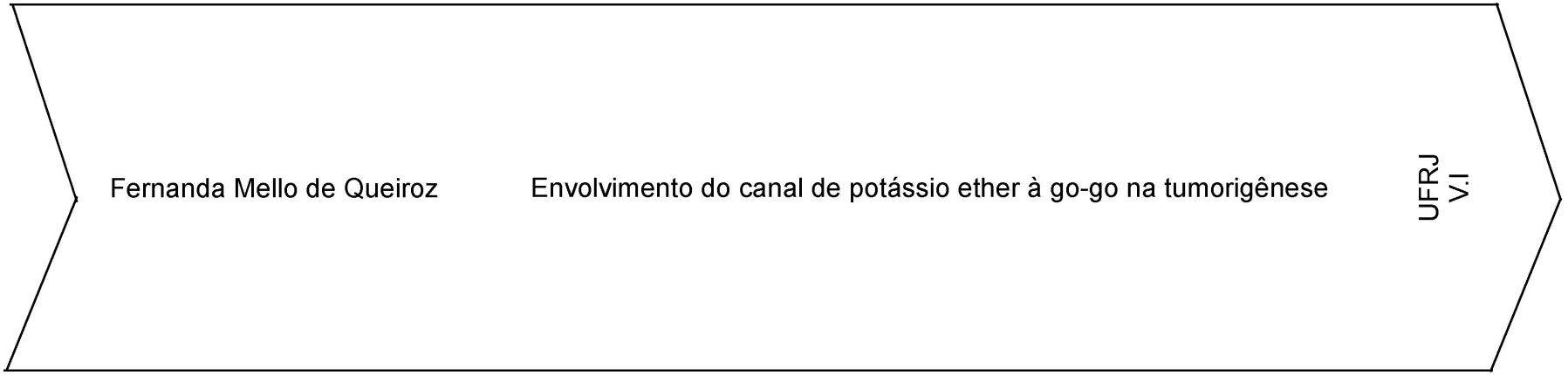
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Fernanda Mello de Queiroz

Envolvimento do canal de potássio *ether à go-go* na tumorigênese

Caracterização da presença e da função do canal Eag1 em Sarcoma de tecido mole

Rio de Janeiro
2006


Fernanda Mello de Queiroz
Envolvimento do canal de potássio ether à go-go na tumorigênese
UFRJ
V.I

Fernanda Mello de Queiroz

Envolvimento do canal de potássio *ether à go-go* na tumorigênese

Caracterização da presença e da função do canal Eag1 em Sarcoma de tecido mole

Dissertação de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Departamento de Embriologia e Histologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Morfológicas.

Orientador: Guilherme Suarez-Kurtz

Rio de Janeiro
2006

Queiroz, Fernanda Mello de.
Envolvimento do canal de potássio ether à go-go na tumorigênese/ Fernanda Mello de Queiroz. Rio de Janeiro, 2006. xiv, 108f.:il.

Dissertação (Doutorado em Ciências Morlógicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Histologia e Embriologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, 2006.

Orientador: Guilherme Suarez-Kurtz

1. Tumorigênese. 2.Canal de potássio. 3. Sarcoma do tecido mole - Teses
I. Suarez-Kurtz, Guilherme (Orient.). II Universidade Federal do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas. III. Título.

À minha família e a Deus

Agradecimentos

Gostaria de começar a agradecer minha família, meu pai Fernando, minha mãe Maria José, minhas irmães Danielle e Carolina e o meu sobrinho Gabriel. Agradeço a vocês todo o apoio, dedicação, coragem, carinho e amor, foi tudo isso que me deu, e continua dando, forças para enfrentar as dificuldades da vida. Agradeço a vocês do fundo do meu coração!

Gostaria de agradecer o restante da família, primos e primas, tios e tias e avós pela força e pelos incentivos, pelas palavras amigas, pelo pensamento positivo e por sempre quererem o meu bem-estar. Saiba que todos vocês estão em um lugar especial do meu coração!

Gostaria de agradecer os amigos novos e velhos, os amigos que estão longe e os que estão perto, os amigos que perdi ao longo dessa jornada e os que estão comigo até hoje. Quero agradecer os amigos do tempo de escola, da universidade, os amigos de farra, os amigos que estão sempre dispostos a ajudar e a ficar do seu lado quando as coisas estão pretas e quando quase não é possível enxergar a luz no fim do túnel. Esses são os meus amigos, amigos de verdade, amigos que estarão em meus pensamentos e no meu coração para sempre.

Quero agradecer um amigo muito especial que se encontra no plano espiritual. Saiba que onde você estiver será sempre lembrado com muito carinho e admiração pelo seu caráter e raciocínio científico. Saiba que você deixou muita saudade em todos os que te conheceram.

Gostaria de agradecer o Prof. Walter Stühmer pela oportunidade de vivenciar a pesquisa fora do Brasil, pela sua presença durante essa nova etapa da minha vida e pela sua disponilidade como amigo, conselheiro e chefe. Gostaria de agradecer o Dr. Luis Pardo por ter supervisionado o meu trabalho, pelas discussões científicas e pela constante disponibilidade e pelo bom humor. Gostaria de agradecer o grupo Eag e todo o departamento do Instituto Max-Planck de Medicina Experimental (Goettingen, Alemanha). Gostaria de agradecer Ute Rust por ter me acolhido e cuidado de mim quando mais precisei. Gostaria de agradecer os meus companheiros de apartamento Eva Herrero Herranz e Bryan Downie pelas confidências trocadas e por ser umaa família postiça quando a família de verdade está tão longe.

Gostaria de agradecer o Prof. Guilherme Kurtz por ter me dado a oportunidade de desenvolver a tese em seu laboratório e de colaborar com o Prof. Walter Stühmer. Gostaria de agradecer os meus companheiros de laboratório do INCa (Rio de Janeiro,

Brasil) pela camaradagem durante a minha presença e, principalmente, durante a minha ausência já que deixei todos os meus papéis ocupando espaço no laboratório.

Gostaria de agradecer a Prof. Márcia Cury pelo olhar cuidadoso empregado na revisão desta tese. Quero agradecer o Prof. Vivaldo por ter auxiliado e agilizado todo o processo para a aquisição do título de doutor. Gostaria de agradecer aos professores José Garcia de Abreu, Rosane Vianna Jorge e José Cláudio Casali da Rocha que aceitaram participar da banca de avaliação da minha tese. E gostaria de agradecer ao Dr. Fernando Vargas por ter aceito o meu convite para participar da banca de avaliação da minha tese.

Gostaria de agradecer Miso Mitkovsky por ter me apresentado ao programa Latex e por ter me auxiliado quando tudo parecia perdido.

E por último, gostaria de agradecer a Deus por ter me dado muita saúde, confiança e disposição para seguir o meu caminho e enfrentar os obstáculos que possam aparecer pelo meu caminho.

Essa conquista eu agradeço a todos vocês! Obrigada!

Resumo

Queiroz, Fernanda Mello de. Envolvimento do canal de potássio ether à go-go na tumorigênese: caracterização da presença e da função do canal Eag1 em sarcoma do tecido mole. Rio de Janeiro, 2006. Dissertação (Doutorado em Ciências Morfológicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

O canal de potássio ether à go-go humano (Eag1) pode ser encontrado em células tumorais e em tumores primários, e o seu envolvimento na oncogênese tem sido sugerido. Utilizando a técnica de imunohistoquímica mostramos que o canal Eag1 está expresso em algumas populações celulares fora do sistema nervoso central. Ao contrário, amostras de tumores (carcinomas) mostram uma alta freqüência de expressão do Eag (43% à 82%). No caso dos tumores do tipo sarcoma de tecido mole, Eag1 está expresso em 71% dos casos estudados. Nenhuma associação foi vista entre expressão do Eag1 e fatores epidemiológicos, apesar de termos um diferença significativa quando comparamos os tipos histológicos. Além disso, demonstramos que o antígeno para o Eag1 não é estável ao longo do tempo impedindo a realização de estudos retrospectivos. Células derivadas de sarcoma foram utilizadas para estudos *in vitro*. Dados obtidos por qPCR mostram que todas as células analisadas são positivas para Eag1e a inibição do canal por RNA interferência foi capaz de reduzir o crescimento de todas as células através da indução de morte celular. Analisando os dados obtidos, experimentos *ex vivo* e *in vitro* , podemos sugerir que o Eag1 representa um promissor alvo para propostas de diagnóstico e tratamento do câncer.

Abstract

Queiroz, Fernanda Mello de. Envolvimento do canal de potássio ether à go-go na tumorigênese: caracterização da presença e da função do canal Eag1 em sarcoma do tecido mole. Rio de Janeiro, 2006. Dissertação (Doutorado em Ciências Morfológicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

The human ether à go-go potassium channel (Eag1) can be detected in both tumor cell lines and primary tumors, and it's role in oncogenesis has been suggested. Expression levels of Eag1 on normal and tumor tissue were determined by immunohistochemistry. We showed that Eag1 is expressed in some cellular populations outside central nervous system. On the other hand, tumors samples (carcinomas) showed a high frequency of Eag1 expression (43% to 82%). Eag1 was expressed in 71% of all soft tissue sarcomas. No association was seen between Eag1 expression and epidemiological factors, even though we found statistic difference comparing tumor histological types. We also showed that Eag1 antigen is not stable throughout years imparing the realization of retrospective studies. Cell lines derived from relevant sarcoma histological types were used for *in vitro* experiments. Data obtained by real-time PCR showed that all four lines are positive for Eag1. In all four cell lines, reduction of Eag1 by RNA interference led to a decrease in cell growth by means of cell death induction. These observations, from *ex vivo* and *in vitro* experiments, suggests a usage of this protein for diagnostic and/or therapeutic purposes.

Lista de Figuras

1 Esquema simplificado das conformações adotadas pelos canais iônicos . . . 2
2 Distribuição dos canais da família Eag . . . 7
3 Desenho esquemático do canal Eag . . . 8
4 Expressão diferencial dos canais Eag1 e Eag2 em cérebro de rato . . . 11
5 Distribuição dos tipos histopatológicos de STM do Instituto Nacional do Câncer . . . 15
6 Distribuição dos diferentes tipos de sarcoma de acordo com a idade . . . 16
7 PCR para detecção de micoplasma . . . 24
8 Isolamento de RNA . . . 25
9 Exemplo de resultado do qPCR . . . 28
10 Mecanismo de ação da técnica de RNA interferência . . . 29
11 Histograma da expressão do Eag1 em amostras de tissue-array . . . 41
12 Padrão de expressão do anti-Eag1 em sarcoma de tecido mole . . . 42
13 Curva de degradação do antígeno para Eag1 ao longo do tempo . . . 43
14 Expressão do Eag1 por western-blot . . . 47
15 Curva de redução da proteína total analisada por citometria de fluxo . . . 49
16 Curva da expressão do mRNA para Eag1 e GAPDH na célula TE-671 . . . 50
17 Inibição da proliferação da célula TE-671 por RNA interferência . . . 51
18 Avaliação do ciclo celular da linhagem TE-671 após tratamento com RNA interferência . . . 53
19 Indução de morte celular da linhagem TE-671 após tratamento por RNA interferência . . . 54
20 Indução de apoptose da célula TE-671 após tratamento por RNA interferência 55
21 Inibição da proliferação da célula TE-671 por bloqueadores . . . 56
22 Efeito de bloqueadores e RNA interferência sobre o IC_{50} de Doxorubicina da célula TE-671 . . . 57
23 Curva da expressão do mRNA para Eag1 e GAPDH na célula A-204 . . . 58
24 Inibição da proliferação da célula A-204 por RNA interferência . . . 59
25 Indução de morte celular da linhagem A-204 após tratamento por RNA interferência . . . 60
26 Inibição da proliferação da célula A-204 por bloqueadores . . . 61
27 Efeito de bloqueadores e RNA interferência sobre o IC_{50} de Doxorubicina da célula A-204 . . . 62
28 Curva da expressão do mRNA para Eag1, Eag2 e GAPDH na célula HT-1080 63
29 Inibição da proliferação da célula HT-1080 por RNA interferência . . . 65
30 Indução de morte celular da linhagem HT-1080 após tratamento por RNA interferência . . . 66
31 Inibição da proliferação da célula HT-1080 por bloqueadores . . . 67
32 Efeito de bloqueadores e RNA interferência sobre o IC_{50} de Doxorubicina da célula HT-1080 . . . 67
33 Curva da expressão do mRNA para Eag1, Eag2 e GAPDH na célula Hs 633t 69
34 Inibição da proliferação da célula Hs 633t por RNA interferência . . . 70

35 Indução de morte celular da linhagem Hs 633t após tratamento por RNA interferência 71
36 Inibição da proliferação da célula Hs 633t por bloqueadores 72
37 Efeito de bloqueadores e RNA interferência sobre o IC_{50} de Doxorubicina da célula Hs 633t 73

Lista de Tabelas

1 Linhagens celulares derivadas de sarcoma 22
2 Descrição dos reagentes para PCR (micoplasma) 24
3 Sequência dos primers utilizados em qPCR 27
4 Descrição dos reagentes para qPCR 28
5 Sequência dos siRNA para Eag1 e Eag2 30
6 Distribuição e expressão do Eag1 em tecido normal 38
7 Expressão do Eag1 em diferentes tipos de tumores sólidos 40
8 Características clinico-patológica dos pacientes e expressão do Eag1 45
9 Associação entre histologia e expressão do Eag1 46
10 Expressão do Eag1, Eag2 e TFR por qPCR 46

Lista de Abreviaturas

Na^+	íon sódio
K^+	íon potássio
ATP	adenosina trifosfato
Ca^{+2}	íon cálcio
Mg^{+2}	íon magnésio
Cl^-	íon cloro
H^+	íon hidrogênio
canal de K^+	canal de potássio
Eag	canal de potássio da família ether à go-go
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
cGMP	guanina monofosfato cíclico
IC_{50}	50% da concentração inibitória máxima
K_v	canal de potássio ativado por voltagem
CHO	célula epitelial derivada de ovário de hamster
STM	sarcoma de tecido mole
BSA	albumina bovina
TBS	tampão Tris
CO_2	gás carbônico
HEK	célula embrionária de rim humano
PCR	reação em cadeia da polimerase
DEPC	dietil pirocarbonato
RNA	ácido ribonucléico
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucléico trifosfatado
siRNA	RNA pequeno de dupla fita
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
TA	temperatura ambiente
PBS	tampão fosfato
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato dodecil de sódio

Sumário

1 Introdução **1**
1.1 Canais iônicos . . . 1
1.2 Canais iônicos e câncer . . . 4
1.3 Canais da família Eag . . . 6
1.4 Eag1 *versus* Eag2 . . . 10
1.5 Eag1 em câncer . . . 12
1.6 Sarcoma . . . 14

2 Objetivos **18**
2.1 Objetivo Geral . . . 18
2.2 Objetivos Específicos . . . 18

3 Materiais e Métodos **20**
3.1 Análise de amostras clínicas . . . 20
3.1.1 Coleta de material . . . 20
3.1.2 Descrição do anticorpo anti-Eag1 de cadeia única . . . 20
3.1.3 Imunohistoquímica . . . 21
3.1.4 Avaliação da marcação . . . 21
3.2 Cultivo das linhagens . . . 22
3.2.1 Descrição das linhagens derivadas de sarcoma . . . 22
3.2.2 Descrição das linhagens transfectadas com Eag1 . . . 23
3.2.3 Análise de contaminação por Micoplasma . . . 23
3.3 Transcrição reversa - Reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR) . . . 25
3.3.1 Isolamento de RNA . . . 25
3.3.2 Síntese de c-DNA . . . 26
3.3.3 Primers . . . 26
3.3.4 PCR quantitativo (qPCR) . . . 27
3.4 RNA Interferência (RNAi) . . . 29
3.4.1 Mecanismo de ação . . . 29
3.4.2 Duplexes de siRNA . . . 29
3.4.3 Transfecção com siRNA . . . 30
3.5 Detecção do Eag1 por western-blot . . . 32
3.6 Análise Funcional . . . 33
3.6.1 Aspectos gerais da citometria de fluxo . . . 33
3.6.2 Detecção do Eag1 por citometria de fluxo . . . 33
3.6.3 Ensaio de viabilidade celular por citometria de fluxo . . . 34
3.6.4 Ensaio de morte celular por citometria de fluxo . . . 34
3.6.5 Ensaio de determinação do ciclo celular por citometria de fluxo . . . 35
3.6.6 Ensaio MTT . . . 35
3.6.7 Determinação do IC50 do quimioterápico doxorubicina . . . 35
3.6.8 Fármacos . . . 35

3.7 Análise estatística 36

4 Resultados **37**
4.1 Distribuição do Eag1 em tecido normal 37
4.2 Expressão do Eag1 em tecido tumoral 39
4.3 Expressão do Eag1 em pacientes com sarcoma do tecido mole 41
4.4 Expressão do Eag1 em células derivadas de sarcoma de tecido mole 44
4.5 Inibição da expressão do Eag1 por RNA interferência 48
4.6 Caracterização funcional do Eag1 em células derivadas de sarcoma 48
4.6.1 Rabdomiossarcoma - TE-671 48
4.6.2 Rabdomiossarcoma - A-204 57
4.6.3 Fibrossarcoma - HT-1080 64
4.6.4 Fibrossarcoma - Hs 633t 68

5 Discussão **74**
5.1 Tecido normal *versus* câncer 74
5.2 Expressão do Eag1 em sarcoma do tecido mole 75
5.3 Estudo da função do canal Eag1 em células tumorais 77
5.4 Correlação entre quimioterapia e expressão do Eag1 79

6 Conclusão **81**

7 Perspectivas **83**
7.1 Rabdomiossarcoma - modelo *in vivo* 83

Referências Bibliográficas **85**

1 Introdução

1.1 Canais iônicos

A membrana celular foi essencial para o desenvolvimento da célula, possibilitando a retenção no citoplasma de componentes vitais para o seu crescimento, assim como prevenindo o acesso de uma grande diversidade de moléculas. Para fazer trocas com o meio extracelular, tais como: excreção de metabólitos, secreção de produtos ativos e regulação de volume, a célula precisou desenvolver proteínas capazes de fazer o transporte de variados tipos de solutos. A solução foi o desenvolvimento de um poro que fosse suficientemente grande para permitir a passagem de íons e pequenos metabólitos mas não de macromoléculas. A maioria das membranas de bactérias gram-negativas e das mitocôndrias funciona dessa maneira. Entretanto, as membranas citoplasmáticas dos organismos superiores apresentam uma arquitetura complexa, composta de mecanismos seletivos de transporte com diferentes funções. Os mecanismos de transporte podem ser divididos em duas classes de proteínas: as carreadoras e os canais, sendo que o transporte por proteínas carreadoras pode ser passivo ou ativo, e o transporte por canais é sempre passivo (Hille, 2001; Alberts et al., 2002).

O transporte por proteínas carreadoras através da membrana tem início após a ligação do soluto ao seu sítio específico. Mudanças conformacionais expõem o sítio de ligação de forma sequencial, de um lado da membrana e depois do outro, transferindo, assim, o soluto ligado. Algumas proteínas carreadoras transportam solutos de acordo com o seu gradiente eletroquímico, enquanto outras fazem o transporte contra o gradiente,

usando a energia proveniente da hidrólise do ATP. Como exemplo de proteínas carreadoras, pode ser citada a bomba Na^+K^+ATPase que transfere para o meio extracelular três íons Na+, enquanto bombeia para o citoplasma dois íons K^+ (Alberts et al., 2002).

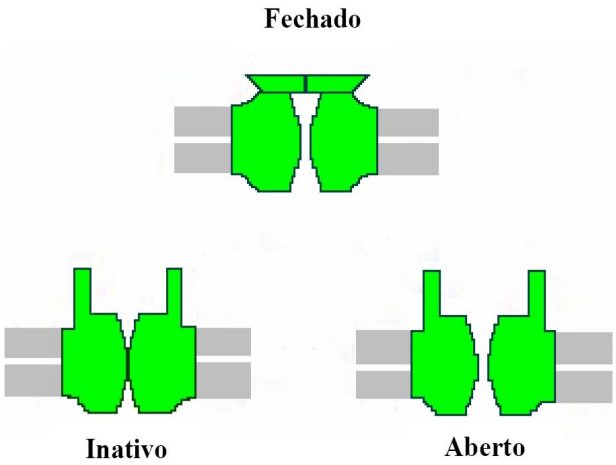


Figura 1: Esquema simplificado das conformações adotadas pelos canais iônicos. Os canais iônicos podem ser encontrados nas três conformações mostradas acima. Adaptado de Alberts et al., 2002.

Os canais fazem parte de outra classe de proteínas transportadoras. Canais iônicos são poros hidrofílicos que diferem de simples poros aquosos devido a duas propriedades importantes: a alta seletividade iônica e o fato de não estarem continuamente abertos, mas sim oscilando entre os estados aberto, fechado e inativo (Figura 1). No estado aberto ocorre a passagem de íons pelo poro, no estado inativo não há fluxo iônico e o canal não pode ser ativado. No estado fechado não há passagens de íons, mas o canal está hábil a responder ao estímulo (Hille, 2001).

Os canais iônicos se abrem em resposta a uma mudanca no potencial de membrana (canais dependentes de voltagem) ou a presenca de ligantes (canais dependentes de ligante), permitindo a passagem de íons inorgânicos a favor do gradiente eletroquímico (Alberts et al., 2002). No caso do canal dependente de voltagem, a oscilação entre os estados conformacionais (fechado, aberto e inativo) depende predominantemente do potencial

da membrana. Com a variação do potencial, os canais tendem a ir para a conformação mais estável naquele momento. Durante o potencial de repouso, a conformação fechada é a mais estável para a maioria dos canais. Quando ocorre a despolarização da célula a conformação dos canais pode variar entre os estados aberto e o inativo. Já para os canais dependentes de ligantes, como canais de potássio dependentes de cálcio, a presença do ligante provoca a abertura do canal (Hille, 2001).

Canais iônicos possuem importante papel na propagação do potencial de ação em células excitáveis, como os neurônios e as fibras musculares. Em células não excitáveis, as funções desempenhadas pelos canais iônicos vão do controle da secreção de insulina nas células α das ilhotas de Langerhans, reabsorção de Na^+ em células tubulares renais e determinação do potencial de membrana durante a ativação dos linfócitos T (Hille, 2001; Alberts et al., 2002).

A participação de ambas as classes de proteínas transportadoras (carreadoras e canais) em uma típica célula de mamífero produz um equilíbrio eletroquímico que mantém constantes as concentrações iônicas intracelulares (em mM) de K^+ 140, Na^+ 5-15, Ca^{+2} 0,0001, Mg^{+2} 0,5, Cl^- 5-10 e H^+ $7x10^{-5}$ (pH 7,2) quando o ambiente extracelular é composto por (mM) K^+ 5, Na^+ 145, Ca^{+2} 1-2, Mg^{+2} 1-2, Cl^- 110 e H^+ $4x10^{-5}$ (pH 7,4; (Alberts et al., 2002)). As concentrações iônicas dos solutos nos meios intracelular e extracelular aliadas à permeabilidade seletiva da membrana a estes íons determinam o que chamamos de potencial de membrana da célula (Hille, 2001).

Os canais iônicos permeáveis ao íon K^+ (canais de potássio) são encontrados em todas as células animais. Essa característica torna a membrana altamente permeável ao K^+. Dessa forma, o K^+, ou melhor, canais de potássio passam a ter papel crucial na manutenção do potencial de membrana (Alberts et al., 2002).

1.2 Canais iônicos e câncer

Estudos eletrofisiológicos revelaram que células tumorais se encontram despolarizadas em relação às células dos tecidos normais, e isto tem sido proposto como uma prerrogativa necessária para células destinadas a ter proliferação ilimitada (Marino et al., 1994a; Marino et al., 1994b; Bianchi et al., 1998). Portanto, a identificação da presença dos diferentes tipos e subtipos de canais iônicos expressos em células tumorais, pode ser de grande importância para a compreensão do desenvolvimento da neoplasia.

Entre os canais iônicos expressos em células excitáveis e não excitáveis, os canais de potássio (K^+) são os mais diversificados do ponto de vista estrutural e funcional. Canais de K^+ desempenham importantes funções em uma ampla variedade de mecanismos celulares que incluem: regulação do ritmo cardíaco, contração muscular, secreção de neurotransmissores, excitabilidade neuronal, secreção de insulina, transporte eletrolítico epitelial, regulação do volume celular e resposta imunológica (Hille, 2001).

Apesar de trabalhos recentes demonstrarem um conhecimento da estrutura e do mecanismo de permeabilidade dos canais de K^+ (Miller, 2000; Jiang et al., 2003a; Jiang et al., 2003b), ainda existem muitas questões abertas sobre a sua localização e o seu papel nos processos biológicos fundamentais, como proliferação celular e sobrevivência de células tumorais.

Atualmente já foram identificados mais de 80 tipos de canais de K^+ derivados de diferentes genes e/ou diferentes transcritos de *splicing* alternativo. Os variados tipos de canais de K^+ possuem propriedades eletrofisiológicas distintas e são sujeitos a diferentes tipos de regulação: pelo controle transcripcional tecido específico ou pela ação bioquímica de efeitos específicos. Esses efeitos específicos podem ser tão variados quanto um potencial elétrico, Ca^{+2} ou ATP no citoplasma, quinases, fosfatases, neurotransmissores ou hormônios.

Alguns desses canais iônicos são essenciais para o controle da proliferação celular

e para a síntese de proteínas durante o crescimento celular. Os casos documentados na literatura relacionam canais de K^+ sensíveis à voltagem aos linfócitos (Chandy et al., 1984; DeCoursey et al., 1984; Amigorena et al., 1990a; Amigorena et al., 1990b) onde esses canais estão envolvidos em eventos que levam à mitogênese durante a resposta imune. A ativação de canais de K^+ está associada com a diferenciação induzida por cálcio em queratinócitos (Mauro et al., 1997) e com a proliferação das células de Schwann (Pappas & Ritchie, 1998), sem falar em outros exemplos.

Já que células tumorais são altamente proliferativas, não é surpreendente que vários canais de K^+ estejam associados ao câncer. Trabalhos recentes baseados em técnicas eletrofisiológicas e de biologia molecular vêm demonstrando que vários canais iônicos, além dos canais de K^+, participam diretamente da proliferação e invasividade em diferentes tumores. Os canais iônicos e os tipos de tumores em que estes canais são encontrados estão descritos abaixo:

1. Canais de K^+: câncer de mama humano (MCF-7), glioma de rato (C6), adenocarcinoma de cólon humano; de próstata de rato (Mat-LyLu e AT-2) e humano (LNCaP e PC-3), de fígado humano (Hep 2, HuH-7 e HFL) e mieloma humano (RPMI-8226) (Fraser SP, 2000; Grimes et al., 1995; Laniado et al., 2001; Malhi et al., 2000; Rane, 2000; Rouzaire-Dubois et al., 2000; Köhler et al., 2000; Skryma et al., 1997; Woodfork et al., 1995);

2. Canais de cálcio (Ca^{+2}): câncer de pâncreas humano (MIA PaCa-2 e CAV), de mama humano (MCF-7/ADRR, MDA-231, MDA-231R44 e BT-474), melanoma humano (MM-RU) e de próstata humano (DU-145, PPC-1, PC3 e LNCaP) (Sato et al., 1994; Lambert et al., 1997; Kohn et al., 1996; Wasilenko et al., 1996; Benzaquen et al., 1995);

3. Canais de cloro (Cl^-): câncer de mama humano (MCF-7); de cólon humano (T84), mieloma humano (RPMI-8226), astrocitomas humano e glioma de rato (C6) (Chou

et al., 1995; Levitan & Garber, 1995; Rouzaire-Dubois et al., 2000; Ullrich et al., 1996);

4. Canais de sódio (Na^+): câncer de mama humano (MCF-7), de pulmão (NCI-H146) e de próstata de rato (Mat-LyLu e AT-2) (Blandino et al., 1995; Fraser SP, 2000; Grimes et al., 1995).

Apesar dos canais iônicos estarem relacionados diretamente com a proliferação e invasividade dos tumores descritos acima, o mecanismo pelo qual esses canais desempenham tais funções fisiológicas permanece um mistério a ser desvendado.

Além do câncer existem várias doenças genéticas humanas que estão relacionadas com mutações de genes estruturais de canais iônicos. São exemplos: a paralisia periódica hipercalêmica familiar, causada pelos canais de Na^+ do músculo esquelético que permanecem aberto por um período muito longo na presença de altas concentrações de potássio extracelular e a fibrose cística na qual os canais de Cl^- perdem sua regulação (Hille, 2001).

1.3 Canais da família Eag

O presente projeto trata do canal de K^+ da família ether à go-go (Eag). Essa família de canais foi descoberta em 1969 a partir de mutantes derivados do canal de K^+ do tipo *Shaker* da *Drosophila melanogaster* com excesso de atividade motora, isto é, a mosca balançava as pernas freneticamente sob anestesia com éter (Kaplan & Trout, 1969). Usando a triagem por homologia com a família Eag, foram identificadas seqüências de DNA, desde nematodos até o homem. Tais seqüências foram divididas em três diferentes subfamílias (Figura 2): eag, eag-related gene (erg) e eag-like (elk). Os primeiros canais Eag de mamífero clonados foram Eag1 de rato (rEag1) e Erg1 humano (Warmke & Ganetzky, 1994). Desde então, todos os membros das subfamílias foram clonados em rato: dois canais Eag (Eag1 (Ludwig et al., 1994), Eag2 (Saganich et al., 1999)), três Erg (Erg1

(Bauer et al., 1998), Erg2 e Erg3 (Shi et al., 1997)) e três Elk (Shi et al., 1998; Engeland et al., 1998).

