UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Caracterização celular e molecular dos efeitos
do ácido retinóico sobre as células ST1 de glioma
de rato**

Mário Henrique Bengtson

Tese de Doutorado

Profª. Dra. Mari Cleide Sogayar

SÃO PAULO

Data do Depósito do Trabalho na SPG: 09/04/2002

Nove de Abril de dois mil e dois

1.88
56c

“Caracterização Celular e Molecular dos Efeitos do Ácido Retinóico sobre as Células ST1 de Glioma de Rato”

filas OK

MÁRIO HENRIQUE BENGTON

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Profa. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. ALEXANDER HENNING ULRICH
IQ – USP

Profa. Dra. VILMA REGINA MARTINS
LUDWIG

Profa. Dra. SUELY KAZUE NAGAHASHI MARIE
FM – USP

Profa. Dra. ANAMARIA ARANHA CAMARGO
LUDWIG

SÃO PAULO
03 DE JUNHO 2002.

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004802

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bengtson, Mário Henrique

B466c Caracterização celular e molecular dos efeitos do ácido
retinóico sobre as células ST1 de glioma de rato / Mário
Henrique Bengtson. -- São Paulo, 2002.
132p

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Sogayar, Mari Cleide.

1. Expressão gênica 2. Biologia celular 3. Câncer :
Medicina 4. Biologia molecular I. T. II. Sogayar,
Mari Cleide, orientador.

574.88 CDD

Para meu pai por ter-me ensinado a
admiração com o mundo e ser sempre
meu grande incentivador;
Para minha mãe por ter me ensinado a
estudar e a gostar de aprender.

"Um dos antigos filósofos gregos, que viveu há mais de dois mil anos, acreditava que a filosofia era fruto da capacidade do homem de se admirar com as coisas."

"Vamos resumir: um coelho branco é tirado de dentro de uma cartola. E porque se trata de um coelho muito grande, este truque leva bilhões de anos para acontecer. Todas as crianças nascem bem nas pontas dos finos pêlos do coelho. Por isso elas conseguem se encantar com a impossibilidade do número de magia a que assistem. Mas conforme vão envelhecendo, elas vão se arrastando cada vez mais para o interior da pelagem do coelho. E ficam por lá. Lá embaixo é tão confortável que elas não ousam mais subir até a ponta dos finos pêlos, lá em cima. Só os pensadores têm ousadia para se lançar nesta jornada rumo aos limites da existência. Alguns deles não chegam a concluí-la, mas outros se agarram com força nos pêlos dos coelhos e berram para as pessoas que estão lá embaixo, no conforto da pelagem, enchendo a barriga de comida e bebida:

Senhoras e Senhores – gritam eles -, estamos flutuando no espaço!

Mas nenhuma das pessoas lá de baixo se interessa pela gritaria.

Deus do céu! Que caras mais barulhentos! - eles dizem.

E continuam a conversar: será que poderia me passar a manteiga? Qual a cotação das ações hoje? Qual o preço do tomate? Você ouviu dizer que Lady Di está grávida de novo?"

Jostein Gaarder em "O Mundo de Sofia".

AGRADECIMENTOS

À Profa. Mari por ter me acolhido no seu laboratório e compartilhado sua experiência, entusiasmo pela ciência e conhecimento comigo. Apreendi muito contigo nestes anos de convivência.

Ao Prof. Sandro, por ter sido meu mentor durante a iniciação científica, acreditando no meu potencial, e me ajudando a quebrar várias barreiras. "Oh Captain, my Captain...".

Aos colegas do laboratório (Alexandre, André, Antero, Ariadne, Áurea, Beth, Cleber, Delano, Diana, Fernanda, Fernanda Festa, Fernando, Helena, Jean, João Marcos, Juan, Maria Leonor, Lincoln, Lúcia, Luciana, Maki, Marcos, Malú, Rafael, Renato, Ricardo, Rita, Roberto, Sheila, Tatiana, Thiago e Wagner), pela troca de idéias e informações e pela agradável convivência diária que tornou estes 4 anos extremamente curtos.

À Silvy pela grande ajuda com os experimentos de apoptose e BrdU e amizade.

À Luciana e a Theri pela ótima ajuda com o seqüenciador.

Às pessoas com quem tive o prazer de trabalhar mais diretamente, aprendendo e compartilhando um pouco do que aprendi: Ana Paula, Carlos, Christian, Jorge, Karin, Leonardo, Sandra e Sueli Oba.

Ao Cristiano pelas ótimas discussões científicas, filosóficas e pelas boas risadas que tivemos oportunidade de dividir durante sua estadia em São Paulo.

Ao Prof. Mauro, por ter me ensinado, entre outras coisas, que apesar das dificuldades não devemos nunca perder o entusiasmo, pois é ele que toca as coisas para frente.

Ao Emmanuel pelas empolgantes discussões científicas com as quais aprendi muito.

Ao Dr. Hugo e pessoal de seu laboratório pelas discussões e sugestões nos seminários de sexta.

À Zizi, Irenice, Débora e Sandra pelo ótimo apoio técnico.

Ao Dr. Dorry, ao Dr. Verjovski-Almeida e integrantes de seus laboratórios pelo empréstimo de material e equipamento.

À Esther por ter acreditado no meu potencial, mesmo quando eu duvidava, e por tudo o que foi.

Ao amigo Brian por ter dividido o apartamento comigo e pelos momentos, curtos, mas bons de convivência diária.

À Katlin pelo carinho e companheirismo, sem falar na ajuda com correções da tese. "Na imensa vastidão do espaço e do tempo, é um grande prazer compartilhar o mesmo espaço e o mesmo tempo contigo...".

Ao meu irmão Marcos pelas discussões sobre coisas possíveis e impossíveis nos finais de semana e a minha irmã Taís pela amizade e carinho.

Ao Tio Toninho e família pelo constante apoio e incentivo.

APOIO FINANCEIRO:

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

ICGEB – International Center for Genetic Engineering and Biotechnology

PRP-USP – Pró-reitoria de Pesquisa – USP

FINEP – Financiadora de Estudos e Projetos

ÍNDICE

Índice.....	2
Índice de Figuras e Tabelas	5
Resumo	8
Summary.....	9
Lista de abreviaturas	10
1. Introdução:.....	12
1.1. Glia e gliogênese.....	12
1.2. Glioma	13
1.3. Ácido retinóico no tratamento de gliomas e outras neoplasias.....	15
1.4. Ácido retinóico:	17
1.4.1. Metabolismo da vitamina A e produção de ácido retinóico:	17
1.4.2. Receptores de ácido retinóico e a regulação da expressão gênica	18
1.4.3. Ácido retinóico e ciclo celular.....	20
1.4.4. Ácido retinóico no desenvolvimento e na diferenciação de células da glia.....	21
1.5. Células ST1 de glioma de rato e ácido retinóico	23
1.6. Métodos de identificação de genes diferencialmente expressos.....	25
2. Objetivos do trabalho.....	29
3. Racional.....	29
4. Materiais e Metodologia.....	30
4.1. Materiais.....	30
4.1.1. Linhagem celular	30
4.1.2. Soluções e meios de cultura para células de mamífero.....	30
4.1.3. Meio de cultura para bactérias.....	30
4.1.4. Isótopos radioativos.....	31
4.1.5. Reagentes	31
4.1.6. Soluções	31
4.2. Métodos.....	31
4.2.1. Análise da síntese de DNA de células ST1 na presença e na ausência de diversas concentrações de ATRA.....	31
4.2.2. Cinética do efeito de ATRA sobre síntese de DNA de células ST1.....	32
4.2.3. Ensaio de apoptose pelo método de TUNEL.....	33
4.2.4. Crescimento em suspensão de agarose	34
4.2.5. Construção das bibliotecas de subtração pelo método de SSH	34
4.2.5.1. Preparo de mRNA e subtração de cDNAs de células ST1 tratadas (ou não) com ATRA por 10h	34

4.2.5.2. Clonagem dos fragmentos da subtração e transformação bacteriana	38
4.2.5.3. Preparo de bactérias eletrocompetentes e eletroporação	40
4.2.6. Rastreamento ("screening") com arranjos de DNA ("macroarrays") de 96 amostras.....	41
4.2.6.1. Preparo das membranas de 96 amostras	41
4.2.6.2. Preparo das membranas de 1.536 amostras	41
4.2.6.3. Preparo dos cDNAs para sonda	42
4.2.6.4. Hibridização dos “macroarrays”.....	43
4.2.7. Northern blot.....	43
4.2.7.1. Extração e purificação de RNA total de células de mamíferos (Chirgwin et al., 1979)	43
4.2.7.2. Fracionamento de RNA em gel de agarose-formaldeído (Thomas, 1980) e transferência para membrana de nylon.	44
4.2.7.3. Preparo da sonda de cDNA e marcação radioativa.....	44
4.2.7.4. Hibridização e lavagem dos filtros.....	45
4.2.7.5. Autoradiografia.....	45
4.2.8. Seqüenciamento automatizado de DNA	46
4.2.9. Construção das bibliotecas de subtração por RDA	46
4.2.9.1. Síntese de cDNAs utilizando o kit “SMART PCR cDNA Synthesis Kit”	46
4.2.9.2. Hibridização subtrativa:	47
5. Resultados.....	50
5.1. Efeito de diferentes concentrações de ATRA sobre a síntese de DNA de células ST1	50
5.2. Análise da parada de crescimento das células ST1 tratadas com ATRA	53
5.3. Efeito de ATRA sobre o crescimento de células ST1 em suspensão de agarose	57
5.4. Construção das bibliotecas de subtração	60
5.4.1. Preparo de fragmentos de cDNAs	60
5.4.2. Hibridização subtrativa e PCRs primário e secundário	63
5.4.3. Teste da eficiência de subtração/normalização	65
5.5. Rastreamento ("screening") da biblioteca de subtração	66
5.6. Confirmação da expressão diferencial	75
5.7. Análise da seqüência do clone FIB8	77
5.8. Construção de biblioteca de cDNA utilizando a técnica de RDA (Representational Differential Analysis).....	79
5.8.1. Síntese de cDNA	79
5.8.2. Construção das Representações.....	82

5.8.3. Hibridizações e obtenção dos produtos diferenciais I e II	85
5.9. Caracterização da biblioteca de RDA.....	88
5.10. Confirmação da expressão diferencial	89
5.11. Análise das seqüências dos clones regulados por ATRA	91
6. Discussão	94
6.1. Caracterização da reversão fenotípica das células ST1 de glioma de rato	94
6.2. Construção das bibliotecas de subtração.....	95
6.2.1. Construção da biblioteca de SSH e rastreamento.....	95
6.2.2. Construção da biblioteca de RDA	99
6.3. Genes identificados como regulados por ATRA na reversão fenotípica das células ST1	101
6.3.1. FIB8.....	101
6.3.2. VEGF	103
6.3.3. SPI-3	104
6.3.4. CDV-3A.....	106
6.3.5. Aldose redutase like	107
6.3.6. retSDR1	108
6.3.7. Stran	108
6.3.8. GEM/Kir	110
6.3.9. EYA2.....	113
6.3.10.OKL38	115
6.4. Comentário geral	116
7. Conclusões.....	118
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
Curriculum Vitae.....	129

