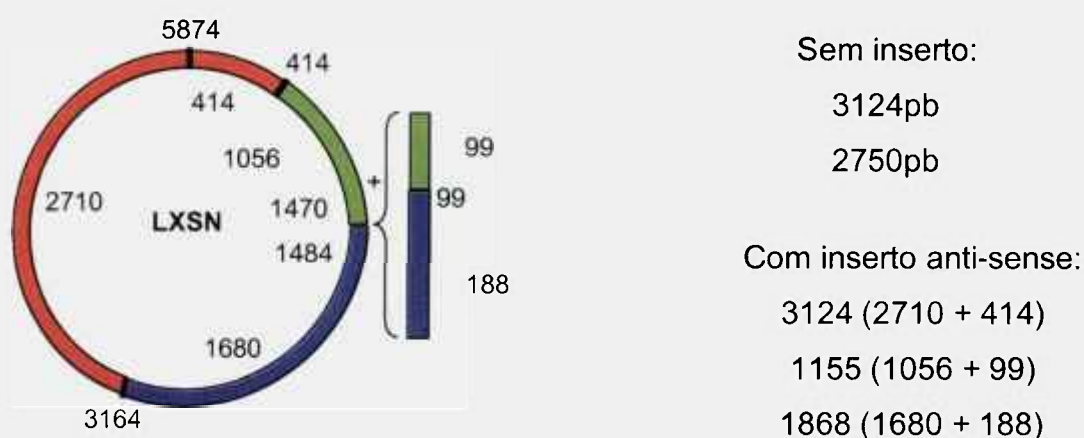


Figura 4.5 Desenho da análise de restrição com a enzima *SacI*

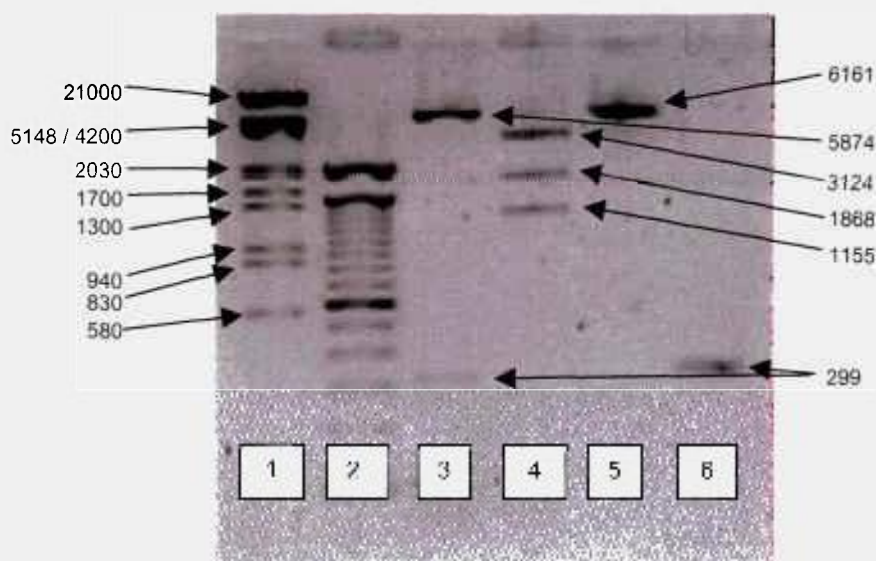


Figura 4.6 Gel de agarose 1%

- 1) Marcador de peso molecular *EcoRI/HindIII*
- 2) Marcador de peso molecular 100pb de 2000pb a 100pb
- 3) Plasmídeo LS100PSN-anti-sense clivado com *EcoRI* e *XhoI* gerando fragmentos de aproximadamente 5900 (vetor LXS 5874pb) e 300pb (S100P)
- 4) Plasmídeo LS100PSN-anti-sense clivado com a enzima *SmaI* gerando fragmentos de 3124pb, 1868pb e 1155pb
- 5) Plasmídeo LS100PSN-anti-sense linearizado com a enzima *EcoRI* gerando um único fragmento de aproximadamente 6.200 pb
- 6) S100P com 299 pb

4.6 Preparação das células de empacotamento Fibroblastos GP+E86

4.6.1 Transfecção Transiente e Infecção permanente

As células de empacotamento GP+E86 foram transfectadas com o vetor pLS100PSN-anti-sense e pelo vetor vazio pLXS pela técnica da coprecipitação com cloreto de cálcio. O sobrenadante, contendo as partículas virais, foi coletado após 48 horas do início da transfecção e utilizado para infecção das células anfotróficas GP+env+Am12. O restante do meio com partículas virais foi imediatamente congelado.

A seleção dos clones positivos foi realizada com o antibiótico G418 durante 12 dias.

Conseguimos isolar 11 clones positivos Am12LS100PSN-anti-sense e 4 clones Am12LXS. As células não apresentaram nenhuma alteração fenotípica durante ou após o término da seleção.

4.7 Título viral apresentado pelas células anfotróficas para os clones

Am12LS100PSN–anti-sense

Para testarmos a capacidade de infecção das partículas virais presentes no sobrenadante dos 11 clones Am12LS100PSN–anti-sense foi realizada a cultura de fibroblastos da linhagem de camundongos NIH-3T3, seguida de infecção pelas partículas virais e seleção das células infectadas com o antibiótico G-418, por 12 dias. Após a seleção, as placas foram coradas com o corante não vital Rodamina B (Fig. 4.7) e as colônias foram contadas e os valores expressos em unidade de formação de colônia por mL (ufc/mL).



Figura 4.7 Clone Am12LS100PSN-anti-sense-6 corado com Rodamina B

Conforme pode ser analisado na Tabela 4.1, todos os clones apresentaram títulos iguais ou superiores a 10^4 ufc/mL. Sendo que 7 dos 11 clones anti-sense (64%) apresentaram valores entre $1,2$ e $1,8 \times 10^5$ ufc/mL, titulação considerada boa para esse tipo de vetor e coerente com valores encontrados na literatura (Bellini, M.H. 2001; Mathor, M.B. 1994). Os clones com maior poder de infecção, ou seja, com o maior título viral foram escolhidos para infecção das células tumorais mamárias T47D.

Tabela 4.1 Título viral apresentado pelas células anfotróficas Am12LS100PSN-Anti-sense

Clone	Título (ufc/mL)
1	$1,5 \times 10^5$
2	$1,4 \times 10^5$
3	$1,6 \times 10^5$
4	$1,6 \times 10^5$
5	$1,5 \times 10^5$
6	$1,8 \times 10^5$
7	$0,7 \times 10^5$
8	$1,2 \times 10^5$
9	$0,9 \times 10^5$
10	$0,8 \times 10^5$
11	$0,5 \times 10^5$

Para serem utilizados como controle positivo, foram infectadas células NIH-3T3 com clones Am12LXSN, seguindo-se os mesmos padrões da infecção dos clones Am12LS100PSN-anti-sense. Conforme demonstrado na Tabela 4.2, todos os clones apresentaram títulos iguais ou superiores a 10^4 ufc/mL .

Tabela 4.2 Título viral apresentado pelas células anfotróficas Am12LXSN

Clone	Título (ufc/mL)
1	$1,7 \times 10^5$
2	$0,7 \times 10^5$
3	$0,3 \times 10^5$
4	$0,5 \times 10^4$

4.8 Cultura de células de carcinoma ductal mamário T47D

As células T47D demonstraram ser de difícil cultura e tripsinização, permanecendo muito aderidas às placas e formando grumos ao se soltarem o que exigiu maior tempo para padronização das técnicas de cultura. Seu crescimento foi lento e para melhorá-lo foram adicionadas 0,2UI de insulina (Willard, S.T. e cols. 1997). Após o domínio das técnicas de cultura e manutenção, as células foram utilizadas em nosso trabalho.

Na figura 4.8, podemos visualizar uma placa com células T47D após 12 dias de cultura.

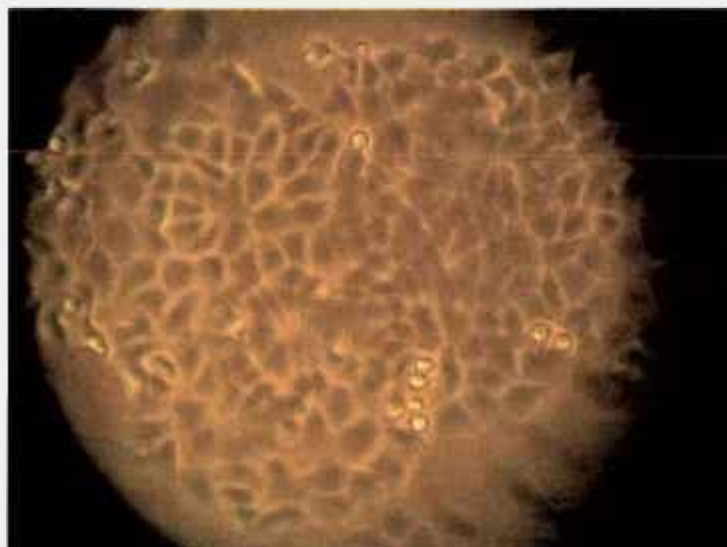


Figura 4.8 Célula T47D em cultura.

4.9 Infecção das células de carcinoma mamário T47D

Para a infecção das células de carcinoma mamário humano T47D, foram escolhidos três clones das células de empacotamento AM12LS100PSN-anti-sense, dentre os quais estão os que obtiveram os maiores títulos, que foram os clones 1, 4 e 8 com $1,5 \times 10^5$, $1,6 \times 10^5$ e $1,2 \times 10^5$ células respectivamente e o clone controle Am12LXSN 4 que apresentou um título de $0,5 \times 10^4$ células infectadas. A infecção retroviral ocorreu na presença de polibreno que age tornando a membrana mais permeável. (Mathor, M.B. 1994).

Este ensaio foi realizado com duas concentrações diferentes de células, foram semeadas 1×10^5 células e 5×10^4 células de cada clone em duplicata. Utilizamos duas concentrações celulares diferentes para avaliar o

rendimento da infecção. Porém não obtivemos diferença significativa entre as duas concentrações. Em todas as placas obtivemos a formação de clones após a seleção com G418.

Na Fig. 4.9 podemos observar uma placa com células T47D transduzidas onde após um período de 7 dias de seleção as colônias se formaram normalmente e não apresentaram nenhuma alteração morfológica, este padrão se manteve estável até o final do último ensaio celular. A placa que havia recebido apenas células T47D sem vetor, que serviu como controle de seleção, não continha mais nenhuma célula viva após os 12 dias de seleção com G418 (Fig. 4.10). Estas células passaram a ser denominadas T47DLS100PSN-A/S e T47DLXSN.