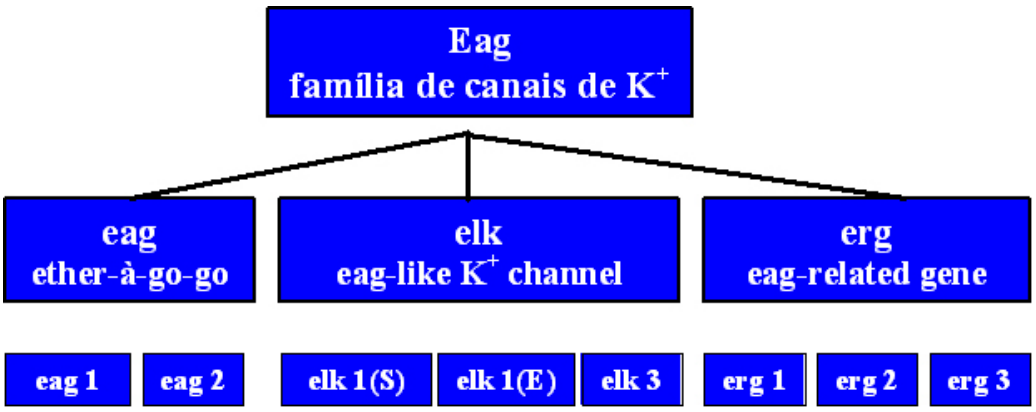


Figura 2: Distribuição dos canais da família Eag. A família de canais Eag consiste de três subfamílias: eag (gene ether-à-go-go), elk (gene eag-like) e erg (gene eag-related). Cada uma das subfamílias possuem 2 ou 3 membros clonados em rato. Adaptado de Bauer & Schwarz, 2001.

O alinhamento de seqüências dos canais Eag de *Drosophila*, rato, camundongo e homem com seqüências em bancos de dados nos mostraram que esses canais são estruturalmente relacionados com os canais de K^+ sensíveis a voltagem e com os canais catiônicos sensíveis a nucleotídeos cíclicos (Warmke & Ganetzky, 1994). A estrutura secundária contém uma subunidade com 6 domínios transmembranares do tipo α-hélice (S1-S6) e um segmento entre S5 e S6, denominado região P, que forma o poro do canal (Figura 3 A). A região P é a responsável pela passagem seletiva de íons K^+ e é o domínio mais conservado dentre os diversos tipos de canais K^+. Outra característica comum está no segmento S4, conhecido como sensor de voltagem, onde estão localizados resíduos catiônicos que estão envolvidos nas mudanças conformacionais iniciais que levam à abertura do canal quando a membrana despolariza. Os canais da família Eag são estruturas multiméricas formadas pela associação de 4 subunidades (Figura 3 B,C). Os canais da família Eag contêm ainda o domínio Per-Arnt-Sim (PAS) na região N-terminal (Cabral et al., 1998), uma assinatura característica (GFGN) na região do poro e, na região C-terminal, um domínio de ligação de nucleotídeos cíclicos (c-NBD), de ligação à proteína

calmodulina (CAM) e o domínio de tetramerização (TCC; Figura 3 A).

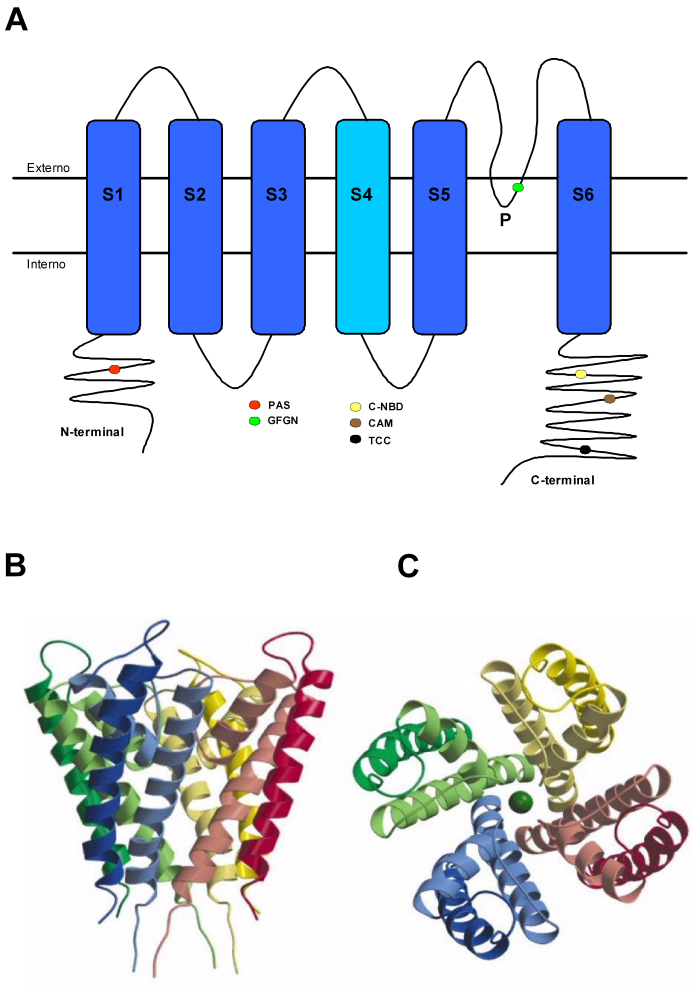


Figura 3: Desenho esquemático do canal Eag. (A) Estrutura de uma subunidade contendo seis segmentos transmembranares (S1-S6), onde S4 é o sensor de voltagem e P é a região do poro. Os domínios considerados importantes para o canal se encontram destacados. (B, C) Quatro subunidades formam o canal funcional. A figura não está representada em escala. Adaptado do site: courses.cm.utexas.edu/jrobertus/ch339k/overheads-2.htm

Entre as propriedades biofísicas dos canais Eag, podemos citar: 1) a ativação por voltagem, onde a cinética de ativação é diminuída por pré-pulsos negativos denominada de mudança Cole-Moore (Ludwig et al., 1994), 2) o tempo de ativação diminui com o aumento da concentração extracelular de Mg^{+2} (Terlau et al., 1996), 3) cAMP aumenta a amplitude da corrente (Brüggemann et al., 1993) e 4) o aumento de Ca^{+2} intracelular

bloqueia o canal pela ligação da calmodulina na porção C-terminal (Stansfeld et al., 1996). A cinética de ativação dos canais Eag é fortemente influenciada pelo potencial de repouso de membrana e pela concentração de Mg^{+2} de tal forma que a hiperpolarização torna lenta a sua ativação. Devido a este comportamento cinético sugere-se que este canal tenha um importante papel na repolarização da membrana celular (Ludwig et al., 1994).

Apesar da semelhança estrutural entre o canal Eag expresso em Drosófila (dEag) e em cérebro de rato, esses canais possuem algumas diferenças biofísicas: 1) modulação: o rEag não é modulado por nucleotídeos cíclicos como cAMP ou cGMP, enquanto que o dEag tem a corrente de saída potencializada por tais nucleotídeos e 2) cinética: a corrente do canal dEag mostra uma inativação parcial mediante uma despolarização sustentada, enquanto a corrente do canal rEag não se inativa. As características farmacológicas dos canais dEag e rEag são similares, ambos são bloqueados pela quinidina e por Ba^{+2}, e insensíveis a 4-aminopiridina (4-AP) e ao tetraetilamônio (TEA) (Ludwig et al., 1994).

Os canais Eag são descritos como canais com baixa sensibilidade a bloqueadores clássicos como TEA e 4-AP ou ao bloqueador do canal Erg E4031. A quinidina bloqueia o canal hEag1 com IC_{50} de 1,4 $\pm$ 0.06 μM enquanto o IC_{50} para os canais hEag2 é igual à 151,8 $\pm$ 24,8 μM, em torno de 100 vezes menos sensíveis, portanto a quinidina pode ser usada para diferenciar farmacologicamente as isoformas dos canais Eag (Schönherr et al., 2002).

Outros fármacos capazes de bloquear o canal hEag1 são: imipramina (anti-depressivo tricíclico) e astemizol (anti-histamínico). A imipramina é capaz de bloquear diversos tipos de canais iônicos incluindo canais hErg, de Na^{+}, de Ca^{+2}, de K^{+} ativado por voltagem, de K^{+} ativado por Ca^{+2} (Dreixler et al., 2000; Terstappen et al., 2001; Gavrilova-Ruch et al., 2002; Ogata & Narahashi, 1989; Teschemacher et al., 1999). Existem algumas diferenças na afinidade pela qual a imipramina é capaz de bloquear esses canais iônicos mas, em todos os casos, os valores de IC_{50} descritos variam na faixa de 1

a 30 μM. O fato de diferentes canais iônicos mostrarem afinidade pela imipramina sugere uma conservação estrutural do sítio de ligação, portanto a probabilidade da imipramina de bloquear o canal hEag2 não pode ser descartada apesar de não existirem dados até o presente momento. O mecanismo de bloqueio da imipramina é altamente dependente da voltagem e assume um sítio de ligação na porção intracelular quando o canal se encontra aberto (García-Ferreiro et al., 2004)

O astemizol, ao contrário da imipramina, possui ação mais restrita. Por exemplo, o astemizol em concentrações de até 10 μM não parece ter efeito sobre correntes em outros canais de K^+ tais como os canais dependentes de voltagem $K_v1.1$, $K_v2.1$, $K_v4.2$, o canal de retificação interna IRK1 e as correntes cardíacas I_{sK} (Suessbrich et al., 1996). O canal hElk2 também se mostra insensível ao astemizol (Becchetti et al., 2002), ao contrário, o canal hErg é altamente sensível ao bloqueio por astemizol com IC_{50} na faixa de 50nM (Suessbrich et al., 1996; Barros et al., 1997). Isso sugere uma conservação estrutural da arquitetura dos canais hEag1 e hErg sustentando uma inibição seletiva desse fármaco.

O astemizol também é capaz de bloquear o canal hEag2 de maneira indistinta do canal hEag1, ambos com IC_{50} em torno de 1,5 μM. O mecanismo de bloqueio do astemizol é bastante similar ao da imipramina, mas o primeiro não possui a dependência à voltagem que é essencial para a ação da imipramina (García-Ferreiro et al., 2004).

1.4 Eag1 *versus* Eag2

Os canais hEag1 e hEag2 (Eag1 e Eag2) possuem 73% de homologia, exibindo a maior divergência na porção C-terminal. Ambos os canais são expressos em áreas restritas no sistema nervoso central (Figura 4; (Schönherr et al., 2002)) e a sua função fisiológica ainda precisa ser elucidada.

Apesar da grande homologia ao nível protéico, as características biofísicas dos canais Eag1 e Eag2 são diferentes. Comparando-se as correntes de ambos os canais te-

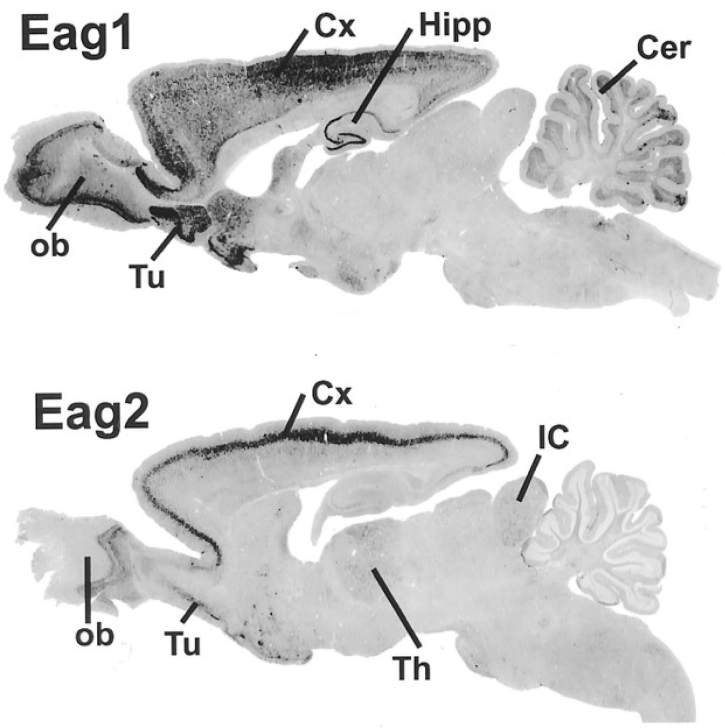


Figura 4: Expressão diferencial dos canais Eag1 e Eag2 em cérebro de rato. Hibridização *in situ* utilizando sondas antisense para RNA marcadas com digoxigenina. Tu: tubérculo olfatório, ob: bulbo olfatório, Cx: córtex cerebral, Hipp: hipocampo, Cer: cerebelo, IC: colículo inferior e Th: tálamo. Adaptado de Saganich et al., 2001 .

mos que o tempo de ativação do canal Eag2 em +40mV é 4 vezes mais lento do que o canal Eag1. Além disso, as correntes do canal Eag2 possuem uma menor dependência à voltagem, mas a maior diferença entre ambas as isoformas está no potencial de ativação do canal (Schönherr et al., 2002). Uma possível explicação molecular para esta diferença seria um interação da porção N-terminal com a alça entre os domínios S2 e S3 já que o sensor de voltagem está conservado em ambas isoformas (Wray, 2004).

Ambas as isoformas são capazes de interagir e formar canais heteromultiméricos. A formação desses canais heteromultiméricos poderia aumentar a variabilidade funcional das correntes Eag em regiões do sistema nervoso central onde ocorre uma superposição da expressão (Schönherr et al., 2002). O mesmo mecanismo foi proposto para os canais Erg, que formam heterotetrâmeros *in vivo*, mas não são capazes de interagir com rEag1

(Wimmers et al., 2001; Jenke et al., 2003).

O canal Eag1 está expresso em células normais tais como, células do sistema nervoso central e mioblastos (Crociani et al., 2000) e em vários tipos de células tumorais (Arcangeli et al., 1995; Bianchi et al., 1998; Fraser SP, 2000; Meyer & Heinemann, 1998; Nilius & Wohlrab, 1992; Pardo et al., 1998; Pardo et al., 1999; Rane, 2000; Trudeau et al., 1995; Wang et al., 1998; Woodfork et al., 1995). Já o canal Eag2, possui expressão do mRNA no sistema nervoso central e no músculo esquelético, também pode ser detectado em baixos níveis em coração, placenta, pulmão, fígado e rim (Ju & Wray, 2002).

A fisiologia do canal Eag2 ainda não é conhecida. Entretanto, o canal Eag1 está implicado na fusão de mioblastos (Occhiodoro et al., 1998), e Eag2 está expresso no músculo esquelético. Além disso, a expressão do Eag1 é importante para o desenvolvimento celular e crescimento tumoral (como veremos na seção 1.5) e, talvez, pode-se especular um papel fisiológico similar para o canal Eag2 (Ju & Wray, 2002).

1.5 Eag1 em câncer

Achados recentes sobre a proliferação de células tumorais e normais mostram que o canal Eag1 está envolvido no controle desse processo (Pardo et al., 1999). Além disso, as propriedades biofísicas desse canal são modificadas pelo ciclo celular, e essa modulação possui dois componentes: 1) redução da densidade da corrente na fase de mitose e 2) aumento da seletividade para o K^+ na fase de mitose e concomitante aumento de sensibilidade ao bloqueio do Na^+ intracelular (Brüggemann et al., 1997; Camacho et al., 2000). Além disso, adição do fator promotor de mitose (MPF) é capaz de modular a atividade do canal Eag1 de maneira a reduzir a corrente em um sistema de expressão heterólogo (Brüggemann et al., 1997).

Neste trabalho nós daremos um maior enfoque ao canal Eag1, que está restrito ao sistema nervoso central no homem adulto e também pode ser encontrado nos mioblastos

indiferenciados (Warmke & Ganetzky, 1994; Occhiodoro et al., 1998). A presença do canal Eag1 se restringe aos mioblastos indiferenciados e parece ser um fenômeno relacionado ao ciclo celular, já que a fusão do mioblasto está acoplada com a saída irreversível do ciclo celular (Occhiodoro et al., 1998). Além da linhagem de neuroblastoma humano, outras linhagens tumorais se mostraram positivas para o canal Eag1, tais como: EFM-19, MCF-7 (carcinoma de mama), HeLa (carcinoma cervical; (Pardo et al., 1999)), SHSY5Y (Meyer & Heinemann, 1998) e IGR1 (melanoma; (Gavrilova-Ruch et al., 2002)). A expressão heteróloga do canal rEag1 em células CHO e NIH 3T3 induziu características de um fenótipo transformado tais como: crescimento acelerado, perda da dependência ao substrato e a fatores de crescimento e perda da inibição por contato. Além disso, a expressão do canal Eag1 em células que foram injetadas em camundongos imunodeficientes promoveu uma vantagem na progressão de tumores *in vivo*. A utilização de RNA anti-sense para Eag1 foi capaz de inibir a expressão do canal além de inibir a proliferação *in vitro* de diversas células tumorais (Pardo et al., 1999).

Estudos eletrofisiológicos baseados na técnica de patch-clamp caracterizaram as propriedades biofísicas e farmacológicas do canal Eag1 expresso heterologamente em ovócitos e células CHO, e em linhagens tumorais (Brüggemann et al., 1993; Terlau et al., 1996; Pardo et al., 1999; Pardo et al., 1998). Recentemente, foi detectada a presença do canal Eag1 em câncer cervival e, pela primeira vez, foi medida a corrente derivada deste canal em tumores (Farias et al., 2004). Entretanto, muito pouco tem sido feito no sentido de determinar as características biofísicas e farmacológicas do canal Eag1 em células de tumores sólidos.

Por ter sua expressão limitada ao sistema nervoso central no tecido normal do adulto, o canal Eag1 pode vir a ser um marcador tumoral. Além disso, utilizando-se um inibidor específico para o canal Eag1 seria possível diminuir a taxa de proliferação tumoral e eliminar o tumor, tornando o canal Eag1 um candidato promissor para propostas de

diagnóstico e terapia.

1.6 Sarcoma

Sarcomas são tumores malignos que surgem a partir do tecido esquelético ou conectivo, incluindo o sistema nervoso periférico. Por mais diversificado que os elementos celulares dessas estruturas anatômicas possam ser, eles possuem uma origem embriológica comum: o mesoderma com uma pequena contribuição do neuroectoderma (sistema nervoso periférico). Sarcomas de tecido mole (STM) correspondem aos tumores derivados do tecido conectivo ou do sistema nervoso periférico.

Os STM constituem um grupo bastante heterogêneo e são classificados histogeneticamente de acordo com a sua semelhança morfológica ao tecido normal cognato (Enzinger et al., 1969). Entre os diferentes tipos de STM podemos citar: rabdomiossarcoma (tecido muscular esquelético), leiomiossarcoma (tecido muscular liso), lipossarcoma (tecido adiposo), fibrossarcoma (tecido fibroso), sinoviossarcoma (histogênese incerta) e fibrohistiocitoma maligno (tumores fibrohistiocísticos). Foram identificados mais de 50 tipos histológicos de STM, mas os tipos mais comuns são os tumores descritos acima (Coindre et al., 2001). A figura 5 mostra a distribuição dos diferentes tipos histopatológicos de STM adquiridos no arquivo de tumores do Instituto Nacional do Câncer (INCa). Os tipos histopatológicos: rabdomiossarcoma e fibrossarcoma se encontram destacados na figura 5 pois daremos uma maior enfâse a esses dois tipos tumorais no estudo.

Os STM são relativamente raros e correspondem à apenas 1% de todos os novos casos de câncer quando comparado aos carcinomas e outras neoplasias. Dados da Sociedade Americana de Câncer mostram que no ano de 2005 seriam dignosticados 9.420 novos casos nos Estados Unidos da América e que 3.490 desses novos casos evoluíram para morte, o que constitui quase 40% de mortalidade (Jemal et al., 2005).

A incidência e distribuição dos STM parece ser similar entre as variadas regiões

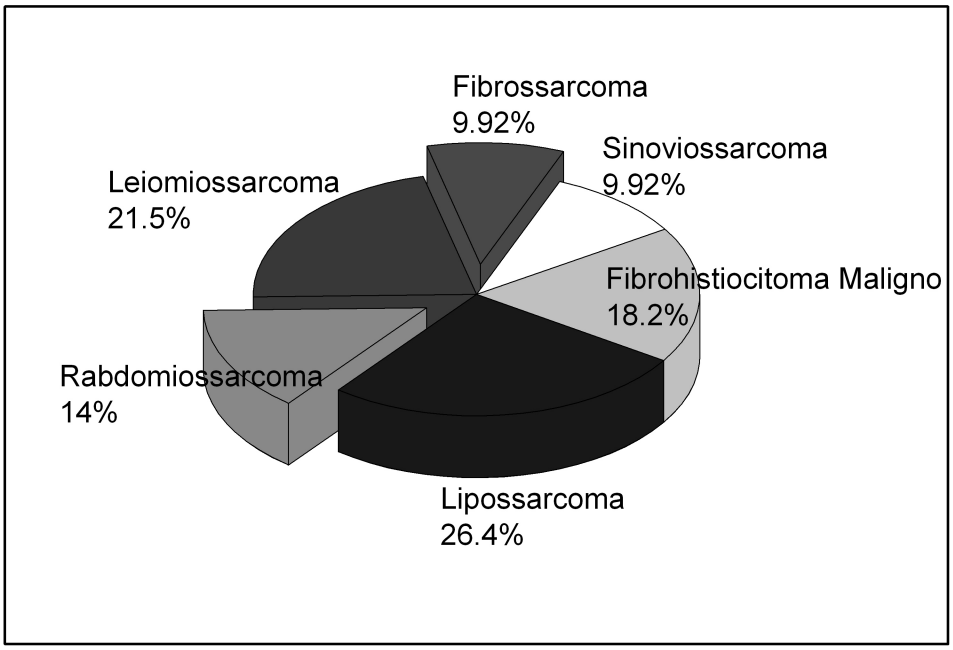


Figura 5: Distribuição dos tipos histopatológicos de STM do Instituto Nacional do Câncer (INCa). A distribuição dos tipos histopatológicos de STM adquiridos no arquivo de tumores do INCA. Os dois tipos tumorais: rabdomiossarcoma e fibrossarcoma estão destacados.

do globo. STM podem ocorrer em qualquer idade dependendo do tipo de STM, mas são comumente encontrados em adultos a partir de 40 anos com poucas exceções relacionadas aos sarcomas de infância. Na figura 6 podemos observar a distribuição dos diferentes tipos de STM de acordo com a idade. STM podem ocorrer em qualquer parte do corpo, mas a localização preferencial é nas extremidades (50%), seguida do tronco, abdômen e pelve (40%) e cabeça e pescoço (10%).

A patogênese que leva ao surgimento dos STM é desconhecida, como é o caso para outros tumores malignos. Ao contrário dos carcinomas, a progressão para STM a partir de tumores benignos do tecido mole é bastante rara, com exceção do tumor maligno do nervo periférico que se desenvolve a partir do neurofibroma. Os STM são caracterizados por agressividade local e são capazes de invasão ou crescimento destrutivo, de recorrência e

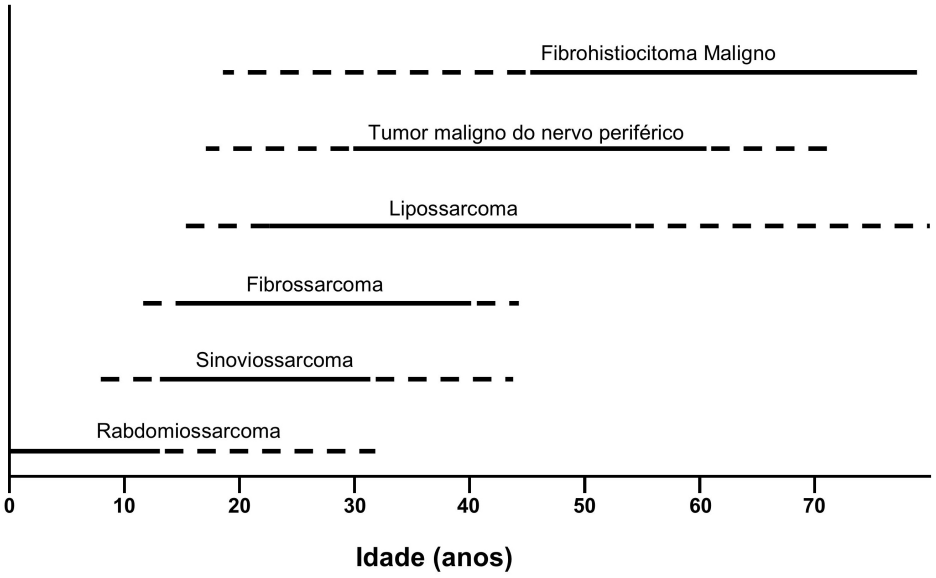


Figura 6: Distribuição dos diferentes tipos de sarcoma de acordo com a idade. Relação aproximada entre a incidência dos diferentes tipos de STM e a idade. As linhas contínuas indicam o pico de incidência do tumor enquanto que as linhas pontilhadas indicam uma redução da incidência desses tumores que varia de 10 a 20%. Adaptado de Weiss & Goldblum, 2001

de metastizar para outros órgãos, formando tumores secundários. O padrão de metástase da maioria dos STM é hematogênico. Metástases para linfonodos são incomuns (menos que 5%), com exceção dos tipos celulares usualmente associados aos sarcomas da infância como é o caso do rabdomiossarcoma e do sinoviossarcoma (Fong et al., 1993).

O prognóstico do paciente depende de vários aspectos, incluindo a idade do paciente e o tamanho, grau histológico e estadiamento do tumor. As características patológicas que definem o grau do tumor incluem celularidade, diferenciação, pleomorfismo, necrose e número de mitoses. Infelizmente, o critério para gradação desses tumores não é específico e nem padronizado, além disso, várias escalas de graus são usadas. Portanto a discordância entre os patologistas para definir o grau do tumor varia entre 25 e 40% (Singer, 1999; Presant et al., 1986). A alta taxa de discordância mostra a necessidade de marcadores moleculares ou bioquímicos para aperfeiçoar o diagnóstico histológico convencional. Os

fatores associados a um mau prognóstico incluem idade do paciente (acima de 60 anos), tumor grande (maior que 5 cm) ou alto grau histológico (índice mitótico, presença de hemorragia e necrose). Os STM de baixo grau, geralmente, são curáveis com a cirurgia; enquanto os STM de alto grau são associados com alta taxa de falhas no tratamento local e aumento do potencial metastático.

Um diagnóstico acurado é de fundamental importância para a definição do tratamento em pacientes com STM. A terapia local consiste de cirurgia, ou esta combinada com radioterapia, e este é o procedimento mais utilizado em pacientes com tumores menores que 5cm e sem evidência de metástase. Em pacientes com STM de médio e alto grau, além da cirurgia é recomendado tratamento adjuvante com quimioterâpicos. Os STM variam entre subtipos que respondem à quimioterapia ou são resistentes a esta. Apenas três drogas são associadas com resposta de 20% ou maior em pacientes com STM, são elas: doxorubicina, dacarbazina e ifosfamida (Cormier & Pollock, 2004).

A taxa de sobrevivência após cinco anos de pacientes diagnosticados com STM permanece entre 50 e 60% (Pollock, 2002). A maioria dos pacientes morre devido a metástes que se tornam evidentes em dois ou três anos após o dignóstico inicial, isso corresponde a 80% dos casos. Apesar da melhoria no tratamento de tumores locais, a metástase e, consequente, morte permanecem um grande problema para pacientes com STM de alto grau. Portanto uma forma adequada de determinação do grau do tumor é importante para um diagnóstico correto e o encaminhamento para a terapia indicada.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Determinar se a presença do canal de potássio Eag1 é um marcador de malignidade em tumores sólidos e qual o mecanismo pelo qual ele é capaz de induzir essa malignidade.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a distribuição e a freqüência da expressão do Eag1 no tecido normal;
- Determinar a freqüência da expressão do Eag1 em tumores sólidos, principalmente nos tumores do tipo sarcoma do tecido mole;
- Correlacionar a expressão do Eag1 com fatores epidemiológicos dos tumores do tipo sarcoma de tecido mole;
- Determinar a freqüência da expressão do Eag1 em linhagens celulares derivadas de sarcoma de tecido mole;
- Determinar o papel do Eag1 no crescimento *in vitro* de linhagens celulares derivadas de sarcoma de tecido mole utilizando bloqueadores ou tratamento com RNA interferência;

- Definir a sensibilidade destas linhagens a quimioterápicos em presença ou ausência de bloqueadores para Eag1 ou tratamento com RNA interferência.

3 Materiais e Métodos

3.1 Análise de amostras clínicas

3.1.1 Coleta de material

As amostras de tecido normal e de tecido tumoral (todos os tumores sólidos com exceção dos sarcomas de tecido mole) pertencem ao arquivo do Departamento de Patologia do Hospital Universitário da Universidade Georg-August de Goettingen.