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Esquema do funcionamento da metodologia de SSH (Gurskaya <i>et al.</i>, 1996)	36
Figura 2. Esquema do funcionamento da metodologia de RDA (Hubank & Schatz, 1994)	48
Figura 3. Inibição da síntese de DNA em células ST1 tratadas com diferentes concentrações de ATRA por 48 h	51
Figura 4. Morfologia de células ST1, cultivadas em DMEM/SFB2%, não tratadas (A) ou tratadas (B) com 10^{-5}M de ATRA por 72h.	52
Figura 5. Ensaio de incorporação de BrdU pelas células ST1 tratadas (ou não) com ATRA (10^{-5}M)	55
Figura 6: Ensaio de TUNEL para detecção de apoptose em células ST1 tratadas (ou não) com ATRA (10^{-5}M)	55
Figura 7. Fotomicrografias dos ensaios de TUNEL das células ST1 tratadas (ou não) com ATRA (10^{-5}M)	56
Figura 8. Efeito de ATRA (10^{-5}M) sobre a eficiência de plaqueamento das células ST1 em suspensão de agarose	58
Figura 9. Aspecto das colônias, das células ST1, formadas em suspensão de agarose na ausência (A) ou na presença (B) de ATRA a 10^{-5}M	59
Figura 10. Fracionamento dos cDNAs dupla fita sintetizados antes e após a digestão com <i>RsaI</i>, em gel de 1% agarose	62
Figura 11. Teste da eficiência de ligação aos adaptadores	62
Figura 12. Fracionamento dos produtos de PCR primário e secundário da subtração, em gel de 2% agarose	64
Figura 13. Teste da eficiência de normalização/subtração	64
Figura 14. Rastreamento de 96 clones de cDNAs em "macroarrays"	67
Figura 15. Rastreamento de 768 clones de cDNAs em "macroarrays", em duplicatas	68

Figura 16. Representação gráfica da relação de intensidade da hibridização "Forward/ Reverse" para 1 placa contendo 96 clones	74
Figura 17. Northern blot de clones isolados no rastreamento da biblioteca de SSH.	76
Figura 18. Busca de seqüências homólogas a FIB8 no banco de dados nr, usando o programa Blast.	78
Figura 19. Seqüência da proteína virtual deduzida a partir do clone genômico NHO493L, usando o programa GENSCAN.	80
Figura 20. Alinhamento da proteína virtual com banco de dados nr, usando o programa BLAST.	81
Figura 21 . Fracionamento, em gel de 1% agarose, dos cDNAs sintetizados a partir de RNA de células ST1 tratadas (ou não) com ATRA a 10^{-5} M por 24h, usando-se o kit "Smart"	83
Figura 22. Fracionamento, em gel de agarose 1,2%, dos cDNAs sintetizados a partir de RNA de células ST1 tratadas (ou não) com ATRA 10^{-5} M por 24h, usando-se o kit "Smart" ..	84
Figura 23. Fracionamento em gel de 1% agarose dos fragmentos de cDNAs das células ST1 tratadas (ou não) com ATRA 10^{-5} M por 24h, amplificados por PCR por um número variado de ciclos.	86
Figura 24. Fracionamento em gel de 1% agarose dos produtos diferenciais I e II obtidos pelo RDA.	87
Figura 25. Northern blot de clones isolados no RDA	90
Figura 26. Seqüência de aminoácidos da proteína virtual STRAN deduzida a partir do clone genômico.	92
Tabela 1. Eficiência de plaqueamento das células ST1 em meio semi-sólido de agarose na presença ou na ausência de ATRA	58
Tabela 2. Densitometria da hibridização "Forward" da membrana de 768 clones	70
Tabela 3. Densitometria de hibridização "reverse" da membrana de 768 clones	71

Tabela 4. Média densitométrica das intensidades da hibridização dos clones aplicados no "macroarray", e correlação ("Forward/Reverse") entre os sinais da hibridização "Forward" e "Reverse".72

Tabela 5 - Genes isolados pelo RDA, posição de alinhamento das ESTs clonadas correspondentes e sua frequência de aparecimento.....89

RESUMO

Os gliomas são os tumores mais fatais do sistema nervoso central, para os quais ainda não há tratamento eficaz. Para analisar as bases celulares e moleculares da ação do agente diferenciador e antitumoral ácido retinóico (ATRA) sobre gliomas, foi utilizado, como modelo, a linhagem ST1 de glioma de rato. Propôs-se: a) analisar os efeitos de ATRA sobre a morfologia, proliferação e morte celular; b) isolar, identificar e caracterizar genes induzidos por ATRA em células ST1.

Verificou-se que o tratamento com ATRA promove achatamento celular e inibição da síntese de DNA e do crescimento em suspensão de agarose, caracterizando uma completa reversão fenotípica tumoral-normal, a qual não é acompanhada de indução de apoptose.

Os genes induzidos por ATRA foram isolados através da construção de bibliotecas subtraídas de cDNA por: RDA ("Representational Difference Analysis") e SSH ("Suppressive Subtractive Hybridization") acoplados a rastreamento em "macroarrays". Foram identificados 10 genes regulados por ATRA durante a reversão fenotípica das células ST1: *p450rai2*, *spi3*, *vegf*, *cdv-3a*, *okl38*, *eya2*, *gem*, *retSDR1*, *aldose reductase-like*, e um gene novo, com 61% de identidade com uma fosfatase de galinha.

Este estudo permitiu a caracterização dos efeitos de ATRA sobre ST1 e identificou novos alvos para futuro desenvolvimento de novas drogas e terapia gênica.

SUMMARY

Gliomas are the most fatal central nervous system tumors, for which efficient treatment is still not available. To analyze the cellular and molecular bases for the action of the differentiating and anti-tumor agent retinoic acid (ATRA) in gliomas, the rat glioma ST1 cell line was used as a model. We proposed: a) to analyze the effects of ATRA in ST1 cells morphology, growth and apoptosis; b) to isolate, identify and characterize the ATRA-induced genes in ST1 cells.

We demonstrated that ATRA promotes cellular flattening and inhibition of DNA synthesis and growth in agarose suspension, characterizing a complete tumoral to normal phenotypic reversion, which is not accompanied by apoptosis.

Subtracted cDNA libraries were generated, using 2 different methodologies: RDA (Representational Difference Analysis) and SSH (Suppressive Subtractive Hybridization) followed by macroarray screening. This allowed identification of 10 ATRA induced genes which are up regulated by ATRA during ST1 cells phenotypic reversion, namely: *p450rai2*, *spi3*, *vegf*, *cdv-3a*, *okl38*, *eya2*, *gem*, *retSDR1*, *aldose reductase-like* and a new gene with 61% identity with chicken phosphatase.

This study characterized the cellular and molecular effects of ATRA upon ST1 cells and allowed identification of new targets for future development of new drugs and gene therapy.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATRA	Todo-trans-ácido retinóico ("all-trans-retinoic acid")
ATP	Trifosfato de adenosina
cDNA	DNA complementar
DAPI	4',6 diamidino 2-fenilindol
ddNTP	Didesoxinucleotídeo trifosfato
DEPC	Dietil-piromcarbonato
DMEM	"Dulbecco's Modified Eagle's Medium"
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodinitrilotetracético sal dissódico
EST	"Expressed sequence tag"
GAP	"GTPase activating protein"
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GFAP	Proteína ácida fibrilar de glia
GTP	Trifosfato de guanosina
HPLC	"High Performance Liquid Chromatography"
IPTG	L-isopropil- β -D-l-tiogalactopiranosídeo
kDa	Kilo Daltons
kb	Kilo pares de base
LB	"Luria-Bertani Medium"
MCS	Seqüência múltipla de clonagem
min	Minutos
MOPS	"3-[N-Morpholino] propanosulfonic acid"
mRNA	RNA mensageiro
bp	Pares de bases
PBS	Solução salina tamponada com fosfato ("Phosphate Buffered Saline")

PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase
PLP	Proteína proteo-lipídica
RAR	Receptor de ácido retinóico
RDA	“Representational difference analysis”
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RXR	Receptor de ácido retinóico
SAGE	“Serial Analysis of gene expression”
SDS	Dodecil Sulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SSC	Solução salina contendo Citrato de Sódio, pH7,0
SSH	“Suppressive subtractive hybridization”
SSPE	Solução salina contendo Sódio, Fosfato e EDTA, pH 7,0
TAE	Tampão Tris-Acetato- EDTA, pH 7,5
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA, pH8,3
TCA	Ácido tri-cloro acético
TE	Tampão Tris-EDTA, pH 7,5
TUNEL	“TdT-mediated dUTP Nick End Labeling”
UTR	“Untranslated Region”
UV	Luz ultravioleta
X-gal	5-Bromo, 4- cloro, 2-indolil, β -D-galactopiranosídeo

1. INTRODUÇÃO:

1.1. Glia e gliogênese

O tecido cerebral é composto por dois tipos principais de células: os neurônios e a neuroglia (glia). A glia é formada por 4 tipos de células: astrócitos, oligodendrócitos, ependimócitos e microglia. Os primeiros representam 50% das células da glia enquanto os outros tipos celulares representam, respectivamente, 40, 5 e 5% (Bloom & Fawcett, 1994). O conjunto das células da glia constitui 90% das células cerebrais em humanos, 65% em roedores e 25% em *Drosófila* (Pfrieger & Barres, 1995).

Antigamente, acreditava-se que a glia possuía apenas as funções de sustentação e agregação do sistema nervoso. Atualmente, este conceito foi revisto, à medida que novas evidências sugerem que a glia é necessária para o desenvolvimento neuronal (Toresson *et al.*, 1999; Noctor *et al.*, 2001), funcionamento correto dos neurônios maduros e regeneração do sistema nervoso central (Gimenez y Ribotta *et al.*, 2001). Uma teoria que vem sendo cada vez mais aceita é a de que a glia pode ter capacidade de comunicação, complementando aquela apresentada pelos neurônios, através da formação de "redes gliais" (Giaume & Venance, 1995; Coles & Abbott, 1996; Kast, 2001).

A glia madura se origina das células tronco ("stem cells") do SNC. Neste processo de diferenciação, estão envolvidas diversas células precursoras as quais são definidas pela morfologia, expressão de determinados marcadores protéicos e pela capacidade de gerar células específicas em cultura (Holland, 2001). Assim, as células tronco cerebrais dão origem a precursores restritos da glia (glioblastos), os quais possuem capacidade de gerar tanto precursores de oligodendrócitos quanto astrócitos. Os precursores dos astrócitos (APC) dão

origem a astrócitos do tipo 1. Os precursores dos oligodendrócitos são conhecidos como células O2A e podem dar origem tanto a oligodendrócitos como a astrócitos do tipo 2. Os astrócitos do tipo 1 e 2 são diferenciados pela expressão do marcador A2B5 (Lee *et al.*, 2000; Holland *et al.*, 2001).

Alguns dos genes e fatores responsáveis pela transição de um precursor a outro, começaram a ser identificados apenas recentemente. A diferenciação das células tronco nos glioblastos parece envolver a via de Shh ("sonic hedgehog"), vitronectina, os fatores de crescimento PDGF ("Platelet-derived growth factor") e FGF ("Fibroblast growth factor") e os fatores de transcrição da família HES e Id. A transição dos glioblastos para astrócitos envolve os fatores LIF ("leukemia inhibitor factor"), BMP ("bone morphogenetic protein"), CNTF ("ciliary neurotrophic factor") e EGF ("endothelium growth factor"). A formação dos oligodendrócitos a partir das células O2A está relacionada com os fatores de transcrição da família SOX, Tst-1/SCIP/Oct-6, proteínas com o domínio POU, da via de Notch, além de GRO- α , e dos fatores PDGF, CNTF, LIF e neuroregulin (Lee *et al.*, 2000; Richardson, 2000; Holland, 2001).

1.2. Glioma

Os tumores da glia, genericamente conhecidos como glioma, são os tumores primários mais comuns do sistema nervoso central (Akbasak & Sunar-Akbasak, 1992).

Os gliomas são classificados de acordo com sua morfologia e características clínicas em astrocitomas, oligodendromas e oligoastrocitomas. Eles são graduados em uma escala de I a IV de acordo com seu grau de malignidade. Dentre os gliomas, os tumores mais frequentes são os astrocitomas, os quais são classificados em 4 classes clínicas: astrocitoma

pilocítico (grau I), astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III) e glioblastoma multiforme (grau IV) (Cavenee *et al.*, 2000; Maher *et al.*, 2001).