Figura 4.9 Célula T47D infectada com o Clone Am12LS100PSN anti-sense/4, 7 dias após o início da seleção com G418

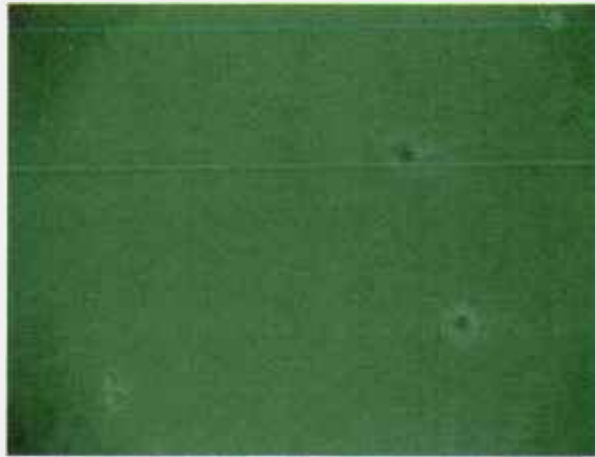


Figura 4.10 Células T47D sem vetor LXSN, após 7 dias de seleção com o antibiótico G-418.

4.10 Obtenção de RNA

4.10.1 Extração de RNA dos clones T47DLS100PSN-A/S e T47DLXSN

A extração de RNA foi realizada segundo protocolo descrito por Chomczynski e Sacchi (1987). Devido a rápida degradação do RNA, foram tomadas todas as precauções em relação à degradação do mesmo.

Como reagente foi escolhido o Trizol[®], finalizando-se a extração com o volume de 50 μ L.

Para garantirmos um resultado mais acurado, o RNA foi quantificado em espectrofotômetro de capilar a uma leitura DO de 260nm e o resultado final após cálculo de $40 \times DO_{260}$ foi expresso em μ g/mL e está discriminado na tabela 4.3.

Para avaliar o grau de pureza das amostras realizamos também a leitura da DO_{280} e obtivemos em todos os casos uma razão $\geq 1,7$ portanto estando de acordo com os padrões de uso e qualidade de RNA (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 Rendimento da extração de RNA total de células T47D após o processo de extração com trizol.

Clone T47DLS100PSN-A/S	Quantificação de RNA OD ₂₆₀	Razão
T47DLS100PSN-A/S 1	1.030 µg/mL	1,85
T47DLS100PSN-A/S 4	600 µg/mL	1,91
T47DLS100PSN-A/S 8	496 µg/mL	1,70
T47DLXSN	1.500 µg/mL	1,91

4.10.2 Eletroforese para avaliar a qualidade do RNA

Para avaliar a pureza e a integridade do RNA extraído das células foi realizada eletroforese em gel de agarose com MOPS e formaldeído (Fig. 4.11).

Como o RNA tem a tendência a formar estruturas secundárias e terciárias, que poderiam impedir a separação por eletroforese e a adequada análise, foi realizada a desnaturação preliminar do RNA, tanto no gel com o auxílio do formaldeído, como por aquecimento pré eletroforese.

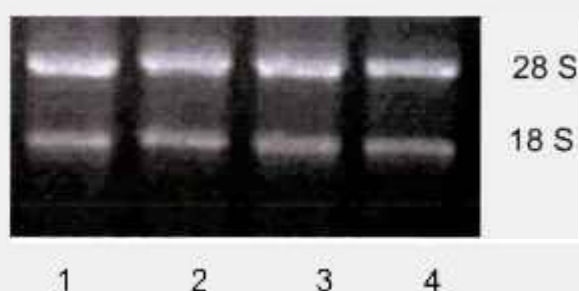


Figura 4.11 Gel de agarose com MOPS apresentando as subunidades ribossomais 28S e 18S e demonstrando a integridade e a excelente qualidade do RNA extraído

- 1) T47DLXSN
- 2) T47DLS100PSN-A/S 1
- 3) T47DLS100PSN-A/S 4
- 4) T47DLS100PSN-A/S 8

4.11 Amplificação e quantificação do cDNA

4.11.1 Reação em cadeia da Polimerase em tempo real

A técnica da Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) tem demonstrado grande eficiência para avaliar a expressão gênica e quantificar o cDNA.

Após a transcrição para cDNA, realizamos vários ensaios para padronizar as condições ideais de temperatura de anelamento, que ficou estabelecida em 55°C, quantidade de ciclos (40), quantidade de cDNA (2µg) e escolha do gene endógeno para controle interno.

Utilizamos primeiramente o GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) como gene endógeno para validar o ensaio (Wilkening, S. e Bader, A., 2004), porém este não foi adequado para as nossas condições, demonstrando muita variação entre ensaios.

Escolhemos então a ciclofilina A como gene endógeno (Peinnequin, A. e cols, 2004), esta escolha se baseou em referências da literatura e se mostrou muito mais apropriada para o nosso estudo.

Os dados para a análise foram obtidos pelo próprio programa do termociclador, SDS versão 1.9 (Applied Biosystems), que gerou tabelas com os valores relativos de cada limiar, ou seja, um ponto pré-estabelecido na fase linear da curva de expressão que representa a melhor emissão de fluorescência. Estes dados foram exportados para uma tabela Excel (Microsoft) e então analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e apresentados na forma de tabela (Peinnequin, A. e cols., 2004; Peirson, S.N, e cols., 2003; Yang, J. e cols., 2004).

A figura 4.12 mostra o padrão de expressão do gene da ciclofilina A em todos os clones. As curvas são resultantes de um dos ensaios realizados e que nos forneceram parte dos dados para posterior análise estatística. Todas as amostras foram amplificadas em triplicata, sendo que as amplificações das triplicatas foram muito similares, o desvio padrão não ultrapassou 0,35 em nenhuma amostra.

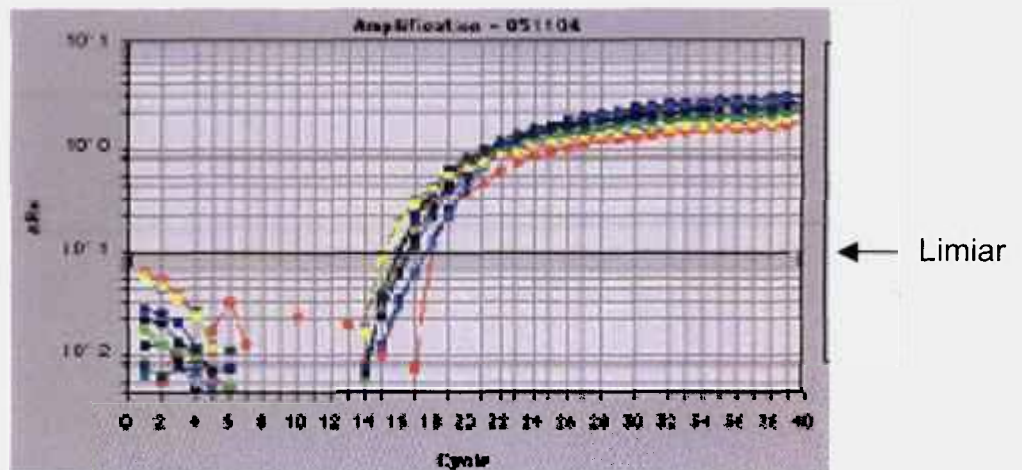


Figura 4.12 Gráfico obtido em um dos ensaios de PCR em tempo real apresentando o padrão de expressão da ciclofilina A em todos os clones.

Na figura 4.13 podemos visualizar o padrão de expressão do gene da S100P do mesmo ensaio mostrado na figura anterior, com todos os clones e todas as amostras em triplicata.

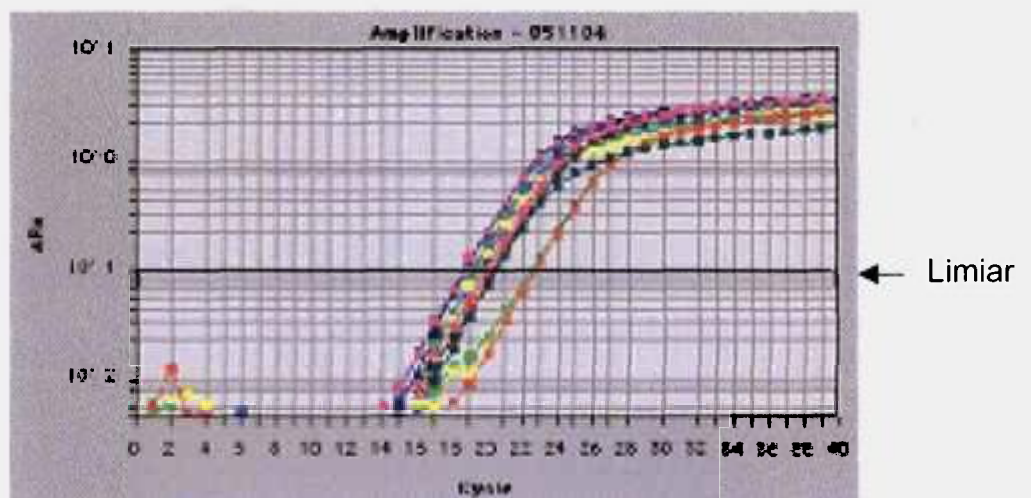


Figura 4.13 Gráfico obtido em um dos ensaios de PCR em tempo real apresentando o padrão de expressão da S100P em todas as amostras em triplicata.

Nas figuras 4.14 e 4.15 apresentamos apenas as curvas de expressão do clone T47D-LXSN e do clone T47D-LS100PSN-A/S 4 respectivamente mostrando as expressões da S100P e do gene endógeno da ciclofilina A.

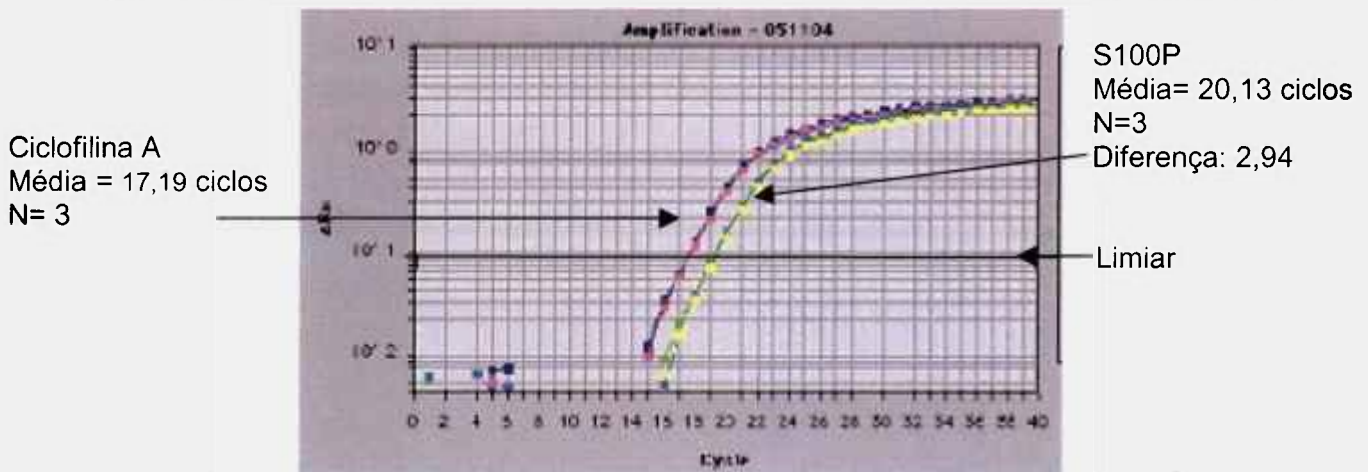


Figura 4.14 Gráfico obtido em um dos ensaios de PCR em tempo real apresentando o padrão de expressão das células T47D-LXSN para o gene endógeno e para o gene da S100P.