Uma seleção aleatória foi realizada de acordo com o tipo dos tumores sólidos. A pesquisa dos sarcomas de tecido mole foi realizada no acervo do Instituto Nacional do Câncer (INCa) entre os anos de 1997 a 2004. O sub-tipo de sarcoma foi determinado pela equipe de patologistas do INCa através de avaliação histológica desses tumores durante o diagnóstico. A presença do Eag1 foi avaliada através da técnica de imunohistoquímica descrita na seção 3.1.3.

O *tissue-array* de amostras parafinadas foi adquirido da BioChain (Hayward, CA, USA). As lâminas utilizadas correspondem a: tecido normal (T8234708), diversos tipos tumorais e o correpondente normal (T8235712 e T8235713), diversos tipos tumorais (T8235715D), câncer de pulmão (T8235724), câncer de cólon e o correspondente normal (T8235790D) e câncer de mama (T8235721).

3.1.2 Descrição do anticorpo anti-Eag1 de cadeia única

O anticorpo é uma proteína recombinante que contém um epítopo linear composto de 10 aminoácidos, que reconhece a região do poro do canal Eag1, e está acoplado à enzima

fosfatase alcalina. O anticorpo possui reação cruzada com tecido de camundongo e rato.

A especificidade do anticorpo foi testada por ELISA, Western-blot e BIAcore, reconhecendo a proteína Eag1 recombinante, mas não a proteína Eag2 em todas as técnicas. O anticorpo foi cedido pela empresa de biotecnologia IOGen (Goettingen, Alemanha). Esse anticorpo foi utilizado apenas para os ensaios de imunohistoquímica descritos abaixo.

3.1.3 Imunohistoquímica

Os tumores selecionados foram recebidos já incluídos em bloco de parafina. Os cortes foram feitos na espessura de 0,3 a 0,4 μm em lâminas previamente cobertas com poli-lisina. Os cortes foram processados para desparafinização e re-hidratação em banhos de xilol e etanol.

A recuperação antigênica foi feita em câmara a vapor ou em micro-ondas em presença de tampão citrato pH 6,0 por 30 minutos. Após esse procedimento, foi adicionada sobre os cortes uma solução de BSA 10% em TBS por 30 minutos. O anticorpo para o Eag1 foi adicionado na titulação de 1:100, e os cortes permaneceram a temperatura de 37°C por 2 horas. Após esse período, os cortes foram lavados com água destilada e, posteriormente, lavados 3 vezes por 3 minutos com tampão de detecção (100mM Tris-base, 100mM NaCl e 5mM MgCl2 com pH 8,8). Após esse procedimento, foi adicionado sobre os cortes BCIP/NBT, o substrato da fosfatase alcalina, por 20 minutos protegido da luz. Os cortes foram lavados com água destilada e imersos na solução de Nuclear Fast Red por 3 minutos para contra-corar. Os cortes foram processados para desidratação em banhos de etanol e xilol e as lâminas montadas com bálsamo a base de xilol.

3.1.4 Avaliação da marcação

A avaliação da marcação utilizada foi baseada no teste HercepTest para Her2/Neu. Os valores foram determinados como 0 (quando menos de 10% das células tumorais foram marcadas), 1+ (marcação fraca em mais de 10% das células), 2+ (marcação intermediária

em mais de 10% das células) e 3+ (marcação forte em mais de 10% das células). Foram designadas as seguintes definições para cada valor de marcação: negativa (0), positiva (1) e altamente positiva (2 e 3). Cada lâmina foi avaliada por dois observadores independentes. Não houve discordância relacionada à marcação.

3.2 Cultivo das linhagens

3.2.1 Descrição das linhagens derivadas de sarcoma

As células foram adquiridas do Banco de células alemão DSMZ (TE-671, A-204 e HT-1080; Braunschweig, Alemanha) e do Banco de células europeu ECACC (Hs 633t; Salisbury, Reino Unido). As alíquotas congeladas foram colocadas em cultivo e essa passagem foi designada como passagem zero (P0). Todas as células foram cultivadas com meio (DMEM 1mg/ml glicose - TE-671, HT-1080 e Hs 633t; McCoy 5A - A-204) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2. As células foram tripsinizadas a cada 4-5 dias, para tanto a monocamada foi lavada com PBS e foi adicionada tripsina (0,05% tripsina/0,02% EDTA). As células foram testadas quanto a possível contaminação por micoplasma (descrita na seção 3.2.3) a cada três meses. Na tabela 1 podemos ver as células estudadas, o tecido de origem, além do tempo de duplicação designado pelo banco de célula.

Célula	**Tecido de origem**	**Tempo de duplicação [horas]**
TE-671	Rabdomiossarcoma	45
A-204	Rabdomiossarcoma	30
HT-1080	Fibrossarcoma	30
Hs 633t	Fibrossarcoma	nd

Tabela 1: Linhagens celulares derivadas de sarcoma. As linhagens celulares foram adquiridas de Banco de Células Europeus. A tabela mostra a linhagem celular e o tecido de origem correspondente além do tempo de duplicação, com exceção da linhagem Hs 633t (nd - não determinado).

3.2.2 Descrição das linhagens transfectadas com Eag1

As células foram cedidas pelo Prof. Dr. Walter Stühmer do Instituto Max-Planck de Medicina Experimental (Goettingen, Alemanha). As alíquotas congeladas foram colocadas em cultivo e essa passagem foi designada como passagem zero (P0). Todas as células foram cultivadas com meio (DMEM-F12 1:1 - HEK293-wild type [HEK-wt] e HEK293 transfectada com Eag1 [HEK-Eag1]; HAM-F12 - CHO transfectada com o vetor ptracer ou com Eag1 [CHO-pt ou CHO-Eag1]) suplementado com 10% SFB e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2. As células foram tripsinizadas a cada 4-5 dias, para tanto a monocamada foi lavada com PBS e foi adicionada tripsina (0,05% tripsina/0,02% EDTA).

3.2.3 Análise de contaminação por Micoplasma

Amostras de sobrenadante das linhagens celulares foram coletadas das culturas em confluência máxima. 100μl da amostra foram aquecidos a 95°C por 10 a 15 minutos e centrifugados brevemente em microcentrífuga. Após esse procedimento, foi adicionado ao sobrenadante 10μl da resina StraraClean^{TM} (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). O sobrenadante das amostras foi coletado após breve centrifugação e estocado a 4°C ou utilizado imediatamente para detecção de micoplasma por PCR. Na tabela 2 podemos encontrar a descrição dos reagentes utilizados na reação de PCR.

As amostras foram submetidas a dois programas no termociclador: **1**. um ciclo com os seguintes parâmentros: 2 minutos a 94°C, 2 minutos a 50°C e 2 minutos a 72°C e **2**. quarenta ciclos com os seguintes parâmentros: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C e 2 minutos a 72°C. Após esse procedimento, as amostras foram analisadas atráves de eletrofose em gel de agarose 1,5%. O resultado pode ser visto na figura 7 onde o controle positivo possui um produto de PCR correspondente a 874 bp. A figura 7 representa apenas um resultado representativo, e em nenhum momento foi encontrada contaminação por micoplasma nas células utilizadas neste estudo.

Reagente	**Volume (μl)**
Tampão de reação (10x)	5
dNTP (10mM)	1
$MgCl_2$ (50mM)	1,5
Taq DNA polimerase (5U/μl)	0,25
Primers (25μM)	1
Água-DEPC	31,25
Amostra	10
Volume final	50

Tabela 2: Descrição dos reagentes utilizados para a detecção de micoplasma por PCR. O volume descriminado para os reagentes correspondem a uma amostra.

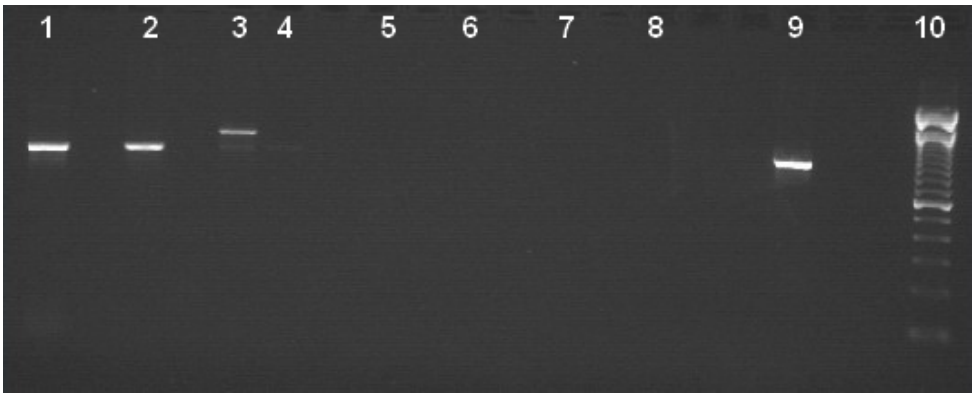


Figura 7: PCR para detecção de micoplasma. A figura mostra um resultado obtido por PCR para detecção de micoplsma. As linhas correspondem: 1. Controle positivo (DNA de micoplasma), 2. Controle positivo (célula contaminada), 3. Controle interno, 4. Controle negativo (água), 5. HT-1080, 6. Hs 633t, 7. A-204, 8. TE-671, 9. Controle positivo (célula contaminada) e 10. Padrão de pares de base (100bp).

3.3 Transcrição reversa - Reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR)

3.3.1 Isolamento de RNA

O isolamento de RNA das amostras estudadas foi realizado com auxílio do kit RNeasy (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha). As amostras foram lisadas com um tampão contendo isotiocianato de guanidina e homogeinizadas. O etanol foi adicionado ao lisado, criando condições que promovem seletivamente a ligação do RNA à membrana de sílica-gel da coluna de purificação, fazendo com que o RNA total permaneça ligado à membrana e os resíduos contaminantes sejam eliminados através de centrifugações em microcentrífuga. A amostra foi tratada com enzima DNase para degradação do DNA genômico. Após as lavagens, RNA de alta qualidade foi eluído em água livre de RNase (Figura 8). A amostra foi avaliada quanto à concentração de RNA, pureza e integridade.

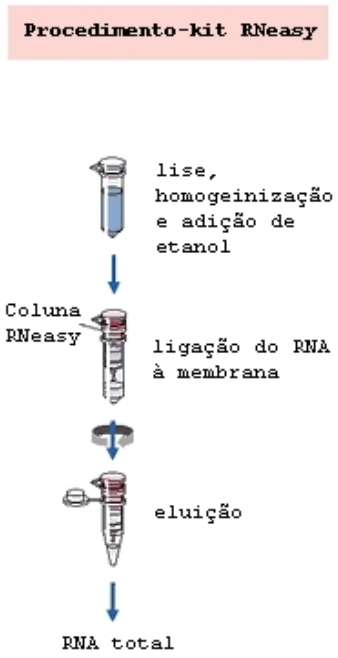


Figura 8: Isolamento de RNA. A figura mostra os principais passos para a purificação de RNA de alta qualidade com o auxílio do kit RNeasy. Adaptado do site www.qiagen.com

3.3.2 Síntese de c-DNA

Foi adicionado às amostras 1μl de Oligo $(dT)_{12-18}$ e água-DEPC de maneira que a concentração de RNA e o volume final da amostra fosse igual à 2,5μg/μl e 12μl, respectivamente. A cada passo as amostras foram misturadas com auxílio de vórtex e coletadas através de breves centrifugações. A mistura de reação foi aquecida a 70°C por 10 minutos e, rapidamente, esfriada com gelo por 1 minuto. A seguir foi adicionado tampão de reação contendo: 2μl do tampão de transcriptase reversa 10x concentrado, 2μl de $MgCl_2$ 25mM, 2μl de DTT 0,1mM e 1μl de dNTPs 10mM. A mistura de reação foi aquecida por 5 minutos e, logo após, foi adicionado 1μl da enzima transcriptase reversa ou água-DEPC. Após a adição da enzima ou água, as amostras foram incubadas por 50 minutos a 42°C e, a seguir, 15 minutos a 70°C. Foi adicionado 1μl da enzima RNase para degradação do RNA presente nas amostras de maneira a evitar possíveis contaminações nos ensaios de qPCR. A mistura de reação foi incubada por 20 minutos a 37°C. Ao final do procedimento foi adicionado 4μl de água-DEPC de maneira que o volume final de reação consistiu em 25μl com concentração final de c-DNA igual à 0,1μg/μl. Todos os reagentes utilizados para a síntese de c-DNA foram adquiridos na Invitrogen (Karlsruhe, Alemanha).

3.3.3 Primers

A sequência dos primers utilizados nos ensaios de qPCR está disposta na tabela 3. A sonda foi desenhada de acordo com o sistema de detecção TaqMan onde a molécula fluorescente (reporter; FAM or JOE) está ligada covalentemente à porção 5' do oligonucleotídeo. Quando a sonda se encontra intacta, TAMRA (quencher) suprime a fluorescência do reporter pela energia de transferência do tipo Froester (FRET). As sondas para os diferentes genes foi desenhada de maneira a se ligarem na molécula de DNA entre os primers senso e antisenso.

Gene	Primer	Seqüência
Eag1a	Senso	5'-TCT GTC CTG TTT GCC ATA TGA TGT-3
	Sonda	5'-**(FAM)** AAC GTG GA **(Tamra)** GAC GGC ATC AGC AGC CT-3'
	Antisenso	5'-CGG AGC AGC CGG ACA A-3'
Eag2	Senso	5'-CCC TCT GCT TTG TGG TGT CAG-3
	Sonda	5'-**(FAM)** CCC TTC CC **(Tamra)** AAA ATA GCC ACC ACC TCA-3'
	Antisenso	5'-CGG ACG TTC GCA CAT GC-3'
GAPDH	Senso	5'-CCA CAT CGC TCA GAC ACC AT-3
	Sonda	5'-**(FAM)** AAT ACG ACC AAA TCC GTT TCC GAC CT **(Tamra)**-3'
	Antisenso	5'-ACC AGA GTT AAA AGC AGC CCT G-3'
TFR	Senso	5'-GAC TTT GGA TCG GTT GGT GC-3
	Sonda	5'-**(Joe)** TGA ATG GCT AGA GGG **(Tamra)** A CCT TTC GTC CC-3'
	Antisenso	5'-CCA AGA ACC GCT TTA TCC AGA T-3'

Tabela 3: Sequência dos primers utilizados em qPCR. A sequência dos primers senso e antisenso juntamente com a sonda do tipo TaqMan para cada gene estudado, i.e., Eag1 (Eag1a), Eag2, gliceraldeído-3-fostato desidrogenase (GAPDH) e receptor de transferina (TFR).

3.3.4 PCR quantitativo (qPCR)

A reação de PCR consistiu de quarenta ciclos com os seguintes parâmentros: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 15 segundos a 56°C e 1 minuto a 60°C. A figura 9 representa o resultado obtido para o gene *EAG1a*, o exemplo utilizado corresponde à linhagem CHO-Eag1. Os reagentes utilizados na reação de qPCR estão descritos na tabela 4.

Os valores correspondentes ao número de ciclos foram convertidos para número de cópias por μl através de uma curva padrão realizada para cada gene. O valor de número de cópias por μl foi normalizado pelo obtido para o gene do receptor de transferrina em

Reagente	Volume (μl)
Tampão Taq Man (10x)	1
dNTP[a]	1
$MgCl_2$ (25mM)	1,4
AmpErase (1U/μl)	0,2
AmpliTaq-polimerase (5U/μl)	0,4
Primers[b]	1
Água-DEPC	4,2
Amostra	1
Volume final	10

Tabela 4: Descrição dos reagentes utilizados no ensaio de qPCR.
[a] dNTP- 2,5mM CTP, ATP e GTP e 5mM UTP.
[b] Concentração inicial igual à: 900nM (senso e antisenso) e 250nM (sonda)

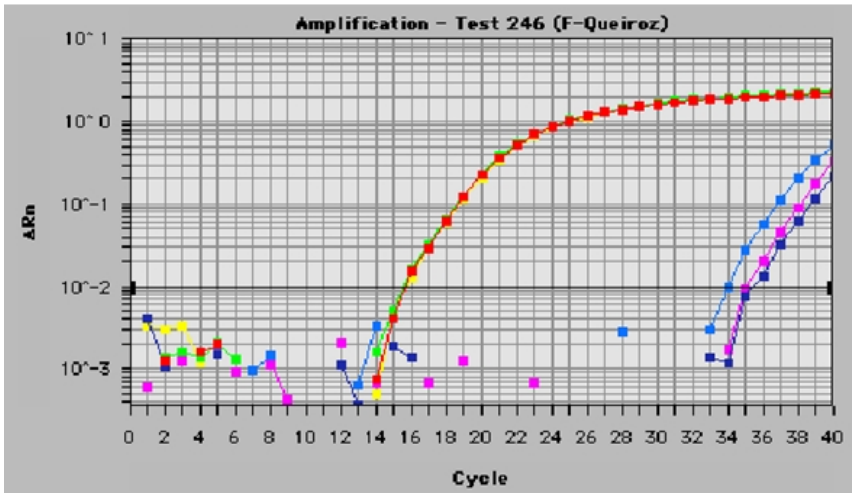


Figura 9: Exemplo de resultado do qPCR. A figura mostra um resultado obtido por qPCR para o gene Eag1a da linhagem CHO-Eag1, onde os traços vermelho, amarelo e verde e os traços azul, rosa e roxo correspondem às amostras tratadas ou não com transcriptase reversa, respectivamente. O gráfico mostra a intensidade de fluorescência detectada em cada ciclo de reação.

cada caso estudado.

3.4 RNA Interferência (RNAi)

3.4.1 Mecanismo de ação

A técnica de RNA interferência se baseia no silenciamento pós-transcripcional do gene através da transfecção de pequenos RNA de dupla fita (siRNA). O siRNA se liga ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) que reconhece a seqüência RNA alvo e promove a sua degradação (Figura 10, (Bantounas et al., 2004)).

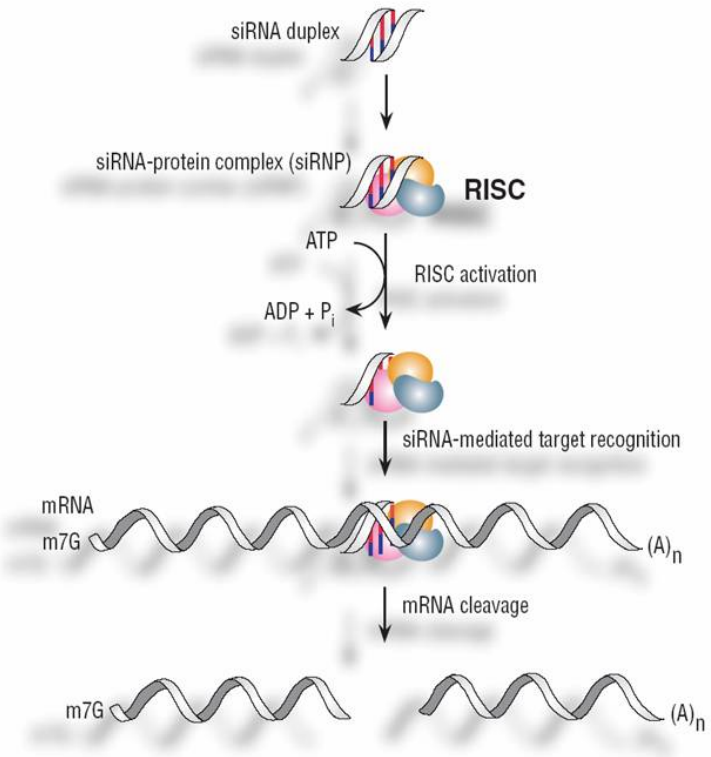


Figura 10: Mecanismo de ação da técnica de RNA interferência. O siRNA se liga ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) que reconhece a seqüência RNA alvo e promove a sua degradação. Adaptado de http://www.weizmann.ac.il/home/csyakob. Acesso em 12/12/2005

3.4.2 Duplexes de siRNA

A seqüência dos siRNA utilizados nos ensaios de RNA interferência para Eag1 e Eag2 está disposta na tabela 5. Além disso, como controle negativo foi utilizado uma sequência de siRNA que não possui similaridade com genes conhecidos (Yatabe et al.,

Gene	siRNA	Seqüência Alvo	Região de anelamento
Eag1	A	TCG GCG GTC CAA TGA TAC TAA	102-122
	B	CTG AGA TAC TCA GGA TAT TAA	2810-2830
	C	TAC AGC CAT CTT GGT CCC TTA	726-746
	D	CCG GAA CCT GAT TCT GAC GTA	2031-2051
Eag2	A	CAA GGA TAT TAC GTT GTT CAA	384-404
	B	CGC CAT TAT GGT TCC TTA TAA	684-704
	C	CTC AAC ATG GTC CAT GTC AAA	1530-1550
	D	TAA GCT CAT AAG GAT GAA CTA	843-863

Tabela 5: A sequência alvo dos siRNA para Eag1 e Eag2 está mostrada na tabela. Os siRNA foram adquiridos da empresa Qiagen GmbH.

2004; Koshiji et al., 2004). Essa sequência foi definida como scrambled.

3.4.3 Transfecção com siRNA

Diferentes células possuem características distintas, portanto não foi possível utilizar um único protocolo de transfecção. Os protocolos foram otimizados para cada linhagem celular estudada e estão dispostos abaixo:

Linhagem HEK

As células foram plaqueadas 24 horas antes da transfecção na concentração de 10^5células/ml em garrafa de 25cm^2. Foram adicionados 15μl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) à 750μl de Optimen, e essa mistura foi designada como tubo 1 . Em um outro tubo, siRNA para Eag1, Eag2, GAPDH ou scrambled foram adicionados à 750μl de Optimem na concentração final de 25nM para cada siRNA (A, B, C ou D) ou 100nM quando todos os siRNA foram usados em conjunto (A-D), e essa mistura foi designada como tubo 2. Após incubação de 15 minutos à temperatura ambiente (TA) do tubo 1, ambos os tubos foram misturados e incubados por 25 minutos à TA. Foi adicionado 4,5ml de Optimen à mistura contendo siRNA e lipofectamine e o volume final de 6ml foi aplicado às células. O tempo de transfecção foi de 4 horas.

Linhagem TE-671 (rabdomiossarcoma) e HT-1080 (fibrossarcoma)

As células foram plaqueadas 24 horas antes da transfecção na concentração de 10^5células/ml em garrafa de 25cm^2. Foram adicionados 50μl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) à 450μl de Optimen, e essa mistura foi designada como tubo 1 . Em um outro tubo, siRNA para Eag1, Eag2, GAPDH ou scrambled foram adicionados à 500μl de Optimem, e essa mistura foi designada como tubo 2. Após incubação de 15 minutos à TA do tubo 1, ambos os tubos foram misturados e incubados por 25 minutos à TA. Foi adicionado 1ml de Optimen à mistura contendo siRNAs e lipofectamine e o volume final de 2ml foi aplicado às células. O tempo de transfecção foi de 6 horas.

Linhagem Hs 633t (fibrossarcoma)

As células foram plaqueadas 24 horas antes da transfecção na concentração de 10^5células/ml em garrafa de 25cm^2. Foram adicionados 50μl de Oligofectamine (Invitrogen) à 200μl de Optimen, e essa mistura foi designada como tubo 1 . Em um outro tubo, siRNA para Eag1, Eag2, GAPDH ou scrambled foram adicionados à 250μl de Optimem, e essa mistura foi designada como tubo 2. Após incubação de 15 minutos à TA do tubo 1, ambos os tubos foram misturados e incubados por 25 minutos à TA. Foi adicionado 1,5ml de Optimen à mistura contendo siRNA e oligofectamine e o volume final de 2ml foi aplicado às células. A transfecção foi realizada *over-night*.

Linhagem A-204 (rabdomiossarcoma)

As células foram plaqueadas 24 horas antes da transfecção na concentração de 10^5células/ml em garrafa de 25cm^2. Foram adicionados 25μl do reagente de transfecção Dharmacon 2 (Dharmacon, Chicago, IL, EUA) à 225μl de Optimen, e essa mistura foi designada como tubo 1 . Em um outro tubo, siRNA para Eag1, Eag2, GAPDH ou scrambled, e essa mistura foi designada como tubo 2. Após incubação de 10 minutos à TA do tubo 1, ambos os tubos foram misturados e incubados por 20 minutos à TA. Foi adicionado 1,5ml de Optimen à mistura contendo siRNA e dhamacon 2 e o volume final

de 2ml foi aplicado às células. A transfecção foi realizada *over-night*.

3.5 Detecção do Eag1 por western-blot

Para obter os lisados, as células foram cultivadas em garrafas de 175 cm^2 até a confluência máxima e raspadas com *rubber policeman*. A amostra foi lavada por 3 vezes com PBS e lisada com tampão de lise não desnaturante (1% Triton-X100, 300mM NaCl, 5mM EDTA e 50mM Tris-HCl com pH 7,4). A amostra foi centrifugada por 15 minutos a 16.200rpm e o sobrenadante coletado. A concentração de proteína foi determinada pelo método de BCA (Pierce, Bonn, Alemanha).

A amostra foi desnaturada por aquecimento a 99°C por 10 minutos com tampão Laemmli e separada por SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 7,5%). A transferência para membrana de nitrocelulose foi realizada a TA em tampão de transferência (10mM $NaHCO_3$, 3mM Na_2CO_3, 0,01% SDS e 20% metanol) com agitação constante seguindo os parâmetros: 10V, 10 minutos; 20V, 10 minutos; 30V, 10 minutos; 40V, 10 minutos e 50V, 25 minutos. As membranas foram incubadas por 1 hora com 1% caseína em TBS-T (0,15M NaCl, 20mM Tris-HCl com pH 7,5 e 0,05% Tween 20). O anticorpo primário (anti-Eag1.9391 [1:100] e anti-GAPDH [1:4.000]) foi diluído em 1% caseína em TBS-T e a membrana foi incubada por 2 horas a TA com agitação constante. A membranda foi lavada 5 vezes com 100ml de água destilada, e posteriormente com TBS-T por 5 minutos. O anticorpo secundário acoplado com peroxidase (1:10.000) foi diluído em 1% caseína em TBS-T e a membrana foi incubada por 1-2 horas a TA com agitação constante. A membranda foi lavada 7 vezes com 100ml de água destilada, e posteriormente com TBS-T por 5 minutos. A membrana foi revelada utilizando o sistema enzimático ligado à quimioluminescência (kit ECL, PerkinElmer Life Sciences, Wellesley, MA, EUA). O filme de raio X foi impres-

sionado e revelado (Napp et al., 2005).

3.6 Análise Funcional

3.6.1 Aspectos gerais da citometria de fluxo

As medidas foram realizadas em citômetro de fluxo FACSAria Becton Dickinson (Becton Dickinson - Heidelberg, Alemanha) equipado com três lasers nos seguintes comprimentos de onda: 407, 488 e 633 nm. Este equipamento permitiu a leitura simultânea do espalhamento frontal de luz (*foward-scatter* - FSC) e do espalhamento de luz coletada a 90° (*side-scatter* - SSC). Anti-Eag1 conjugado com quantum dots foi excitado em 488nm e a fluorescência emitida captada no detector com filtro de 695/40nm e espelho dicróico de 556nm. O iodeto de propídeo foi excitado em 488nm e a fluorescência emitida foi captada no detector com filtro de 695/40nm e espelho dicróico de 655nm ou 610/20 e espelho dicróico 595nm. Anexina-FITC foi excitado em 488nm e a fluorescência emitida foi captada no detector com filtro de 530/30nm e espelho dicróico de 502nm.

Os dados coletados foram analisados usando o programa BD FACSDiva (Becton Dickinson). Todas as medidas foram efetuadas na temperatura de 4°C, com exceção das amostras para determinação de apoptose cuja as medidas foram efetuadas à 37°C. Todos os eventos (10.000) observados durante o processo de aquisição foram analisados, sendo utilizadas regiões (gates) para exclusão ou inclusão de dados.

3.6.2 Detecção do Eag1 por citometria de fluxo

As células foram transfectadas com siRNA scrambled e Eag1, e após 4 horas foram distribuídas em placa de 6 poços. Em tempos determinados (24-144 horas) as células foram tripsinizadas e lavadas duas vezes com PBS. Ao precipitado foi adicionado 100μl de uma solução contendo: 0,1% saponina em PBS e anti-Eag1 quantum dots (diluição 1:500) e a amostra incubada por 2 horas a 4°C. A amostra foi lavada 2 vezes com 0,1% saponina em

PBS e ressuspendida em 1ml de PBS em tubo próprio de citometria.

O anticorpo anti-Eag1 conjugado com quantum dots é uma mistura do anti-Eag1.33 e anti-Eag1.62 (Hemmerlein et al., a). Quantum dots são semicondutores de nanocristais e possuem tamanho que pode variar entre alguns nanômetros ou algumas centenas de nanômetros. A cor do quantum dot varia conforme o tamanho, quanto maior o quantum mais próximo do vermelho ele será e quanto menor, mais próximo do azul. Além disso a molécula de quantum dots pode ser excitada por um amplo espectro de luz mas emite a fluorescência em uma faixa muita restrita, além de serem bastante estáveis o que torna essas moléculas excelentes ferramentas para a microscopia e citometria de fluxo (Michalet et al., 2005).