Os graus III e IV são muito agressivos, altamente invasivos, neurologicamente destrutivos, sendo considerados como os mais mortais dos tumores humanos. No caso de glioblastoma multiforme (astrocitoma grau IV), por exemplo, o tempo de vida média do paciente é de 1 ano (Maher *et al.*, 2001). Estes tumores de grau mais elevado podem surgir primariamente ou a partir do progresso das outras classes (Louis *et al.*, 2002).

Ainda não se sabe se os tumores da glia são originários principalmente de mutação das células precursoras ou da transformação neoplásica/"desdiferenciação" de células adultas. O que se observa é que, em geral, os gliomas possuem muitas características de células precursoras, tais como: expressão de marcadores expressos durante o desenvolvimento e alta capacidade de migração e invasão (Holland, 2001; Maher *et al.*, 2001).

As alterações genéticas mais comuns nos astrocitomas envolvem: mutação de p53 e superexpressão de PDGF ("platelet-derived growth factor") e seu receptor nos astrocitomas de baixo grau; mutação de RB, amplificação de CDK4 ("cyclin dependent kinase 4"), perdas de INK4a ("cyclin-dependent kinase inhibitor 4a"), ARF, PTEN ("phosphatase and tensin homology"), DMBT1 ("deleted in malignant brain tumors") e Mxi ("Max interacting protein 1") e deleção de 19q e 11p nos astrocitomas anaplásicos; amplificação e mutações no receptor de EGFR ("epidermal growth factor receptor"), perdas de INK4a, ARF, PTEN e mutação de RB, nos glioblastomas (Maher *et al.*, 2001). O perfil das alterações genéticas encontradas nos oligodendromas e oligoastrocitomas é bem distinto dos astrocitomas. Nos oligodendromas, são comuns deleções no braço curto do cromossomo 1 e do braço longo do

cromossomo 19 (Louis & Cavenee, 2000). As mutações comuns nos oligoastrocitomas reúnem as mutações comuns dos astrocitomas e dos oligodendromas (Maher *et al.*, 2001; Maintz *et al.*, 1997).

Apesar de todo avanço recente da cirurgia, radioterapia e quimioterapia, e dos 20 anos de testes de drogas promissoras em pacientes, ainda não há uma terapia realmente funcional contra os gliomas (Maher *et al.*, 2001).

1.3. Ácido retinóico no tratamento de gliomas e outras neoplasias

Devido ao efeito de inibição de crescimento associado à diferenciação celular, o ácido retinóico e seus derivados vêm sendo testados, com variados graus de sucesso, no tratamento e prevenção da reincidência de vários tipos de tumores. Nas últimas 2 décadas, foram testados como agentes terapêuticos, em cânceres hematológicos, tais como: leucemia pró-mielocítica aguda (Chomienne *et al.*, 1990), linfoma cutâneo de células T (Dobozy *et al.*, 1987), e em cânceres de pele (Lippman *et al.*, 1992), cabeça e pescoço (Hong *et al.*, 1990), pulmão (Pastorino *et al.*, 1993), fígado (Muto *et al.*, 1996), neuroblastoma (Villablanca *et al.*, 1995) e gliomas (Yung *et al.*, 1996).

Por sua ação diferenciadora, os retinóides são potencialmente interessantes para tratamento dos gliomas. Estes tumores são altamente migratórios e invasivos, o que torna praticamente impossível sua remoção total através de cirurgia e tratamento radioterápico. Além disto, estes tumores são muito resistentes ao uso de quimioterápicos. A indução de diferenciação poderia inibir sua capacidade migratória, associada ao estado indiferenciado, diminuindo, assim, o comportamento biológico destrutivo destes tumores (Schmidt *et al.*, 2000).

O ácido retinóico foi testado, primeiramente, em diversas linhagens celulares de glioma, nas quais apresenta alta capacidade de inibição de

crescimento em monocamada (Rutka *et al.*, 1988; Magrassi *et al.*, 1995) e em suspensão (Yung *et al.*, 1989; Mukherjee *et al.*, 1995).

Os resultados celulares motivaram o teste em pacientes. Desta forma, os retinóides têm sido testados em pacientes recorrentes de gliomas após remoção cirúrgica e tratamento quimioterápico. Os resultados obtidos são modestos, com uma baixa porcentagem de remissão do tumor, variados graus de estabilização da doença e com um índice de progressão inaceitável terapeuticamente (Yung *et al.*, 1996; Defer *et al.*, 1997; Kaba *et al.*, 1997; Phuphanich *et al.*, 1997).

Apesar de serem eficientes em alguns casos clínicos e tipos de tumor (leucemia pró-mielocítica e câncer de pele, por exemplo), a ação destes agentes é restrita a alguns tipos de tumores, além de apresentarem problemas de toxicidade e de ação transitória. A toxicidade envolve efeitos sobre mucosas e pele, como secura, escoriações, dores de cabeça, dor óssea, sintomas digestivos, elevação de enzimas do fígado, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia (Hong & Itri, 1994). A ação transitória parece estar relacionada com redução da concentração plasmática dos retinóides, provavelmente por indução de enzimas metabólicas (Muindi *et al.*, 1992) e por seleção de mutantes com defeitos nos receptores (Love & Gudas, 1994).

Assim, o melhor entendimento da ação dos retinóides poderia permitir que estes problemas fossem contornados. A identificação das enzimas metabólicas induzidas permitiria o desenho de drogas que as inibissem, prolongando o efeito dos retinóides. A identificação dos genes alvos, responsáveis pelo efeito sobre o crescimento, poderia sugerir novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento de drogas/terapia gênica que possam agir sem a necessidade de ativação dos receptores, evitando o principal problema associado à resistência adquirida. Estes genes poderiam constituir alvos

interessantes inclusive para os tumores resistentes ou para potencialização dos efeitos do ácido retinóico.

1.4. Ácido retinóico:

1.4.1. Metabolismo da vitamina A e produção de ácido retinóico:

Toda vitamina A do corpo é obtida pela absorção a partir da alimentação, principalmente nas formas de retinil ésteres de retinol ou de carotenóides precursores. Uma pequena parcela é absorvida na forma de retinol e ácido retinóico. Nas células do intestino, o retinil éster é hidrolisado a retinol pelas enzimas retinil éster hidrolases. Os carotenóides são convertidos a retinal pela enzima caroteno-15,15'-dioxigenase, o qual é convertido a retinol pela retinol redutase. O retinol formado nestas duas reações, e o retinol absorvido, são re-esterificados pela lecitina retinol aciltransferase e empacotados, juntamente com outros lipídios, em quilomicrons. Os quilomicrons são transportados pelo sistema linfático, sendo captados, principalmente, pelo fígado. Neste órgão, os retinil ésters são convertidos novamente a acetato de retinol, o qual poderá ser estocado nas células esteladas hepáticas, ou secretado para o sangue ligado à proteína ligante de retinol (PLR) (Blaner & Olson, 1994).

A maior parte dos tecidos obtém a vitamina A, da qual necessitam, captando-a da PLR presente na circulação. O acetato de retinol obtido é oxidado a retinaldeído e, subseqüentemente, a ácido retinóico. Tem sido sugerido que duas famílias de enzimas podem estar envolvidas na primeira reação: a família das álcool desidrogenases de cadeia média (ADH1 e ADH4) e a família das desidrogenases/redutases de cadeia curta (RoldH I, II e III). A segunda reação é catalisada pela retinal desidrogenase (RALDH). Como o acetato de retinol e o ácido retinóico são derivados lipídicos pouco

hidrossolúveis, eles permanecem ligados a proteínas específicas durante estas reações, as quais são conhecidas como proteínas ligantes de retinol (CRBP I, II e III) e proteínas ligantes de ácido retinóico (CRABP I e II) (Gottesman *et al.*, 2001).

A principal forma absorvida da vitamina A é o todo-trans-retinol (ATRA). Porém, outras formas isoméricas podem ser geradas, tais como o 9-cis-retinol e o 13-cis-retinol. Estas formas podem ser produzidas pelo metabolismo de 9 e 13-cis-carotenóides, ou a partir da isomerização do todo-trans-retinol (Leid *et al.*, 1992; Blaner & Olson, 1994).

1.4.2. Receptores de ácido retinóico e a regulação da expressão gênica

Os receptores do ácido retinóico são membros da família dos receptores heterodiméricos nucleares não esteroídicos. Estes receptores possuem atividades de ligação ao DNA e de transativação (Willy & Mangelsdorf, 1998). O dímero transcricional é formado por duas famílias de proteínas: RAR e RXR. Cada uma destas famílias possuiu três diferentes membros: RAR α , β e γ e RXR α , β e γ e várias isoformas. A família RAR se liga tanto a todo-trans-ácido retinóico (ATRA) quanto a 9-cis-ácido retinóico, enquanto que a RXR se liga apenas a 9-cis-ácido retinóico (Chambon, 1993).

Os receptores possuem 6 regiões distintas conservadas que são denominadas de A a F. A mais conservada é a região C, a qual contém 2 domínios de dedos de zinco, sendo responsável pelo reconhecimento de seqüências específicas no DNA. A região E corresponde ao sítio de interação dos ligantes, sendo bastante conservada na mesma família de receptores, mas há diferenças entre as duas famílias. Esta região é complexa, uma vez que corresponde ao sítio de dimerização, além de possuir a função de

transativação. As regiões A e B, aparentemente, também estão envolvidas com transativação, uma vez que sua deleção provoca perda da capacidade dos receptores de induzir genes-repórter. A porção amino terminal da região A é tecido (e isoforma) específica. As funções das regiões D e F ainda são desconhecidas (Zelent *et al.*, 1989; Leid *et al.*, 1992).

A família RXR é capaz de formar dímero e estimular a ligação ao DNA não apenas de RAR, mas, também, do receptor de hormônio tireoidiano e do receptor de vitamina D (Yu *et al.*, 1991; Leid *et al.*, 1992).

O fato dos transcritos de cada receptor possuírem uma distribuição espaço-temporal específica durante a embriogênese e no indivíduo adulto, e de suas seqüências serem muito conservadas entre espécies, sugere que cada complexo de receptores RAR:RXR (isoforma) desempenha funções diferentes (Ruberte *et al.*, 1991; Leid *et al.*, 1992; Chambon, 1993).

A existência de diversos derivados diferentes, as múltiplas combinações de receptores e a possibilidade de interação com outras vias, tornam a via do ácido retinóico complexa e intrigante.

Diversos genes foram previamente identificados como sendo regulados por ácido retinóico, incluindo componentes da sua própria via de sinalização (RAR α , RAR β e CRABP II), fatores de transcrição (membros da família de "homeobox" Hox), enzimas (Proteínas quinase C, colesterol éster transferase), receptores de neurotransmissores (receptor D2 de dopamina), hormônios (oxitocina), moléculas de adesão (laminina B1, colágeno α 1) (McCaffery & Dräger, 2000).

Apesar destes genes atualmente conhecidos como sendo regulados, o mecanismo pelo qual o ácido retinóico desempenha suas ações sobre o desenvolvimento, diferenciação e crescimento das células, ainda não é completamente compreendido.

1.4.3. Ácido retinóico e ciclo celular

Postula-se que alguns dos efeitos de inibição de crescimento do ácido retinóico sejam devido à sua capacidade de inibir a atividade do complexo AP-1 ("activating protein 1") (Chambon, 1996; Lin *et al.*, 2000). O complexo AP-1 é um dímero formado por produtos de proto-oncogenes, que são membros das famílias *fos* e *jun* e tendo a regulação de sua atividade relacionada com proliferação ou diferenciação celular (Angel & Karin, 1991). Entretanto, em alguns modelos de indução de diferenciação, como o carcinoma embrionário F9, o tratamento com ácido retinóico promove aumento da expressão de *c-jun* e da atividade de AP-1 (Yang-Yen *et al.*, 1990).