As curvas de cor azul marinho, azul claro e rosa correspondem ao primer da ciclofilina A. As outras correspondem ao primer da S100P

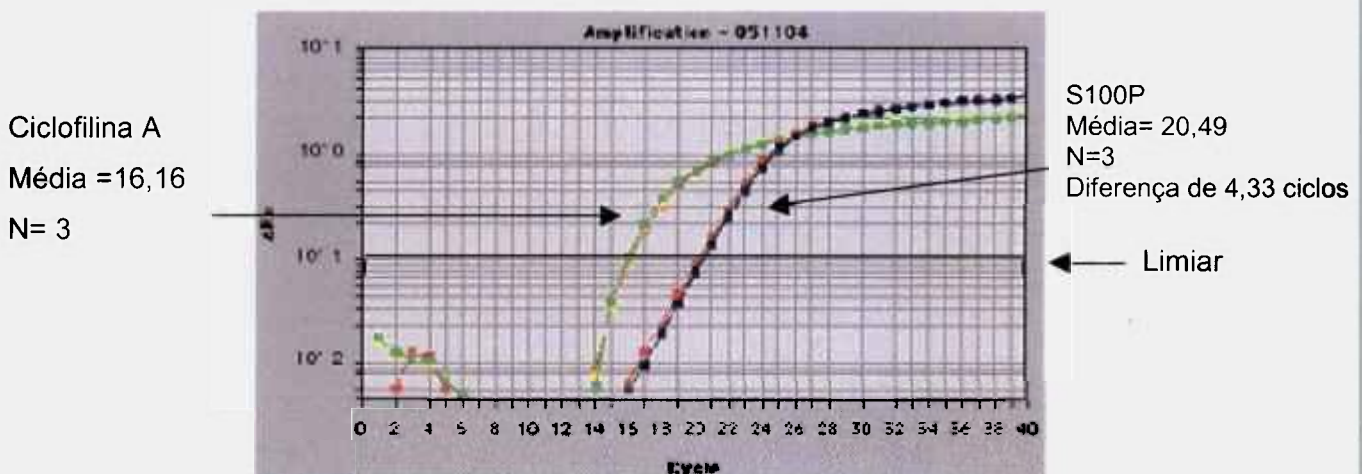


Figura 4.15 Gráfico de PCR em tempo real apresentando a expressão do Clone T47DLS100PSN-A/S 4

Curvas: verde, amarelo e vermelho: primer ciclofilina A

Curvas: preto, vermelho e azul: primer S100P

Levando em consideração o limiar admitido para as curvas de expressão, obtivemos os valores de ciclos (CT). Notamos que houve uma diferença de expressão entre os dois genes de 2,94 ciclos no clone controle T47D-LXSN e esta diferença subiu para 4,33 ciclos no clone T47DLS100PSN-A/S 4. Estes

valores foram exportados para uma tabela e analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que gerou os dados finais apresentados na tabela 4.4.

Este cálculo é sugerido pelo fabricante do aparelho de PCR em tempo real e foi o escolhido por diversos autores. Segue o seguinte princípio: os níveis relativos de expressão do gene alvo são comparados aos do gene endógeno e calculados como $2^{-\Delta Ct}$, onde $\Delta Ct = \text{médias dos CT's da S100P} - \text{médias dos CT's da ciclofilina A}$. A razão da expressão do clone T47DLS100PSN-A/S 4 em relação a expressão do clone controle T47DLXSN foi então calculado como $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{T47DLS100PSN-A/S\ 4} - \Delta Ct_{T47DLXSN}$ (Yang, J. e cols. 2004).

Tabela 4.4 Relação de expressão adquirida a partir das médias dos CT's.

Amostras	S100P média	Ciclofilina A	ΔCt *	$\Delta\Delta Ct$ **	Relação $2^{-\Delta\Delta Ct}$
	CT \pm erro padrão	média CT \pm erro padrão			
T47D-LXSN	20,05 \pm 0,19	17,13 \pm 0,21	2,92 \pm 0,28	0,00 \pm 0,28	1,00
T47D-A/S-4	20,57 \pm 0,20	16,23 \pm 0,13	4,34 \pm 0,23	1,42 \pm 0,23	0,37

* $\Delta Ct = \text{médias dos CT's da S100P} - \text{médias dos CT's da ciclofilina A}$

** $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (T47D-A/S-4) - \Delta Ct \text{ da } T47D-LXSN \text{ (controle)}$

valores expressos em ciclos

Nesta tabela estão os resultados dos clones T47DLS100P-A/S 4 e T47D-LXSN. Esses valores correspondem a dois ensaios independentes realizados em triplicata, totalizando um n=6. Podemos observar que o clone T47DLS100P-A/S 4 apresentou apenas 37% da expressão da S100P em comparação com o T47D-LXSN. Nos clones T47DLS100P-A/S 1 e 8 não houve alteração significativa da expressão desse gene.

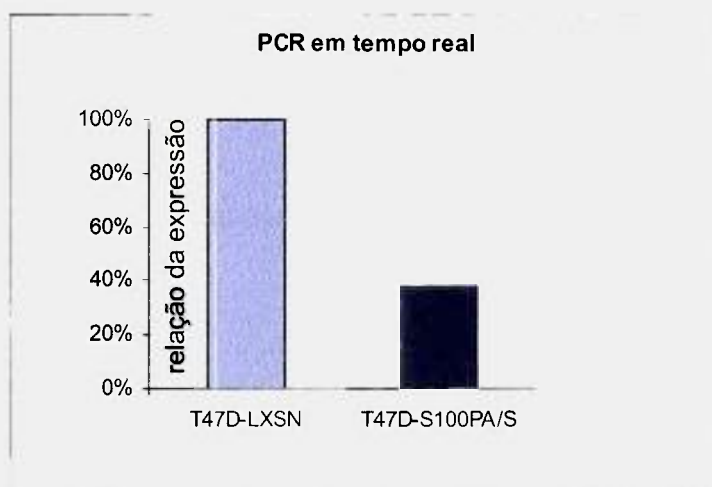


Figura 4.16 Gráfico demonstrando a relação de expressão obtida em PCR em tempo real.

Células T47D-LXSN e T47DLXSN-A/S 4. Os resultados foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Resultados analisados pelo teste “t” demonstraram que a diferença foi significativa $P < 0,001$. Os resultados apresentados são médias \pm EP.

Neste histograma consideramos a expressão do clone T47D-LXSN como sendo 100% e a expressão do clone T47D-LS100P-A/S 4 sendo relativa a este controle. Podemos visualizar a significativa diminuição da expressão do gene da S100P. As células transduzidas com o anti-sense apresentaram um decréscimo da expressão de 63% em relação à expressão das células T47D controle.

4.11.2 Gel de agarose para confirmação do produto de PCR em tempo real

Após a realização do PCR em tempo real foi preparado um gel de agarose 1,5% e todas as amostras foram submetidas a eletroforese para confirmar a integridade do produto do PCR em tempo real (Figura 4.17).

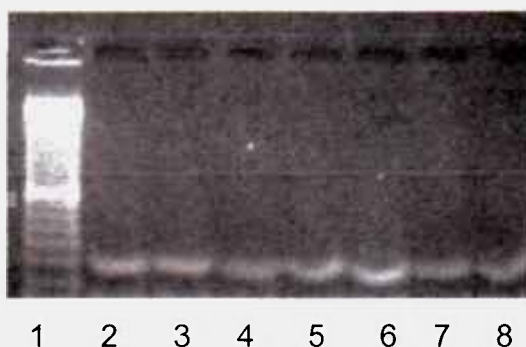


Figura 4.17 Gel de agarose 1,5% com produto do PCR em tempo real.

- 1) Marcador de peso molecular 100bp
- 2) T47D-LXSN
- 3) T47D-LS100P-A/S 1
- 4) T47D-LS100P-A/S 1
- 5) T47D-LS100P-A/S 4
- 6) T47D-LS100P-A/S 4
- 7) T47D-LS100P-A/S 8
- 8) T47D-LS100P-A/S 8

4.12 Microscopia confocal

A microscopia confocal foi utilizada neste trabalho para avaliação da eficácia da técnica anti-sense em relação à expressão protéica. Ou seja, avaliar se um decréscimo de 63% na expressão do clone T47DLS100PSN-A/S 4 seria o suficiente para demonstrar uma alteração na concentração protéica celular.

As células foram marcadas com o anticorpo da S100P, que na micrografia podemos localizar emitindo fluorescência na coloração esverdeada, e com o marcador DAPI que marca o núcleo celular com uma coloração azulada.

Na Figura 4.18 podemos observar o clone T47DLS100PSN-A/S 4 representado nas imagens B, D e F com uma marcação do anticorpo da S100P bem menos pronunciada em relação as células controle T47DLXSN Fig. 4.18 A, C e E sinalizando uma redução da concentração de proteína S100P celular no clone transduzido com o anti-sense dessa proteína.

O ensaio foi repetido três vezes, em triplicata finalizando com um $n=9$, com dupla marcação.