3.6.3 Ensaio de viabilidade celular por citometria de fluxo

As células foram tripsinizadas nos tempos determinados e lavadas 2 vezes com PBS. O precipitado foi ressuspendido em PBS na concentração final de 10^6 células/ml. Alíquotas de 1ml foram colocadas em tubos para citometria e foram adicionados 2μl de iodeto de propídeo (100μg/ml). Os tubos foram acondicionados à 4°C e as amostras foram lidas no citômetro de fluxo.

3.6.4 Ensaio de morte celular por citometria de fluxo

As células foram tripsinizadas nos tempos determinados e lavadas 2 vezes com PBS. O precipitado foi ressuspendido em tampão de ligação (140mM NaCl, 2,5mM $CaCl_2$, 10mM Hepes com pH 7,5) na concentração final de 10^6 células/ml. Alíquotas de 100μl foram colocadas em tubos para citometria e foram adicionados 5μl de Anexina-FITC e 2μl de iodeto de propídeo (100μg/ml). Após incubação de 10 minutos protegido da luz, foram adicionados 400μl do tampão de ligação e as amostras foram lidas no citômetro de fluxo.

3.6.5 Ensaio de determinação do ciclo celular por citometria de fluxo

As células foram tripsinizadas nos tempos determinados e lavadas 2 vezes com PBS. O precipitado foi ressuspendido em PBS na concentração final de 10^6 células/ml. Alíquotas de 0,5ml foram colocadas em tubos para citometria e foram adicionados 25μl de iodeto de propídeo (1mg/ml), 25μl de Saponina 6% e 10μl de RNAse (10mg/ml). Após incubação de 15 minutos à 4°C protegido da luz as amostras foram lidas no citômetro de fluxo.

3.6.6 Ensaio MTT

Para os ensaios de viabilidade, as células foram plaqueadas a uma densidade de 10^4 ou 5x10^4 células/ml e o MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) na concentração de 5 mg/ml foi adicionado à cultura nos tempos indicados. Após 4 horas, a reação foi paralizada usando 100μl do revelador (10% SDS em 0,01 N HCl). A leitura foi realizada em filtro de 570nm após incubação *over night* (Mosmann, 1983).

3.6.7 Determinação do IC50 do quimioterápico doxorubicina

As células foram plaqueadas a uma densidade de 10^4 ou 5x10^4 células/ml e variadas concentrações de doxurubicina (0-1μM) foram adicionadas. Após 96 horas na presença ou ausência de bloqueadores (imipramina e astemizol) ou após transfecção com siRNA, foi realizado o ensaio MTT e os dados coletados foram tratados pelo programa GraphPad Prism v4.0. Os valores de IC_{50} foram definidos através de *fitting* de uma curva sigmóide dose-resposta com inclinação variável.

3.6.8 Fármacos

Os fármacos imipramina e astemizol (Sigma, Seelze, Alemanha) foram utilizados nos ensaios de MTT e de determinação do IC_{50} de doxorubicina. A concentração final foi

igual à 1μM para astemizol e 10μM para imipramina.

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism v4.0. Diferenças entre expressão do Eag1 e sexo, idade, tamanho, grau, histologia e localização do tumor foram calculadas usando o teste chi-quadrado (teste χ^2). O teste t não pareado foi utilizado para comparações entre cada tratamento e o seu respectivo controle.

4 Resultados

4.1 Distribuição do Eag1 em tecido normal

As amostras de diferentes tipos de tecido normal foram analisadas por imunohistoquímica para determinação da expressão do Eag1. Na tabela 6 podemos ver a intensidade de expressão do Eag1 nos diferentes tecidos. Para quantificar a marcação do Eag1, foi utilizada uma adaptação simplificada da quantificação do HER2 que é usada rotineiramente no diagnóstico do câncer de mama (HercepTest), que classifica as amostras em 0, 1+, 2+ e 3+ em função do número de células marcadas e da intensidade da marcação por célula (seção 3.1.4). Foram designadas as seguintes definições para cada valor de marcação: negativa (0), positiva (1) e altamente positiva (2 e 3).

No tecido normal, a expressão do Eag1 foi considerada negativa mas em alguns casos obtivemos positividade em populações específicas dentro do tecido estudado. No trato gastro-intestinal, somente as células fonte da glândula gástrica foram consideradas altamente positivas, as células parietais da glândula gástrica, bem como, a superfície epitelial gástrica, o intestino grosso e o apêndice se mostraram positivos para Eag1. As glândulas acessórias do sistema digestivo, como a vesícula biliar e as células do ácino pancreático também foram consideradas positivas.

No sistema reprodutor feminino, o epitélio ectocervical, a trompa de falópio, a glândula mamária e o estroma do ovário foram considerados positivos, enquanto que o epitélio endometrial e o epitélio folicular do ovário se mostraram altamente positivos para Eag1. A expressão do Eag1 foi considerada altamente positiva no trofoblasto, mas o es-

Tecido	Expressão Eag1	Tecido	Expressão Eag1
Esôfago	0	Glândula mamária	1
Glândula salivar	0	Epitélio do ovário	0
Superfície epitelial gástrica	1	Estroma do ovário	1
Células mucosas da glândula gástrica	0	Epitélio folicular do ovário	2
Células parietais da glândula gástrica	1	Estroma da placenta	0
Células fonte da glândula gástrica	2	Trofoblasto	2
Duodeno	0	Alvéolo pulmonar	0
Intestino grosso, apêndice	1	Glândula submucosa pulmonar	0
Fígado	0	Epitélio brônquico	0
Ducto bilial, vesícula biliar	1	Centro germinativo, linfócitos	1
Ducto pancreâtico	0	Linfócitos da área intergerminativa	0
Pâncreas endócrino	0	Plasmócitos	2
Ácino pancreático	1	Macrófagos	2
Epitélio tubular renal	0	Timo (linfócito e epitélio)	0
Ducto coletor renal	0	Epiderme	1
Epitélio transitorial urinário	0	Apêndices epidermais	1
Epitélio da glândula prostática	0	Glândula adrenal	0
Estroma da próstata	0	Tireóide	0
Vesícula seminal	0	Paratireóide	1
Células Sertoli	0		
Células Leydig	0		
Espermatogênese	0		
Epitélio endocervical	0		
Epitélio ectocervical	1		
Estroma endometrial	0		
Epitélio endometrial	2		
Miométrio	0		
Trompa de falópio	1		

Tabela 6: Distribuição e expressão do Eag1 em tecido normal. A intensidade de marcação igual a 0 foi considerada negativa, 1 foi considerada como positiva, e 2 ou 3 como altamente positiva. (n=157)

troma da placenta se mostrou completamente negativo. No sistema reprodutor masculino, todos os tecidos foram negativos para Eag1.

No sistema imunológico, os macrófagos e os plasmócitos se mostraram altamente positivos ao contrário dos linfócitos do centro germinativo. A epiderme e as apêndices epidermais se mostraram positivos para Eag1. A tireóide foi considerada negativa, enquanto que a paratireóide se mostrou positiva para Eag1. Outros órgãos foram considerados negativos.

Na tabela 6 podemos ver a descrição detalhada da distribuição e da expressão do Eag1 nos diferentes tecidos mostrando que o Eag1 tem a sua expressão restrita à algumas populações celulares além do sistema nervoso central.

4.2 Expressão do Eag1 em tecido tumoral

Na tabela 7 podemos ver os diferentes tipos de tumores sólidos e a freqüência de casos positivos para Eag1 que foram analisados por imunohistoquímica. A freqüência da expressão do Eag1 varia entre 43% (carcinoma de esôfago) a 82% (carcinoma de mama), entre os tumores nos quais a freqüência ficou em 100% se encontram o carcinoma da vesícula biliar, pancreático, de próstata e melanoma maligno com número de casos estudados igual à 1.

Alguns tumores de relevância epidemiológica como carcinoma de cólon (40 casos) e de mama (116 casos) mostraram uma alta freqüência de expressão, 78 e 82%, respectivamente. Além do elevado número de casos positivos, a intensidade da marcação foi predominantemente altamente positiva quando comparado ao tecido normal cognato (intestino grosso e glândula mamária). Juntamente com os dados referentes a outras neoplasias, podemos ver que existe uma alta freqüência de imunoreatividade para Eag1 quando comparamos tecido normal e tecido tumoral.

Além das amostras obtidas no arquivo do Departamento de Patologia do Hospital

Tumor	**Expressão Eag1**	
	Casos (N)	% Positivo
Carcinoma de esôfago	12	66
Carcinoma gástrico	14	43
Carcinoma de cólon	40	78
Carcinoma hepatocelular	8	67
Carcinoma da vesícula biliar	1	100
Carcinoma pancreático	1	100
Carcinoma celular renal	9	67
Carcinoma celular transicional	6	66
Carcinoma de próstata	1	100
Carcinoma de mama	116	82
Carcinoma de brônquio	73	56
Carcinoma papilar da tireóide	3	66
Melanoma maligno	1	100
Total	286	71

Tabela 7: Expressão do Eag1 em diferentes tipos de tumores sólidos. A tabela mostra o número de casos para cada tipo de tumor e o percentual de tumores positivos para o Eag1.

Universitátio da Universidade Georg-August de Goettingen, nós utilizamos *tissue-array* contendo amostras de tecido normal e tumoral. A análise da freqüência dos casos positivos por imunohistoquímica nessas amostras mostrou que a maioria dos tumores possui alta expressão do Eag1 (Figura 11). No caso do tecido normal, a distribuição da freqüência entre os três níveis de expressão foi homogênea.

A alta freqüência de sinais positivos do *tissue-array* no tecido normal pode ser devido à fixação do tecido ser menos controlada, já que nesse caso as amostras geralmente são derivadas de necrópsias. No caso das amostras de biópsias ou de material cirúrgico obtidas no arquivo do Departamento de Patologia do Hospital Universitátio da Universidade Georg-August de Goettingen passam por um processo de fixação mais controlado, como é o caso das amostras de tumores que constituem o *tissue array*. Desse forma podemos concluir que a preservação da amostra é de extrema importância para a marcação

do Eag1.

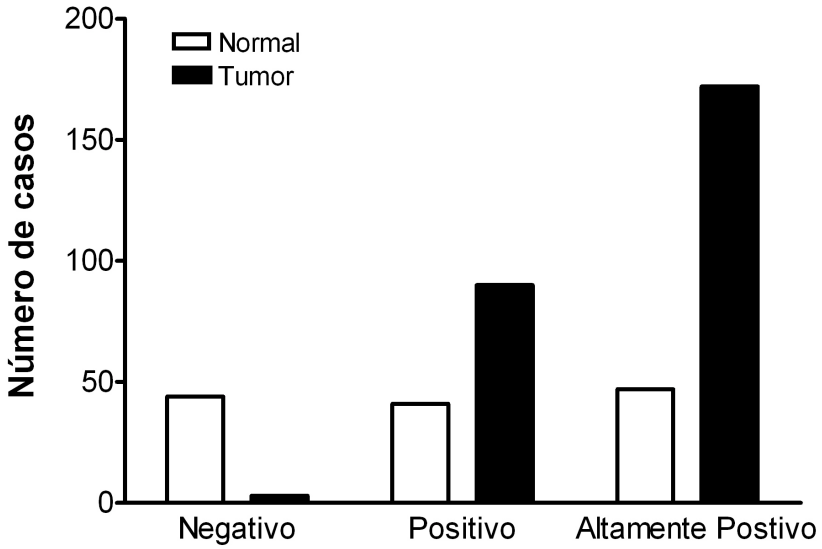


Figura 11: Histograma da expressão do Eag1 em amostras de tissue-array. A expressão do Eag1 em tecido normal (barra branca) e em tecido tumoral (barra negra). As amostras de tecido tumoral mostram alta expressão do Eag1, enquanto que as amostras de tecido normal mostram uma distribuição homogênea nos três níveis de expressão.

4.3 Expressão do Eag1 em pacientes com sarcoma do tecido mole

Amostras de 210 pacientes diagnosticados com sarcoma do tecido mole foram selecionadas para avaliação da expressão do Eag1 por imunohistoquímica. Uma alta positividade foi observada entre as amostras estudadas. A expressão para Eag1 foi exclusivamente citoplasmática mostrando uma marcação perinuclear (Figura 12). A intensidade da marcação foi geralmente homogênea dentro do caso testado. A marcação para Eag1 foi predominante em células tumorais quando comparado às células normais. O tecido normal dos pacientes também foi analisado e em todos os casos foi observada a ausência ou uma fraca marcação. Na figura 12 podemos observar a marcação do Eag1 em dois casos estudados: rabdomiossarcoma (A) e fibrossarcoma (B).

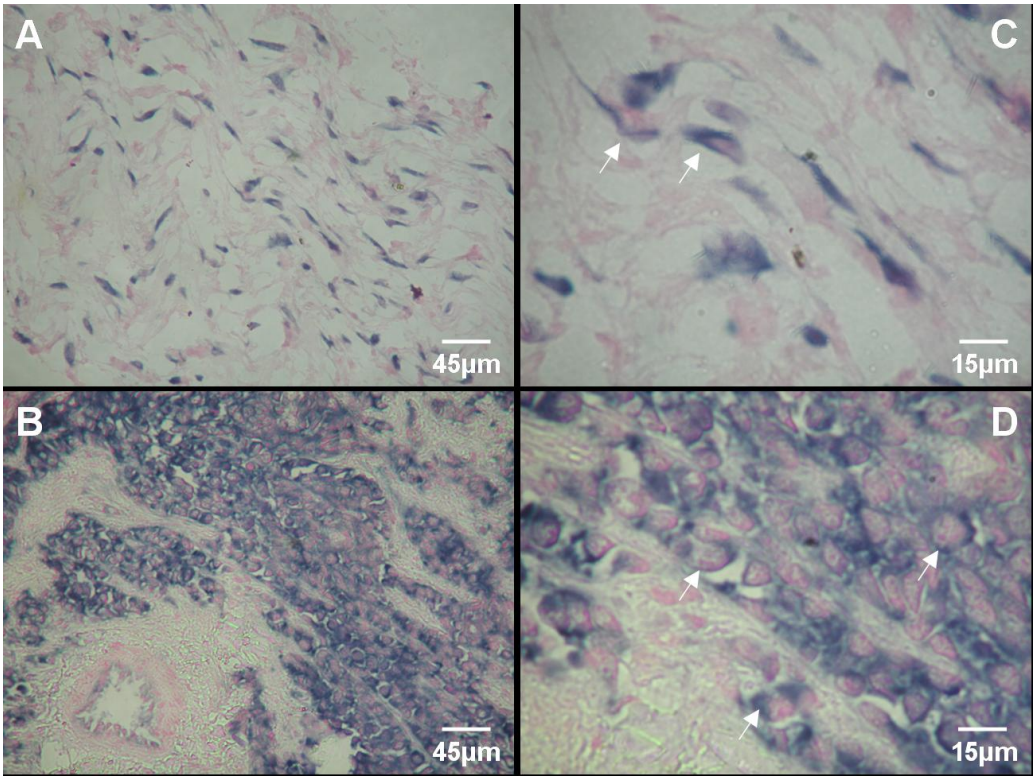


Figura 12: Padrão de expressão do anti-Eag1 em sarcoma de tecido mole. Exemplo da marcação para Eag1 em dois tipos de sarcoma de tecido mole: (A) fibrossarcoma mixóide e (B) rabdomiossarcoma. A expressão para Eag1 foi exclusivamente citoplasmática com marcação perinuclear (C, D; setas). A marcação para Eag1 foi predominante em células tumorais quando comparado às células normais. Aumento: x200 (A, B) e x600 (C, D).

Ao analisar a freqüência de casos positivos para Eag1, foi observado uma correlação entre o ano de coleta da amostra e a freqüência de casos positivos. A figura 13 *insert* mostra a distribuição dos tumores positivos para Eag1 *versus* o ano de coleta da amostra (1997-2004). A maioria dos casos estudados, entre os anos de 1997 e 2000, se mostrou negativa, enquanto 65% dos casos de 2001 se mostraram positivos. O número limitado de casos no ano de 2002 não nos permitiu fazer uma análise mais detalhada, mas 70% dos tumores nos anos de 2003 e 2004 se mostraram positivos. Quando analisamos o tempo entre o processamento das amostras e a realização da imunohistoquímica, vimos que tumores processados em até 2 dois anos anteriores à marcação podem ser utilizados

já que neste caso o antígeno se encontra estável (Figura 13). Apesar do antígeno para Eag1 degradar em amostras processadas mais antigas que três anos, no tempo estudado (6 anos) a freqüência de casos positivos para Eag1 nessas amostras ficou em torno de 20%. A análise dos dados sugere que o antígeno para Eag1 não é bem conservado ao longo dos anos, ocorrendo uma possível degradação do epítopo nos blocos parafinados, e que essa degradação não é completa já que ainda podemos detectar o Eag1 em 20% das amostras mais antigas que três anos. Devido a essa propriedade do Eag1, não foi possível realizar estudos retrospectivos.

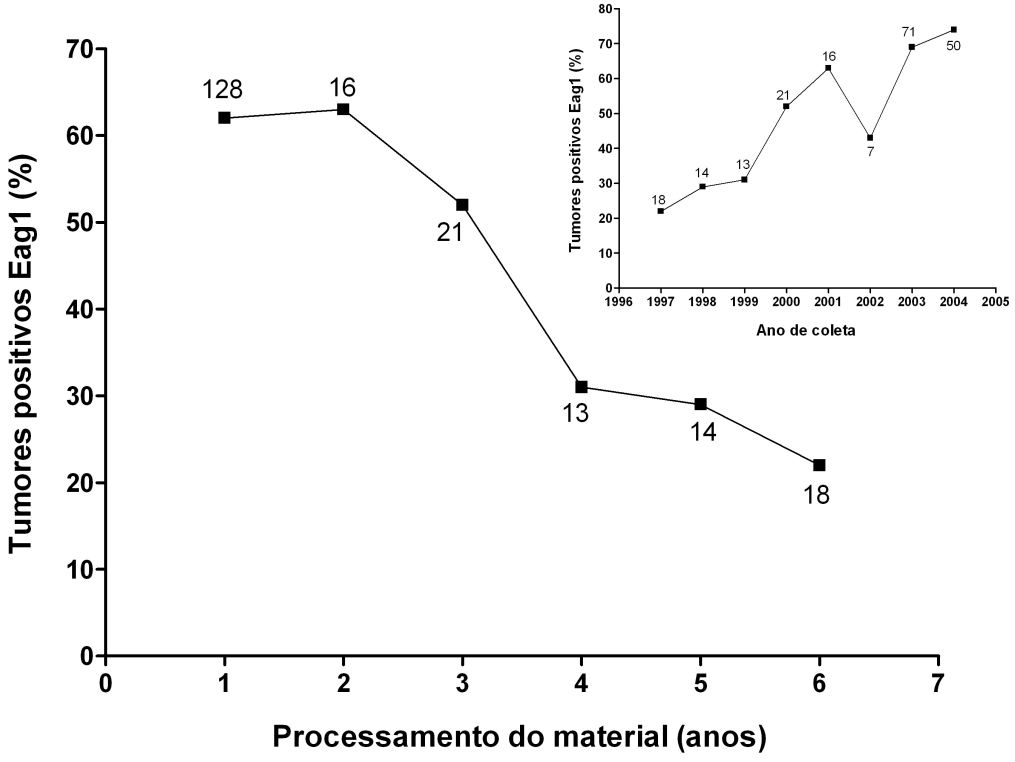


Figura 13: Curva de degradação do antígeno para Eag1 ao longo do tempo. O percentual de tumores positivos para Eag1 diminui após três anos em que a amostra foi processada, indicando que o antígeno para Eag1 não é estável em tecidos parafinados. No *insert* podemos ver que o percentual de tumores positivos para Eag1 aumenta ao longo dos anos (1997-2004). O números indicados representam o número de casos testados para cada ano.

Para a análise quantitativa descrita neste estudo foram utilizadas somente amostras obtidas de 119 pacientes que sofreram cirurgia em 2003 e 2004. A tabela 8 sumariza as características clinico-patológicas das amostras assim como a expressão do Eag1. A freqüência da expressão do Eag1 em sarcomas de tecido mole foi de 71% com os valores variando entre 56% (lipossarcoma) a 82% (rabdomiossarcoma). Não foi encontrada nenhuma associação entre a expressão do Eag1 e fatores epidemiológicos tais como: sexo, idade, grau, tamanho e localização do tumor. A expressão do Eag1 em tumores primários ou em metástases (75 and 85%, respectivamente) foi maior quando comparado às recidivas (56%), mas essa diferença não alcançou significância estatística.

Utilizando o sistema de quantificação HercepTest foi observado que 57 pacientes (47% da população total) possuem expressão altamente positiva enquanto que 39 pacientes possuem expressão positiva (Tabela 9). Nenhum dos dois grupos mostrou correlação com os fatores epidemiológicos estudados, mas foram observadas diferenças entre os tipos histológicos (Tabela 9). Rabdomiossarcoma e sinoviossarcoma apresentaram alta expressão do Eag1 (100% e 88% dos tumores ($p < 0{,}01$), respectivamente). Os outros tipos histológicos tiveram distribuição homogênea entre expressão positiva e altamente positiva do canal.

4.4 Expressão do Eag1 em células derivadas de sarcoma de tecido mole

Linhagens celulares derivadas de sarcoma de tecido mole foram selecionadas como modelo para estudos *in vitro*. Como primeiro passo, foi estabelecida a presença dos canais Eag1 e Eag2 ao nível de RNA mensageiro (mRNA). As células que não expressam Eag1 ou Eag2 possuem um número reduzido de cópias de mRNA, na faixa de 0,3 cópias por 10^3 células. Na tabela 10 podemos observar a expressão de mRNA para Eag1 e Eag2 e para o receptor de transferrina (TFR) (controle interno), determinada por qPCR. As

	Número de tumores (%)	**Expressão do Eag1 (%)**
Sexo		
Masculino	54(45%)	35(65%)
Feminino	67(55%)	51(76%)
Idade (anos)		
≤ 14	11(9%)	9(82%)
15-34	19(16%)	14(74%)
35-64	65(54%)	46(71%)
≥ 65	26(21%)	17(65%)
Histologia		
Fibrossarcoma	12(10%)	8(67%)
Leiomiossarcoma	26(22%)	19(73%)
Lipossarcoma	32(26%)	18(56%)
Fibrohistiocitoma Maligno	22(18%)	18(81%)
Rabdomiossarcoma	17(14%)	14(82%)
Sinoviossarcoma	12(10%)	9(75%)
Grau		
Baixo	70(58%)	49(70%)
Moderado	23(19%)	15(65%)
Alto	28(23%)	21(75%)
Tamanho		
< 5 cm	74(61%)	52(70%)
> 5 cm	47(39%)	33(70%)
Localização		
Primário	76(63%)	57(75%)
Recidiva	32(26%)	18(56%)
Metástase	13(11%)	11(85%)
Total	121	86 (71%)

Tabela 8: Características clinico-patológica dos pacientes e expressão do Eag1. Os resultados representam o número de casos estudados e, em parênteses, o número percentual em relação à população total.

Histologia	Positivo	Altamente Positivo
Fibrossarcoma	4(50%)	4(50%)
Leiomiossarcoma	9(48%)	10(52%)
Lipossarcoma	5(28%)	13(72%)
Fibrohistiocitoma Maligno	10(56%)	8(44%)
Rabdomiossarcoma	0(0%)	14(100%)∗
Sinoviossarcoma	1(12%)	8(88%)∗
Total	29	57

Tabela 9: Associação entre histologia e expressão do Eag1. Os resultados representam o número de casos estudados e, em parênteses, o número percentual em relação à população total. A marcação igual a 1 foi considerada positiva e 2 ou 3, altamente positiva.∗ p<0,01

células derivadas de fibrossarcoma expressam tanto Eag1 quanto Eag2 enquanto as células derivadas de rabdomiossarcoma somente expressam mRNA para Eag1.

Normalizando os dados obtidos para Eag1 pelo TFR, o número de cópias por 10^3 células passa a ser igual a: TE-671, 0,124; A-204, 0,104; HT-1080, 0,024 e Hs 633t, 0,023. O número de cópias para Eag1 presente nas células derivadas de rabdomiossarcoma é em torno de 2,5 vezes maior do que nas células derivadas de fibrossarcoma.

Célula	Eag1	Eag2	TFR	Eag1/TFR
Rabdomiossarcoma				
TE-671	373,1 ± 0,7	0,0004 ± 0,009	2997,5 ± 0,6	0,124
A-204	306 ± 0,6	0,0003 ± 0,01	2923,9 ± 0,7	0,104
Fibrossarcoma				
HT-1080	141,4 ± 0,5	65,2 ± 0,6	5891,5 ± 0,9	0,024
Hs 633t	147,4 ± 0,9	74,7 ± 0,8	6255,7 ± 0,9	0,023
Epitelial				
CHO-pt	0,29 ± 0,8	0,0005 ± 0,001	-	-
CHO-Eag1	39326 ± 0,8	0,0003 ± 0,001	-	-

Tabela 10: Expressão do Eag1, Eag2 e TFR por qPCR. Os resultados mostram o número de cópias de mRNA por 10^3 células e representam a média e erro padrão de quatro experimentos (n=3).

O fato de termos expressão ao nível de RNA não significa que exista expressão da proteína de um determinado gene. Para analisar a expressão do Eag1 ao nível proteíco utilizamos a metodologia de western-blot descrita na seção 3.5. Como podemos observar na figura 14 todas as células derivadas de sarcoma possuem duas bandas correspondentes aos dois estados de modificação pós-transducional do canal Eag1 descritos (Napp et al., 2005). Para detectar Eag1 nas células derivadas de sarcoma foi preciso adicionar 100μg de proteína total, enquanto que para as células HEK-wt e HEK-Eag1 foram adicionados apenas 20μg de proteína total. Podemos observar essa diferença no conteúdo protéico total quando analisamos o blot para GAPDH (Figura 14).

A análise semi-quantitaiva do blot para Eag1 mostrou que as células A-204, HT-1080 e Hs 633t possuem a mesma distribuição entre as duas formas de Eag1 (51 e 49%) enquanto as células TE-671 e HEK-Eag1 possuem uma maior quantidade da forma de alto peso molecular (57%). Quando comparamos a expressão do Eag1 nas células derivadas de sarcoma podemos observar que as células derivadas de rabdomiossarcoma possuem uma maior expressão do Eag1.

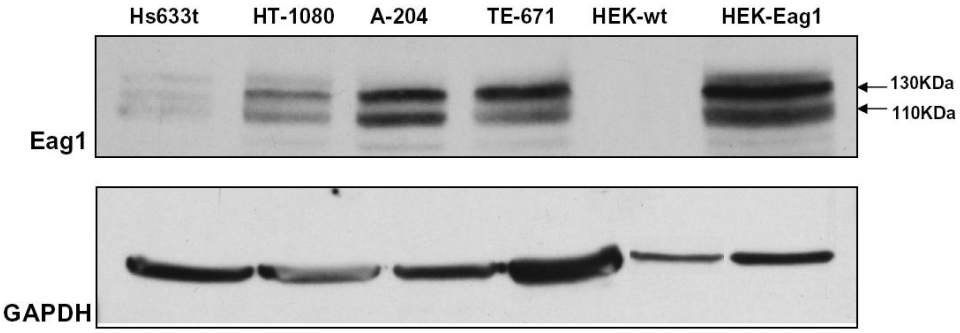


Figura 14: Expressão do Eag1 por western-blot. No blot para Eag1 podemos observar duas bandas correspondentes aos dois estados de modificação pós-translacional em todas a células testadas, com exceção da célula HEK-wt. No blot para GADPH podemos observar uma banda em todas as linhagens testadas.

4.5 Inibição da expressão do Eag1 por RNA interferência

A metodologia de RNA interferência foi testada em células HEK-Eag1. A cinética de degradação do Eag1 foi testada utilizando-se a técnica de qPCR. Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que após o tratamento com RNA interferência, foi observado uma redução significativa do mRNA para Eag1 nas primeiras 24 horas. A redução do mRNA para Eag1 se manteve em torno de 50% até 72 horas, tempos superiores não foram testados. A célula HEK-wt também foi testada quanto à degradação do Eag1 provocada por RNA interferência, neste caso não obtivemos variação do nível de mRNA ao longo do tempo já que esta linhagem não possui transcritos para o canal (Weber et al., 2006).

A análise da proteína total por citometria de fluxo mostrou uma redução de 40% nas primeiras 24 horas. A redução aumenta para 60% em 48 e 72 horas, após 96 horas começamos a observar uma pequena recuperação da proteína que atinge 80% de recuperação em 144 horas (figura 15).

A redução de 50% do mRNA para Eag1 é seguida pela redução ao nível protéico nas primeiras 24 horas. Entre 48 e 72 horas a redução é mantida tanto ao nível de mRNA quanto ao nível protéico. Após 96 horas a célula começa a recuperar o Eag1 ao nível protéico. Podemos esperar, pelos dados obtidos para proteína, que a partir de 96 horas devemos esperar também uma recuperação ao nível de mRNA.

4.6 Caracterização funcional do Eag1 em células derivadas de sarcoma

4.6.1 Rabdomiossarcoma - TE-671

A célula TE-671 foi transfectada com diferentes siRNA para GAPDH, Eag1 e Eag2 e testada quanto ao conteúdo de mRNA e à proliferação. Em todas as transfecções foram utilizados siRNA para GAPDH (controle positivo) e scrambled (controle negativo).