Mais recentemente, outros pontos do ciclo celular nos quais o tratamento com ácido retinóico pode atuar vêm sendo identificados. Células da linhagem mielocítica e linfócitos B, quando tratadas com ácido retinóico, sofrem diversas alterações em componentes do ciclo celular, tais como: redução da expressão de *c-myc*, redução da expressão das ciclinas A e E, aumento da expressão de p21^{cip} e redução da fosforilação de Rb (proteína retinoblastoma) (Naderi & Blomhoff, 1999; Dimberg *et al.*, 2002). Em células de neuroblastoma, o tratamento com ácido retinóico promove indução de p18, redução de ciclina D1 e redução de cdks (quinases dependente de ciclina 1) (Wainwright, 2001).

A redução da ciclina D1 pelo tratamento com ácido retinóico parece envolver um mecanismo específico de proteólise que é induzido por ubiquitinação (Spinella *et al.*, 1999; Dow *et al.*, 2001; Dragnev *et al.*, 2001). Este mecanismo tem sido proposto como sendo um dos responsáveis pelos efeitos de prevenção do desenvolvimento de câncer pelo ácido retinóico (Langenfeld *et al.*, 1997; Dragnev *et al.*, 2000; Dragnev *et al.*, 2001). Por

provocar um atraso na transição G1-S nas fases do ciclo celular, permitiria reparo do DNA mutagenizado antes de novos ciclos de divisão celular (Langenfeld *et al.*, 1996; Langenfeld *et al.*, 1997).

A maioria destas alterações ocorre após tratamento prolongado com ácido retinóico, sendo que o sinal que dispara estas alterações não está completamente estabelecido.

A indução de algumas isoformas de TGF- β (fator de crescimento tumoral), pelo tratamento com ácido retinóico, pode estar intensamente relacionada com alguns destes efeitos sobre a multiplicação celular. A ação de TGF- β sobre o ciclo celular tem sido associada com inibição da atividade dos complexos ciclina D-Cdk4/6 e ciclina E/Cdk2, levando à hipofosforilação de RB e conseqüente redução de crescimento. Além disto, TGF- β induz inibidores de quinases dependentes de ciclinas, tais como p21^{CIP}, p15^{INK4B} e p27^{Kip1} (Yue & Mulder, 2001).

O tratamento com anticorpo anti-TGF- β inibe parcialmente a redução de crescimento promovida por ácido retinóico em alguns tipos celulares (Nugent *et al.*, 1998) e totalmente em outros (Kishi *et al.*, 2001). O tratamento com TGF- β e ácido retinóico simultaneamente induz uma maior inibição de crescimento do que cada um administrado isoladamente, mostrando sinergismo entre os dois agentes (Nugent *et al.*, 1998).

1.4.4. Ácido retinóico no desenvolvimento e na diferenciação de células da glia

A vitamina A e seus derivados são essenciais para o desenvolvimento embrionário normal e manutenção da diferenciação celular no indivíduo adulto (De Luca, 1991; Hofmann & Eichele, 1994). A falta de ácido retinóico durante a embriogênese bloqueia o crescimento, a segmentação e a

vascularização do embrião (Ross *et al.*, 2000). Sua deficiência transitória em fase embrionária afeta diversos tecidos e órgãos tais como a crista neural, olhos, coração e sistema nervoso (Dickman *et al.*, 1997). Já o excesso nesta fase promove alterações teratogênicas tais como má formação de membros, defeitos oculares, acefalia e braquignatia (Ross *et al.*, 2000).

O ácido retinóico é capaz de promover a diferenciação de uma grande variedade de tipos celulares em cultura. Células de carcinoma embrionário F9 e P19, quando tratadas com ácido retinóico, se diferenciam em derivados endodérmicos e células da neuroectoderme (neurônio e glia), respectivamente (Alonso *et al.*, 1991; McBurney, 1993). Linhagens pró-mielocíticas, como HL60, são induzidas a se diferenciarem em linhagem granulocítica (Drexler *et al.*, 1995). Linhagens de precursores neuronais tais como PC12 e LAN-5 e células precursoras primárias derivadas de cérebro de rato são induzidas a se diferenciarem em neurônios (Matsuoka *et al.*, 1989; Hill e Robertson, 1998; Takahashi *et al.*, 1999).

Células tronco-embrionárias ("stem cells") tratadas com ácido retinóico se diferenciam em astrócitos, oligodendrócitos e neurônios (Fraichard *et al.*, 1995). Os oligodendrócitos gerados são capazes de promover mielinização de axônios de neurônios em cultura, na coluna vertebral desmielinizada quimicamente e em neurônios de ratos *shiverer*, deficientes na produção de mielina, (Liu *et al.*, 2000).

Apesar deste efeito sobre células tronco-embrionárias, ainda não está claro se o ácido retinóico participa ou não dos mecanismos fisiológicos da diferenciação dos precursores da glia nas células glia (Richardson, 2000).

1.5. Células ST1 de glioma de rato e ácido retinóico

As células C6 de glioma de rato foram isoladas e estabelecidas em cultura a partir de tumores induzidos em ratos tratados com metilnitrosuréia (Benda *et al.*, 1968).

Quando são tratadas com ácido retinóico, estas células apresentam achatamento celular e inibição de crescimento em monocamada de 60-90%, dependendo da quantidade de soro no meio (Fischer *et al.*, 1987). A inibição de crescimento também ocorre em tumores provocados pela injeção de células C6 no córtex de ratos, tratados com ácido retinóico (Rodts & Black, 1994).

O achatamento celular e a inibição de crescimento em cultura são acompanhados pela indução da proteína proteolipídica (PLP) e da glicoproteína associada à mielina, que são marcadores de diferenciação de oligodendrócitos (Zhu *et al.*, 1992). Isto sugere que o tratamento com ácido retinóico promove a redução do crescimento das células C6 pela indução de sua diferenciação em oligodendrócitos.

Células C6, quando tratadas com AMPc, passam a expressar grandes quantidades de GFAP (proteína ácida fibrilar de glia) (Backhovens *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 2001), além de apresentarem inibição de crescimento por ação deste agente (Braunewell & Gundelfinger, 1997). GFAP é um marcador de diferenciação de astrócitos (Lee *et al.*, 2000), o que indica uma provável diferenciação de C6 neste tipo celular por este tratamento.

A capacidade das células C6 se diferenciarem em oligodendrócitos e astrócitos sugere que estas células sejam tumores de células O-2A, as quais são precursoras de células da glia, capazes de dar origem aos dois tipos celulares (Zhang *et al.*, 2001).

Células C6 também são responsivas ao tratamento com glicocorticóides, apresentando inibição de crescimento em monocamada e em suspensão

(Armelin *et al.*, 1983; Freshney, 1984), além de indução de marcadores de diferenciação de oligodendrócitos (Zhu *et al.*, 1994).

A linhagem C6 é polimórfica, sendo constituída de tipos celulares morfológicamente distintos, tais como células poligonais e células finas e alongadas (Armelin *et al.*, 1982). De acordo com o número de passagens em cultura, sua taxa de crescimento e suas características morfológicas predominantes são alteradas (Gubtis *et al.*, 1992).

A partir da linhagem C6, foram isolados clones hiper-sensíveis (ST1) e hiper-resistentes (P7) ao tratamento com glicocorticóides (Armelin & Armelin, 1983). A linhagem ST1 se caracteriza por apresentar profundas alterações morfológicas e fisiológicas mediante o tratamento com glicocorticóides. Fazem parte destas alterações: crescimento dependente de soro e ancoragem, morfologia normal (Armelin *et al.*, 1983) e incapacidade de gerar tumor em camundongos “nude” (Armelin *et al.*, 1978), caracterizando uma completa reversão fenotípica tumoral→normal.

A linhagem ST1, derivada de C6, vem sendo usada, por nosso laboratório, para a investigação dos efeitos de glicocorticóides na expressão gênica, associados à indução da reversão fenotípica (Valentini *et al.*, 1994; Sasahara, 1995; Valentini & Armelin, 1996; Vedoy & Sogayar 2002).

Assim, por dois motivos principais, a linhagem ST1 foi escolhida, nesta tese, para estudar os efeitos inibitórios de crescimento do ácido retinóico sobre gliomas. O primeiro deles é que esta é uma linhagem clonal, com células morfológicamente semelhantes, as quais devem apresentar uma resposta homogênea ao tratamento. As variações ao longo de suas passagens em cultura, são insignificantes quando comparadas com a linhagem C6. O segundo é que o estudo dos efeitos dos glicocorticóides sobre gliomas está sendo conduzido com células ST1. Assim, usando esta mesma linhagem,

futuramente, os resultados obtidos poderão ser facilmente relacionados, permitindo a comparação entre as vias de diferenciação induzidas por ácido retinóico e pelos glicocorticóides. Além disto, acredita-se que genes induzidos por ambos agentes devem constituir ferramentas mais potentes para o desenvolvimento de estratégias para terapia gênica.

1.6. Métodos de identificação de genes diferencialmente expressos

A identificação dos genes diferencialmente expressos entre duas condições fisiológicas distintas é um dos meios mais promissores de iniciar a elucidação de um processo biológico complexo. No entanto, isto não é uma tarefa fácil, principalmente devido à alta complexidade no número de transcritos expressos pela célula, à existência de grandes diferenças entre as expressões de transcritos diferentes, e, muitas vezes ao baixo número de diferenças de expressão entre as duas condições que se quer comparar.

Ao longo dos anos, muitas metodologias surgiram com esta finalidade. As principais delas são: o "differential display", metodologias baseadas em hibridização subtrativa, tais como "representational difference analysis" (RDA) e "suppressive subtractive hybridization" (SSH), SAGE ("serial analysis of gene expression") e "microarrays" de DNA.

O "differential display" se baseia na amplificação de uma sub população de fragmentos dos genes expressos, usando "primers" arbitrários. Os fragmentos amplificados são separados em gel de seqüenciamento e comparados entre as condições experimentais. As bandas diferenciais são cortadas, purificadas do gel e identificadas por seqüenciamento (Liang & Pardee, 1992).

Nas metodologias de hibridização subtrativa, as amostras de cDNA contendo os genes que se quer identificar ("Tester") são ligadas a adaptadores

em sua porção 5', desnaturadas e renaturadas na presença de excesso de cDNA da condição que se quer comparar ("Driver"). Na etapa seguinte, os híbridos "Tester-Tester" são seletivamente amplificados em uma reação de PCR, enquanto os híbridos "Tester-Driver" e "Driver-Driver" não são. Os cDNAs obtidos são clonados, gerando uma biblioteca enriquecida para genes diferencialmente expressos. No RDA, esta hibridização pode ser executada diversas vezes, gerando bibliotecas altamente enriquecidas (Hubank & Schartz, 1994). No SSH, é feita uma adaptação que permite que, junto com a hibridização, ocorra normalização das seqüências pouco expressas em relação às aquelas mais abundantes (Gurskaya *et al.*, 1996).

O SAGE baseia-se no princípio de que seqüências curtas de 9 pares de base são suficientes para identificar, inequivocamente, todos os mensageiros expressos. Assim, brevemente, os cDNAs são gerados com oligo-dT biotinilado e digeridos com uma enzima que reconhece 4 pares de base. Os fragmentos correspondentes à porção 3' final dos mensageiros são capturados por streptavidina ligada a bolinhas ("beads") e seletivamente purificados. No sítio da enzima de restrição destas regiões é ligado um adaptador contendo sítio para *BsmF1*, uma enzima que cliva a 12 pares de base de sua seqüência de reconhecimento. Assim, após digestão com esta enzima, cada mensageiro gera um único "tag" (etiqueta) de 9 pares de base, a partir do sítio de reconhecimento da enzima que reconhece 4 pares de bases mais 3' do mensageiro. Os "tags" são ligados entre si e seqüenciados, gerando uma tabela de frequência de cada "tag". Comparando esta tabela entre as condições que se quer comparar a expressão gênica, os genes diferencialmente expressos são identificados (Velculescu *et al.*, 1995).