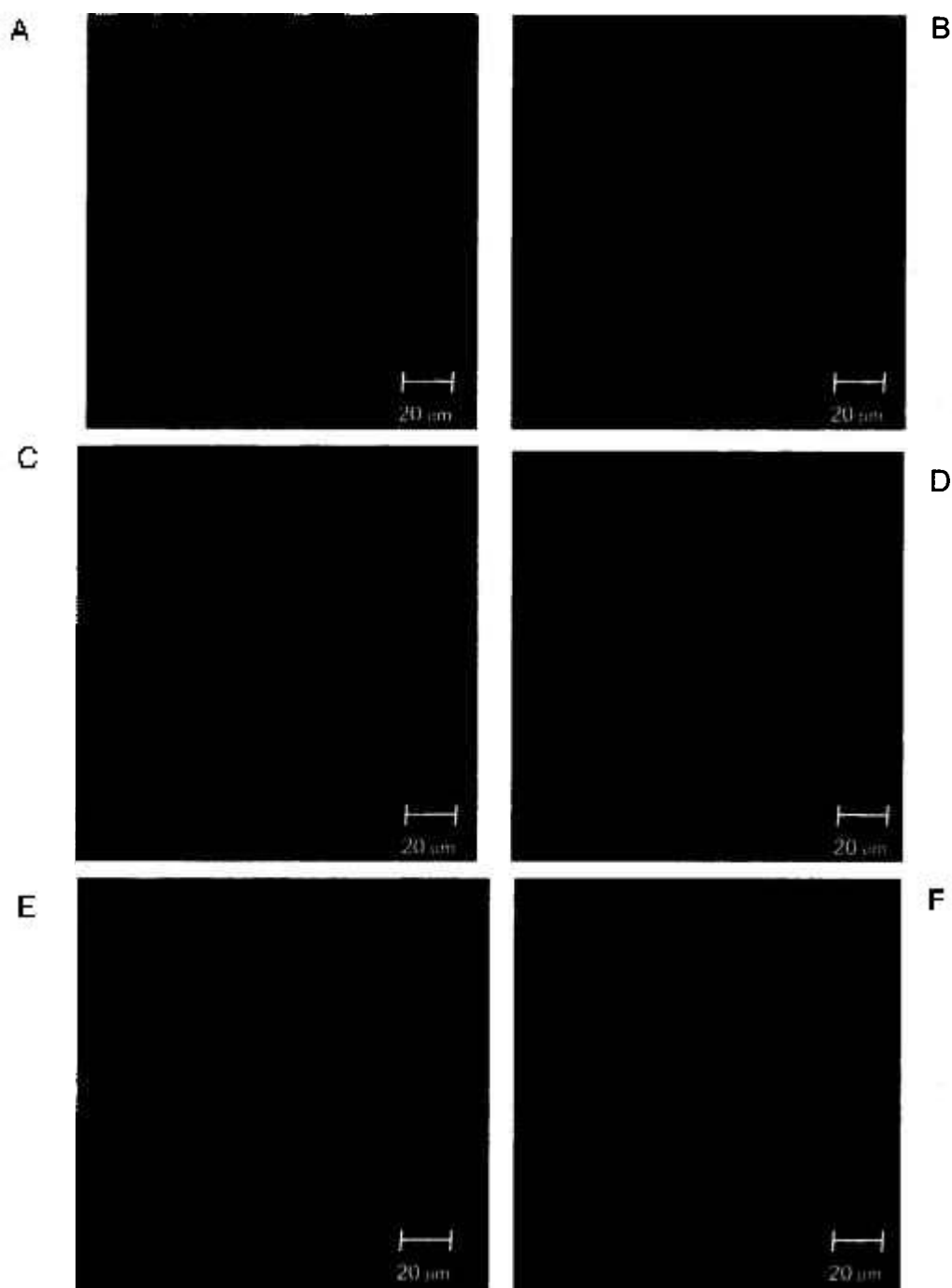


Figura 4.18 A, C e E Micrografia confocal do clone T47DLXSN e **B, D e F** do clone T47D-LXSN-A/S 4 com dupla marcação: S100P em verde e DAPI em azul, mostrando a imunolocalização intracelular da proteína S100P. Nas imagens **E e F** podemos visualizar a colocalização da marcação (S100P e DAPI).

Analisando as imagens notamos uma diminuição muito acentuada no tamanho nuclear entre as células transduzidas e as controle. Realizamos então um ensaio histométrico, utilizando o programa Image Lab 2000 para calcular o

tamanho dos núcleos nas duas amostras. Com uma amostragem de 69 células de cada grupo obtivemos uma diminuição, da média, de 65% do volume nuclear nas células transduzidas. Este ensaio será repetido, porém já demonstra uma alteração muito importante.

4.13 Ensaio de citometria de fluxo

Para analisarmos se haveria alguma alteração nas fases do ciclo celular, principalmente visando a fase S do mesmo, realizamos o ensaio de citometria de fluxo. As determinações do conteúdo de DNA nuclear por citometria de fluxo são obtidas por comparação com um padrão que no nosso caso foram as células T47D sem a marcação com o fluoróculo de escolha.

As células foram coradas com um fluoróculo que se liga especificamente e estequiometricamente ao DNA. Em nossos ensaios escolhemos o Iodeto de Propídeo (IP) para corar a dupla fita de DNA, pois segundo Crissman e cols.1976, o IP em comparação ao Brometo de Etídeo (BE), outro fluoróculo utilizado para esta técnica, produz histogramas com Coeficientes de variação ligeiramente inferiores aos obtidos com BE. Hoje em dia, o IP é o corante intercalar mais usado em estimativas do conteúdo em DNA nuclear. Como este corante também se liga à cadeia dupla de RNA, a precisão das determinações do conteúdo de DNA utilizando este corante depende da destruição do RNA por Rnases (Price,H. e Johnston, J. 1996).

O conteúdo do DNA foi analisado pela fluorescência 2 (FL2A) área versus a largura de FL2 (FL2-W), que permite excluir agregados de duas ou mais células que poderiam proporcionar uma super estimação da fração de células em G2/M (Wu,W.B e cols. 2003). As porcentagens das células nas fases GO/G1, S e G2/M foram determinadas com o auxílio do programa ModFit LT (Verity Software House Inc., Topsham, ME, USA).

Na Fig. 4.19 mostramos um gráfico de um dos ensaios realizado com o clone controle T47DLXSN demonstrando o padrão de distribuição de células, no nosso controle, nas diferentes fases do ciclo celular. A fig. 4.20 mostra o padrão de distribuição nas diferentes fases do ciclo celular do clone transfectado.

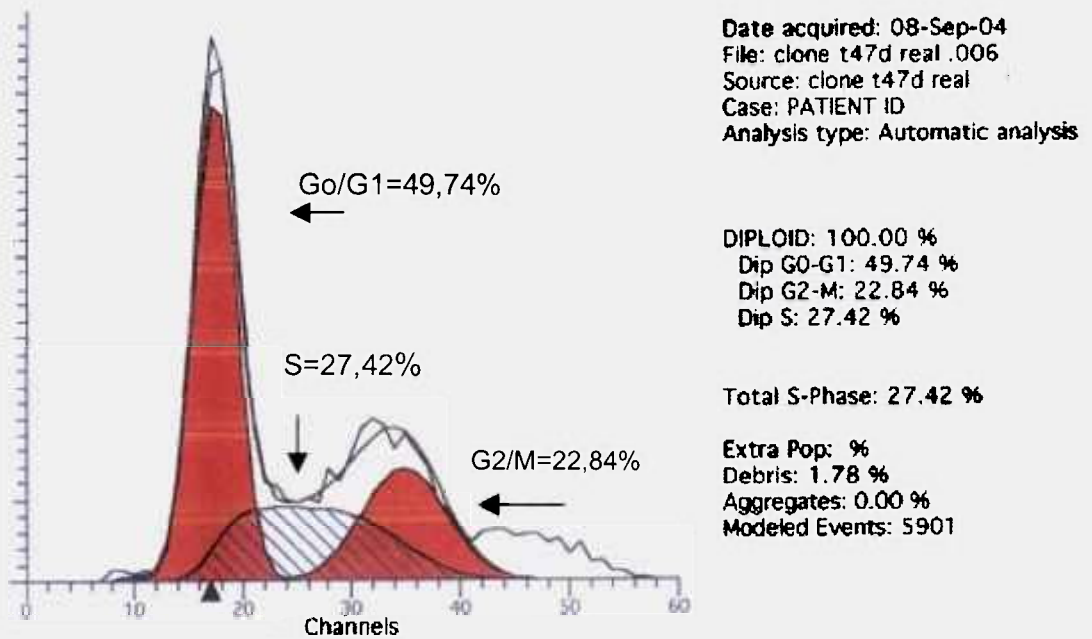


Figura 4.19 Gráfico gerado pelo programa ModFit com a representação das fases do ciclo celular do clone T47DLXSN de acordo com a quantidade de DNA marcado.

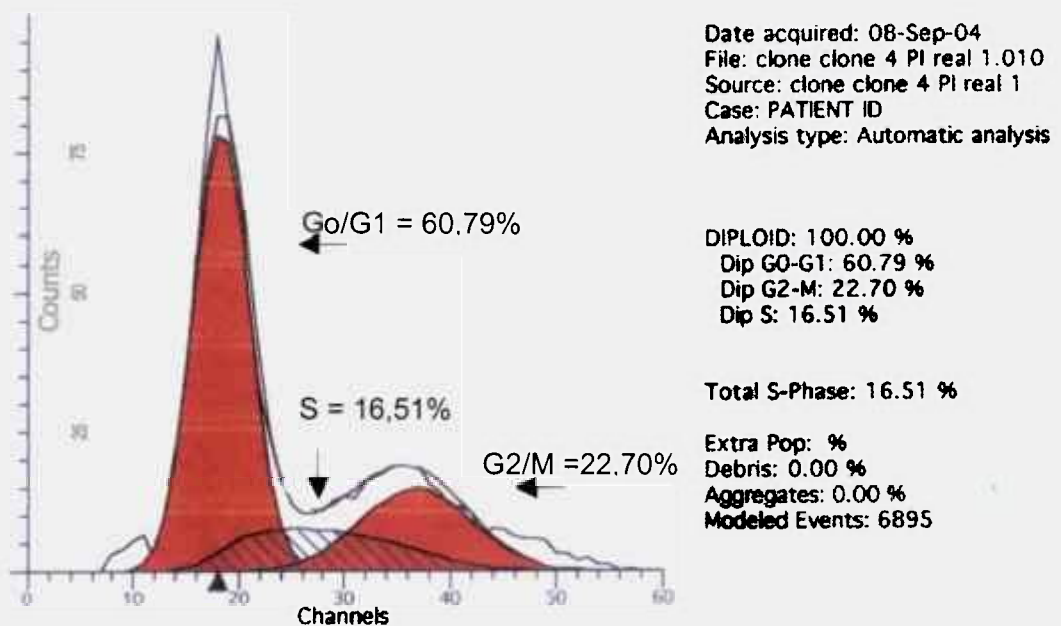


Figura 4.20 Gráfico gerado pelo programa ModFit com a representação das fases do ciclo celular do clone T47DLS100PSN-A/S 4 de acordo com a quantidade de DNA marcado.

Na tabela 4.5 podemos observar os resultados das médias de quatro ensaios com células T47DLXSN usadas como controle e das células T47DLS100PSN-A/S 4.

Tabela 4.5 Distribuição das células no ciclo celular, valores estão expressos em porcentagem e correspondem à média e erro padrão dos resultados de 4 ensaios em duplicata.

CITOMETRIA DE FLUXO - Média \pm erro padrão			
S100P	G0-G1	Fase S	G2-M
T47D-LXSN	54,07 \pm 2,17	34,04 \pm 3,17	11,89 \pm 3,47
T47D-A/S 4	57,73 \pm 1,25	26,40 \pm 3,35	13,26 \pm 3,67

As análises estatísticas foram realizadas para comparar o perfil do ciclo celular das células T47DLXSN e T47DLS100PSN-A/S clone 4. O programa ModFit especializado em ciclo celular analisa as seguintes fases: Go/G1, S e G2/M.

O grupo controle apresentou 34,04 % das células na fase S e o grupo das células com anti-sense da S100P apresentou uma média de 26,40% das células na mesma fase do ciclo celular. Houve, portanto uma redução de 23% de células na fase S entre o grupo de células controle e das que receberam o vetor retroviral com anti-sense. Aplicando o teste “t” de Fisher nos valores apresentados pelos dois clones, observamos que tanto na fase S como na fase G0-G1 houve diferença significativa $P < 0,01$.

Na figura 4.21 representamos graficamente a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular.