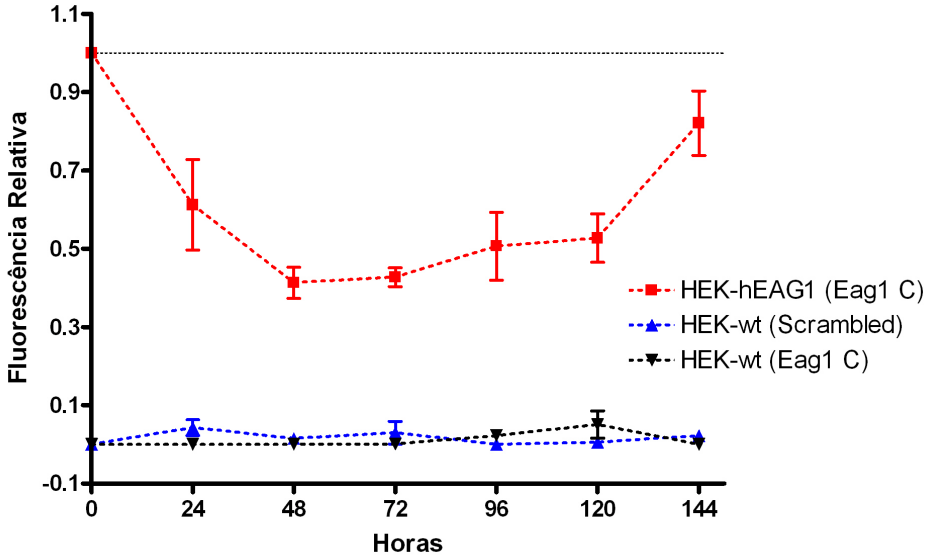


Figura 15: Curva de redução da proteína total analisada por citometria de fluxo. Células HEK-wt e HEK-Eag1 foram transfectadas com siRNA scrambled ou Eag1 C e testadas quanto ao conteúdo de proteína total por citometria de fluxo com anti-Eag1 conjugado com quantum dots. Os dados apresentados foram normalizados pelo dados obtidos após transfecção da célula HEK-Eag1 com siRNA scrambled. Os resultados representam a média e erro padrão de quatro experimentos.

Foram testados quatro tipos de siRNA que reconhem partes distintas da molécula de RNA para Eag1 e Eag2 (Tabela 5). O número de cópias de mRNA para GAPDH e Eag1 foi monitorado através de qPCR. Todos os valores obtidos foram normalizados pelo controle interno, que no nosso caso foi o receptor de transferrina (TFR).

Na figura 16 podemos observar os valores normalizados para Eag1 (A) e GAPDH (B) pela amostra tratada somente com o reagente de transfecção (lipofectamine). A transfecção com o siRNA Eag1 C reduziu o número de cópias por μl em 74% ($p < 0{,}0001$), enquanto os siRNA Eag1 A, B e D reduziram o mRNA em 18, 45 e 7%, respectivamente. A maior redução (90%, $p < 0{,}0001$) ocorreu quando todos os siRNA para Eag1 (A-D) foram utilzados na concentração final de 100nM, o resultado final foi a adição dos resultados obtidos com os siRNA Eag1 A, B e C (25nM cada). A adição de siRNA para Eag2 (A-D), GAPDH e scrambled não modificou o número de cópias por μl de mRNA para Eag1.

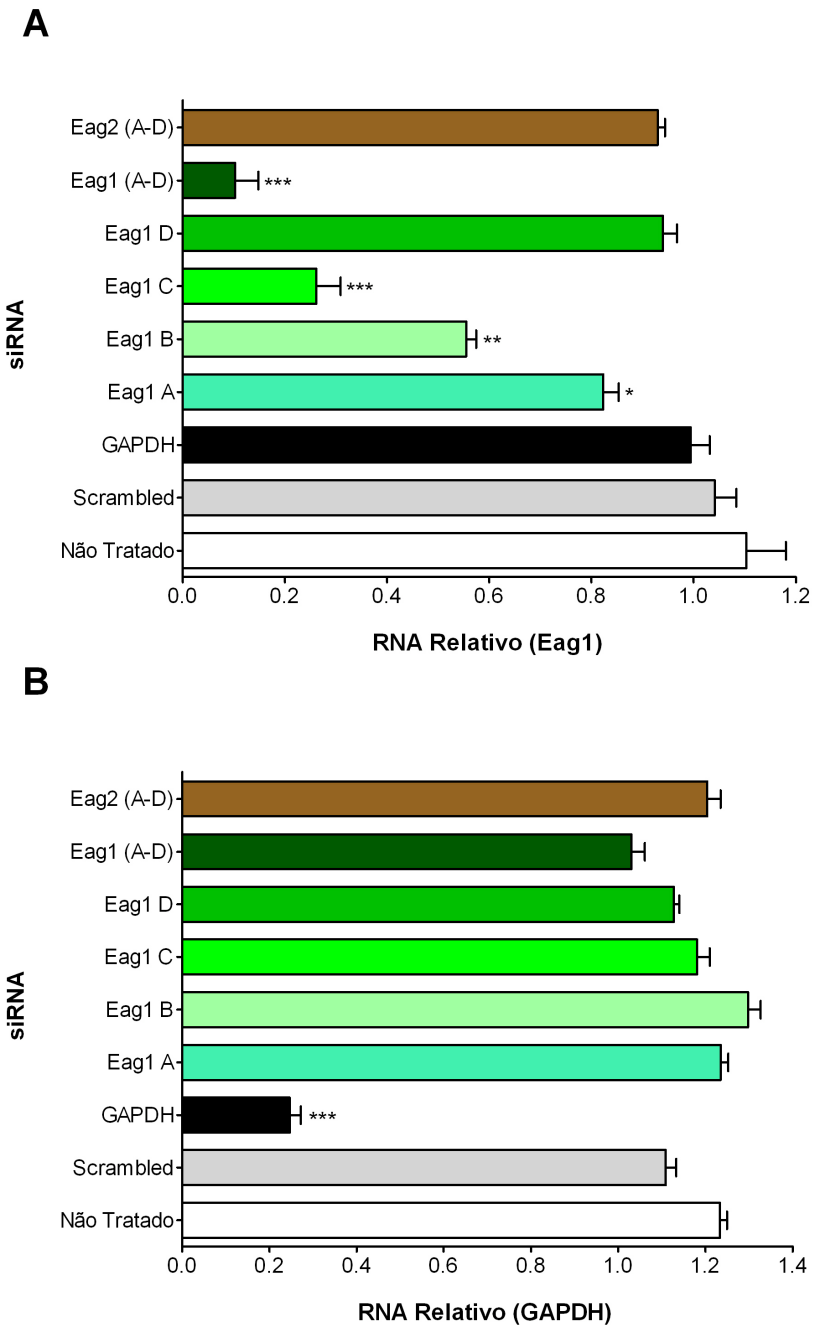


Figura 16: Curva da expressão do mRNA para Eag1 na célula TE-671. O número de cópias para Eag1 (A) e GAPDH (B) foi determinado através de qPCR na presença de diferentes siRNA, incluindo GAPDH, scrambled, Eag1 e Eag2 após 24 horas. Os valores foram normalizados pelo veículo de transfecção (Lipofectamine). Os resultados representam a média e erro padrão de três experimentos (n=3). *** $p < 0{,}0001$, ** $p < 0{,}001$ e * $p < 0{,}05$

Não foi monitorado mRNA para Eag2 nesta amostra pois como observado anteriormente na tabela 10, a célula TE-671 não possui mensagem para este canal. Na figura 16 (B) podemos observar que a redução do número de cópias por μl para GAPDH foi de 76% ($p < 0{,}0001$). A adição dos outros siRNA não modificou a expressão de mRNA para GAPDH.

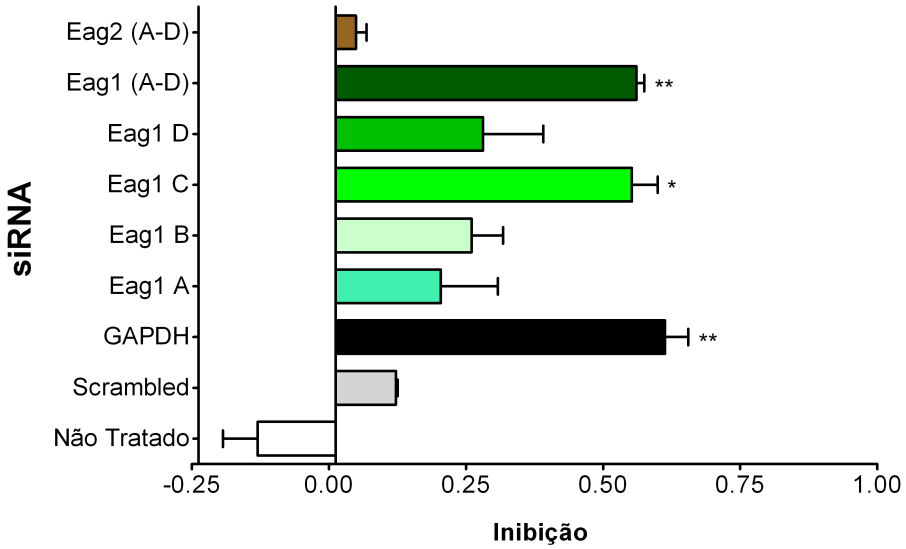


Figura 17: Inibição da proliferação da célula TE-671 por RNA interferência. A proliferação foi determinada através da técnica de MTT, 96 horas após a transfecção com os diversos siRNA. Os valores foram normalizados pelo veículo de transfecção (Lipofectamine). Os resultados representam a média e erro padrão de três experimentos (n=4). ** $p < 0{,}0001$ e * $p < 0{,}001$

A proliferação da célula TE-671 foi monitorada utilizando-se a técnica do MTT (seção 3.6.6). Como podemos observar na figura 17, a transfecção com o siRNA Eag1 C inibiu a proliferação em 54% ($p < 0{,}001$) após 96 horas, enquanto os siRNA Eag1 A, B e D inibiram a proliferação em apenas 19, 25 e 27%, respectivamente. A utilização de todos os siRNA reduziu a proliferação em 55% ($p < 0{,}0001$) e a adição do siRNA GAPDH foi capaz de reduzir a proliferação da célula TE-671 em 60% ($p < 0{,}0001$, Figura 17). Podemos notar que a redução observada para GAPDH é comparável com a redução observada para Eag1.

Não houve diferença estatística entre os siRNA Eag1 A, B e D em relação à inibição da proliferação da célula TE-671. Portanto a eficiência na redução no número de cópias por μl do mRNA para Eag1 não reflete necessariamente em uma mesma eficiência na inibição da proliferação celular. Como visto previamente, obtivemos diferentes níveis de redução do mRNA para Eag1 quando as amostras foram tratadas com os siRNA Eag1 A, B e D (Figura 16).

Para analisar mais detalhadamente o bloqueio da proliferação por RNA interferência na célula TE-671, realizamos ensaios para determinação de morte e ciclo celular. Nesses ensaios foram comparados apenas células transfectadas com os siRNA scrambled e Eag1 C. Na figura 18 podemos observar histogramas das fases do ciclo celular representativos de células transfectadas com scrambled (A) e Eag1 C (B) após 96 horas. A figura 18 C mostra que não há diferenças entre as fases do ciclo celular quando comparamos ambos siRNA após 96 horas. Tempos anteriores (48 e 72 horas) foram testados e também não mostraram diferenças (dados não mostrados).

Realizamos ensaios para determinação da viabilidade celular onde avaliamos o número de células viáveis utilizando iodeto de propídeo. Na figura 19 podemos observar *dot-plot* representativos de células tranfectadas com siRNA scrambled (A) e Eag1 C (B), onde as células demarcadas pelo *gate* P2 representam as células viáveis. A figura 19 C mostra que o número de células viáveis após 96 horas está significativamente reduzido ($p < 0{,}05$) quando comparamos com as células transfectadas com siRNA scrambled ou Eag1 C.

Realizamos estudos de morte celular mais detalhados que foram capazes de discriminar entre células apoptóticas (quadrante Q4) e células em necrose (quadrante Q2). Na figura 20 A,B podemos observar *dot-plot* representativo após tratammento com RNA interferência. Não observamos diferenças no número de células apoptóticas nos tempos testados (20 C). Os dados apresentados mostram que a inibição da proliferação por RNA

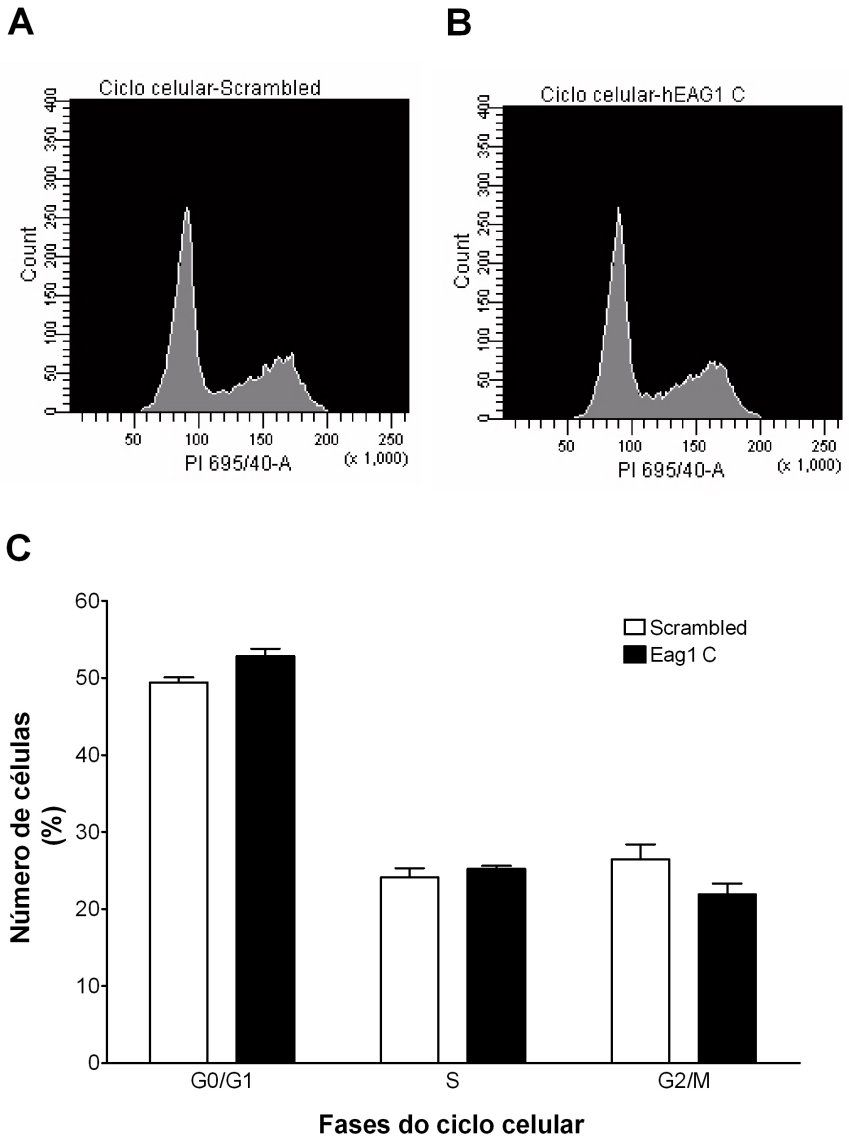


Figura 18: Avaliação do ciclo celular da linhagem TE-671 após tratamento com RNA interferência. Os ensaios foram realizados após 96 horas. Experimentos representativos de células transfectadas com siRNA para scrambled (A) e Eag1 C (B) são apresentados. (C) Os resultados representam a média e erro padrão de três experimentos.

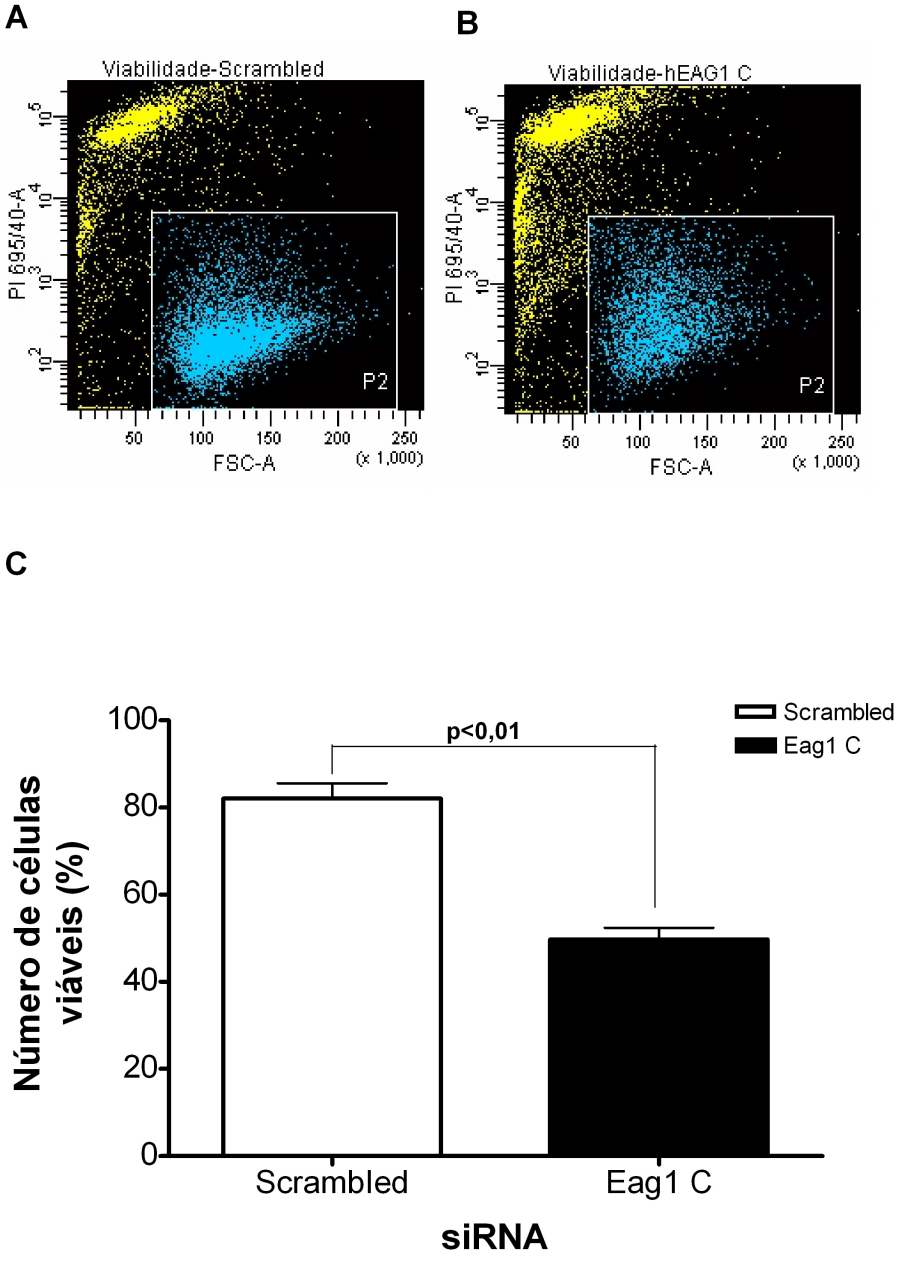


Figura 19: Indução de morte celular da linhagem TE-671 após tratamento por RNA interferência. Após 96 horas, o número de células viáveis foi determinado por citometria de fluxo. Experimentos representativos de células transfectadas com siRNA para scrambled (A) e Eag1 C (B) são apresentados. (C) Os resultados representam a média e erro padrão de três experimentos.

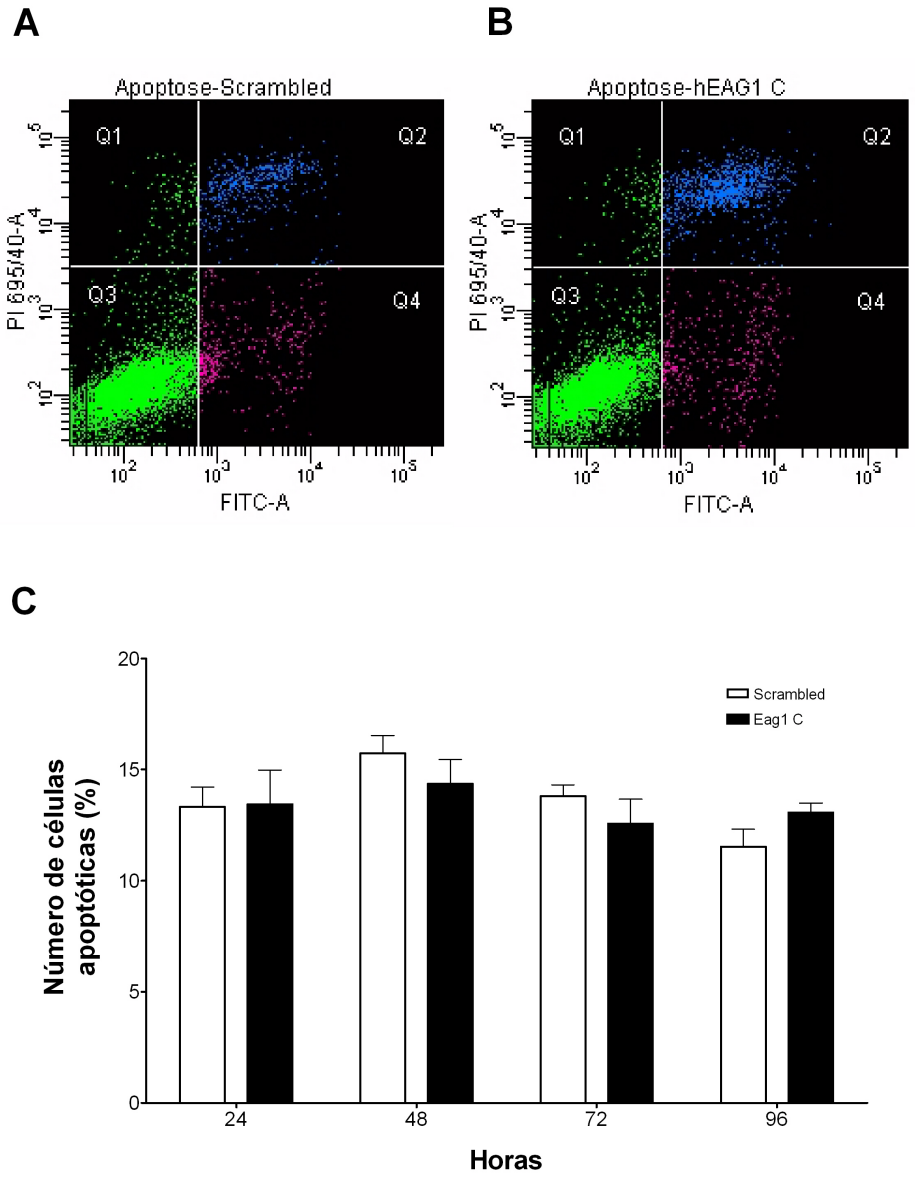


Figura 20: Indução de apoptose da célula TE-671 após tratamento por RNA interferência. O número de células apoptóticas foi determinado por citometria de fluxo nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Experimentos representativos de células avaliadas 96 horas após transfecção com siRNA para scrambled (A) e Eag1 C (B) são apresentados. (C) Os resultados representam a média e erro padrão de três experimentos. Não há diferença estatística entre os tempos testados.

interferência não é o resultado de um acúmulo de células em determinada fase do ciclo celular, mas sim de morte celular. Dessa forma podemos dizer que a presença do canal Eag1 promove uma vantagem para a sobrevivência da célula.

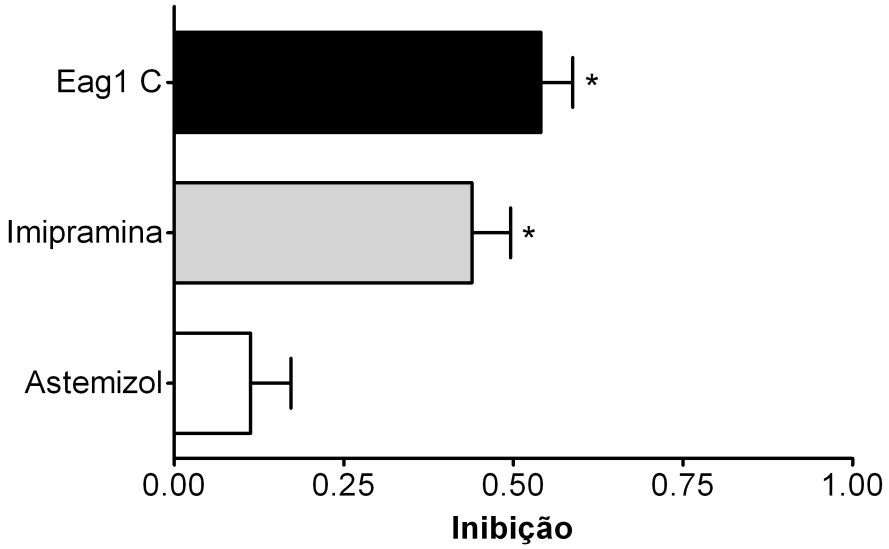


Figura 21: Inibição da proliferação da célula TE-671 por bloqueadores do canal Eag1. A proliferação foi determinada através da técnica de MTT após 96 horas. Os valores foram normalizados pelo veículo de transfecção (Lipofectamine), no caso da transfecção por RNA interferência, ou pela amostra não tratada, no caso dos bloqueadores. Os resultados representam a média e erro padrão de três experimentos (n=4). * $p < 0{,}005$

A figura 21 mostra a redução da proliferação da célula TE-671 após a adição de astemizole (1μM), imipramina (10μM) ou transfecção com o siRNA Eag1 C (12, 44 e 55% respectivamente). A análise estatística foi realizada comparando-se as células tratadas com os bloqueadores com o controle não tratado e, no caso do RNA interferência, as células transfectadas com siRNA foram comparadas com as células transfectadas apenas com o veículo de transfecção. Podemos notar que o percentual de inibição da proliferação promovido pela imipramina ou transfecção com siRNA Eag1 C são similares.

Os bloqueadores do canal Eag1 e a redução desta proteína por RNA interferência são capazes de diminuir a proliferação da célula TE-671 mas não diminuem o IC_{50} da

doxorubicina (IC_{50}dox). A figura 22 mostra que a adição de astemizol, imipramina ou transfecção com siRNA Eag1 C não modifica o IC_{50}dox. Os valores de IC_{50}dox obtidos foram iguais à 8 ± 2 nM, 12,2 ± 1,7, 11 ± 0,2 nM e 10 ± 1 nM para o controle, astemizol, imipramina e Eag1 C, respectivamente.

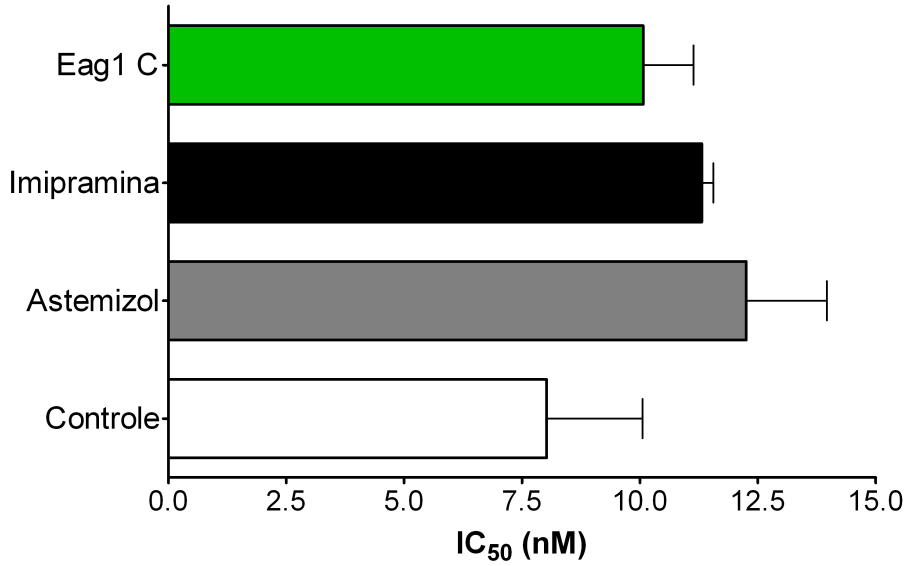


Figura 22: Efeito de bloqueadores e RNA interferência sobre o IC_{50} de Doxorubicina da célula TE-671. As células foram tratadas com variadas concentrações de doxorubicina após transfecção com siRNA Eag1 C ou adição de imipramina ou astemizol. Os resultados representam a média e erro padrão de quatro experimentos (n=4).