Na técnica de microarranjos de DNA ("microarrays"), seqüências conhecidas de cDNA de milhares de genes são organizadas sobre uma

superfície de vidro. As duas populações de mRNA que se quer comparar, são transcritas a cDNA, cada uma na presença de nucleotídeos marcados com fluorocromos diferentes. A seguir, os cDNAs são desnaturados, misturados na mesma proporção e hibridizados com os cDNA fixos no vidro. As lâminas são submetidas à estimulação nos comprimentos de onda apropriados e os sinais registrados. A comparação entre as duas imagens geradas permite a identificação dos genes diferencialmente expressos (Schena *et al.*, 1995).

Cada uma das técnicas descritas apresenta vantagens e desvantagens, sendo que nenhuma delas é, atualmente, perfeita.

O "differential display" tem como vantagem o fato de ser um processo relativamente rápido, além de permitir trabalhar com pequena quantidade de amostra inicial. Porém, esta técnica possui uma alta taxa de falso-positivos, geralmente tendo, como alvo, mRNAs de média abundância, permitindo a análise de uma pequena parcela dos cDNAs da célula por vez. As bibliotecas de subtração são muito sensíveis e eficientes, porém trabalhosas (Ausubel *et al.*, 1999). O SAGE permite a análise de muitas amostras ao mesmo tempo, porém exige seqüenciamento automatizado e em grande escala para se chegar às seqüências pouco expressas. Os "microarrays" são extremamente rápidos e eficientes, mas só identificam genes já conhecidos, além do preço ainda torná-los inapropriados para laboratórios de pequeno-médio porte (Soares, 1997; Kozian & Kirschbaum, 1999).

A técnica utilizada nesta tese para a identificação dos genes regulados por ácido retinóico nas células ST1 foi a de construção de bibliotecas de subtração. Esta escolha foi feita com base no custo relativamente baixo desta metodologia, na possibilidade de identificar genes novos, além de permitir a identificação de um set interessante de genes diferencialmente expressos,

inclusive os menos abundantes (Ausubel et 1999; Gurskaya *et al.*, 1996; O'Neil & Sinclair, 1997; Vedoy *et al.*, 1999).

2. OBJETIVOS DO TRABALHO

- 1-) Caracterizar a ação de ATRA sobre o fenótipo tumoral das células ST1 de glioma de rato;
- 2-) Identificar genes regulados por ácido retinóico nas células ST1, utilizando técnicas recém-desenvolvidas de grande potencial.

3. RACIONAL

A clonagem de genes modulados por ATRA em células ST1 pode revelar genes relacionados com inibição de crescimento, potencialmente importantes para desenvolvimento futuro de terapia gênica e para o desenvolvimento de novas drogas anti-tumorais. Além disto, pode permitir melhor compreensão do processo de diferenciação de células da glia.

4. MATERIAIS E METODOLOGIA

4.1. Materiais

4.1.1. Linhagem celular

ST1: clone derivado da linhagem C6 de glioma de rato, hipersensível ao hormônio glicocorticóide, obtida em nosso laboratório (Armelin *et al.*, 1982; Armelin *et al.*, 1983).

4.1.2. Soluções e meios de cultura para células de mamífero

Meio de cultura: DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle Medium"): (Gibco BRL- Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA).

Soro fetal bovino: SFB (Cultilab Materiais para Cultura de Células, Campinas, São Paulo).

Solução Salina: PBSA ("Phosphate Buffered Saline", sem cálcio ou magnésio), solução salina tamponada pH 7,2 composta por NaCl a 140 mM ; KCl a 2,7 mM; Na₂HPO₄ a 8mM e KH₂PO₄ a 1,5mM.

Tripsina: (ICN Pharmaceuticals Inc., Cleveland USA; Gibco Limited, Scotland, UK).

4.1.3. Meio de cultura para bactérias

1 Meio LB (Luria- Bertani) para cultivo bacteriano. Triptona a 10 g/L; extrato de levedura a 5 g/L e NaCl 10 g/L (pH=7,5). Para o preparo de meio sólido em placas, adicionou-se agar a 1,5 g/L (Difco, Merck, Gibco-BRL).

2 Ampicilina: a solução estoque foi preparada a 100 mg/mL, filtrada e estocada congelada.

4.1.4. Isótopos radioativos

[$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP (3000 Ci/mmol); [^{35}S] dATP (> 1000 Ci/mmol); [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP (3000 Ci/mmol a 10 mCi/ml) (Amersham International pIc, Buckinghamshire, England; DuPont New England Nuclear, Boston, MA, USA).

Solução de timidina tritiada - ($5\mu\text{Ci/mL}$ de timidina radioativa; $2 \times 10^{-6}\text{M}$ de timidina fria), (Amersham International pIc, Buckinghamshire, England; DuPont New England Nuclear, Boston, MA, USA).

4.1.5. Reagentes

Ácido retinóico -Sigma, St. Louis, USA

BrdU ($100\mu\text{M/mL}$) - Amersham Pharmacia Biotech do Brasil

anticorpo primário anti-BrdU - Amersham Pharmacia Biotech do Brasil

anticorpo secundário - Amersham Pharmacia Biotech do Brasil

DAPI - Sigma, St. Louis, USA

4.1.6. Soluções

Todas as soluções utilizadas foram feitas a partir de reagentes de grau de pureza biologia molecular para análise, seguindo formulações descritas em manuais de laboratório (Ausubel *et al.*, 1999 ; Sambrook *et al.*, 1989).

4.2. Métodos

4.2.1. Análise da síntese de DNA de células ST1 na presença e na ausência de diversas concentrações de ATRA

Células ST1 cultivadas em DMEM contendo 2% de SFB (DMEM/2%SFB) foram plaqueadas na densidade de 10^4 células/ cm^2 em bandeja de 48 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas com ATRA, em

quaduplicata, para concentrações finais de 10^{-4}M , 10^{-5}M e 10^{-6}M ou sem tratamento. Depois de 48h sob ação deste agente, foram então adicionados 25 μL de solução de timidina ($5\mu\text{Ci/mL}$; $2 \times 10^{-6}\text{M}$) e as culturas foram incubadas por 6h. A seguir, o meio de cultura foi removido e as culturas lavadas com TCA 5% gelado por duas vezes, secos brevemente em papel toalha (por inversão) e as células lisadas por adição de solução de NaOH 0,5M e incubação a 37°C por 30 min. Em cada poço foi colocado um pedaço de filtro grosso ($1 \times 1,5\text{cm}$) no qual o DNA marcado se adsorve. Os filtros foram transferidos para um copo de Becker e lavados sucessivamente com 5% de TCA, etanol e acetona gelados para eliminação da timidina não marcada. Após a secagem completa, os filtros foram colocados em “vials” contendo 3 mL de líquido de cintilação e a contagem foi realizada em contador beta.

4.2.2. Cinética do efeito de ATRA sobre síntese de DNA de células ST1.

Células ST1 foram plaqueadas em lâminulas circulares na densidade de 10^4 células/ cm^2 , em DMEM/2%SFB. Após 24h, o meio foi trocado e substituído por meio fresco na presença de 1/1.000 (V/V) etanol (controle) ou na presença de 10^{-5}M de ATRA (tratado). Esta troca foi repetida a cada 24h. Sete horas antes dos períodos de coleta (10, 24, 48 e 72h), foi adicionado BrdU ao meio para concentração final de $100\mu\text{M}$. Em cada período de coleta, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, fixadas em metanol por 10 min e re-hidratadas por incubação com PBS por 15 min. O próximo passo foi a desnaturação do DNA com solução de 1,5M HCl por 30 min sob agitação branda.

O ácido foi neutralizado e removido através de 3 lavagens consecutivas com PBS. As células fixadas foram incubadas com 40 μL de anticorpo

primário anti-BrdU (Amersham Pharmacia Biotech do Brasil) por 1h e lavadas com PBS por 3X. A marcação dos núcleos foi feita incubando-se as células fixadas com 40 µl de anticorpo secundário (Amersham Pharmacia Biotech do Brasil) por 30 min, no escuro. Para marcação das células, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com 40 µL de DAPI por 20 min. Após lavagem com PBS (3 lavagens de 5 min cada), as lamínulas foram montadas sobre lâminas e o número de núcleos marcados e de células foi determinado em microscópio de fluorescência (Nikon Fluophot).

4.2.3. Ensaio de apoptose pelo método de TUNEL.

Células ST1 foram plaqueadas em lamínulas e tratadas nas mesmas condições descritas no item 4.2.2. As células foram fixadas com paraformaldeído e submetidas ao kit de detecção de apoptose “In Situ Cell Death Detection, POD” (Roche Molecular Biochemicals).

Este kit se baseia na técnica de TUNEL (“TdT-mediated dUTP nick end labeling”). Nesta técnica, os fragmentos do DNA cromossômico, gerados na apoptose, são identificados por meio da marcação de suas extremidades 3'-OH. Isto é feito incubando-se as células fixadas com a enzima terminal dioxinucleotídeo transferase, a qual catalisa a incorporação de nucleotídeos marcados com fluoresceína nestas pontas. A seguir, incubando-se com anticorpo anti-fluoresceína marcado, os núcleos apoptóticos são identificados. O controle positivo da reação é obtido incubando-se uma das lamínulas, contendo células fixadas, com 5U de *DNaseI* livre de *RNase* (10U/µL) (Amersham Pharmacia Biotech do Brasil) a 37°C por 10 min. Este tratamento gera fragmentos de DNA os quais provocam marcação do núcleo celular após as reações do kit.

4.2.4. Crescimento em suspensão de agarose

Poços da bandeja com 24 poços foram preenchidos com 0,5 mL de agarose 0,6% em DMEM/2%SFB. Sobre esta camada de agarose foram plaqueados 100 μ L de meio contendo células diluídas nas concentrações: 10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 células/mL, em duplicata para o controle e para as células a serem tratadas. Rapidamente, para evitar a adesão das células, foi adicionado 1,0 mL de solução semi-sólida de agarose 0,3% em DMEM/2%SFB. Após 24 horas, foram adicionados 500 μ L de DMEM/2%SFB no controle, e DMEM/2%SFB contendo ATRA para uma concentração final de 10^{-5} M nas células tratadas. Esta camada superior de meio líquido foi trocada a cada 2 dias, acrescentando-se ATRA 10^{-5} M às culturas tratadas. Depois de 17 dias, as colônias foram contadas em aumento de 40 vezes em microscópio invertido (Nikon Fluophot).

4.2.5. Construção das bibliotecas de subtração pelo método de SSH

4.2.5.1. Preparo de mRNA e subtração de cDNAs de células ST1 tratadas (ou não) com ATRA por 10h

A extração de mRNA das células ST1 tratadas (ou não) com ATRA por 10h foi feita utilizando-se o kit “QuickPrep Micro mRNA purification Kit” (Amersham Pharmacia Biotech do Brasil), segundo instruções do fabricante. Este kit combina a extração com isotiocianato de guanidina com a purificação cromatográfica em coluna de oligo (dT)-celulose, adaptada para uso em microcentrífuga. Os passos seguintes foram realizados conforme descrito no kit, a não ser quando indicado.

Resumidamente, as culturas foram tripsinizadas, e as células foram coletadas por centrifugação (750g por 5 min) e lisadas na solução de lise deste

kit (tiocianato de guanidina e N-lauril sarcosina). O "lisado" foi diluído 3 vezes para permitir formação de pontes de hidrogênio entre a cauda de poli (A) dos mRNAs e o oligo (dT), sem a perda das características desnaturantes da guanidina. Esta solução foi transferida para tubo de microcentrífuga contendo "beads" ligadas ao oligo (dT). Os tubos foram agitados por 3 min para permitir a ligação do mRNA às "beads". Estas "beads" foram submetidas a sucessivas lavagens seguidas de centrifugação, com tampão contendo inicialmente alta concentração de sal e, na final baixa concentração de sal. A seguir, o mRNA puro foi eluído da coluna em tampão de eluição (10mM Tris-HCl, pH=7.5; 1mM EDTA) quente. Nesta etapa, o tampão de eluição foi substituído por apenas tampão 10mM Tris-HCl (pH=7,5), pois o EDTA poderia influenciar na próxima etapa de digestão com *DNaseI*.