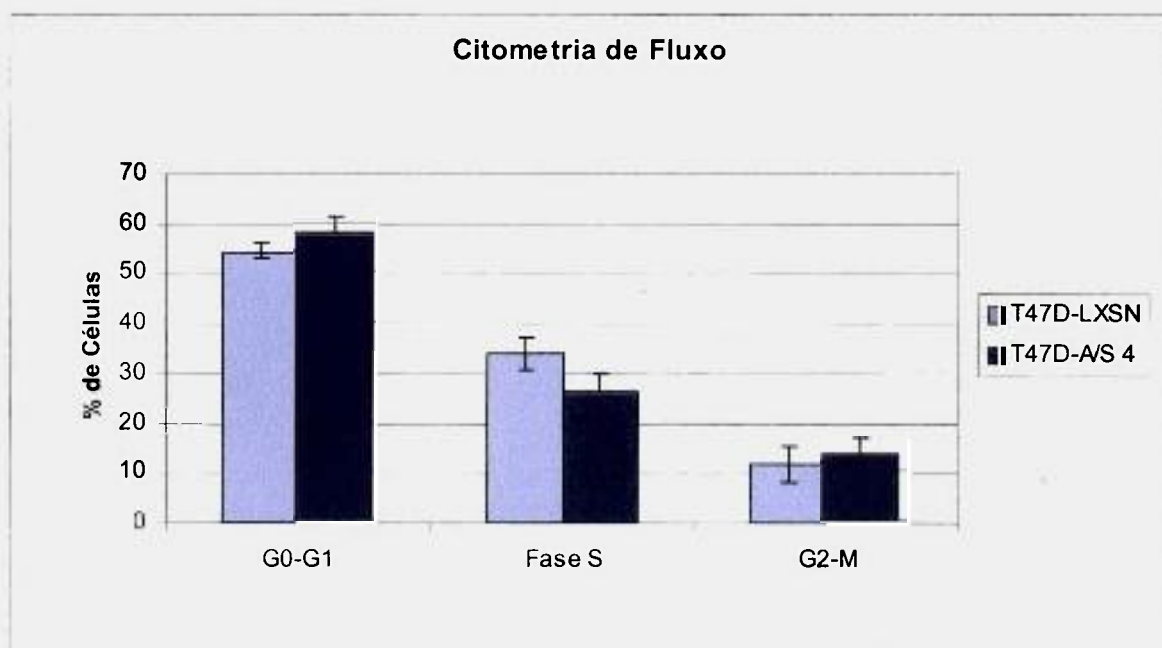


Figura 4.21 Histograma demonstrando a distribuição de fases de ciclo celular das células T47D-LXSN e do clone T47D-LXSN-A/S 4. Resultados expressos como média \pm EP

5 DISCUSSÃO

O Câncer representa um grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, e sua incidência vem aumentando vertiginosamente no mundo. Dentre os diversos tipos de câncer, o de mama está entre os que causam maior preocupação.

A Organização Mundial da Saúde estima que, por ano, ocorram mais de 1.050.000 de casos novos de câncer de mama em todo o mundo, o que o torna o mais comum entre as mulheres. No Brasil, não tem sido diferente. Informações processadas pelos registros de Câncer de Base Populacional, disponíveis para 16 cidades brasileiras, mostram que na década de 90, este foi o câncer mais freqüente no país. As maiores taxas de incidência foram observadas em São Paulo, no Distrito Federal e em Porto Alegre (INCA, 2005).

Além disso, o câncer de mama constitui-se na primeira causa de morte por câncer entre as mulheres, registrando-se uma variação percentual relativa de mais de 80% em pouco mais de duas décadas: a taxa de mortalidade padronizada por idade, para 100.000 mulheres, aumentou de 5,77 em 1979, para 9,74 em 2000 (Ministério da Saúde, 2002).

Segundo estimativas do INCA, no Brasil para o ano de 2005 ocorrerão 467.440 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes serão os de pele não melanoma (56 mil), os de próstata (46 mil) e do pulmão (17 mil) no sexo masculino e de pele não melanoma (57 mil), de mama (49 mil) e colo de útero (21 mil) para o sexo feminino, acompanhando a mesma magnitude observada no mundo (INCA, 2005).

A detecção precoce é extremamente importante para reduzir a mortalidade por câncer de mama e por isso o auto-exame e a mamografia são altamente recomendados pela Sociedade Americana de Câncer e pelo Instituto Nacional do Câncer. Os benefícios da detecção precoce ficam muito claros quando analisamos as taxas de sobrevivência de mulheres diagnosticadas com

câncer de mama: para um tumor localizado, a taxa de cura é de 90% se precocemente diagnosticado, esta taxa baixa para 70% nos casos de linfonodos positivos e chega a menos de 20% nos casos de metástases. Por isso também a incessante busca por novos marcadores do início da doença.

Acredita-se que entre 90-95% dos cânceres de mama sejam esporádicos e decorram de mutações somáticas que se verificam durante a vida, e que 5-10% sejam hereditários (familiares) devido à herança de uma mutação germinativa que confere maior suscetibilidade ao desenvolvimento de um câncer de mama (Bilimoria, M. M., 1995).

Os cânceres de mama desenvolvem-se como resultado de mutações em vários oncogenes e genes supressores tumorais. Aproximadamente 5-10% dos cânceres de mama são herdados como resultado de mutações nos genes supressores de tumor BRCA1 e BRCA2. Mulheres que herdaram um alelo BRCA1 mutante têm uma probabilidade de 60% de desenvolver câncer de mama em torno dos 50 anos. Já os casos esporádicos podem apresentar mutações em vários outros genes como *erbB-2*, *c-myc*, *p53* e *Rb*. O gene *erbB-2*, que codifica um receptor proteína-tirosina quinase é amplificado e expresso em níveis altos em cerca de 30% dos cânceres de mama.

Como a superexpressão da proteína S100P em células de tumor de mama foi associada a imortalização dessas células *in vitro* e a progressão tumoral *in vivo* (Da Silva e cols. 2000), decidimos avaliar, se uma redução dessa expressão poderia refletir de alguma maneira no desenvolvimento destas células.

Apesar das evidências de que a S100P está presente em uma variedade de cânceres e tem relação com a transformação celular, permanece obscuro o efeito que esta causa sobre a função celular (Arumugam, T. e cols. 2004). As proteínas da família S100 tem sido objeto de vários estudos *in vitro* assim como *in vivo* nos últimos anos, que avaliam suas diversas funções intracelulares e extracelulares em situações tanto normais, como patológicas. Porém, ainda existem inúmeras dúvidas sobre sua função e interação celular. Para proporcionar uma base sólida para futuros estudos funcionais, são necessários ainda muitos trabalhos envolvendo estudos clínicos e terapêuticos, até se conseguir uma total compreensão sobre a complexidade biológica dessa proteína.

Escolhemos a linhagem de células de carcinoma intraductal mamário T47D para receber o vetor retroviral com a construção no sentido anti-sense da proteína S100P, pois trata-se de uma linhagem celular que apresenta alta expressão da proteína S100P (Da Silva, I. d. C. G. e cols., 2000).

Estas células se mostraram de difícil manuseio, formando colônias que se aderiram muito às placas, o que dificultou bastante a tripsinização. Porém, este projeto nos forneceu o domínio na manipulação de células tumorais além do conhecimento de técnicas analíticas refinadas.

Para realizarmos este estudo, escolhemos a técnica de anti-sense gene, introduzindo toda a seqüência do gene em sentido contrário no vetor. Essa técnica foi escolhida como possível fator de redução de expressão do gene (Quan, S. e cols, 2001). Optamos pela abordagem de anti-sense gene por considerarmos mais segura, sendo a ligação altamente específica e por ser mais econômica e portanto a opção mais viável para iniciar este projeto.

Quan e colaboradores (2001), utilizaram a técnica de anti-sense para avaliar se a superexpressão, assim como a baixa expressão, do gene da heme oxigenase humana I (HO-I) poderiam ser controladas durante um longo período, baseados na introdução deste gene nos sentidos sense e anti-sense. Os resultados demonstraram que células endoteliais transduzidas com o retrovírus contendo o HO-I no sentido anti-sense apresentavam uma diminuição nos níveis de proteína de HO-I de 55% e 45%. Esses resultados foram adquiridos de células tratadas e não tratadas com heme respectivamente.

Em um outro estudo realizado por Annab e colaboradores em 2000 e que também valeu-se da técnica de anti-sense gene e do vetor retroviral pLXSN, os resultados foram igualmente positivos. Annab tinha como objetivo testar a hipótese de que o gene BRCA1 desempenha um importante papel na regulação da morte de células de tumor de ovário, bem como na inibição da proliferação de células ovarianas. Para tal construiu um vetor retroviral com o gene da BRCA1 em sentido anti-sense e infectou células BG-1 (células de adenocarcinoma ovariano) dependentes de estrógeno. Os resultados demonstraram uma diminuição tanto dos níveis de RNA como de proteína de BRCA-1 nas células BG-1.

Utilizamos o vetor pLXSN como método de transferência gênica, pois esse vetor é altamente eficiente e integrativo. O trabalho realizado por Bellini e cols. em 2003, demonstrou a alta eficiência do vetor retroviral pLXSN na

transdução de queratinócitos humanos primários. A produção de hGH, *in vitro*, foi de $4\mu\text{g}/10^6$ cél. dia em células não selecionadas e $7,7\mu\text{g}/10^6$ cél. dia em células selecionadas com 0,6 mg/mL de geneticina.

Em nosso trabalho obtivemos igualmente uma alta eficiência desse vetor. Os títulos virais apresentados pelas células anfotróficas para os clones com o gene anti-sense assim como para o vetor vazio estiveram todos condizentes com os valores apresentados pela literatura. O vetor retroviral LS100PSN apresentou um título máximo de $1,8 \times 10^5$ UFC/mL, resultado que está perfeitamente em concordância com a literatura.

O resultado da transdução de células de carcinoma mamário também foi altamente eficiente, e não obtivemos nenhuma alteração fenotípica nas células selecionadas após a transdução em nenhum momento do ensaio, e este padrão se manteve até o final do último ensaio. Podemos então, reafirmar a alta eficiência do vetor pLXSN para transferência gênica.

O uso da técnica da reação em cadeia da polimerase para quantificação gênica e para auxiliar em diagnósticos moleculares aumentou tanto, que atingiu um lugar de destaque na medicina diagnóstica. Seu uso inclui estudos sobre quantificação de marcadores de resistência a drogas em células tumorais, monitora respostas a quimioterapias, detecta células tumorais circulantes em pacientes com câncer, além de detectar patógenos como bactérias e vírus (Bustin, S. A., 2000) transformando-se em um equipamento essencial em laboratórios de pesquisa. A reação em cadeia de polimerase em tempo real tem levado a uma maior aceitação pela sua rapidez, especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade (Mackay, I. M., e cols, 2002).

Em nosso trabalho utilizamos esta técnica com a finalidade de quantificar a expressão do gene da S100P em células T47D normais e nas células T47D transduzidas, e para avaliarmos o uso da técnica de anti-sense em relação a expressão gênica.