4.6.2 Rabdomiossarcoma - A-204

Na figura 23 podemos observar os valores normalizados para Eag1 (A) e GAPDH (B) pela amostra tratada somente com o reagente de transfecção (dharmacon 2). A transfecção com o siRNA Eag1 C reduziu o número de cópias por μl em 74% ($p < 0,05$), enquanto os siRNA Eag1 A, B e D reduziram o mRNA em 36, 33 e 70%, respectivamente. Quando todos os siRNA para Eag1 (A-D) foram utilizados na concentração final de 100nM, a redução foi de 92% ($p < 0,05$). A adição de siRNA para Eag2 (A-D), GAPDH e scrambled não modificou o número de cópias por μl de mRNA para Eag1 (Figura 23

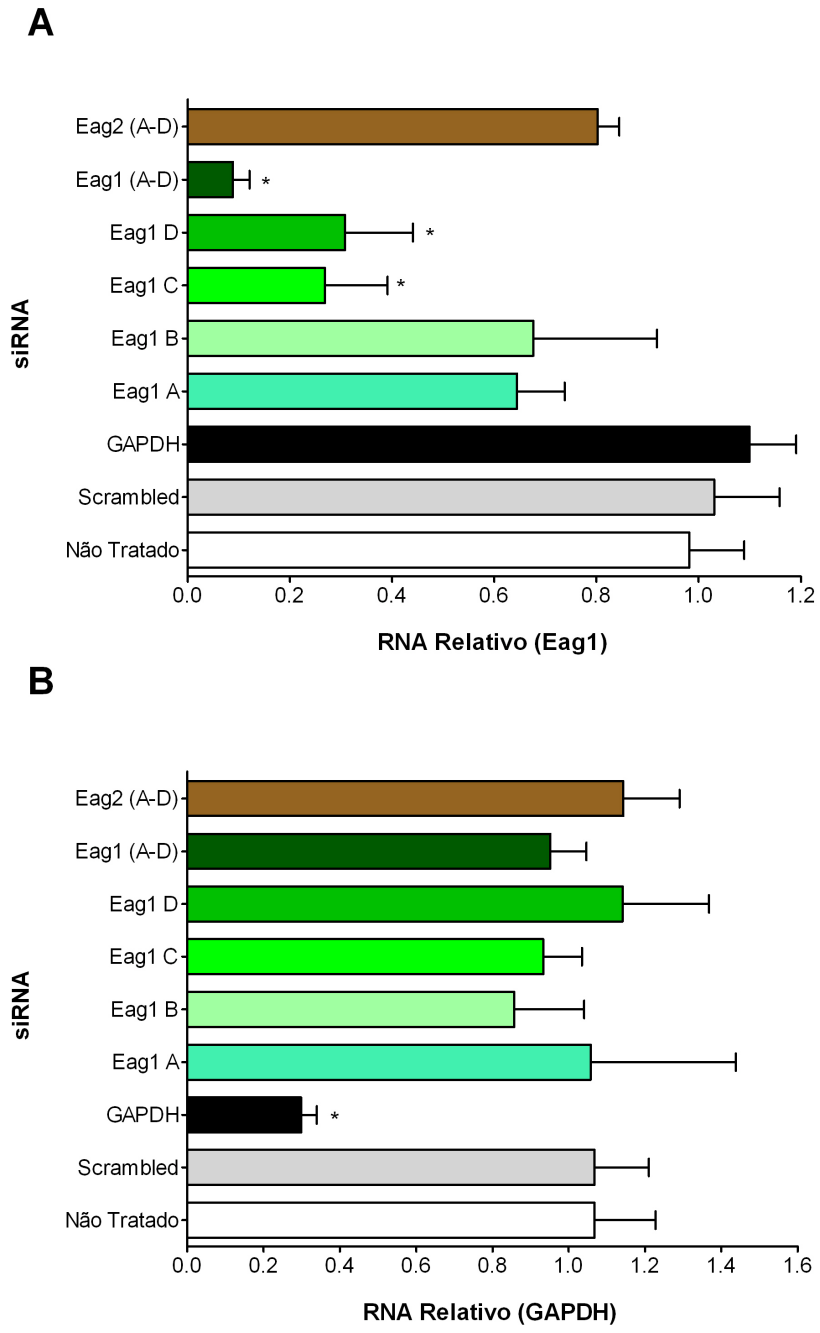


Figura 23: Curva da expressão do mRNA para Eag1 na célula A-204. O número de cópias para Eag1 (A) e GAPDH (B) foi determinado através de qPCR na presença de diferentes siRNA, incluindo GAPDH, scrambled, Eag1 e Eag2 após 24 horas. Os valores foram normalizados pelo veículo de transfecção (Dharmacon reagente 2). Os resultados representam a média e erro padrão de três experimentos (n=3). * $p < 0{,}05$

A).

Não monitoramos mRNA para Eag2 nesta amostra pois como observado anteriormente na tabela 10, a célula A-204 não possui mensagem para este canal. Na figura 23 (B) podemos observar que a redução do número de cópias por μl para GAPDH foi de 70% ($p < 0{,}05$). A adição dos outros siRNA não modificou a expressão de mRNA para GAPDH.

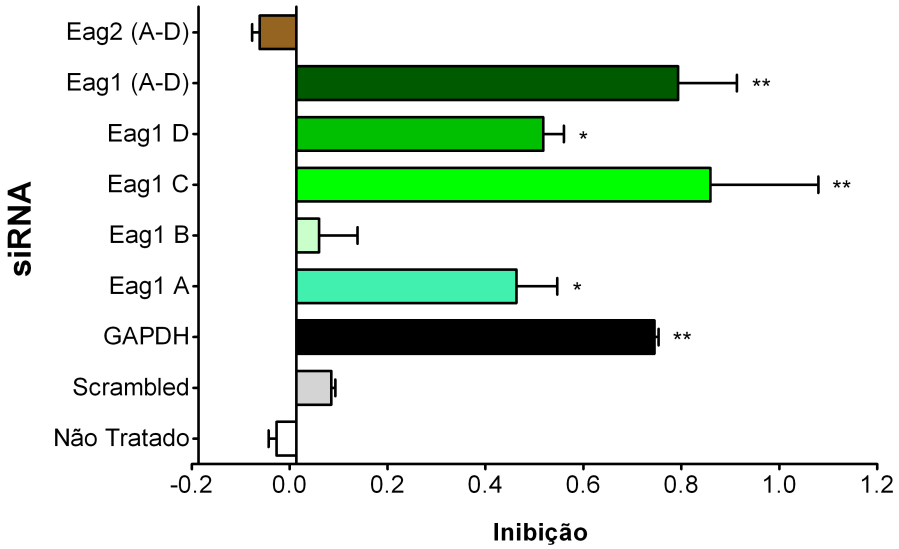


Figura 24: Inibição da proliferação da célula A-204 por RNA interferência. A proliferação foi determinada através da técnica de MTT após 96 horas. Os valores foram normalizados pelo veículo de transfecção (Dharmacon reagente 2). Os resultados representam a média e erro padrão de três experimentos (n=4). ****** $p < 0{,}01$ e ***** $p < 0{,}05$

A proliferação da célula A-204 foi monitorada utilizando-se a técnica do MTT. Como podemos observar na figura 24, a transfecção com o siRNA Eag1 C inibiu a proliferação em 84% ($p < 0{,}01$) após 96 horas, enquanto os siRNA Eag1 A, B e D inibiram a proliferação em apenas 44, 5 e 50%, respectivamente. Não houve diferença estatística entre os siRNA Eag1 A e D em relação à inibição da proliferação da célula A-204. A utilização de todos os siRNA reduziu a proliferação em 78% ($p < 0{,}01$) e a adição do siRNA GAPDH foi capaz de reduzir a proliferação da célula A-204 em 73%($p < 0{,}01$,

Figura 24). Podemos notar que a redução observada para GAPDH é comparável com a redução observada para Eag1, como mostrado para a célula TE-671.

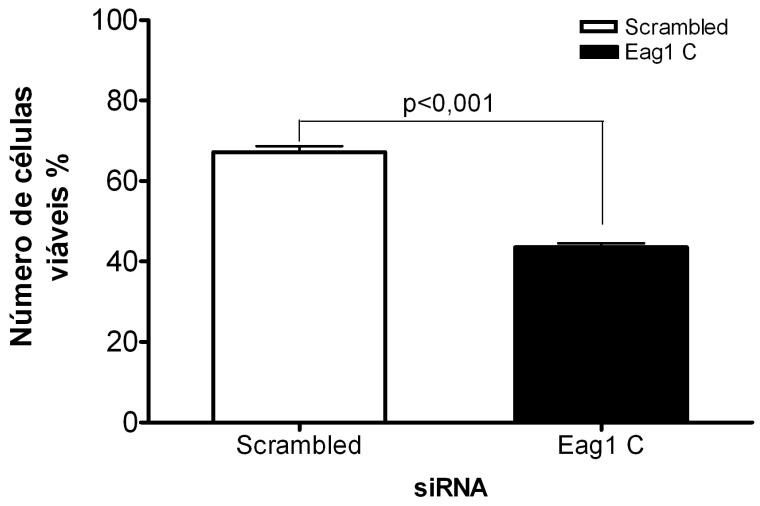


Figura 25: Indução de morte celular da linhagem A-204 após tratamento por RNA interferência. Após 96 horas, o número de células viáveis foi determinado por citometria de fluxo. Os resultados representam a média e erro padrão de três experimentos.

Realizamos um estudo mais detalhado para determinar a causa da inibição da proliferação por RNA interferência. Para tanto determinamos o número de células na diferentes fases do ciclo celular da célula A-204 após transfecção com siRNA scrambled e Eag1 C. Não encontramos diferenças em nenhum dos tempos testados (dados não mostrados).

O segundo passo dado foi determinar a viabilidade celular. Na figura 25 (A) podemos observar uma redução significativa ($p < 0{,}001$) após 96 horas no número de células viáveis quando comparamos as amostras transfectadas com siRNA scrambled e Eag1 C.

A figura 26 mostra a redução da proliferação da célula A-204 após a adição de astemizol, imipramina ou transfecção com siRNA Eag1 C (0, 16 e 84% respectivamente). Podemos notar que o percentual de inibição da proliferação pela transfecção com siRNA Eag1 C foi muito maior (em torno de 5x) que o percentual de inibição pela imipramina.

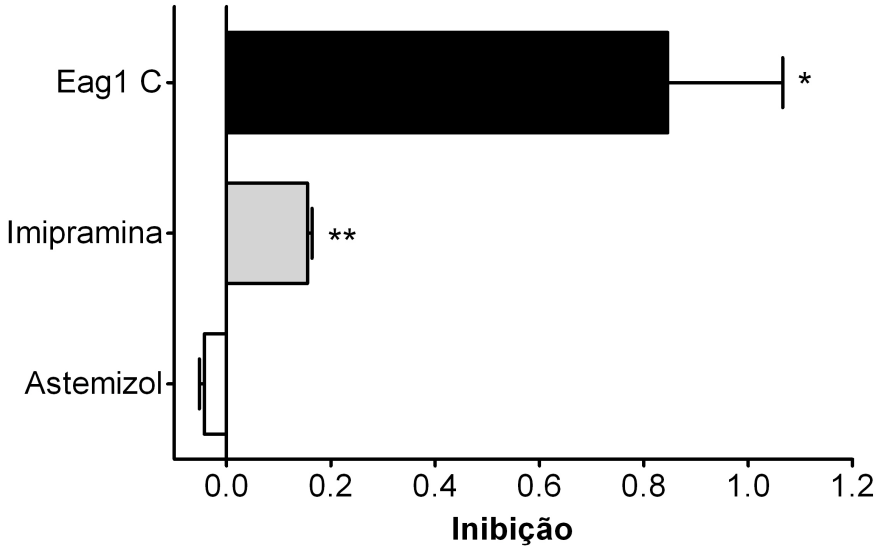


Figura 26: Inibição da proliferação da célula A-204 por bloqueadores do Eag1. A proliferação foi determinada através da técnica de MTT após 96 horas. Os valores foram normalizados pelo veículo de transfecção (Dharmacon reagente 2), no caso da transfecção por RNA interferência, ou pela amostra não tratada, no caso dos bloqueadores. Os resultados representam a média e erro padrão de três experimentos (n=4). ** $p < 0{,}001$ e * $p < 0{,}05$

Novamente a adição de astemizol não promoveu nenhum efeito quanto à proliferação da célula A-204. Ao contrário dos dados obtidos para a célula TE-671 onde o efeito provocado pela imipramina foi comparável à transfecção de siRNA, na célula A-204 o efeito foi significativamente reduzido ($p < 0,05$).

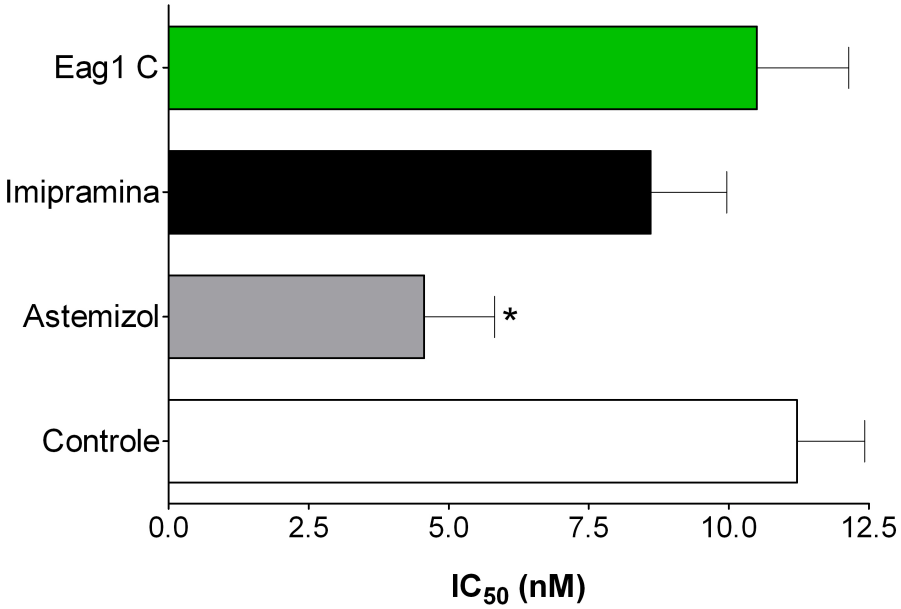


Figura 27: Efeito de bloqueadores e RNA interferência sobre o IC_{50} de Doxorubicina da célula A-204. As células foram tratadas com variadas concentrações de doxorubicina após transfecção com siRNA Eag1 C ou adição de imipramina ou astemizol. Os resultados representam a média e erro padrão de três experimentos (n=4). * $p < 0,05$.

A adição de astemizol foi capaz de reduzir em 2,4 vezes o IC_{50}dox na célula A-204 apesar de não ter efeito sobre a proliferação. Outros tratamentos, como a adição de imipramina ou transfecção com o siRNA Eag1 C são capazes de inibir a proliferação mas não promovem modificações nos valores de IC_{50}dox (Figura 27). Os valores de IC_{50}dox obtidos foram iguais à 11 ± 1,2 nM, 4,5 ± 1,2 nM, 8,6 ± 1,3 nM e 10,5 ± 1,6 nM para o controle, astemizol, imipramina e Eag1 C, respectivamente.

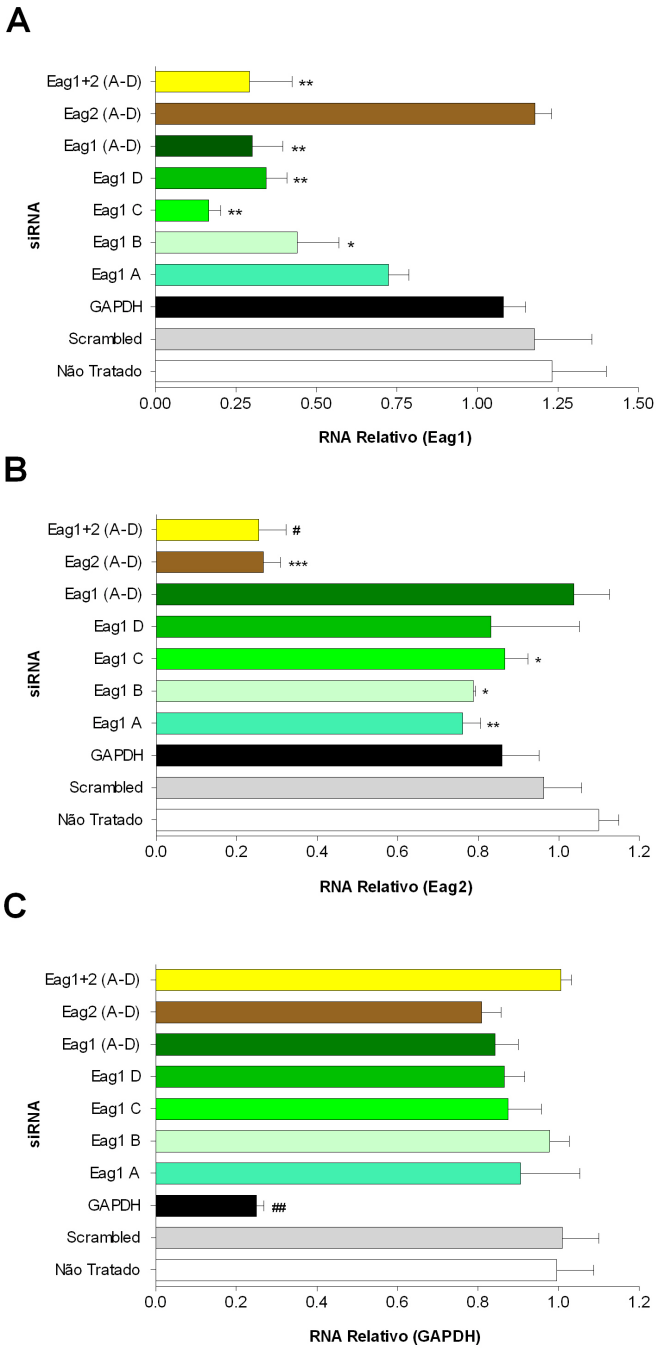


Figura 28: Curva da expressão do mRNA para Eag1, Eag2 e GAPDH na célula HT-1080. O número de cópias para Eag1 (A), Eag2 (B) e GAPDH (C) foi determinado através de qRT-PCR na presença de diferentes siRNA, incluindo GAPDH, Scrambled, Eag1 e Eag2 após 24 horas. Os valores foram normalizados pelo veículo de transfecção (Lipofectamine). Os resultados representam a média e erro padrão de três experimentos (n=3). * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}001$, # $p < 0{,}001$ e ## $p < 0{,}0001$

4.6.3 Fibrossarcoma - HT-1080

Na figura 28 podemos observar os valores normalizados para Eag1 (A), Eag2 (B) e GAPDH (C) pela amostra tratada somente com o reagente de transfecção (lipofectamine). A transfecção com o siRNA Eag1 C reduziu o número de cópias por μl em 83% ($p < 0{,}01$), enquanto os siRNA Eag1 A, B e D reduziram o mRNA em 28, 56 e 66%, respectivamente. Quando todos os siRNA para Eag1 (A-D) foram utilzados na concentração final de 100nM, a redução foi de 70% ($p < 0{,}01$). A adição de siRNA para Eag2 (A-D), GAPDH e scrambled não modificou o número de cópias por μl de mRNA para Eag1 (Figura 28 A).

A célula HT-1080 possui mRNA tanto para Eag1 quanto para Eag2 como mostrado anteriormente na tabela 10. A adição de siRNA para Eag2 (A-D) foi capaz de reduzir o número de cópias por μl em 74% ($p < 0{,}001$, Figura 28 B). Neste caso utilizamos todos os siRNA em conjunto na concentração final de 100nM, a mesma concentração utilizada para os siRNA para Eag1. Quando utilizamos ambos siRNA (Eag1 e Eag2, concentração final de 100nM) obtivemos 71 e 75% de redução do mRNA para Eag1 e Eag2, respectivamente.

A figura 28 C mostra que a transfecção com siRNA para GAPDH foi capaz de reduzir o número de cópias por μl em 75% ($p < 0{,}0001$). A adição dos outros siRNA não modificou a expressão de mRNA para GAPDH.

A proliferação da célula HT-1080 também foi monitorada utilizando-se a técnica do MTT. Como podemos observar na figura 29, a transfecção com o siRNA C inibiu a proliferação celular em 36% ($p < 0{,}0001$) após 96 horas, enquanto os siRNA B e D inibiram a proliferação em apenas 23 e 13%, respectivamente. siRNA A não teve efeito na proliferação apesar de ter reduzido o número de cópias por μl em 28% (Figura 28). A utilização de todos os siRNA reduziu a proliferação em apenas 20% ($p < 0{,}001$). A transfecção com siRNA para Eag2 (A-D) também foi capaz de inibir a proliferação (34%, $p < 0{,}0001$). A adição de siRNA para Eag1 (A-D) e Eag2 (A-D) reduziu a proliferação

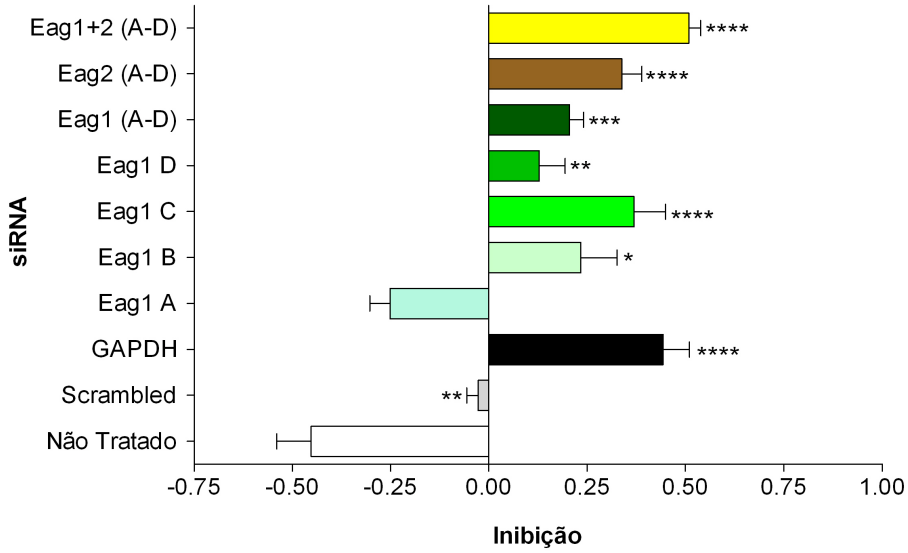


Figura 29: Inibição da proliferação da célula HT-1080 por RNA interferência. A proliferação foi determinada através da técnica de MTT após 96 horas. Os valores foram normalizados pelo veículo de transfecção (Lipofectamine). Os resultados representam a média e erro padrão de três experimentos (n=4). * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}001$ e **** $p < 0{,}0001$

em 50% (Figura 29).

A adição do siRNA GAPDH foi capaz de reduzir a proliferação da célula HT-1080 em 44% ($p < 0{,}0001$, Figura 29). Podemos notar que a redução observada para GAPDH é comparável com a redução observada quando adicionamos siRNA para Eag1 e Eag2.

Realizamos ensaios para determinação de morte e ciclo celular na célula HT-1080. Nesses ensaios foram comparadas apenas células transfectadas com os siRNA scrambled, Eag1 C e Eag2 (A-D). Não observamos diferenças entre as fases do ciclo celular em nenhum dos tempos estudados (dados não mostrados).

A figura 30 mostra a diferença no número de células viáveis entre as amostras trasfectadas com siRNA scrambled, Eag1 C e Eag2 (A-D) após 96 horas. Podemos observar uma redução significativa ($p < 0{,}05$) entre as amostras transfectadas com siRNA Eag1 C e Eag2 (A-D) e transfectadas com siRNA scrambled, mas não detectamos diferença

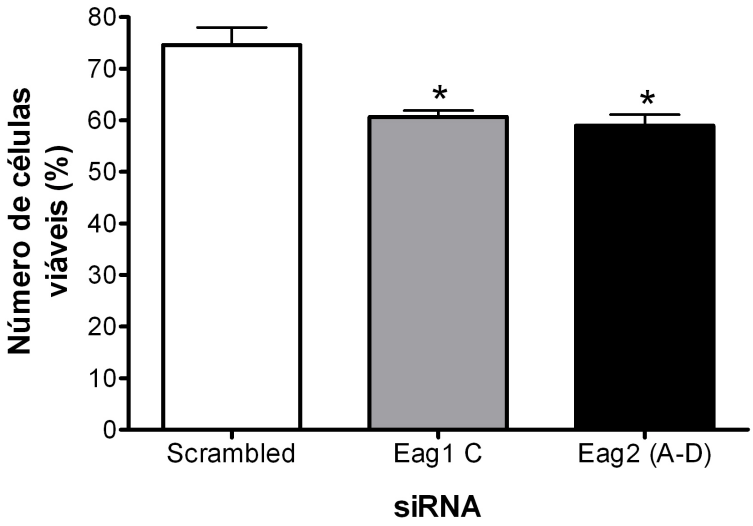


Figura 30: Indução de morte celular da linhagem HT-1080 após tratamento por RNA interferência. Após 96 horas, o número de células viáveis foi determinado por citometria de fluxo. Os resultados representam a média e erro padrão de três experimentos. * $p < 0{,}05$.

estatística entre Eag1 C e Eag2 (A-D).

Na figura 31 podemos observar o efeito dos bloqueadores para o canal Eag1 e Eag2 na proliferação da célula HT-1080. A adição de imipramina ou transfecção com o siRNA Eag1 C ou Eag2 (A-D) reduziu a proliferação em 28, 36 e 33%, respectivamente. A adição de astemizol não teve efeito sobre a proliferação da célula HT-1080, o mesmo foi mostrado para as células derivadas de rabdomiossarcoma. Podemos notar que o percentual de inibição da proliferação pela imipramina ou transfecção com siRNA Eag1 C ou Eag 2 (A-D) são similares (não há diferença estatística).

A adição de imipramina ou a trasnfecção com siRNA Eag1 C ou Eag2 (A-D) é capaz de reduzir a proliferação da célula HT-1080 mas não modifica o IC_{50}dox. A figura 32 mostra que a adição de astemizol, imipramina ou transfecção com o siRNA Eag1 C ou Eag2 (A-D) não modifica o IC_{50}dox.

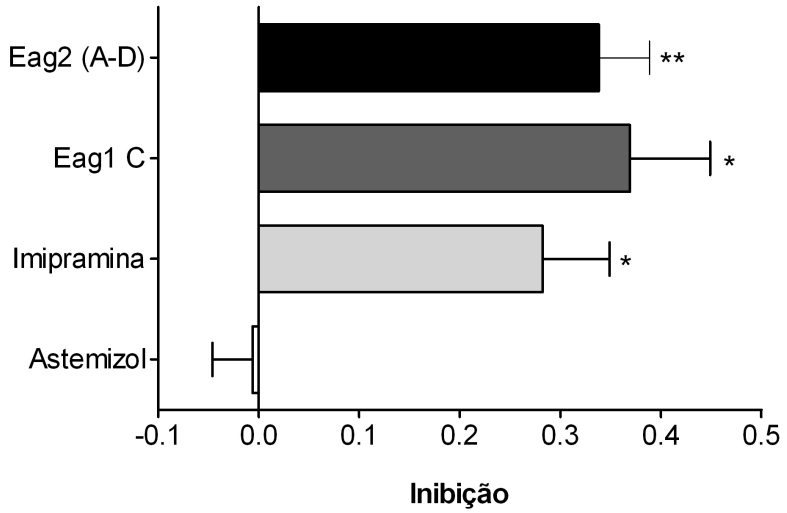


Figura 31: Inibição da proliferação da célula HT-1080 por bloqueadores. A proliferação foi determinada através da técnica de MTT após 96 horas. Os valores foram normalizados pelo veículo de transfecção (Lipofectamine) no caso da transfecção por RNA interferência ou pela amostra não tratada, no caso dos bloqueadores. Os resultados representam a média e erro padrão de quatro experimentos (n=4). * $p < 0{,}05$ e ** $p < 0{,}01$

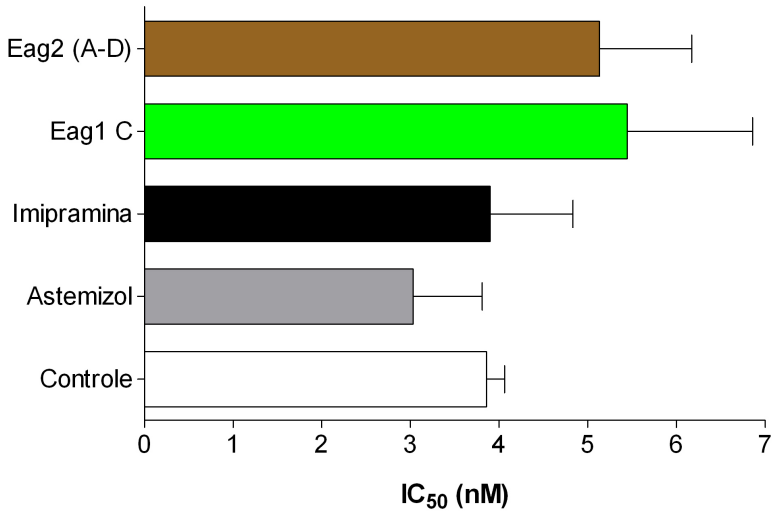


Figura 32: Efeito de bloqueadores e RNA interferência sobre o IC_{50} de Doxorubicina da célula HT-1080. As células foram tratadas com variadas concentrações de doxorubicina após transfecção com siRNA Eag1 C ou Eag2 (A-D) ou adição de imipramina ou astemizol. Os resultados representam a média ± erro padrão de três experimentos

4.6.4 Fibrossarcoma - Hs 633t

A célula Hs 633t também foi testada quanto ao conteúdo de mRNA e à proliferação após transfecção utilizando-se a técnica de RNA interferência. Como nos casos anteriores utilizamos diferentes siRNA para GAPDH, Eag1, Eag2 e scrambled.