Ao eluato da coluna foram adicionadas 50U de *DNaseI* livre de *RNase* em tampão apropriado (40mM Tris-HCl , pH 7,5; 6 mM $MgCl_2$), a 37°C por 1 h, para eliminação de possível contaminação com DNA genômico.

Após purificação com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), o mRNA foi precipitado com 1/10 do volume final, de acetato de potássio (2,5M, pH 5,0), 50µg de glicogênio e 2 volumes de etanol 95%, por 16 h a -70°C e ressuspendido em 12µL de H₂O MiliQ.

Após a quantificação e verificação em gel de agarose/formaldeído, estes mRNAs foram usados para a geração e subtração de cDNAs, utilizando-se o kit "PCR Select cDNA Subtraction Kit" (Clontech), baseado no método descrito por Gurskaya *et al.*, 1996 (esquema apresentado na Figura 1). Neste kit, o mRNA de células tratadas (ou não) com o agente diferenciador é convertido em cDNA. A primeira população de cDNA, na qual estão contidos os genes diferencialmente expressos, é chamada de "tester", e a segunda

Figura 1. Esquema do funcionamento da metodologia de SSH (Gurskaya *et al.*, 1996).

população, “driver”. Na subtração "Reverse", é feito o contrário: o cDNA da célula não tratada corresponde ao “tester” e da tratada, o “driver”.

“Tester” e “driver” são digeridos com *RsaI*, com a finalidade de reduzir a complexidade dos “amplicons” e gerar representações de cada cDNA. A seguir, o “tester” é dividido em duas porções, as quais serão ligadas a adaptadores diferentes. Cada um dos 2 adaptadores inclui diferentes seqüências de anelamento de iniciadores ("primers") para PCR e possui uma única extremidade fosforilada, a fim de permitir a ligação direcional aos fragmentos. Esta etapa tem grande importância para o funcionamento adequado da técnica, sendo necessária uma eficiência de ligação de, pelo menos, 25% para que a subtração não seja prejudicada. Para assegurar-se que este nível foi atingido, é feito PCR de fragmentos de GAPDH a partir da ligação, utilizando-se dois conjuntos de iniciadores (“primers”). Um conjunto é desenhado para amplificar todo fragmento de GAPDH presente na amostra, enquanto que o outro só amplifica fragmentos de GAPDH ligados ao adaptador. A comparação entre as bandas indica quanto foi ligado em relação ao todo.

Na fase seguinte, é adicionado excesso de “driver” a cada uma das 2 porções de “tester”, e submetidos à desnaturação por calor. A seguir, a temperatura é reduzida a 68°C por 8h, permitindo a renaturação parcial das amostras. Devido à cinética de hibridização ser de segunda ordem, as moléculas mais abundantes sofrem re-anelamento mais rápido, promovendo uma equalização entre as seqüências de fita simples. Ao mesmo tempo, as moléculas da fita simples de seqüências diferencialmente expressas são enriquecidas em relação às não diferencialmente expressas, as quais tendem a formar híbridos com o “driver”, por estarem super-representadas. Na próxima

etapa, as duas amostras “tester” são misturadas na presença de mais driver desnaturado, sem serem desnaturadas. Assim, somente as moléculas de fita simples equalizadas e diferencialmente expressas devem re-associar, formando híbridos com adaptadores terminais diferentes (provenientes das duas amostras de “tester”). Após o preenchimento das pontas pela *Taq* DNA polimerase, foi realizado PCR primário, usando os dois iniciadores ("primers") para os dois diferentes adaptadores. Nesta etapa, as moléculas contendo o mesmo adaptador nas duas pontas não são amplificadas devido a sua complementaridade, o que faz com que, na temperatura de anelamento dos iniciadores as pontas da molécula anelem entre si. Para ter-se uma especificidade maior, o produto deste primeiro PCR foi diluído e re-amplificado com iniciadores internos aos primeiros ("primers nested").

Com a finalidade de testar a eficiência de normalização/subtração do produto de subtração, uma parte do produto de PCR foi diluído e submetido à amplificação por números variáveis de ciclos, com iniciadores (“primers”) para GAPDH. A comparação com a amplificação deste fragmento na amostra não subtraída informa quantos ciclos a mais são necessários para amplificá-lo após a subtração, indicando aproximadamente o nível de normalização obtido.

Deste modo os fragmentos de cDNA diferencialmente expressos, equalizados, são seletivamente amplificados e, posteriormente, clonados em vetores adequados para a sua caracterização.

4.2.5.2. Clonagem dos fragmentos da subtração e transformação bacteriana

Para a construção da biblioteca de cDNA, 64 µL dos produtos de PCR da subtração foram purificados em colunas utilizando-se o kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (Amersham Pharmacia Biotech do

Brasil) e eluídos em 50 μ L de H₂O MilliQ. Estas colunas são feitas de matriz de fibra de vidro nas quais o DNA se liga na presença de agentes caotrópicos, permitindo sua purificação com remoção de proteínas, nucleotídeos e sais. Fragmentos muito pequenos, tais como iniciadores ("primers"), se ligam permanentemente à coluna, sendo eliminados durante a purificação.

Os cDNAs purificados foram preenchidos e fosforilados em reação catalisada por Klenow (5U) e Polinucleotídeo quinase (10U), em tampão 3,3 mM Tris-acetato (pH 7,9), 1 mM acetato de magnésio, 6,6 mM acetato de potássio e 0,01 mg/mL BSA, adicionado de 1 μ L de dNTPs (10mM cada) e 3 μ L de 10mM ATP, incubando-se a 37°C por 45 min.

Após nova purificação em colunas GFX, um quinto dos fragmentos puros foi ligado com 100ng de pUC18 *Sma*I/BAP. Para esta reação, foram usadas 400 U de T4 DNA ligase em tampão 10mM Tris-acetato, 10mM acetato de magnésio, 50mM acetato de potássio, à temperatura ambiente por 16h.

A fim de testar se todos tamanhos de fragmentos ligaram eficientemente ao plasmídeo, 1 μ L de uma diluição 1/200 da ligação foi usado em uma reação de PCR com iniciadores ("primers") M13, que se ligam à região que flanqueia o MCS (seqüência múltipla de clonagem). Neste PCR, foram utilizadas 2 U de *Taq* DNA polimerase, 0,5 μ L de dNTP (10mM cada), 1 μ L de cada iniciador ("primer") M13, em tampão 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1,5 mM MgCl₂ e 50 mM KCl. A reação foi submetida a 95°C por 4 min para desnaturação inicial e programa de 94°C por 30 seg para desnaturação, 55°C por 40 seg para anelamento e 72°C por 1,5 min para extensão, por 30 ciclos, seguidos do 72°C por 5 min de extensão final. O produto desta reação foi fracionado em gel de agarose 1%, em tampão TAE diluído 1 vez. Um microlitro da ligação foi

usado para transformar bactérias *E. coli* DH5 α , por eletroporação, conforme item 4.2.5.3. As bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo 50 μ L/mL IPTG, 225 μ L/mL X-gal e 75 μ L/mL ampicilina. Colônias brancas (transformadas) foram selecionadas e crescidas em microplacas de 96 poços em meio LB com ampicilina a 100 μ g/mL, por 16h e congelados em 15% glicerol.

4.2.5.3. Preparo de bactérias eletrocompetentes e eletroporação

Para a preparação de bactérias eletrocompetentes, 10 mL de uma cultura fresca de *E. coli* DH5 α crescida por 16h, foram inoculadas em 1 L de meio LB e esta cultura foi incubada a 37°C até OD₆₀₀ de 0,7. Neste ponto, as bactérias foram transferidas para gelo e, após 30 min, coletadas por centrifugação a 4.000xg por 15 min em centrífuga refrigerada. O meio de cultura foi drenado completamente e as células ressuspensas em 1 litro de água gelada estéril. Os passos de coleta e ressuspensão foram repetidos por 3 vezes, sendo que o litro de água foi trocado por 0,5 litro de água, 20 mL de 10% glicerol gelado e, por fim, 2 mL de 10% glicerol. A seguir, as bactérias foram aliquotadas e estocadas a -70°C até o momento do uso.

Para a eletroporação, 40 μ L de bactérias eletrocompetentes foram transferidas para cubetas estéreis geladas de 2mm de espessura, às quais foi acrescentado 1 μ L da ligação. Após 1 min no gelo, a cubeta foi colocada no aparelho eletroporador EC 100 (EC Apparatus Corporation) e submetida à uma tensão de 2,8 kV, 120 Ω . As bactérias foram imediatamente ressuspensas em 1 mL de LB, e crescidas a 37°C por 1h a 200 rpm. Após este período, as bactérias foram plaqueadas em LB-ágar contendo IPTG, Xgal e ampicilina.

4.2.6. Rastreamento ("screening") com arranjos de DNA ("macroarrays") de 96 amostras

4.2.6.1. Preparo das membranas de 96 amostras

Bactérias crescidas e congeladas em placas de 96 poços foram repicadas (~1µL) para placas de PCR contendo 14 µL de mix de PCR. Este mix continha: 1.226 µL de H₂O, 150 µL de tampão de PCR 10x, 45 µL de MgCl₂ a 50mM, 19µL de dNTP (10mM cada), 25 µl de iniciador ("primer") M13F a 10µM, e 10µl de *Taq* a 5U/µl, para cada 100 reações. A seguir, a reação foi submetida às temperaturas de: 95°C por 4 min para lise inicial das bactérias, 95°C por 45 seg para desnaturação, 57°C por 45 seg para anelamento, 72°C por 1 min de extensão, por 40 ciclos e 72°C por 5 min de extensão final. O produto desta reação foi fracionado em gel de agarose 1%, em tampão TAE diluído 1 vez.

As amostras foram desnaturadas acrescentando-se 15 µl de 0,6N NaOH a cada amostra. Em seguida, foram aplicadas sobre membranas de nylon neutras, utilizando-se um sistema robotizado contendo 96 agulhas (Hydra-Thomas), conforme seu manual. As membranas, contendo as amostras, foram então neutralizadas em solução de Tris-HCl a 0,5 M (pH=7,5) e secas. O cDNA foi fixado nas membranas em forno a 80°C por 2h.

4.2.6.2. Preparo das membranas de 1.536 amostras

Os clones bacterianos, obtidos pela transformação dos fragmentos da subtração clonados em pUC18, foram repicados e crescidos em placas de 96 poços. Estes clones foram transferidos para placas de PCR e submetidos à PCR de colônia como descrito anteriormente.

O produto deste PCR, foi aplicado em membranas de nylon Hybond-XL (Amersham Pharmacia Biotech do Brasil) como descrito a seguir.

As membranas foram hidratadas em água MilliQ por 10 min e secas parcialmente para remover o excesso de água. A seguir, as amostras foram aplicadas utilizando um sistema de aplicação manual adaptado a partir daquele proposto por SCHUMMER *et al.*, 1997. O sistema, “ExprecisionTM DNA Arraying System” (Bioinformática do Brasil), permite a aplicação de 1.536 amostras em cada membrana, sendo que, em cada aplicação, é transferido um volume de 0,1µL de solução. A concentração do produto do PCR utilizada foi em média 225ng/µL. Entre cada aplicação, o “spotter” foi lavado com água sanitária 10%, seguido de água MilliQ e flambagem.

A seguir, os cDNAs aplicados foram desnaturados, embebendo-se a membrana em solução NaOH a 0,6 N por 10 min e, neutralizados em Tris-HCl a 0,5M (pH=7,5) por 5 min. A fixação do DNA foi feita em forno a 80°C por 2h.