Para obter o cDNA da S100P realizamos a transcrição reversa em ensaio separado da PCR. Para tal, utilizamos a enzima M-MLV-RT (Moloney murine leukaemia vírus) que segundo Bustin (2000) é considerada a melhor escolha se o objetivo do estudo for a amplificação total do gene. Utilizamos oligo-dT primers, que segundo o mesmo autor também é uma escolha muito

interessante, pois maximiza o número de moléculas de mRNA que podem ser analisadas mesmo partindo-se de uma amostra pequena de RNA.

Iniciamos este estudo utilizando o gene da GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase) como gene endógeno, porém esta escolha apesar de ter sido tomada baseada em trabalhos publicados (Wilkening, S. e Bader, A., 2004) não foi adequada para o nosso ensaio.

Outros trabalhos também discutiram a eficiência deste gene para uso como controle endógeno, segundo Thellin e cols., 1999, que sugerem que a concentração de GAPDH pode variar muito por inúmeros motivos, levando a uma significativa variação nos níveis de transcrição de GAPDH. Vale ressaltar o trabalho de Bustin (2000), que compilou vários dados da literatura de pesquisas envolvendo a metodologia de RT-PCR e, entre outros, o uso de GAPDH como controle endógeno.

Escolhemos, então, o gene da ciclofilina A como gene endógeno para validar o nosso ensaio, por ser uma proteína de expressão constante, tanto em células normais como patológicas (Peinnequin, A. e cols., 2004) o que nos inspirou muita confiança em relação aos nossos resultados.

A Ciclofilina A é uma prolina isomerase que foi descoberta graças a seu poder de ligação à droga imunossupressora Ciclosporina A (Songkai, L. e cols., 2004). Está envolvida no dobramento celular e nas interações das mesmas proteínas (Thellin, O., 1999).

Estabelecemos 40 ciclos como ideal para esta análise, pois por volta do ciclo 21 ambos os genes iniciavam a fase de aceleração negativa de crescimento da curva e após o ciclo 32 começamos a notar a estabilização do platô. Porém, como segurança, deixamos correr mais alguns ciclos.

A escolha pelo método de cálculo da quantificação foi baseada em vários trabalhos publicados (Yang, J. E cols. 2004; Peinnequin, A. e cols. 2004; Peirson, S.N. e cols. 2003), pela indicação do próprio fabricante do aparelho utilizado e na experiência de outros profissionais do laboratório. Segundo este método escolhido, faz-se a comparação da expressão entre o gene em estudo e um gene endógeno estável. A quantificação é realizada em relação ao resultado da subtração do número de ciclos atingidos pelo gene em estudo no momento do limiar (Ct) e pelo Ct do gene endógeno. Esta diferença de ciclos (Δ CT) é o que nos fornece as informações sobre a expressão gênica. O Δ CT é o exponencial da

base 2 devido a duplicação do material durante cada ciclo da PCR (Ginzinger, D. G., 2002).

Os resultados obtidos foram altamente expressivos, e pudemos observar que o clone T47D-anti-sense 4 apresentou apenas 37% da expressão da S100P em comparação com a T47D-LXSN o que significa uma diminuição da expressão de 63%.

Após tão significativa diminuição da expressão gênica resolvemos avaliar a eficácia da técnica de anti-sense também em relação a uma possível diminuição da expressão protéica. Ou seja, avaliar se um decréscimo de 63% na expressão do clone T47DLS100PSN-A/S 4 poderia levar a uma alteração da concentração protéica celular.

Para tal avaliação lançamos mão da técnica de imunofluorescência com análise das imagens por microscopia confocal. Realizamos uma dupla marcação utilizando um marcador nuclear (DAPI) e o anticorpo específico da S100P.

Além de analisarmos a expressão protéica, observamos a localização intra-celular dessa proteína em células de carcinoma mamário. Baseados nas descrições sobre as localizações de outros membros da família S100, como S100A1, S100A2, S100A4 e S100A6, que foram bem descritos por Mandinova, A. e cols., em 1998, cada membro da família S100 demonstra ter diferente localização intracelular. A S100A6 foi localizada principalmente no retículo sarcoplasmático, assim como também no núcleo. As S100A1 e S100A4 foram encontradas predominantemente no citosol, onde foram fortemente associadas ao retículo sarcoplasmático e às fibras de actina.

As imagens obtidas indicam que a S100P demonstra maior afinidade ao núcleo nas células de carcinoma ductal mamário T47D. E pela diminuição da intensidade de marcação nas células que receberam o anti-sense da S100P, concluímos que há uma diminuição da expressão protéica nestas células.

Assim como a maioria dos outros membros da superfamília EF, as proteínas S100 agem principalmente no meio intracelular, porém alguns membros agem também no meio extracelular, onde atuam junto ao receptor para o produto final glicosilado ou RAGE. Assim também a S100P já foi descrita agindo no meio extracelular e provavelmente interagindo com o mesmo receptor (Arumugam, T. e cols., 2004).

Outro aspecto em relação às células transduzidas que chamou nossa atenção, foi o tamanho do núcleo destas em relação ao tamanho nuclear das células controle. Realizamos então um ensaio histométrico para compararmos o tamanho dos núcleos e realmente obtivemos um resultado muito expressivo. Analisando 69 núcleos de células transduzidas e, 69 núcleos de células controle, obtivemos uma diminuição do tamanho nuclear da grandeza de 65%. Como este resultado é muito impactante pretendemos dar seguimento a esta linha de estudos.

Para finalizar nosso projeto resolvemos realizar estudos relacionados ao ciclo celular das células T47D transduzidas e normais.

A fase S do ciclo celular é, sem dúvida, o parâmetro mais utilizado para estimar a capacidade de progressão de células tumorais. Para essa análise escolhemos a técnica de Citometria de Fluxo. Esta técnica tem se destacado como método de estudo do ciclo celular por ser uma técnica semi-automatizada, precisa, de acurácia estatística, alta reprodutibilidade, e possibilitando a análise de um grande número de amostras em um tempo curto (Rabinovitch, P.S, 1994, Oliveira, M. S. P., 1993)

Vale lembrar que não há na literatura até o presente momento um estudo definindo claramente a interação da S100P no ciclo celular. Há porém, estudos de outros membros da família S100 que agem diretamente na regulação do ciclo celular como a S100B que segundo Baudier e cols., interage com a proteína supressora tumoral p53 protegendo-a contra denaturação e agregações causadas pelo calor.

Uma vez que essa proteína apresenta 50,6% de similaridade com a S100P (Da Silva, I.D.C.G. e cols. 2000) acreditamos poder haver também alguma interação da S100P com esta ou outra proteína envolvida na manutenção do ciclo celular.

Os resultados da citometria de fluxo demonstraram que há alguma interação da proteína S100P com o ciclo celular, e mostraram que houve uma alteração significativa na porcentagem de células na fase S do ciclo celular. Se analisarmos esta fase do ciclo, veremos que houve uma diminuição de 23% de células na fase S entre o grupo de células controle e das que receberam o vetor retroviral com anti-sense, já que o grupo controle apresentou 34,04% das células em fase S e o grupo das células com anti-sense da S100P apresentou uma média

de 26,40% das células na fase S do ciclo celular. Portanto o presente estudo mostra que a redução de níveis de S100P pela técnica anti-sense em células de carcinoma ductal mamário T47D contribui para a confirmação da hipótese de que a S100P tem um significativo papel na regulação do ciclo celular.

Apoiados nos resultados obtidos neste trabalho podemos afirmar que a técnica de anti-sense realmente demonstrou ser altamente eficiente na diminuição da expressão gênica da proteína carreadora de cálcio S100P.

Acreditamos que este trabalho tenha sido o início de um grande projeto que possa colaborar com a elucidação de parte dessas questões. Os clones que foram construídos neste projeto poderão servir como objeto de novos estudos *in vivo*.

6 CONCLUSÕES

- A técnica de anti-sense foi eficaz para reduzir em 63% a expressão do gene da proteína carreadora de cálcio S100P em células de carcinoma ductal mamário T47D.
- A diminuição do número de células na fase S do ciclo celular. do clone T47D-anti-sense/4 indica, que a proteína S100P apresenta um importante papel na capacidade proliferativa das células de carcinoma ductal mamário T47D.
- O clone T47D-anti-sense 4, ao nosso ver, é um excelente modelo biológico para estudos futuros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFONSO,R.; Estudo da expressão citoplásmica bacteriana de uma forma de prolactina humana e de sua solubilização e renaturação a partir de corpos de inclusão. Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2000.

AMLER, L.C.; AGUS, D.B.; LEDUC, C.; SAPINOSO, M.L.; FOX, W.D.; KERN, S.; LEE, D.; WANG, V.; LEYSENS, M.; HIGGINS, B.; MARTIN, J.; GERALD, W.; DRACOPOLI, N.; CORDON-CARDO, C.; SCHER, H.I. and HAMPTON, G.M. Dysregulated Expression of Androgen-responsive and Nonresponsive Genes in the Androgen-independent Prostate Cancer Xenograft Model CWR22-R. **Cancer Research** 60, 6134-6141, November 1, 2000.

ANNAB, L.A.; HAWKINS, R.E.; SOLOMON, G.; CARL BARRETT, J. e AFSHARI, C.A. Increased cell survival by inhibition of BRCA1 using an antisense approach in an estrogen responsive ovarian carcinoma cell line. **Breast Cancer Res.** 2:139-148, 2000.

ARUMUGAM, T.; SIMEONE, D.; SCHMIDT, A M. and LOGSDON, C.D. S100P Stimulates Cell Proliferation and Survival via RAGE. **J. Biol. Chem.** 2004 Feb 13; 279 (7):5059-65, 2004.

AVERBOUKH, L.; LIANG, P.; KANTOFF, P.W. and PARDEE, A B.; Regulation of S100P Expression by Androgen. **The Prostate** 29:350-355, 1996.

BAGATELL, R; KHAN, O; PAINE-MURIETA, G.; TAYLOR, C.W.; AKINAGA, S. and WHITESELL, L. Destabilization of Steroid Receptors by Heat Shock Protein 90-Binding Drugs – A Ligand-independent Approach to Hormonal Therapy of Breast Cancer. **Clinical Cancer Research** Vol. 7, 2076-2084, July 2001.

BARGER, S.W.; WOLCHOK, S.R.; VAN ELDIK, L.J. Disulfide-linked S100 beta dimers and signal transduction. **Biochim. Biophys. Acta** 1160, p.105-112, 1992.

BECKER, T.; GERKE, V.; KUBE, E.; WEBER, K. S100P, a novel Ca²⁺-binding protein from human placenta. **Eur. J. Biochem.** 207, 541-547, 1992.

BEER, D.G.; KARDIA, S.L.R.; HUANG, C.C.; GIORDANO, T.J.; LEVIN, A.M.; MISEK, D.E.; LIN, L.; CHEN, G.; GHARIB, T.G.; THOMAS, D.G.; LIZYNESS, M.L.; KUICK, R.; HAYASAKA, S.; TAYLOR, J.M.G.; IANNETTONI, M.D.; ORRINGER, M.B. and HANASH, S. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. **Nature Medicine**, vol. 8 (8):816-824, 2002.

BELLINI, M.H. Hormônio de crescimento humano na circulação de camundongos anões imunodeficientes após implante de queratinócitos humanos geneticamente modificados. Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, 2001.