Na figura 33 podemos observar os valores normalizados para Eag1 (A), Eag2 (B) e GAPDH (C) pela amostra tratada somente com o reagente de transfecção (oligofectamine). A transfecção com o siRNA Eag1 C reduziu o número de cópias por μl em 75% ($p < 0{,}0005$), enquanto os siRNA Eag1 A, B e D reduziram o mRNA em 32, 53 e 37%, respectivamente. Quando todos os siRNA para Eag1 (A-D) foram utilzados na concentração final de 100nM, a redução foi de 72% ($p < 0{,}005$). A adição de siRNA para Eag2 (A-D), GAPDH e scrambled não modificou o número de cópias por μl de mRNA para Eag1 (Figura 33 A).

A célula Hs 633t assim como a célula HT-1080 também possui mRNA tanto para Eag1 quanto para Eag2. A adição de siRNA para Eag2 (A-D) foi capaz de reduzir ao número de cópias por μl em 71% ($p < 0{,}05$, Figura 33 B). Neste caso utilizamos todos os siRNA em conjunto na concentração final de 100nM, a mesma concentração utilizada para os siRNA para Eag1. Quando utilizamos ambos siRNA (Eag1 e Eag2, concentração final de 100nM) obtivemos 78 e 71% de redução do mRNA para Eag1 e Eag2, respectivamente.

A figura 33 C mostra que a transfecção com siRNA para GAPDH foi capaz de reduzir o número de cópias por μl em 68% ($p < 0{,}005$). A adição dos outros siRNA não modificou a expressão de mRNA para GAPDH.

A proliferação da célula Hs 633t também foi monitorada. Como podemos observar na figura 34, a transfecção com o siRNA Eag1 B inibiu a proliferação celular em 31% ($p < 0{,}005$) após 96 horas, enquanto os siRNA C e D inibiram a proliferação em apenas 9 e 54%, respectivamente. O siRNA A não teve efeito na proliferação apesar de ter reduzido o número de cópias por μl em 32% (Figura 33). A utilização de todos os siRNA reduziu a

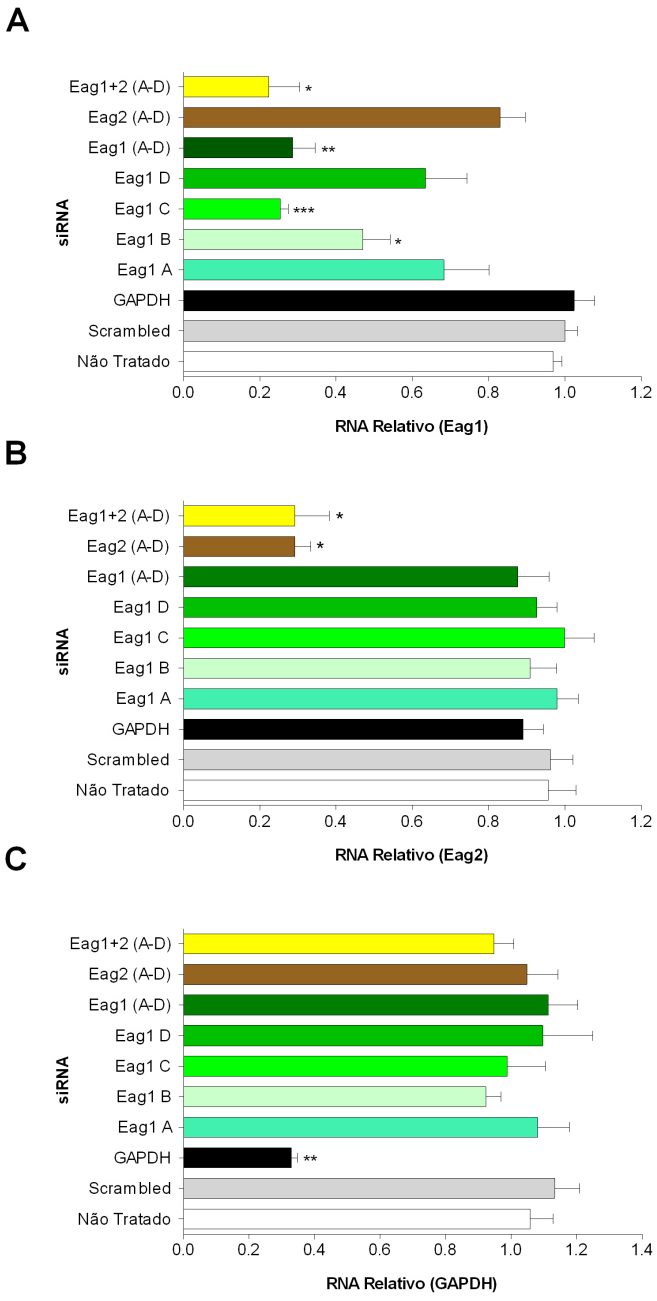


Figura 33: Curva da expressão do mRNA para Eag1, Eag2 e GAPDH na célula Hs 633t. O número de cópias para Eag1 (A), Eag2 (B) e GAPDH (C) foi determinado através de qRT-PCR na presença de diferentes siRNA, incluindo GAPDH, Scrambled, Eag1 e Eag2 após 24 horas. Os valores foram normalizados pelo veículo de transfecção (Oligofectamine). Os resultados representam a média e erro padrão de três experimentos (n=3). * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}005$ e *** $p < 0{,}0005$

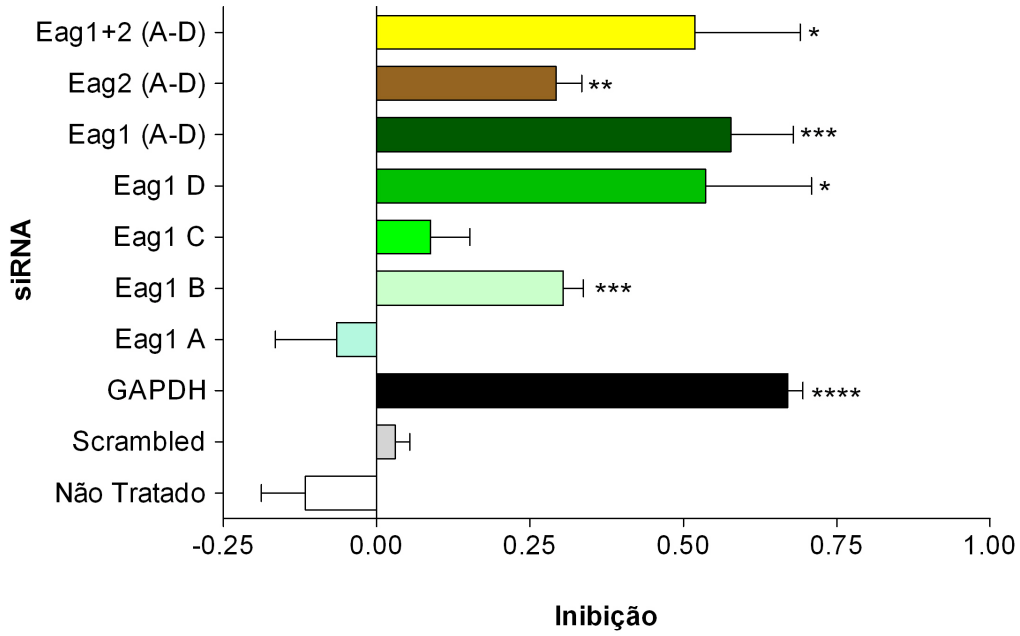


Figura 34: Inibição da proliferação por RNA interferência da célula Hs 633t. A proliferação foi determinada através da técnica de MTT após 96 horas. Os valores foram normalizados pelo veículo de transfecção (Oligofectamine). Os resultados representam a média e erro padrão de três experimentos (n=4). * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}005$ e **** $p < 0{,}0005$

proliferação em 58% ($p < 0,01$). A transfecção com siRNA para Eag2 (A-D) também foi capaz de inibir a proliferação (30%, $p < 0,01$). A adição conjunta de siRNA para Eag1 (A-D) e Eag2 (A-D) reduziu a proliferação em 62% (Figura 34).

A adição do siRNA GAPDH foi capaz de reduzir a proliferação da célula HT-1080 em 44% ($p < 0,0001$, Figura 29). Podemos notar que a redução observada para GAPDH é comparável com a redução observada quando adicionamos siRNA para Eag1 e Eag2, o mesmo resultado encontrado para a célula HT-1080. Realizamos ensaios para

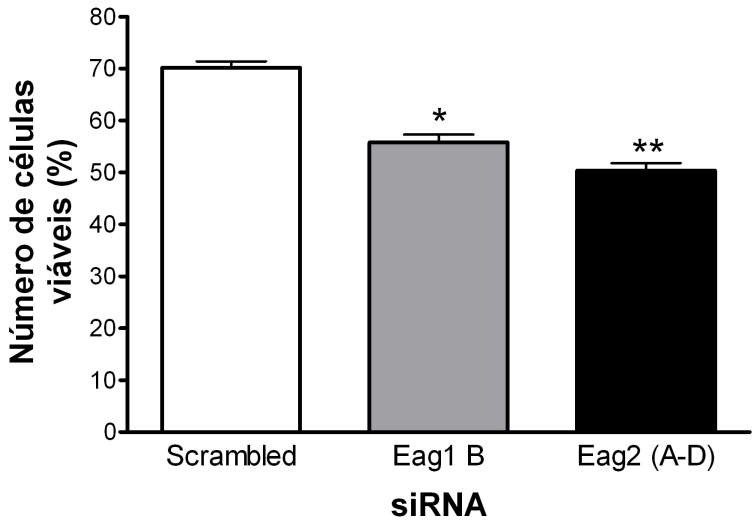


Figura 35: Indução de morte celular da linhagem Hs 633t após tratamento por RNA interferência. Após 96 horas, o número de células viáveis foi determinado por citometria de fluxo. Os resultados representam a média e erro padrão de dois experimentos (n=4). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

determinação de morte e ciclo celular da célula Hs 633t. Nesses ensaios foram comparados apenas células transfectadas com os siRNA scrambled, Eag1 B e Eag2 (A-D). Não observamos diferenças entre as fases do ciclo celular em nenhum dos tempos estudados (dados não mostrados).

A figura 35 mostra a diferença no número de células viáveis entre as amostras trasfectadas com siRNA scrambled, Eag1 B e Eag2 (A-D) após 96 horas. Podemos observar uma redução de 15 e 20% nas amostras transfectadas com siRNA Eag1 B e Eag2

(A-D), respectivamente. Não há diferença estatística entre as amostras transfectadas com siRNA Eag1 B e Eag2 (A-D). Como mostrado anteriormente para todas as células estudadas, parece que o motivo pelo qual temos uma redução da proliferação é o aumento da taxa de morte celular.

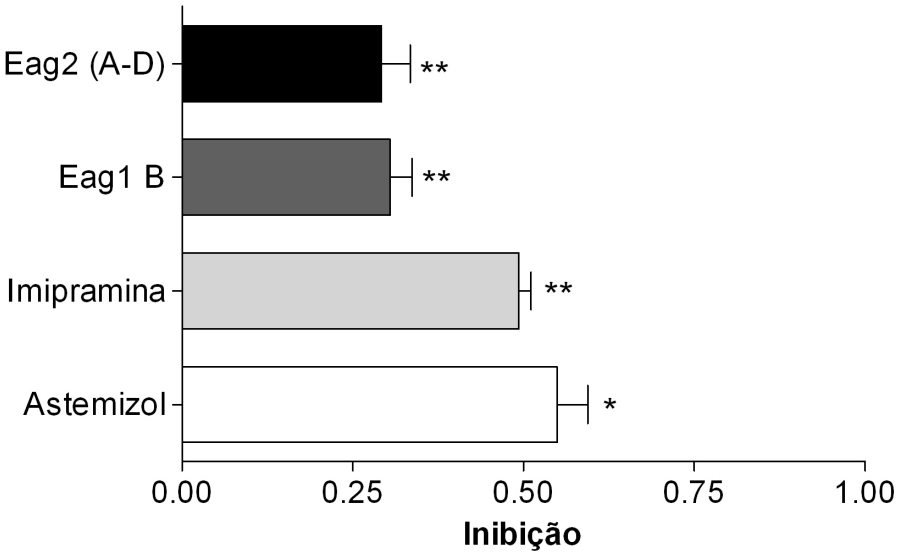


Figura 36: Inibição da proliferação da célula Hs 633t por bloqueadores. A proliferação foi determinada através da técnica de MTT após 96 horas. Os valores foram normalizados pelo veículo de transfecção (Oligofectamine) no caso da transfecção por RNA interferência ou pela amostra não tratada, no caso dos bloqueadores. Os resultados representam a média e erro padrão de quatro experimentos (n=4).* $p < 0{,}001$ e ** $p < 0{,}0001$

Na figura 36 podemos observar o efeito dos bloqueadores para o canal Eag1 e Eag2 na proliferação da célula Hs 633t. A adição de imipramina ou astemizol ou transfecção com o siRNA Eag1 B ou Eag2 (A-D) reduz a proliferação em 46, 51, 30 e 31%, respectivamente. astemizol somente promoveu efeito sobre a proliferação da célula Hs 633t. Podemos notar que o percentual de inibição da proliferação pela imipramina e astemizol é 1,6 vezes maior que a inibição promovida pela transfecção com siRNA Eag1 B ou Eag 2 (A-D). Neste caso podemos supor que imipramina e astemizol são capazes de agir por outros mecanismos que não o bloqueio dos canais Eag1 e Eag2.

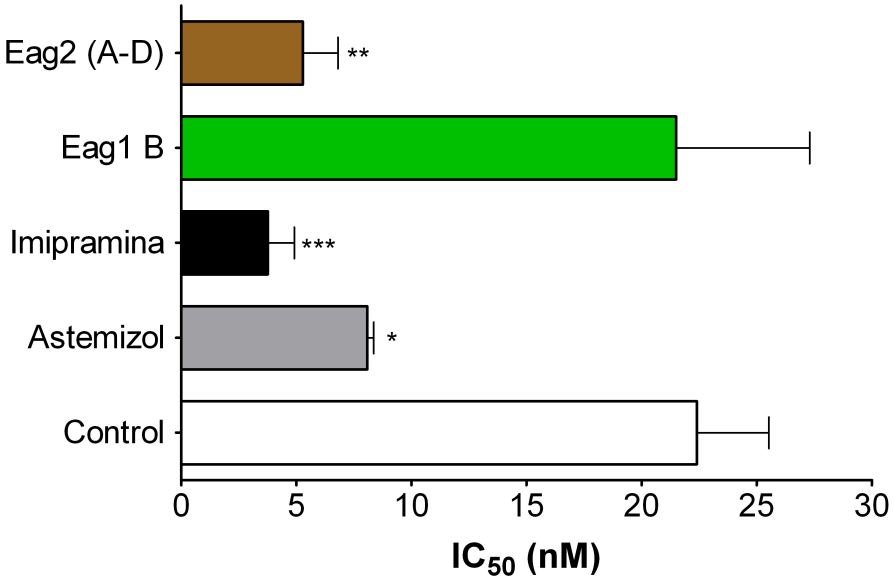


Figura 37: Efeito de bloqueadores e RNA interferência sobre o IC_{50} de Doxorubicina da célula Hs 633t. Os resultados representam a média e erro padrão de três experimentos (n=4). * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$ e *** $p < 0{,}005$.

Os bloqueadores dos canais Eag e a técnica de RNA interferência são capazes de reduzir a proliferação da célula Hs 633t além de modificarem o IC_{50}dox. A figura 37 mostra que a adição de astemizol, imipramina ou transfecção com o siRNA Eag2 (A-D) reduz o IC_{50}dox de 22,4 ± 3,1 nM para 8 ± 0,2, 3,7 ± 1,1 nM e 5,2 ± 1,5 nM, respectivamente. A transfecção com siRNA Eag1 B não tem efeito sobre o IC_{50}dox apesar de reduzir a proliferação da célula Hs 633t.

5 Discussão

5.1 Tecido normal *versus* câncer

A expressão aberrante de proteínas associadas a tumores é amplamente utilizada para o gerenciamento de pacientes com câncer (Bast et al., 2001). A expressão de tais proteínas tem sido utilizada para propostas de diagnóstico, prognóstico e terapia. Em alguns casos, proteínas expressas de maneira aberrante podem ser usadas para desenvolvimento de vacinas contra o câncer (Wang, 1999). Entretanto, não é usual encontrar uma alta freqüência de expressão de uma proteína como mostrado para Eag1 neste trabalho, especialmente se é considerado que a maioria das moléculas que estão superexpressas nos tecidos neoplásicos (Bast et al., 2001) são proteínas que também são encontradas no tecido normal.

Dados recentes mostram uma alta freqüência de aberrações cromossômicas, em torno de 1800 aberrações que afetam o braço longo do cromossomo 1 e 280 aberrações que afetam o locus 1q32 (Mitelman et al., 2005). Eag1 está localizado na posição q32.1-32.3 no braço longo do cromossomo 1, portanto um alvo frequente para quebras ou mutações. Não está claro em qual estágio durante a transformação maligna ocorre a superexpressão do Eag1. Pardo et al., 1999 mostraram que o canal por si só pode induzir um fenótipo transformado e aumentar a taxa de crescimento e a invasividade de tumores experimentais, portanto a expressão de Eag1 pode induzir uma vantagem no crescimento das células tumorais e, assim, levar ao enriquecimento das células que expressam Eag1.

Existem diversos paralelismos entre os dados descritos neste trabalho para Eag1

e o que é conhecido sobre o produto do gene Her2/Neu. Ambos são proteínas de membrana, e portanto acessíveis extracelularmente e podem estar envolvidas na transmissão de sinalização e são expressas em tecidos neoplásicos, tais como o câncer de mama, mas em uma extensão limitada no tecido normal (Natali et al., 1990). Her2/Neu está expresso em 46% dos câncer de mama primários, onde foi mostrado como alvo para propostas de imunoterapia (Bange et al., 2001; Ménard et al., 2000; Piccart-Gebhart et al., 2005).

Parece razoável especular que Eag1 poderia ser utilizado de maneira similar, já que foi demonstrado neste trabalho que existe uma distinção clara e reproduzível em imunohistoquímica que permite diferenciar entre tecido normal e tecido tumoral (Tabelas 6 e 7). O potencial de uma terapia dirigida ao Eag1 teria duas importantes vantagens em comparação às terapias convencionais: 1. poderia ser aplicado a um ampla diversidade de tumores e, portanto, a um grande número de pacientes e 2. a maioria das células que expressam Eag1 estão protegidas pela barreira hemato-encefálica ou correspondem a células terminalmente diferenciadas, permitindo assim uma intervenção terapêutica menos agressiva.

5.2 Expressão do Eag1 em sarcoma do tecido mole

Neste trabalho descrevemos a freqüência da expressão do Eag1 em sarcoma do tecido mole. Eag1 foi encontrado em 71% dos casos estudados, sendo que 47% apresentaram marcação altamente positiva. O tecido normal na mesma lâmina foi negativo, o que abre perspectivas da utilização do Eag1 como um marcador diferencial de transformação maligna em conjunto com a avaliação morfológica. A falta de correlação entre o canal e os fatores epidemiológicos (sexo, idade, grau, localização e tamanho do tumor) torna difícil, a esse estágio, dar ao Eag1 um possível valor prognóstico.

O fato do antígeno para Eag1 ser degradado ao longo do tempo não permite a realização de estudos retrospectivos, portanto estudos propecticvos terão de ser feitos de

forma a determinar se existe correlação entre a expressão do Eag1 e a evolução clínica e/ou resposta ao tratamento. A única indicação, até o presente momento, é o possível uso do Eag1 como marcador tumoral em sarcoma de tecido mole já que os tipos histopatológicos que mostram alta expressão para Eag1 são rabdomiossarcoma e sinoviosarcoma ($p < 0{,}01$) e são considerados tumores particularmente agressivos.

Marcadores prognósticos são ferramentas importantes no gerenciamento de pacientes com câncer (Bast et al., 2001). Eles auxiliam a estratificar os pacientes para tratamento através da identificação de grupos de risco de maneira a reduzir a morbidade e mortalidade. Provavelmente devido a extraordinária alta freqüência de expressão do Eag1, não foi possível estabeler associação entre este marcador e os fatores epidemiológicos neste trabalho. É possível que 29% dos tumores sejam negativos devido à baixa sensitividade de detecção do método utilizado, e a incidência de Eag1 talvez seja maior. Foi utilizado um anticorpo de cadeia única acoplado com fosfatase alcalina, reduzindo assim a probabilidade de casos falso positivo devido a utilização de anticorpos secundários ou aos sistemas de revelação. Ao mesmo tempo, foram perdidos dois passos de amplificação do sinal: o anticorpo secundário e os polímeros de peroxidase o que torna o nosso método menos sensível do que os métodos convencionis de imunohistoquímica, apesar de ser mais específico. A utilização de métodos específicos para determinar pequenas quantidades de macromolécula biológicas como imuno-PCR in-situ (Cao et al., 2000) talvez dê uma estimativa clara da freqüência da expressão do Eag1 em sarcoma do tecido mole.

A imunoreatividade do Eag1 foi principalmente intracelular (Figura 12), apesar de experimentos eletrofisiológicos terem detectado correntes Eag em células tumorais (Meyer et al., 1999) e em tumores primários (Farias et al., 2004). Além disso, observamos uma diferença clara entre as células tumorais e o tecido normal adjacente dentro dos casos positivos. A presença do Eag1 foi uma característica distinta em células tumorais o que

abre oportunidades no potencial terapêutico.

5.3 Estudo da função do canal Eag1 em células tumorais

Dados na literatura mostraram que o canal Eag1 está envolvido na progressão do ciclo celular de células tumorais humanas e a inibição do Eag1 é capaz de reduzir a síntese de DNA (Pardo et al., 1999; Gavrilova-Ruch et al., 2002). Até o presente momento não existem bloqueadores específicos para o canal Eag. Uma alternativa é a utilização da metodologia de RNA interferência, que desde 1998 (Fire et al., 1998) tem sido utilizada para o estudo da função de genes específicos em células de mamíferos (Elbashir et al., 2001).

Os resultados obtidos com as células derivadas de sarcoma mostram que o tumor do tipo rabdomiossarcoma possui alta expressão do Eag1 enquanto fibrossarcoma possui baixa expressão tanto ao nível de mRNA quanto ao nível proteíco. Os dados obtidos com as células derivadas de sarcoma estão de acordo com os achados relacionados aos tumores de pacientes, onde mostramos que fibrossarcoma possui distribuição homogênea entre baixa e alta expressão enquanto que rabdomiossarcoma possui alta expressão do canal Eag1.

Neste estudo mostramos que a redução do canal Eag1 por RNA interferência é capaz de inibir o crescimento celular, além disso mostramos que a redução do crescimento ocorre devido a um aumento da taxa de morte celular. Os resultados obtidos nos permitem sugerir que o canal Eag1 é uma proteína necessária para a sobrevivência das células estudadas.

A eficiência no bloqueio do crescimento celular depende da expressão do canal. Por exemplo, nas células derivadas de rabdomiossarcoma a taxa de inibição do crescimento celular foi em torno de 70% enquanto que nas células derivadas de fibrossarcoma foi em torno de 34%. Quando avaliamos o nível de expressão temos que as células derivadas

de rabdomiossarcoma possuem por volta de 2,5 vezes mais mRNA para Eag1 quando comparado às células derivadas de fibrossarcoma, e isso corresponde a um maior conteúdo protéico. Portanto podemos concluir que a eficiência no bloqueio do crescimento celular está correlacionada com o nível de expressão nas células estudadas.

As células derivadas de fibrosarcoma expressam ambas isoformas de canais da subfamília Eag como visto na seção 4.4. O canal Eag1, juntamente com Erg, se encontra entre os canais mais estudados mas pouco se sabe sobre o canal Eag2. A maioria dos estudos sobre esta isoforma está relacionada com propriedades biofísicas e farmacológicas, além da localização do canal. Estudos mostraram a presença do canal Eag2 em músculo esquelético e portanto especulam um papel fisiológico similar ao Eag1 (Ju & Wray, 2002).

Nas células derivadas de fibrosarcoma, a redução de Eag1 e Eag2 através da técnica de RNA interferência foi capaz de inibir o crescimento celular em torno de 34 e 43%, respectivamente, e quando utilizamos siRNA para ambos canais a taxa de inibição do crescimento celular passa a ser igual à 38,5%. Os resultados sugerem que a utilização concomitante de siRNA para Eag1 e Eag2 não promove um efeito aditivo como seria esperado se os canais tivessem papéis independentes no crescimento celular. Estudos recentes mostram que ambas as isoformas (Eag1 e Eag2) dos canais Eag são capazes de interagir e formar canais heteromultiméricos (Schönherr et al., 2002). Podemos supor que apenas o canal Eag1 está envolvido no crescimento das células tumorais e que a redução provocada pela adição de siRNA para Eag2 pode estar relacionada a um número menor de canais formados.

Experimentos *in vitro* mostraram que todas as células derivadas de sarcoma estudadas expressam canais Eag1, e que o bloqueio deste canal pela imipramina está correlacionado com a redução do crescimento celular. Astemizol não foi capaz de reduzir o crescimento celular, com exceção da célula Hs633t, apesar de ser um bloqueador mais específico dos canais Eag quando comparado à imipramina. Garcia-Ferreiro et al., 2004

mostraram que o mecanismo de bloqueio de ambos os fármacos é bastante similar apesar da sensibilidade e dependência a voltagem serem distintos. Portanto, diferenças no efeito dos bloqueadores utilizados podem sugerir mutações ou deleções do canal ou que o bloqueio da corrente não é um componente necessário para a redução do crescimento celular ou ainda que os efeitos provocados pela adição da imipramina poderiam ser inespecíficos.

5.4 Correlação entre quimioterapia e expressão do Eag1

Doxorubicina é um fármaco da classe das antraciclinas e foi identificado no início da década de 1960. Ainda hoje doxorubicina é amplamente usado em terapias combinadas para uma variedade de tumores e é o fármaco de escolha para o tratamento de pacientes com linfoma, câncer de mama e sarcoma (Binaschi et al., 2001). A atividade anti-tumoral da doxorubicina se dá pela estabilização da topoisomerase II ao DNA de maneira a aumentar os níveis de quebras. A doxorubicina transforma a proteína topoisomerase II em uma potente toxina nuclear que danifica irreversívelmente o DNA (Capranico & Zunino, 1992). O mecanismo descrito parece ser o alvo final levando a célula à morte celular, além disso a doxorubicina é capaz de formar radicais livre de oxigênio, se ligar covalentemente ou se intercalar ao DNA e produzir toxicidade membranar direta (Cummings et al., 1991).

Uma minoria dos pacientes com câncer são curados por quimioterapia, as razões que contribuirem para a falha no tratamento podem incluir parâmetros farmacocinêticos tais como absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos fármacos, e resistência celular. A resistência celular pode ser inerente ou adquirida por mudanças na célula ou induzidas pela administração do fármaco. O mecanismo de resistência clássico está relacionado à presença da glicoproteína P (PGP) e aquisição do fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) (Gottesman & Pastan, 1993; Juranka et al., 1989; Gros et al., 1986).

Neste trabalho estudamos a resposta das células derivadas de sarcoma ao agente

quimioterápico doxorubicina. Os resultados mostram que o canal Eag1 não está envolvido no mecanismo de ação da doxorubicina, pois a redução da expressão deste canal não é capaz de modificar o IC_{50}dox. O mecanismo pelo qual seria possível ocorrer um aumento da sensibilidade ao quimioterápico seria 1. previnir a extrusão do fármaco pela célula através do bloqueio da PGP, por exemplo, ou 2. diminuir a taxa de reparo do DNA. No caso específico da célula Hs633t, a inibição da expressão do canal Eag2 foi capaz de reduzir o IC_{50}dox. O resultado obtido nos surpreendeu já que não esperávamos que o canal tivesse qualquer efeito sobre a atividade tumoral da doxorubicina. O mecanismo pelo qual o canal Eag2 é capaz de reduzir o IC_{50}dox permanece por investigar.

Bloqueadores (imipramina e astemizol) do canal Eag1 foram utilizados para ensaios de determinação do IC_{50}dox. Ishikawa e colaboradores (2000) mostraram que astemizol é capaz de bloquear a atividade da PGP de maneira dependente da dose mas, até o presente momento, não existem dados na literatura relacionando imipramina e MDR. A adição de astemizol nas células A-204 (rabdomiossarcoma) e Hs633t (fibrossarcoma) promove um aumento em torno de 2 vezes da sensibilidade à doxorubicina. Ao contrário do astemizol, imipramina só foi capaz de modificar o IC_{50}dox na célula Hs633t. Não obtivemos os mesmos resultados com o astemizol ou imipramina nas outras células testadas, portanto podemos destacar efeitos inespecíficos ou citotóxicos deste fármaco.