4.2.6.3. Preparo dos cDNAs para sonda

A remoção dos adaptadores das pontas dos fragmentos amplificados é um passo importante pois eles podem causar alto “background” na hibridização. Para isto, os fragmentos são digeridos com enzimas que reconhecem sítios nos adaptadores permitindo sua retirada. Neste passo, 100 µL do produto de subtração foram purificados, usando-se colunas GFX e eluindo-se em água. As amostras foram concentradas em DNA Plus SpeedVac (Heto Lab Equipments) até 25 µL e os fragmentos foram digeridos com 30 U de *RsaI* em tampão Tango Y+ (MBI Fermentas), a 37°C por 16h. A seguir, foram acrescentadas 30 U de *SmaI* incubando-se à temperatura ambiente por 1h. O produto desta digestão foi novamente purificado com colunas GFX e, então, digerido com 30 U da enzima *EagI* à 37°C por 1h e 30

min. Os fragmentos foram novamente purificados com colunas GFX e quantificados em espectrofotômetro antes da marcação radioativa.

4.2.6.4. Hibridização dos “macroarrays”

A hibridização das matrizes de DNA (“macroarrays”) foi feita, sem alterações, como descrito a seguir para o Northern blot, bem como a marcação e purificação das sondas. A única variável foi a quantidade de DNA marcado, que, no caso das sondas para “macroarrays”, foi de 60ng.

4.2.7. Northern blot

4.2.7.1. Extração e purificação de RNA total de células de mamíferos (Chirgwin et al., 1979)

Células ST1 foram cultivadas em diferentes condições (tratadas ou não com ATRA por 10 e 24h) em placas P150 e lisadas com solução de 4M isotiocianato de guanidina; 25mM citrato de sódio (pH 7,0) e 0,1M beta-mercaptoetanol. Os lisados foram transferidos para tubos de polialômero contendo solução de cloreto de cézio a 5,7M e 25mM acetato de sódio (pH 5,0) e foram centrifugados a 20°C, por 17 horas a 130.000xg, em rotor SW 50.1 (Beckman Instruments).

O RNA, sedimentado no fundo dos tubos, foi ressuspenso em água estéril tratada com DEPC, extraído com mistura fenol:clorofórmio (1:1), e precipitado a -20°C ajustando-se a concentração de sal para 0,3M com acetato de sódio, e adicionando-se 2,5 volumes de etanol. Após a remoção do sobrenadante, o sedimento foi lavado com etanol 70% e seco ao ar. A seguir, o precipitado foi ressuspenso em água ou tampão TE.

A concentração do RNA foi determinada pela absorbância das preparações a 260nm, utilizando como valor padrão $1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 40 \text{ } \mu\text{g/mL}$

de RNA. O grau de pureza da preparação foi avaliado pela relação OD260nm/OD280nm, que deve ser próxima a 2,0 para ácidos nucleicos.

4.2.7.2. *Fracionamento de RNA em gel de agarose-formaldeído (Thomas, 1980) e transferência para membrana de nylon.*

Alíquotas (10-20µg) dos diferentes RNAs foram desnaturadas a 65°C por 15 min em solução de 2,2M formaldeído e 50% formamida, para impedir a formação de estruturas secundárias. Após a adição do tampão de amostra, os RNAs foram fracionados por eletroforese em gel de 1% agarose, 2,2M formaldeído em tampão MOPS 1X. Após a corrida, o gel foi lavado 4 vezes por 10 min, em água, para remoção do excesso de formaldeído e corado com solução de brometo de etídeo para observação sob luz ultravioleta. A seguir, os RNAs foram transferidos para membranas de nitrocelulose ou nylon em SSC 10X. Após a transferência, as membranas foram lavadas em SSC 3X e secas ao ar. Os RNAs foram fixados a 80°C por 2 h em forno a vácuo.

4.2.7.3. *Preparo da sonda de cDNA e marcação radioativa*

Bactérias contendo os clones positivos resultantes do rastreamento ("screening"), foram usadas em PCR de colônia, conforme descrito no item 4.2.6.1, com iniciadores ("primers") M13. Alíquotas dos produtos de amplificação foram fracionadas em gel de agarose a 1% em TAE 1X, e no caso de apresentarem banda única, foram purificadas de solução com colunas GFX. As amostras foram, então, quantificadas em espectrofotômetro, a 260 nm.

A marcação radioativa do inserto foi realizada utilizando o kit "DNA Labelling Beads" (Amersham Pharmacia Biotech do Brasil), por reação de "random-primer extension" (Feinberg & Vogelstein, 1984).

Neste kit, aproximadamente 45 µL de solução contendo 25 ng do fragmento de DNA a ser marcado foram desnaturados e usados para ressuspender "beads". As "beads" contêm todos os componentes necessários para a reação de marcação (nucleotídeos, "random primers", Klenow e tampão), menos o nucleotídeo marcado com ^{32}P , o qual é adicionado em seguida. Durante incubação a 37°C, os iniciadores ("primers") anelam em sítios randômicos no DNA, permitindo que a enzima Klenow sintetize as fitas complementares incorporando o nucleotídeo marcado durante o processo.

As sondas foram então purificadas dos nucleotídeos livres em colunas "MicroSpin" S-300 (Amershan Pharmacia Biotech do Brasil).

4.2.7.4. Hibridização e lavagem dos filtros

Os filtros foram pré-hibridizados (SSPE 5X; formamida a 50%; Denhardt 5X; SDS a 0,1%; DNA de esperma de salmão desnaturado a 100 µg/mL) a 42°C por 1-4 horas. A seguir, os filtros foram hibridizados a 42°C por 16 horas (a mistura de hibridização consiste da mistura de pré-hibridização acrescida de 5% de sulfato de dextrana e da sonda radioativa desnaturada).

Após a hibridização, os filtros foram lavados 2 vezes em SSC 2X/SDS 0,1% a temperatura ambiente por 10 min e 4 vezes em SSC 0,1X/SDS 0,1% a 56°C por 30 min.

4.2.7.5. Autoradiografia

Os filtros foram envoltos em filme de plástico e expostos, por diferentes períodos de tempo, a filme de Raios-X a -70°C. Os filmes foram revelados

segundo instruções do fabricante. Alternativamente, foram expostos em telas do PhosphorImager.

4.2.8. Seqüenciamento automatizado de DNA

Para o seqüenciamento, os clones bacterianos foram submetidos a PCR de colônia para amplificação dos insertos.

Aproximadamente 30ng (1µl) do produto de PCR foi usado como "template" na reação de seqüenciamento do Kit “DYEnamic ET terminator cycle sequence kit” (Amersham Pharmacia Biotech). Este kit baseia-se no uso da metodologia do seqüenciamento com dideoxinucleotídeos marcados com fluorescência, acoplado a PCR com apenas um iniciador ("primer"). Esta reação foi corrida no aparelho de seqüenciamento automático ABI (Perkin Elmer).

4.2.9. Construção das bibliotecas de subtração por RDA

4.2.9.1. Síntese de cDNAs utilizando o kit “SMART PCR cDNA Synthesis Kit”

RNA total de células ST1 não-tratadas ou tratadas por 24h com ATRA foi extraído e purificado conforme descrito no item 4.2.7.1 Após a quantificação e verificação da qualidade em gel de agarose-formaldeído, o RNA foi utilizado para a síntese de cDNA com o kit “SMART PCR cDNA Synthesis Kit” (Clontech, Palo Alto), conforme instruções do manual.

Este kit faz uso da atividade terminal transferase da enzima Transcriptase Reversa (RT) para ancorar iniciadores na porção 5' terminal de todos cDNAs sintetizados. Esta atividade faz com que, ao chegar à porção 5' final do mRNA, a enzima catalise a adição de uma pequena repetição de citosinas na fita de cDNA sintetizada. Isto se deve ao fato do kit conter um

iniciador que, por possuir uma região rica em guaninas, se anela com o poli-C adicionado e passa a servir como molde para a RT. Desta forma, uma região do iniciador é adicionada ao cDNA.

A seguir, usando-se um iniciador para esta região e para a porção poli-A do mensageiro, os cDNAs completos sintetizados foram amplificados por "Long distance PCR", na fase exponencial de reação. Os cDNAs incompletos, os RNAs ribossômicos e o DNA genômico não são amplificados, pois não possuem sítios de anelamento para estes iniciadores, garantindo um cDNA completo de alta qualidade.

4.2.9.2. Hibridização subtrativa:

A construção da biblioteca de subtração foi feita seguindo o protocolo descrito por Hubank & Schatz, 2000 (esquematizado na Figura 2). Entretanto, as etapas de purificação com fenol-clorofórmio foram substituídas por purificação em colunas GFX.

Resumidamente, os cDNAs das células tratadas ou não com ATRA foram digeridos com a enzima *Sau3AI* para posteriormente gerar os amplicons. A próxima etapa foi a ligação coesiva dos fragmentos gerados a adaptadores de DNA não fosforilados. Os fragmentos foram amplificados por PCR na fase exponencial da reação para evitar artefatos e distorções na abundância relativa de cada transcrito. Esta amplificação visou gerar uma grande massa de fragmentos. Após a remoção dos adaptadores pela digestão com *Sau3AI*, uma parte dos cDNAs foi reservada para ser usada como "Driver" e outra parte ligada a novos adaptadores semelhantes aos primeiros, constituindo as amostras "Tester". Como as extremidades dos adaptadores não estavam fosforiladas, apenas uma das fitas de cada adaptador foi ligada

Figura 2. Esquema do funcionamento da metodologia de RDA (Hubank & Schatz, 1994).

covalentemente ao grupamento 5'-fosfato dos fragmentos de cDNA. A outra fita foi perdida durante as etapas de desnaturação das amostras.

A seguir, as amostras “Tester” correspondentes aos cDNAs das células tratadas com ATRA foram combinadas com amostras “Driver” das células não- tratadas, em uma relação de 1:100, para a primeira hibridização “Forward”. Para a primeira “Reverse”, a amostra “Tester” correspondeu ao cDNA das células não-tratadas e a “Driver” ao cDNA das tratadas. Os cDNAs foram desnaturados e completamente reanelados lentamente a 67°C por 20h. Os genes presentes igualmente nas duas populações de cDNAs tendem a formar duplo-híbridos “Tester-Driver”, uma vez que o “Driver” está presente em excesso. Enquanto isso, os genes que estão somente presentes na amostra Tester só formam híbridos “Tester-Tester”. Na etapa seguinte, os adaptadores foram preenchidos com *Taq* DNA polimerase, completando-os apenas nas duas fitas dos híbridos “Tester-Tester”. As amostras de cDNA foram então submetidas à reações de PCR com iniciadores para os adaptadores. Como o sítio do iniciador foi criado somente nas extremidades das fitas dos híbridos “Tester-Tester”, apenas estes foram amplificados, favorecendo a amplificação de genes presentes somente na amostra “Tester”. O produto de PCR foi o DPI ("differential product 1") e já possui enriquecimento para genes diferencialmente expressos. Este produto foi digerido e ligado a novos adaptadores, semelhantes aos primeiros. Foi repetido um novo ciclo de hibridização, usando-se a relação “Tester:Driver” 1:800, gerando o segundo produto diferencial DPII. Este produto foi clonado e transformado, como descrito na SSH. Os clones obtidos foram seqüenciados e usados como sonda para Northern blot conforme descrito no item 4.2.7.3.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito de diferentes concentrações de ATRA sobre a síntese de DNA de células ST1

Inicialmente, foi necessário determinar a dose de ATRA que induz a maior inibição de proliferação de ST1, sem provocar morte celular aparente em microscopia de fase.

Como a síntese de DNA é diretamente proporcional à multiplicação celular, este parâmetro foi escolhido para ser analisado em células tratadas com diferentes concentrações de ATRA.

Assim, células ST1 foram plaqueadas na densidade de 10^4 células/cm² e tratadas (ou não) com diferentes concentrações (10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} M) de ATRA por 48h. Após este período, foi adicionado às culturas, um precursor de nucleotídeo marcado radiativamente (timidina tritiada) por 6h. A incorporação de timidina foi medida em cintilador beta.