BELLINI, M.H.; PERONI, C.B.; BARTOLINI, P. Increases in weight of growth hormone (GH)-and immuno-deficient (lit/scid) dwarf mice following grafting of hGH secreting, primary human keratinocytes. **FASEB Journal**, v.17, n.15, p.2322-2324, 2003.

BERRIDGE, M. Elementary and global aspects of calcium signaling. **The Journal of Experimental Biology**, 200:315-319, 1997.

BIGNON, Y.J. e D'INCAN, C. Gene therapy: its present and future in dermatology. **Eur J. Dermatol.** 6:159-163, 1996.

BILMORIA, M.M. The woman at increased risk of breast cancer: evaluation and management strategies. **Cancer**, 45:263-78, 1995.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, 25, 169-193, 2000.

BYUN, J.; KIM, J.-M.; KIM, S.-H.; YIM, J.; ROBBINS, P.D.; KIM, S., A simple and rapid method for the determination of recombinant retrovirus titer by G418 selection. **Gene Ther.** 3: 1018-1020, 1996.

CHISAMORE, M. J.; AHMED, Y.; BENTREM, D.J.; CRAIG JORDAN, V; TONETTI, D.A. Novel Antitumor Effect of Estradiol in Athymic Mice Injected with a T47D Breast Cancer Cell Line Overexpressing Protein Kinase C α . **Clinical Cancer Research**, vol. 7, 3156-3165, October 2001.

CHOMCZYNSKI, P. e SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.** 162, 156, 1987.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques** 15, 532, 1993.

CMOGORAC-JURCEVIC, T.; MISSIAGLIA, E.; BLAVERI, E.; GANGESWARAN, R.; JONES, M.; TERRIS, B.; COSTELLO, E.; NEOPTOLEMOS, J.P. and LEMOINE, N.R. Molecular alterations in pancreatic carcinoma: expression profiling shows that dysregulated expression of S100 genes is highly prevalent. **J. Pathology** 201: 63-74, 2003.

COSTA, A M.M, Pesquisa de mutações na região codificadora do gene QM em pacientes com falência ovariana prematura e disgenesia gonadal pura. Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de São Paulo, 2003.

CRISSMAN H.A; OKA, M.S e STEINKAMP, J.A. Rapid staining methods for analysis of Deoxyribonucleic-acid and protein in mammalian-cells. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry** 24 (1):64-71, 1976.

D'ALESSIO, J.M. and GERARD, G.F. Second-strand cDNA synthesis with E.coli DNA polymerase I and Rnase H: the fate of information at the mRNA 5' terminus and the effect of E.coli DNA ligase. **Nucleic Acids Research**, vol. 16, number 5, 1988.

DA SILVA, I. D. C. G.; HU, Y. F.; RUSSO, I. H.; AO, X.; SALICIONI, A M.; YANG, X.; RUSSO, J. S100P calcium-binding protein overexpression is associated with immortalization of human breast epithelial cells *in vitro* and early stages of breast cancer development *in vivo*. **International Journal of oncology** 16: 231-240, 2000.

DIEDERICHS, S.; BULK, E.; STEFFEN, B.; JI, P.; TICKENBRÖCK, L.; LANG, K.; ZÄNKER, K.S; METZGER, R.; SCHNEIDER, P.M.; GERKE, V.; THOMES, M.; BERDEL, W.E.; SERVE, H. e MÜLLER-TIDOW, C. S100 Family Members and Trypsinogens are Predictors of Distant Metastasis and Survival in Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. **Cancer Res.** 64, 5564-5569, August 15, 2004.

DONATO, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. **Int. J Biochem Cell Biol.** 33, 637-68, 2001.

DONATO, R. Intracellular and Extracellular Roles of S100 Proteins. **Microscopy Research and Technique**, 60:540-551, 2003.

EMBERLEY,E.D.; ALOWAMI,S.; SNELL,L.; MURPHY,L.C. and WATSON,P.H. S100A7(psoriasin) expression is associated with aggressive features and alteration of Jab1 in ductal carcinoma *in situ* of the breast. **Breast Cancer Res.**, 6:R308-R315, 2004.

EMOTO, Y.; KOBAYASHI, R.; AKATSUDA,H. and HIDAKA, H. Purification and characterization of a new member of the S-100 protein family from human placenta. **Biochem Biophys Res. Commun** 182:1246-1253, 1992.

ENGELKAMP, D.; SCHÄFER, B. W.; ERNE, P.; and HEIZMANN, C. W. S100 α , CAPL, and CACY: Molecular Cloning and expression Analysis of Three Calcium-Binding Proteins from Human Heart. **Biochemistry**, 31, 10258-10264, 1992.

ENGELKAMP, D.; SCHÄFER, B. W.; GENEVIÈVE MATTEI, M.; ERNE, P.; and HEIZMANN, C. W. Six S100 genes are clustered on human chromosome 1q21: Identification of two genes coding for the two previously unreported calcium-binding proteins S100D and S100E. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 90, pp.6547-6551, July 1993.

GINZINGER,D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, 30, p. 503-512, 2002.

GIROLAMO, P. D. Introduction. **Microscopy Research and Technique**, 60:537-539, 2003.

GRIBENKO, A; LOPEZ, M.M.; RICHARDSON III, J. M. and MAKHATADZE, G. I. Cloning, overexpression, purification, and spectroscopic characterization of human S100P. **Protein Science**, 7:211-215, 1998.

GRIBENKO, A V.and MAKHATADZE, G. I. Oligomerization and Divalent Ion Binding properties of the S100P Protein: A Ca²⁺/Mg²⁺ -switch Model. **J. Mol. Biol.**, 283, 679-694, 1998.

HEIZMANN,C.W. The multifunctional S100 protein family. **Methods Mol. Biol.**172:69-80, 2002.

HEIZMANN, C.W. and BRAUN, K.; Calcium regulation by calcium-binding proteins in neurodegenerative disorders. Neuroscience Intelligence Unit. R. G. Landes, Austin and Springer , 1995.

HÉLÈNE, C. and TOULMÉ, J.J; Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. **Biochemica et biophysica Acta**, 1049, 99-125, 1990.

HOFFMANN, M.A.; DRURY, S.; FU, C.; QU, W.; AGUCHI, A.; LU, Y.; ÁVILA, C.; KAMBHAM, N.; BIERHAUS, A.; NAWROTH, P.; NEURATH, M.F.; SLATTERY, T.; BEACH, D.; MC CLARY, J.; NAGASHIMA, M.; MORSER, J.; STERN, D.; SCHMIDT, A.M. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. **Cell** 97, 889-901, 1999.

HSIEH, H.L; SCHÄFER, B.W.; WEIGLE, B. and HEIZMANN, C.W. S100 protein translocation in response to extracellular S100 is mediated by receptor for advanced glycation endproducts in human endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications** , 316, 949-959, 2004.

HUTTUNEN, H.; KUJA-PANULA, JUHA; SORCI, G.; AGNELETTI, A.L.; DONATO, R.; and RAUVALA, H. Coregulation of Neurite Outgrowth and Cell Survival by Amphotericin and S100 Protein through Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Activation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol.275, n.51, 22, pp. 40096-40105, 2000.

IACOBUZIO-DONAHUE, C.A.; MAITRA, A.; SHEN-ONG, G.L.; HEEK, T.VAN, ASHFAQ, R.; MEYER, R.; WALTER, K.; BERG, K.; HOLLINGSWORTH, M.A.; CAMERON, J.L.; YEO, C.J.; KERN, S.E.; GOGGINS, M. and HRUBAN, R.H. Discovery of Novel Tumor Markers of Pancreatic Cancer using Global Gene Expression Technology. **American Journal of Pathology**, vol. 160, n.4:1239-1249, 2002.

ILG, E. C.; SCHÄFER, B. W.; HEIZMANN, C. W. Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors. **Int. J. Cancer**: 68, 325-332, 1996.

Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Estimativa 2005, Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil): INCA; 2005. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2005>.

JOHNSON-THOMPSON, M.C and GUTHRIE, J. Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. **Cancer**, 88:1224-9, 2000.

KIRBY, M.S.; SAGARA, Y.; GAA, S.; INESI, G.; LEDERER WJ.; ROGERS, TB. Thapsigargin inhibits contraction and Ca²⁺ transient in cardiac cells by specific inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump. **J. Biol. Chem** 267:12545-12551, 1992.

KOLTZSCHER, M. and GERKE, V. Identification of Hydrophobic Amino Acid Residues Involved in the Formation of S100P Homodimers in Vivo. **Biochemistry**, 39, 9533-9539, 2000.

KOLTZSCHER, M.; NEUMANN, C.; KÖNIG, S. and GERKE, V. Ca²⁺-dependent Binding and Activation of Dormant Ezrin by Dimeric S100P. **Mol Biol. Cell**, 14(6):2372-2384, 2003.

KOTEWICZ, M.L., SAMPSON, C.M., D'ALESSIO, J.M. and GERARD, G.F. Isolation of cloned Moloney murine leukaemia virus reverse transcription lacking ribonuclease H activity. **Nucleic Acids Research**, vol. 16, number 1, 1988.

LEE, S.W.; TOMASETTO, C.; SWISSHELM, K.; KEYOMARSI, K. and SAGER, R. Down-regulation of a member of the S100 gene family in mammary carcinoma cells and reexpression by azadeoxytydine treatment. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol.89:2504-2508, 1992.

LONGSDON, C.D.; SIMEONE, D.M.; BINKLEY, C.; ARUMUGAN, T.; GREENSON, J. K.; GIORDANO, T.J.; MISEK, D.E.; KUICK, R. and HANASH, S. Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. **Cancer Res.**, v.63, 10, p. 2649-57, 2003.

MACKAY, A.; JONES, C.; DEXTER, T.; SILVA, R.L.A.; BULMER, K.; JONES, A.; SIMPSON, P.; HARRIS, R.A.; JT, P.S.; NEVILLE, A.M.; REIS, L.F.L.; LAKHANI, S.R and O'HARE, M.J. cDNA microarray analysis of genes associated with *ERBB2* (*HER2/neu*) overexpression in human mammary luminal epithelial cells. **Oncogene**, 22:2680-2688, 2003.

MACKAY, I.M.; ARDEN, K. and NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, vol.30, No.6, 1292-1305, 2002.

MANDINOVA, A.; ATAR, D.; SCHÄFER, B. W.; SPIESS, M.; AEBI, U. and HEIZMANN, C.W. Distinct subcellular localization of calcium binding S100 proteins in human smooth muscle cells and their relocation in response to rises in intracellular calcium. **Journal of Cell Science** 111, 2043-2054, 1998.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd ed., 1989.

MANN, R.; MULLIGAN, R.C. and BALTIMORE, D. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. **Cell** 33: 153-159, 1983.

MARENHOLZ, I.; HEIZMANN, C.W. and FRITZ, G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). **Biochemical and Biophysical Research Communications** 322, 1111-1122, 2004.

MARKOWITZ, D; GOFF, S; BANK, A. A safe packaging line for gene transfer: Separating viral genes on two different plasmids. *J. Virol.* 62:1120-1124, 1988a.