Os dados obtidos nos ensaios de crescimento celular juntamente com os dados obtidos nos ensaios de determinação do IC_{50}dox nos sugerem que os bloqueadores para o canal Eag podem ser usados em terapias adjuvantes (astemizol) ou combinadas (imipramina) com doxorubicina. Estudos *in vivo* são necessários para avaliar a possível utilização desses bloqueadores para propostas de tratamento do sarcoma de tecido mole.

6 Conclusão

1. A expressão do Eag1 no tecido normal se encontra restita à algumas poucas populações terminalmente diferenciadas além de células no sistema nervoso central;
2. Tumores sólidos possuem alta freqüência da expressão do Eag1 quando comparado ao tecido normal cognato;
3. A freqüência de expressão do Eag1 em sarcoma do tecido mole é de 71%;
4. Não há correlação entre expressão do canal e fatores epidemiológicos como: sexo, idade, localização, tamanho e grau do tumor;
5. Os tipos histopatológicos considerados mais agressivos possuem alta expressão do Eag1;
6. O antígeno do Eag1 é instável ao longo dos anos;
7. Células derivadas de fibrosarcoma possuem Eag1 e Eag2 enquanto as células derivadas de rabdomiosarcoma possuem apenas Eag1;
8. A inibição do Eag1 e Eag2 reduz a taxa de crescimento das células estudadas;
9. A inibição do Eag1 e Eag2 aumenta a taxa de morte das células estudadas;
10. A imipramina é capaz de reduzir o crescimento celular nas células testadas, enquanto o astemizol promove o mesmo efeito somente em uma célula de fibrosarcoma (Hs 633t);

11. A inibição do Eag1 não modifica a sensibilidade das células à doxorubicina;

12. A inibição do Eag2 aumenta a sensibilidade da célula Hs633t à doxorubicina;

7 Perspectivas

7.1 Rabdomiossarcoma - modelo *in vivo*

Camundongo deficientes na proteína transmembranar Patched (Ptch) desenvolvem rabdomiossarcoma (Hahn et al., 2000; Kappler et al., 2003). Ptch está envolvido na cascata de sinalização da via Hedgehog, esta via é necessária para a diferenciação celular e a formação de órgãos durante a embriogênese. Esta via permanece ativa em alguns órgãos do adulto onde está envolvida na regulação da proliferação e manuntenção de células tronco (di Magliano & Hebrok, 2003).

A sinalização acontece através da ligação do ligante Hh (Sonic, Desert ou Indian Hedgehog) à proteína Ptch com auxílio da proteína Hip. Com a ligação do Hh, Ptch não é capaz de reprimir a proteína transmembranar Smoothened (Smo). Como conseqüência, Smo se torna ativo e inicia uma cascata de sinalização que resulta na ativação do fator de transcrição Gli. Após ativação, Gli migra para o núcleo e promove a transcrição de genes envolvidos no controle da proliferação celular e da angiogênese. Na ausência do ligante, a via se encontra inativa e Ptch é capaz de reprimir Smo. Nesse caso, Gli não é capaz de migrar para o núcleo devido a interações com proteínas citoplasmáticas, incluindo Fused e Supressor de Fused (Sufu), dessa maneira os genes alvo da via Hedgehog são reprimidos (di Magliano & Hebrok, 2003). Problemas na regulação da via Hedgehog promove o surgimento de câncer em diferentes tecidos. Mutações em Ptch estão associadas com carcinoma de célula basal, meduloblastoma e rabdomiossarcoma (di Magliano & Hebrok, 2003).

Experimentos preliminares detectaram a presença do canal Eag1 por imunohistoquímica nos tumores obtidos de camundongo deficientes em Ptch (camundongo-ptch$^{-/+}$). Análise de amostras de músculo esquelético normal dos mesmos espécimes se mostraram negativas para o canal. 70% dos camundongos-ptch$^{-/+}$ desenvolvem rabdomiossarcoma dentro dos primeiros seis meses de vida. Esse modelo animal pode ser utilizado para estudos de progressão tumoral na presença de bloqueadores do canal Eag, ou para estudos de regressão do tumor através de terapia combinada entre quimioterapia e bloqueadores do canal Eag. Os dados obtidos com este estudo serão de vital importância para uma eventual aplicação dos bloqueadores no tratamento de pacientes com sarcoma do tecido mole.

Referências Bibliográficas

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P., 2002. **Molecular Biology of the Cell**. 4th edition, Garland Publishing, New York.

Amigorena, S., Choquet, D., Teillaud, J. L., Korn, H. & Fridman, W. H. Ion channels and B cell mitogenesis. **Mol Immunol,** 27, (12): 1259–1268, 1990a.

Amigorena, S., Choquet, D., Teillaud, J. L., Korn, H. & Fridman, W. H. Ion channel blockers inhibit B cell activation at a precise stage of the G1 phase of the cell cycle. Possible involvement of K+ channels. **J Immunol,** 144, (6): 2038–2045, 1990b.

Arcangeli, A., Bianchi, L., Becchetti, A., Faravelli, L., Coronnello, M., Mini, E., Olivotto, M. & Wanke, E. A novel inward-rectifying K+ current with a cell-cycle dependence governs the resting potential of mammalian neuroblastoma cells. **J Physiol,** 489 (Pt 2), 455–471, 1995.

Bange, J., Zwick, E. & Ullrich, A. Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. **Nat Med,** 7, (5): 548–552, 2001.

Bantounas, I., Phylactou, L. A. & Uney, J. B. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. **J Mol Endocrinol,** 33, (3): 545–557, 2004.

Barros, F., del Camino, D., Pardo, L., Palomero, T., Giráldez, T. & de la Peña, P. Demonstration of an inwardly rectifying k+ current component modulated by thyrotropin-releasing hormone and caffeine in gh3 rat anterior pituitary cells. **Pflugers Arch.** 435, 119–129, 1997.

Bast, R. C., Ravdin, P., Hayes, D. F., Bates, S., Fritsche, H., Jessup, J. M., Kemeny, N., Locker, G. Y., Mennel, R. G., Somerfield, M. R. & of Clinical Oncology Tumor Markers Expert Panel, A. S. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. **J Clin Oncol,** 19, (6): 1865–1878, 2001.

Bauer, C. K., Engeland, B., Wulfsen, I., Ludwig, J., Pongs, O. & Schwarz, J. R. RERG is a molecular correlate of the inward-rectifying K current in clonal rat pituitary cells. **Receptors Channels,** 6, (1): 19–29, 1998.

Bauer, C. K. & Schwarz, J. R. Physiology of EAG K+ channels. **J Membr Biol,** 182, (1): 1–15, 2001.

Becchetti, A., Fusco, M. D., Crociani, O., Cherubini, A., Restano-Cassulini, R., Lecchi, M., Masi, A., Arcangeli, A., Casari, G. & Wanke, E. The functional properties of the human ether-à-go-go-like (HELK2) K+ channel. **Eur J Neurosci,** 16, (3): 415–428, 2002.

Benzaquen, L. R., Brugnara, C., Byers, H. R., Gatton-Celli, S. & Halperin, J. A. Clotrimazole inhibits cell proliferation in vitro and in vivo. **Nat Med,** 1, (6): 534–540, 1995.

Bianchi, L., Wible, B., Arcangeli, A., Taglialatela, M., Morra, F., Castaldo, P., Crociani, O., Rosati, B., Faravelli, L., Olivotto, M. & Wanke, E. herg encodes a K+ current highly conserved in tumors of different histogenesis: a selective advantage for cancer cells? **Cancer Res,** 58, (4): 815–822, 1998.

Binaschi, M., Bigioni, M., Cipollone, A., Rossi, C., Goso, C., Maggi, C. A., Capranico, G. & Animati, F. Anthracyclines: selected new developments. **Curr Med Chem Anti-Canc Agents,** 1, (2): 113–130, 2001.

Blandino, J. K., Viglione, M. P., Bradley, W. A., Oie, H. K. & Kim, Y. I. Voltage-dependent sodium channels in human small-cell lung cancer cells: role in action potentials and inhibition by Lambert-Eaton syndrome IgG. **J Membr Biol,** 143, (2): 153–163, 1995.

Brüggemann, A., Pardo, L. A., Stühmer, W. & Pongs, O. Ether-à-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K+ and Ca2+ and modulated by cAMP. **Nature,** 365, (6445): 445–448, 1993.

Brüggemann, A., Stühmer, W. & Pardo, L. A. Mitosis-promoting factor-mediated suppression of a cloned delayed rectifier potassium channel expressed in Xenopus oocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A,** 94, (2): 537–542, 1997.

Cabral, J. H. M., Lee, A., Cohen, S. L., Chait, B. T., Li, M. & Mackinnon, R. Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. **Cell,** 95, (5): 649–655, 1998.

Camacho, J., Sánchez, A., Stühmer, W. & Pardo, L. A. Cytoskeletal interactions determine the electrophysiological properties of human EAG potassium channels. **Pflugers Arch,** 441, (2-3): 167–174, 2000.

Cao, Y., Kopplow, K. & Liu, G. Y. In-situ immuno-PCR to detect antigens. **Lancet,** 356, (9234): 1002–1003, 2000.

Capranico, G. & Zunino, F. DNA topoisomerase-trapping antitumour drugs. **Eur J Cancer,** 28A, (12): 2055–2060, 1992.

Chandy, K. G., DeCoursey, T. E., Cahalan, M. D., McLaughlin, C. & Gupta, S. Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. **J Exp Med,** 160, (2): 369–385, 1984.

Chou, C. Y., Shen, M. R. & Wu, S. N. Volume-sensitive chloride channels associated with human cervical carcinogenesis. **Cancer Res,** 55, (24): 6077–6083, 1995.

Coindre, J. M., Terrier, P., Guillou, L., Doussal, V. L., Collin, F., Ranchère, D., Sastre, X., Vilain, M. O., Bonichon, F. & Bui, B. N. Predictive value of grade for metastasis development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas: a study of 1240 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. **Cancer,** 91, (10): 1914–1926, 2001.

Cormier, J. N. & Pollock, R. E. Soft tissue sarcomas. **CA Cancer J Clin,** 54, (2): 94–109, 2004.

Crociani, O., Cherubini, A., Piccini, E., Polvani, S., Costa, L., Fontana, L., Hofmann, G., Rosati, B., Wanke, E., Olivotto, M. & Arcangeli, A. erg gene(s) expression during development of the nervous and muscular system of quail embryos. **Mech Dev,** 95, (1-2): 239–243, 2000.

Cummings, J., Anderson, L., Willmott, N. & Smyth, J. F. The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo. **Eur J Cancer,** 27, (5): 532–535, 1991.

DeCoursey, T. E., Chandy, K. G., Gupta, S. & Cahalan, M. D. Voltage-gated K+ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? **Nature,** 307, (5950): 465–468, 1984.

di Magliano, M. P. & Hebrok, M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. **Nat Rev Cancer,** 3, (12): 903–911, 2003.

Dreixler, J. C., Bian, J., Cao, Y., Roberts, M. T., Roizen, J. D. & Houamed, K. M. Block of rat brain recombinant SK channels by tricyclic antidepressants and related compounds. **Eur J Pharmacol,** 401, (1): 1–7, 2000.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature,** 411, (6836): 494–498, 2001.

Engeland, B., Neu, A., Ludwig, J., Roeper, J. & Pongs, O. Cloning and functional expression of rat ether-à-go-go-like K+ channel genes. **J Physiol,** 513 (Pt 3), 647–654, 1998.

Enzinger, F., Lattes, R. & Torloni, H., 1969. Histologic typing of soft tissue tumors. Geneva: World Health Organization.

Farias, L. M. B., Ocaña, D. B., Díaz, L., Larrea, F., Avila-Chávez, E., Cadena, A., Hinojosa, L. M., Lara, G., Villanueva, L. A., Vargas, C., Hernández-Gallegos, E., Camacho-Arroyo, I., Dueñas-González, A., Pérez-Cárdenas, E., Pardo, L. A., Morales, A., Taja-Chayeb, L., Escamilla, J., Sánchez-Peña, C. & Camacho, J. Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers. **Cancer Res,** 64, (19): 6996–7001, 2004.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. **Nature,** 391, (6669): 806–811, 1998.

Fong, Y., Coit, D. G., Woodruff, J. M. & Brennan, M. F. Lymph node metastasis from soft tissue sarcoma in adults. Analysis of data from a prospective database of 1772 sarcoma patients. **Ann Surg,** 217, (1): 72–77, 1993.

Fraser SP, Grimes JA, D. M. Effects of voltage-gated ion channel modulators on rat prostatic cancer cell proliferation: comparison of strongly and weakly metastatic cell lines. **Prostate,** 44(1), 61–76, 2000.

García-Ferreiro, R. E., Kerschensteiner, D., Major, F., Monje, F., Stühmer, W. & Pardo, L. A. Mechanism of block of hEag1 K+ channels by imipramine and astemizole. **J Gen Physiol,** 124, (4): 301–317, 2004.

Gavrilova-Ruch, O., Schönherr, K., Gessner, G., Schönherr, R., Klapperstück, T., Wohlrab, W. & Heinemann, S. H. Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells. **J Membr Biol,** 188, (2): 137–149, 2002.

Gottesman, M. M. & Pastan, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. **Annu Rev Biochem,** 62, 385–427, 1993.

Grimes, J. A., Fraser, S. P., Stephens, G. J., Downing, J. E., Laniado, M. E., Foster, C. S., Abel, P. D. & Djamgoz, M. B. Differential expression of voltage-activated Na+ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. **FEBS Lett,** 369, (2-3): 290–294, 1995.

Gros, P., Croop, J. & Housman, D. Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. **Cell,** 47, (3): 371–380, 1986.

Hahn, H., Wojnowski, L., Specht, K., Kappler, R., Calzada-Wack, J., Potter, D., Zimmer, A., Müller, U., Samson, E., Quintanilla-Martinez, L. & Zimmer, A. Patched target Igf2 is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma. **J Biol Chem,** 275, (37): 28341–28344, 2000.

Hemmerlein, B., Weseloh, R. M., de Queiroz, F. M., Knötgen, H., Sánchez, A., Rubio, M. E., Martin, S., Schliephacke, T., Jenke, M., Heinz-Joachim-Radzun, Stühmer, W. & Pardo, L. A. Frequent overexpression of eag1 potassium channels in clinical tumour specimens. Submetido.

Hille, B., 2001. **Ion Channels of Excitable Membranes**. 3rd edition, Sinauer Associates Inc.

Ishikawa, M., Fujita, R., Takayanagi, M., Takayanagi, Y. & Sasaki, K. Reversal of acquired resistance to doxorubicin in K562 human leukemia cells by astemizole. **Biol Pharm Bull,** 23, (1): 112–115, 2000.

Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A., Tiwari, R. C., Ghafoor, A., Feuer, E. J. & Thun, M. J. Cancer statistics, 2005. **CA Cancer J Clin,** 55, (1): 10–30, 2005.

Jenke, M., Sánchez, A., Monje, F., Stühmer, W., Weseloh, R. M. & Pardo, L. A. C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels. **EMBO J,** 22, (3): 395–403, 2003.

Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T. & MacKinnon, R. X-ray structure of a voltage-dependent K+ channel. **Nature,** 423, (6935): 33–41, 2003a.

Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A. & MacKinnon, R. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K+ channel. **Nature,** 423, (6935): 42–48, 2003b.

Ju, M. & Wray, D. Molecular identification and characterisation of the human eag2 potassium channel. **FEBS Lett,** 524, (1-3): 204–210, 2002.

Juranka, P. F., Zastawny, R. L. & Ling, V. P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. **FASEB J,** 3, (14): 2583–2592, 1989.

Kaplan, W. D. & Trout, W. E. The behavior of four neurological mutants of Drosophila. **Genetics,** 61, (2): 399–409, 1969.

Kappler, R., Calzada-Wack, J., Schnitzbauer, U., Koleva, M., Herwig, A., Piontek, G., Graedler, F., Adamski, J., Heinzmann, U., Schlegel, J., Hemmerlein, B., Quintanilla-Martinez, L. & Hahn, H. Molecular characterization of Patched-associated rhabdomyosarcoma. **J Pathol,** 200, (3): 348–356, 2003.

Köhler, R., Degenhardt, C., Kühn, M., Runkel, N., Paul, M. & Hoyer, J. Expression and function of endothelial Ca(2+)-activated K(+) channels in human mesenteric artery: A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction and electrophysiological study in situ. **Circ Res,** 87, (6): 496–503, 2000.

Kohn, E. C., Reed, E., Sarosy, G., Christian, M., Link, C. J., Cole, K., Figg, W. D., Davis, P. A., Jacob, J., Goldspiel, B. & Liotta, L. A. Clinical investigation of a cytostatic calcium influx inhibitor in patients with refractory cancers. **Cancer Res,** 56, (3): 569–573, 1996.

Koshiji, M., Kageyama, Y., Pete, E. A., Horikawa, I., Barrett, J. C. & Huang, L. E. HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. **EMBO J,** 23, (9): 1949–1956, 2004.

Lambert, P. A., Somers, K. D., Kohn, E. C. & Perry, R. R. Antiproliferative and anti-invasive effects of carboxyamido-triazole on breast cancer cell lines. **Surgery,** 122, (2): 372–8; discussion 378–9, 1997.

Laniado, M. E., Fraser, S. P. & Djamgoz, M. B. Voltage-gated K(+) channel activity in human prostate cancer cell lines of markedly different metastatic potential: distinguishing characteristics of PC-3 and LNCaP cells. **Prostate,** 46, (4): 262–274, 2001.

Levitan, I. & Garber, S. S. Voltage-dependent inactivation of volume-regulated Cl- current in human T84 colonic and B-cell myeloma cell lines. **Pflugers Arch,** 431, (2): 297–299, 1995.

Ludwig, J., Terlau, H., Wunder, F., Brüggemann, A., Pardo, L. A., Marquardt, A., Stühmer, W. & Pongs, O. Functional expression of a rat homologue of the voltage gated either á go-go potassium channel reveals differences in selectivity and activation kinetics between the Drosophila channel and its mammalian counterpart. **EMBO J,** 13, (19): 4451–4458, 1994.

Malhi, H., Irani, A. N., Rajvanshi, P., Suadicani, S. O., Spray, D. C., McDonald, T. V. & Gupta, S. KATP channels regulate mitogenically induced proliferation in primary rat hepatocytes and human liver cell lines. Implications for liver growth control and potential therapeutic targeting. **J Biol Chem,** 275, (34): 26050–26057, 2000.

Marino, A. A., Iliev, I. G., Schwalke, M. A., Gonzalez, E., Marler, K. C. & Flanagan, C. A. Association between cell membrane potential and breast cancer. **Tumour Biol,** 15, (2): 82–89, 1994a.

Marino, A. A., Morris, D. M., Schwalke, M. A., Iliev, I. G. & Rogers, S. Electrical potential measurements in human breast cancer and benign lesions. **Tumour Biol,** 15, (3): 147–152, 1994b.

Mauro, T., Dixon, D. B., Komuves, L., Hanley, K. & Pappone, P. A. Keratinocyte K+ channels mediate Ca2+-induced differentiation. **J Invest Dermatol,** 108, (6): 864–870, 1997.

Meyer, R. & Heinemann, S. H. Characterization of an eag-like potassium channel in human neuroblastoma cells. **J Physiol,** 508 (Pt 1), 49–56, 1998.

Meyer, R., Schönherr, R., Gavrilova-Ruch, O., Wohlrab, W. & Heinemann, S. H. Identification of ether à go-go and calcium-activated potassium channels in human melanoma cells. **J Membr Biol,** 171, (2): 107–115, 1999.

Michalet, X., Pinaud, F. F., Bentolila, L. A., Tsay, J. M., Doose, S., Li, J. J., Sundaresan, G., Wu, A. M., Gambhir, S. S. & Weiss, S. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. **Science,** 307, (5709): 538–544, 2005.

Miller, C. An overview of the potassium channel family. **Genome Biol,** 1, (4): REVIEWS0004, 2000.

Mitelman, F., Johansson, B. & Mertens, F., 2005. Database of chromosome aberrations in cancer. In **Em: http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman**.

Ménard, S., Tagliabue, E., Campiglio, M. & Pupa, S. M. Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. **J Cell Physiol,** 182, (2): 150–162, 2000.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods,** 65, (1-2): 55–63, 1983.

Napp, J., Monje, F., Stühmer, W. & Pardo, L. A. Glycosylation of Eag1 (Kv10.1) potassium channels: intracellular trafficking and functional consequences. **J Biol Chem,** 280, (33): 29506–29512, 2005.

Natali, P. G., Nicotra, M. R., Bigotti, A., Venturo, I., Slamon, D. J., Fendly, B. M. & Ullrich, A. Expression of the p185 encoded by HER2 oncogene in normal and transformed human tissues. **Int J Cancer,** 45, (3): 457–461, 1990.

Nilius, B. & Wohlrab, W. Potassium channels and regulation of proliferation of human melanoma cells. **J Physiol,** 445, 537–548, 1992.

Occhiodoro, T., Bernheim, L., Liu, J. H., Bijlenga, P., Sinnreich, M., Bader, C. R. & Fischer-Lougheed, J. Cloning of a human ether-a-go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion. **FEBS Lett,** 434, (1-2): 177–182, 1998.

Ogata, N. & Narahashi, T. Block of sodium channels by psychotropic drugs in single guinea-pig cardiac myocytes. **Br J Pharmacol,** 97, (3): 905–913, 1989.

Pappas, C. A. & Ritchie, J. M. Effect of specific ion channel blockers on cultured Schwann cell proliferation. **Glia,** 22, (2): 113–120, 1998.

Pardo, L. A., Brüggemann, A., Camacho, J. & Stühmer, W. Cell cycle-related changes in the conducting properties of r-eag K+ channels. **J Cell Biol,** 143, (3): 767–775, 1998.

Pardo, L. A., del Camino, D., Sánchez, A., Alves, F., Brüggemann, A., Beckh, S. & Stühmer, W. Oncogenic potential of EAG K(+) channels. **EMBO J,** 18, (20): 5540–5547, 1999.

Piccart-Gebhart, M. J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R., Jackisch, C., Cameron, D., Dowsett, M., Barrios, C. H., Steger, G., Huang, C.-S., Andersson, M., Inbar, M., Lichinitser, M., Láng, I., Nitz, U., Iwata, H., Thomssen, C., Lohrisch, C., Suter, T. M., Rüschoff, J., Suto, T., Greatorex, V., Ward, C., Straehle, C., McFadden, E., Dolci, M. S., Gelber, R. D. & Team, H. A. H. T. S. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med,** 353, (16): 1659–1672, 2005.

Pollock, R., 2002. **American Cancer Society Atlas of Clinical Oncology: Soft Tissue Sarcoma**. BC Deker, Inc.

Presant, C. A., Russell, W. O., Alexander, R. W. & Fu, Y. S. Soft-tissue and bone sarcoma histopathology peer review: the frequency of disagreement in diagnosis and the need for second pathology opinions. The Southeastern Cancer Study Group experience. **J Clin Oncol,** 4, (11): 1658–1661, 1986.

Rane, S. G. The growth regulatory fibroblast IK channel is the prominent electrophysiological feature of rat prostatic cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun,** 269, (2): 457–463, 2000.

Rouzaire-Dubois, B., Milandri, J. B., Bostel, S. & Dubois, J. M. Control of cell proliferation by cell volume alterations in rat C6 glioma cells. **Pflugers Arch,** 440, (6): 881–888, 2000.

Saganich, M. J., de Miera, E. V.-S., Nadal, M. S., Baker, H., Coetzee, W. A. & Rudy, B. Cloning of components of a novel subthreshold-activating K(+) channel with a unique pattern of expression in the cerebral cortex. **J Neurosci,** 19, (24): 10789–10802, 1999.

Saganich, M. J., Machado, E. & Rudy, B. Differential expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K+ channels in brain. **J Neurosci,** 21, (13): 4609–4624, 2001.

Sato, K., Ishizuka, J., Cooper, C. W., Chung, D. H., Tsuchiya, T., Uchida, T., Rajaraman, S., Townsend, C. M. & Thompson, J. C. Inhibitory effect of calcium channel blockers on growth of pancreatic cancer cells. **Pancreas,** 9, (2): 193–202, 1994.

Schönherr, R., Mannuzzu, L. M., Isacoff, E. Y. & Heinemann, S. H. Conformational switch between slow and fast gating modes: allosteric regulation of voltage sensor mobility in the EAG K+ channel. **Neuron,** 35, (5): 935–949, 2002.

Shi, W., Wang, H. S., Pan, Z., Wymore, R. S., Cohen, I. S., McKinnon, D. & Dixon, J. E. Cloning of a mammalian elk potassium channel gene and EAG mRNA distribution in rat sympathetic ganglia. **J Physiol,** 511 (Pt 3), 675–682, 1998.

Shi, W., Wymore, R. S., Wang, H. S., Pan, Z., Cohen, I. S., McKinnon, D. & Dixon, J. E. Identification of two nervous system-specific members of the erg potassium channel gene family. **J Neurosci,** 17, (24): 9423–9432, 1997.

Singer, S. New diagnostic modalities in soft tissue sarcoma. **Semin Surg Oncol,** 17, (1): 11–22, 1999.

Skryma, R. N., Prevarskaya, N. B., Dufy-Barbe, L., Odessa, M. F., Audin, J. & Dufy, B. Potassium conductance in the androgen-sensitive prostate cancer cell line, LNCaP: involvement in cell proliferation. **Prostate,** 33, (2): 112–122, 1997.

Stansfeld, C. E., Röper, J., Ludwig, J., Weseloh, R. M., Marsh, S. J., Brown, D. A. & Pongs, O. Elevation of intracellular calcium by muscarinic receptor activation induces

a block of voltage-activated rat ether-à-go-go channels in a stably transfected cell line. **Proc Natl Acad Sci U S A,** 93, (18): 9910–9914, 1996.

Suessbrich, H., Waldegger, S., Lang, F. & Busch, A. E. Blockade of HERG channels expressed in Xenopus oocytes by the histamine receptor antagonists terfenadine and astemizole. **FEBS Lett,** 385, (1-2): 77–80, 1996.

Terlau, H., Ludwig, J., Steffan, R., Pongs, O., Stühmer, W. & Heinemann, S. H. Extracellular Mg2+ regulates activation of rat eag potassium channel. **Pflugers Arch,** 432, (2): 301–312, 1996.

Terstappen, G. C., Pula, G., Carignani, C., Chen, M. X. & Roncarati, R. Pharmacological characterisation of the human small conductance calcium-activated potassium channel hSK3 reveals sensitivity to tricyclic antidepressants and antipsychotic phenothiazines. **Neuropharmacology,** 40, (6): 772–783, 2001.

Teschemacher, A. G., Seward, E. P., Hancox, J. C. & Witchel, H. J. Inhibition of the current of heterologously expressed HERG potassium channels by imipramine and amitriptyline. **Br J Pharmacol,** 128, (2): 479–485, 1999.

Trudeau, M. C., Warmke, J. W., Ganetzky, B. & Robertson, G. A. HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. **Science,** 269, (5220): 92–95, 1995.

Ullrich, N., Gillespie, G. Y. & Sontheimer, H. Human astrocytoma cells express a unique chloride current. **Neuroreport,** 7, (5): 1020–1024, 1996.

Wang, R. F. Human tumor antigens: implications for cancer vaccine development. **J Mol Med,** 77, (9): 640–655, 1999.

Wang, S., Melkoumian, Z., Woodfork, K. A., Cather, C., Davidson, A. G., Wonderlin, W. F. & Strobl, J. S. Evidence for an early G1 ionic event necessary for cell cycle progression and survival in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. **J Cell Physiol,** 176, (3): 456–464, 1998.

Warmke, J. W. & Ganetzky, B. A family of potassium channel genes related to eag in Drosophila and mammals. **Proc Natl Acad Sci U S A,** 91, (8): 3438–3442, 1994.

Wasilenko, W. J., Palad, A. J., Somers, K. D., Blackmore, P. F., Kohn, E. C., Rhim, J. S., Wright, G. L. & Schellhammer, P. F. Effects of the calcium influx inhibitor carboxyamido-triazole on the proliferation and invasiveness of human prostate tumor cell lines. **Int J Cancer,** 68, (2): 259–264, 1996.

Weber, C., de Queiroz, F. M., Downie, B., Suckow, A., Stühmer, W. & Pardo, L., 2006. Silencing the activity and transforming properties of the human eag1 potassium channel by rnai. Manuscrito em preparação.

Weiss, S. W. & Goldblum, J. R., 2001. **Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors**. 4th edition, Mosby Inc.

Wimmers, S., Wulfsen, I., Bauer, C. K. & Schwarz, J. R. Erg1, erg2 and erg3 K channel subunits are able to form heteromultimers. **Pflugers Arch,** 441, (4): 450–455, 2001.

Woodfork, K. A., Wonderlin, W. F., Peterson, V. A. & Strobl, J. S. Inhibition of ATP-sensitive potassium channels causes reversible cell-cycle arrest of human breast cancer cells in tissue culture. **J Cell Physiol,** 162, (2): 163–171, 1995.

Wray, D. The roles of intracellular regions in the activation of voltage-dependent potassium channels. **Eur Biophys J,** 33, (3): 194–200, 2004.

Yatabe, N., Kyo, S., Maida, Y., Nishi, H., Nakamura, M., Kanaya, T., Tanaka, M., Isaka, K., Ogawa, S. & Inoue, M. HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells. **Oncogene,** 23, (20): 3708–3715, 2004.