MARKOWITZ, D; GOFF, S; BANK, A. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. **J.Virol.** 167:400-406, 1988b.

MATHOR, M. B., Estudos de expressão gênica mediante utilização de queratinócitos humanos normais transduzidos com o gene do hormônio de crescimento humano. "Possível utilização em terapia gênica". São Paulo: 1994, Tese de doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

MICHEA, I.; FERGUSON,D.R.;PETERS,E.M., ANDREWS,P.M.; KIRBY,M.R. and BURG,M.B. Cell cycle delay and apoptosis are induced by high salt and urea in renal medullary cells. **Am J. Physiol. Renal Physiol.** 278:F209-F218, 2000.

MILLER, A.D.; MILLER, D.G.; GARCIA, J.V.; LYNCH, C.M. Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. **Methods Enzymol.** 217: 581-599, 1993.

MOROZ, O.V.; ANTON,A.A.; DODSON,E.J.; BURRELL,H.J.; GRIST,S.J.;LLOYD,R.M.; MAITLAND,N.J.; DODSON,G.G.; WILSON,K.S.; LUKANIDIN,E.; BRONSTEIN,I.B. The structure of S100A12 in a hexameric form and its proposed role in receptor signalling. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.** 58, p.407-413, 2002.

MUELLER,A, BÄCHI,T., HÖCHLI,M., SCHÄFER,B.W. and HEIZMANN,C.W. Subcellular distribution of S100 proteins in tumor cells and their relocation in response to calcium activation. **Histochem Cel Biol.**, 111:453-459, 1999.

MOUSSES, S.; BUBENDORF,L; WAGNER, U.; HOSTETTER, G.; KONONEN,J.; CORNELISON,R.; GOLDBERGER, N.; ELKAHLOUN, A.G.; WILLI, N.; KOIVISTO, P.; FERHLE, W.; RAFFELD, M.; SAUTER, G. and KALLIONIEMI, O.P. Clinical Validation of candidate genes associated with Prostate Cancer Progression in the CWR22 Model System using Tissue Microarrays. **Cancer Research** 62, 1256-1260, March 1, 2002.

MULLIGAN, R.C.; The basic science of gene therapy. **Science**. 260: 926-932. 1993.

NACKEN, W.; ROTH, J.; SORG,C. and KERKHOFF,C. S100a9/s100a8: myeloid representatives of the S100 Protein Family as Prominent Players in Innate Immunity. **Microscopy Research and Technique**, 60:569-580, 2003.

NASCIMENTO, P.A., Avaliação do dano radioinduzido e capacidade de reparo do DNA em pacientes com câncer de mama por meio da técnica do cometa ("single cell gel electrophoresis"). São Paulo, 2000, dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

NOVITSKAYA, V.; GRIGORIAN,M.; KRIAJEVSKA,M.; TARABYKINA,S.; BRONSTEIN, I; BEREZIN,V.; BOCK,E.; LUKANIDIN,E. Oligomeric forms of the metastasis-related Mts1 (S100A4) protein stimulate neuronal differentiation in cultures of rat hippocampal neurons. **J.Biol. Chem**. 275: 41278-41286, 2000.

OLIE, R.A. E ZANGEMEISTER-WITTKE. Targeting tumor cell resistance to apoptosis induction with antisense oligonucleotides: progress and therapeutic potential. **Drug Resistance Updates**, 4:9-15, 2001.

OLIVEIRA, M.S.P. Citometria de fluxo em imunofenotipagem celular. Perfil imunológico de linfócitos circulares. **Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemoterapia**. 163 (15), 59-67, 1993.

PEDROCCHI, M.; SCHÄFER, B. W.; MUELLER,H.; EPPENBERGER, U.; and HEIZMANN, C. W. Expression of Ca²⁺-binding proteins of the S100 family in malignant human breast-cancer cell lines and biopsy samples. **Int. J. Cancer**: 57, 684-690, 1994.

PEINNEQUIN, A.; MOURET,C.; BIROT, O.; ALONSO,A.; MATHIEU,J.; CLARENÇON,D.; AGAY,D.;CHANCERELLE,Y. and MULTON, E. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. **BMC Immunology** , 5:3, 2004.

PEIRSON, S.N.; BUTLER, J.N. e FOSTER,R.G, Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. **Nucleic Acids Research**, vol. 31, 14 e73, 2003.

PRICE, H. and JOHNSTON, J. Analysis of plant DNA content by Feulgen microspectrophotometry and flow cytometry. *Methods of Genome Analysis in Plants*, Eds. Jauhar, P. CRC Press, Boca Raton < New York, London, Tokyo, pp. 115-131, 1996.

QUAN, S.; YANG, L.; ABRAHAM, N.G. and KAPPAS, A.; Regulation of human heme oxygenase in endothelial cells by using sense and antisense retroviral constructs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 2001 October 9; 98(21): 12203-12208, 2001.

RABINOVITCH, P.S. DNA Content Histogram and Cell-Cycle Analysis. in *Methods in Cell Biology*, vol.41, cap. 18: 263-294, **Academic Press, Inc.**, 1994.

RUDLAND, P.S.; PLATT-HIGGINS, A.; RENSHAW, C.; WEST, C.R.; WINSTANLEY, J.H.R.; ROBERTSON, L. and BARRACLOUGH, R. Prognostic Significance of the Metastasis-inducing Protein S100A4 (p9Ka) in Human Breast Cancer. **Cancer Research** 60, 1595-1603, 2000.

RUSSO, J.; HU, Y. F.; SILVA, I. D. C. G. and RUSSO, I. H. Cancer Risk Related to Mammary Gland Structure and Development. **Microscopy Research and Technique**, 52:204-223, 2001.

RUSSO, J.; REINA, D.; FREDERICK, J. and RUSSO, I. H. Expression of Phenotypical Changes by Human Breast Epithelial Cells Treated with Carcinogens *in Vitro*. **Cancer Research** 48, 2837-2857, May 15, 1988.

RUSSO, J.; YANG, X.; HU, Y.; BOVE, B. A.; HUANG, Y.; SILVA, I. D. C. G.; TAHIN, Q.; WU, Y.; HIGGY, N.; ZEKRI, A; and RUSSO, I. H. Biological and Molecular basis of Human Breast Cancer. **Frontiers in Bioscience** 3 d.944-960, September 1, 1998.

SARTORIUS, C.A.; SHEN, T.; HORWITZ, K.B. Progesterone receptors A and B differentially affect the growth of estrogen-dependent human breast tumor xenografts. **Breast Cancer Research and Treatment** 79: 287-299, 2003.

SATO, N. and HITOMI, J. S100P Expression in Human Esophageal Epithelial Cells: Human Esophageal Epithelial Cells Sequentially Produce Different S100 Proteins in the Process of Differentiation. **The Anatomical Record**, 267:60-69, 2002.

SATO, N.; FUKUSHIMA, N.; MATSUBAYASHI, H. and GOGGINS, M. Identification of *maspin* and S100P as novel hypomethylation targets in pancreatic cancer using global gene expression profiling. **Oncogene** 23, 1531-1538, 2004.

SCHÄFER, B.W. and HEIZMANN, C.W., The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. **TIBS**, 21, 134-140, 1996.

SCHOR, A.P.T., Associação da proteína S100P e do receptor de estrogênio com o potencial evolutivo de lesões proliferativas epiteliais mamárias em pacientes com calcificações radiológicas, tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências., São Paulo, 2004.

SILVA, R.L.A., Análise do padrão global de expressão gênica em células derivadas da glândula mamária humana, 2001. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

SONGKAI,L.; ASPARUHOVA,M.; BRONDANI,V.; ZIEKAU,I.; KLIMKAIT,T. e SCHÜMPERLI,D. Inhibition of HIV-1 multiplication by antisense U7 snRNAs and siRNAs targeting cyclophilin A. **Nucleic Acids Research**, vol. 32, No. 12:3752-3759, 2004.

TAMM,I.; DÖRKEN, B.e HARTMANN,G. Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea? **The Lancet**, 358:489-97, 2001.

THELLIN,O; ZORZI,W.; LAKAYE,B.; DE BORMAN,B.; COUMANS,B.;HENNEN, G.; GRISAR, T.; IGOUT, A. E HEINEN, A; Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **J. Biotechnology**, 75, p. 291-295, 1999.

VINDELOV, L.L. e CHRISTENSEN, I.J. A Review of Techniques and Results Obtained in One Laboratory by an Integrated System of Methods Designed for Routine Clinical Flow Cytometric DNA Analysis. **Cytometry**, 11:753-770, 1990.

WANG,G.; ZHANG,S.; FERNIG, D.G.; SPILLER,D.;MARTIN-FERNANDEZ,M.; ZHANG,H.; DING,Y.; RAO,Z.; RUDLAND,P.S. E BARRACLOUGH,R. Heterodimerisation and the heterodimeric interfaces of S100A1 and S100P. **Biochemical Journal**, 2004

WILKENING, S and BADER,A. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction: Methodical Analysis and Mathematical Model, **Journal of Biomolecular Techniques**, vol. 15, (2), 107-111, june 2004.

WILLARD,S.T.; FAUGHT,W.J. and FRAWLEY,S. Real-Time Monitoring of Estrogen-regulated Gene Expression in Single, Living Breast Cancer Cells: A New Paradigm for the Study of Molecular Dynamics. **Cancer Research**57, 4447-4450, October 15, 1997.

WU WB; PENG, HC e HUANG,TF. Disintegrin causes proteolysis of β -catenin and apoptosis of endothelial cells involvement of cell-cell and cell-ECM interactions in regulating cell viability. **Experimental Cell Research** 286, 115-127, 2003.

YANG,E.S. and BURNSTEIN,K.L. Vitamin D Inhibits G_1 to S Progression in LNCaP Prostate Cancer Cells through p27^{Kip1} Stabilization and Cdk2 Mislocalization to the Cytoplasm. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 278, 47, November 21, p. 46862-46868, 2003.

YANG,J.; WOMG,R.K.; WANG, X.; MOIBI,J.; HESSNER,M.J.; GREENE,S.; WU,J.;SUKUMVANICH,S.; WOLF,B.A. e GAO,Z. Leucine culture reveals that ATP synthase functions as a fuel sensor in pancreatic β cells. **JBC Papers in Press**. Published online on October 14, 2004 as Manuscript M405309200.

YANG, L.; QUAN, S. and ABRAHAM, N.G.; Retrovirus-mediated HO gene transfer into endothelial cells protects against oxidant-induced injury. **Am. J. Physiol.** 277(Lung Cell. Mol. Physiol. 21):L127-L133, 1999.

ZHANG, H.;WANG, G.;DING,Y.;WANG, Z.;BARRACLOUGH,R.; RUDLAND,P.S.; FERNIG,D.G. and RAO,Z. The Crystal Structure at 2Å Resolution of the Ca²⁺-binding Protein S100P. **Journal of Molecular Biology**, vol. 325, Issue 4:785-794, 2003.

ZIMMER,D.B.; SADOSKY,P.W. and WEBER, D.J. Molecular Mechanisms of S100-Target Protein Interactions. **Microscopy Research and Technique**, 60:552-559, 2003.