A concentração de 10^{-4} M de ATRA provoca morte em grande parte das células, impedindo a medição da síntese de DNA. Os resultados obtidos para as outras 2 concentrações foram expressos em um gráfico, o qual está apresentado na Figura 3.

Como pode ser observado nesta figura, o tratamento com 10^{-5} M de ATRA por 48h, promove uma inibição, de aproximadamente 65%, na incorporação de timidina tritiada em células ST1. Com 10^{-6} M de ATRA, a inibição é um pouco menor, em torno de 60%.

Assim, a concentração de 10^{-5} M de ATRA foi escolhida para ser usada nos experimentos seguintes.

Para análise das alterações morfológicas induzidas por ATRA em células ST1, estas células foram tratadas (ou não) com 10^{-5} M e acompanhadas

Figura 3. Inibição da síntese de DNA em células ST1 tratadas com diferentes concentrações de ATRA por 48 h. As células foram plaqueadas em 2%SFB em densidade inicial de 10^4 cels/cm² e tratadas com 10^{-6} e 10^{-5} M de ARA, após 24h do plaqueamento. A timidina tritiada foi adicionada 8h antes da lise e a síntese de DNA foi medida conforme descrito em Materiais e Métodos.

A

B

Figura 4. Morfologia de células ST1, cultivadas em DMEM/SFB2%, não tratadas (A) ou tratadas (B) com 10^{-5} M de ATRA por 72h. Fotomicrografia de contraste de fase (aumento de 100x, microscópio invertido Nikon Diaphot).

por 4 dias. Após o 3º dia, intensas alterações morfológicas são visíveis. Na Figura 4 são apresentadas as fotos de culturas tratadas (ou não) por 3 dias com este agente.

Como pode ser observado, a cultura não tratada apresenta um grande número de células arredondadas (a maioria das quais são mitóticas), desorganizadas, sem contato muito estreito entre as células, características de células transformadas e tumorais como a ST1. Na cultura tratada, pode-se notar uma drástica redução visual do número de mitoses, maior "achatamento" das células, um aparente contato maior célula-célula e uma organização celular mais evidente, que são sinais característicos de diferenciação celular.

5.2. Análise da parada de crescimento das células ST1 tratadas com ATRA

No item anterior, foi possível verificar que após 48h de tratamento, as células ST1 apresentavam em torno de 65% de inibição da incorporação de timidina tritiada em DNA. Esta inibição poderia ser causada por parada de crescimento ou por redução do número de células por indução de morte celular. Assim, visando descobrir a causa desta inibição e descrever o comportamento das células desde o início do tratamento até 72h, foram feitos 2 tipos de experimentos.

O primeiro foi a cinética de entrada em na fase S, medida através da incorporação de um precursor de nucleotídeo bromodesoxiuridina (BrdU) ao DNA, antes e após diferentes períodos de tempo de tratamento com ATRA. Como esta incorporação ocorre na fase S do ciclo celular, é um bom parâmetro para indicar proliferação.

No segundo tipo de experimento, foi avaliada a taxa de apoptose, através de ensaios de “TUNEL”, para verificar a possibilidade de ATRA estar promovendo apoptose nas células ST1.

Assim, células ST1 foram plaqueadas, simultaneamente, nas mesmas condições para os dois experimentos, e tratadas por diferentes períodos de tempo (10, 24, 48 e 72h) com ATRA 10^{-5} M. A incorporação de BrdU foi feita por 7h antes da fixação das células em paraformaldeído. As células usadas no experimento de TUNEL foram fixadas em metanol, de acordo com o protocolo descrito em Métodos. Os resultados obtidos nos dois experimentos estão apresentados nas Figuras 5 e 6.

Como pode ser observado na Figura 5, nas condições experimentais usadas, a quantidade de núcleos marcados nos ensaios de imuno-histoquímica para BrdU do controle (células não tratadas) aumenta de cerca de 8% em 10h de tratamento para 68% em 24h e depois reduz gradativamente até cerca de 50% em 72h. Nas células tratadas com ATRA, a quantidade de núcleos marcados aumenta de cerca de 14% em 10h de tratamento para 27% após 24h, reduzindo até aproximadamente 4% após 72h.

As marcações nucleares em 10h são menores do que as dos outros períodos de tempo, provavelmente porque, neste período, as células ainda não entraram em crescimento exponencial.

Após 48h, as células das culturas controle apresentam uma redução da marcação nuclear, possivelmente devido a uma desaceleração da multiplicação provocada pelo aumento de densidade celular.

Aparentemente, a inibição de crescimento mediada por ATRA se inicia entre 10 e 24h de tratamento, pois, apenas neste último período de tempo, é possível observar diferenças quanto à marcação nuclear. Esta inibição é progressiva, chegando, em 72h de tratamento, a inibir em 10 vezes a

Figura 5. Ensaio de incorporação de BrdU pelas células ST1 tratadas (ou não) com ATRA (10^{-5}M) por diferentes períodos de tempo (10, 24, 48 e 72h).

Figura 6. Ensaio de TUNEL para detecção de apoptose em células ST1 tratadas (ou não) com ATRA (10^{-5}M) por diferentes períodos de tempo (10, 24, 48 e 72h).

Figura 7. Fotomicrografias dos ensaios de TUNEL das células ST1 tratadas (ou não) com ATRA (10^{-5}M). O painel A corresponde ao controle positivo da reação de TUNEL. Painéis B e D, correspondem às células coradas com DAPI. Painéis C e E, correspondem às reações de TUNEL. Painéis B e C correspondem às células ST1 não tratadas com ATRA. Painéis D e E correspondem às células tratadas com ATRA por 72h.

incorporação de BrdU das células ST1, quase que bloqueando completamente seu crescimento.

Nas Figuras 6 e 7 estão os resultados do experimento de apoptose. A foto do controle positivo, na Figura 7, indica que a reação funcionou de forma adequada. O número de núcleos apoptóticos antes e durante o tratamento pouco varia, permanecendo em um nível bastante baixo (2%). Desta forma, conclui-se que o tratamento com ATRA não induz apoptose nas células ST1.

Assim, o tratamento com ATRA parece promover uma forte redução da entrada das células ST1 na fase S do ciclo, o que leva à inibição da proliferação celular. Esta inibição não é acompanhada de apoptose, portanto, o principal mecanismo que leva à redução do aumento do número de células ao longo do tratamento é a diminuição no número de células que entram na fase S do ciclo celular.

5.3. Efeito de ATRA sobre o crescimento de células ST1 em suspensão de agarose

De todos os parâmetros de transformação celular, o que melhor se correlaciona com oncogenicidade é a capacidade de crescimento em meio semi-sólido. Portanto, este é um ótimo parâmetro para avaliar o efeito diferenciador do ATRA sobre ST1.

Células ST1 foram plaqueadas em suspensão de agarose em diferentes densidades (conforme descrito em Métodos) e tratadas com 10^{-5} M de ATRA. Após 17 dias, as colônias formadas foram fotografadas e contadas de acordo com seu tamanho.

Os resultados das contagens de 2 experimentos independentes, para células ST1, estão apresentados na Tabela 1. Como se observa, uma grande inibição da capacidade de formação de colônia das células ST1, ocorre em

Experimento 1		10 ⁴ células/poço	10 ³ células/poço	10 ² células/poço
Controles	Colônias grandes	185	139	12
		149	167	7
	Total de colônias	incontáveis	215	14
		incontáveis	230	7
Tratadas com ATRA	Colônias grandes	11	0	0
		14	0	0
	Total de colônias	incontáveis	10	0
		incontáveis	24	0

Experimento 2		10 ⁴ células/poço	10 ³ células/poço	10 ² células/poço
Controles	Colônias grandes	137	158	14
		157	131	15
	Total de colônias	incontáveis	233	18
		incontáveis	237	22
Tratadas com ATRA	Colônias grandes	14	0	0
		17	0	0
	Total de colônias	incontáveis	11	0
		incontáveis	7	0

Tabela 1. Eficiência de plaqueamento de células ST1 em meio semi-sólido de agarose na presença ou na ausência de ATRA. As células foram plaqueadas em diferentes densidades (10², 10³, 10⁴ cels/poço) em duplicatas. A concentração de ATRA usada no tratamento foi de 10⁻⁵ M.

Figura 8. Efeito de ATRA (10⁻⁵ M) sobre a eficiência de plaqueamento das células ST1 em suspensão de agarose.

Figura 9. Aspecto das colônias de células ST1, formadas em suspensão de agarose na ausência (A) e na presença (B) de ATRA a 10^{-5} M. Células ST1 plaqueadas na densidade de 10^3 cels/poço e tratadas ou não com 10^{-5} M de ATRA por 17 dias. Fotomicrografia de contraste de fase (aumento de 40x, microscópio invertido Nikon Diaphot).

todas as densidades testadas, devido ao tratamento com o agente diferenciador. Este efeito é mais evidente na densidade de 10^2 células por poço em bandeja de 24 poços, na qual o ATRA praticamente elimina qualquer crescimento de ST1. Além da redução da quantidade de colônias, nota-se uma limitação de seus tamanhos, a qual é mais evidente na densidade de 10^4 células por poço. Usando os dados obtidos na densidade de plaqueamento de 10^3 células por poço, foi construído um gráfico, apresentado na Figura 8, para melhor visualização dos dados obtidos. Conforme se observa, o desvio padrão é baixo, refletindo a pequena diferença entre os dois experimentos. A inibição na capacidade de formar colônia é intensa, ultrapassando 15 vezes.

A eficiência de plaqueamento (número de colônias X 100/número de células plaqueadas) das células não tratadas é de 23%, enquanto que das células tratadas com ATRA é de apenas 1,3%.

Colônias das células ST1 mantidas em suspensão de agarose na ausência e na presença de ATRA, na densidade de 10^3 células por poço de bandeja de 24 poços podem ser observadas na Figura 9. Nota-se uma redução drástica tanto do número quanto do tamanho das colônias.

5.4. Construção das bibliotecas de subtração

5.4.1. Preparo de fragmentos de cDNAs

Amostras (2 μ g) de mRNA extraído de células ST1 tratadas (ou não) por 10h com 10^{-5} M de ATRA, foram usadas na síntese de cDNAs dupla fita, conforme descrito em Métodos. Estes cDNAs foram digeridos com *Rsa*I, para gerar fragmentos de, em média, 500 bp. Esta digestão é necessária para se evitar a tendência de ocorrer, nas etapas posteriores de PCR, amplificação de fragmentos pequenos em detrimento dos grandes, selecionando fragmentos

pequenos. Além disto, a cinética de hibridização de fragmentos deste tamanho é mais homogênea. Outras duas vantagens são: evitar formação de híbridos complexos entre diversos cDNAs diferentes e, ainda, permitir que um mesmo gene seja representado por vários fragmentos na biblioteca, aumentando sua probabilidade de ser clonado.

A Figura 10 mostra eletroforese dos cDNAs dupla fita sintetizados, antes e depois da digestão com *RsaI*. Conforme pode ser observado nesta figura, o arraste de síntese de cDNAs tornou-se visível a partir de ~7 Kb, sendo que a maioria se localizou em torno de 3 Kb. Após a digestão, a maior parte dos fragmentos se localizou entre 200-500 bp, embora haja fragmentos de 1-2Kb.

Devido ao fato de ter sido aplicado no gel, uma quantidade reduzida de cDNAs, os transcritos mais longos, por serem também menos abundantes, não ficaram muito visíveis. Provavelmente, adicionando nucleotídeos radioativos na reação de síntese de cDNA teria sido possível observar arraste mais superior, correspondente a cDNAs mais longos. O tamanho do arraste observado mostra que a síntese de cDNA ocorreu de forma eficiente, possuindo representação da maior parte dos mensageiros expressos (1-6Kb). A digestão com *RsaI* gerou fragmentos do tamanho esperado.

A seguir, diluições de cada um dos dois tipos de cDNAs foram divididas em dois tubos para permitir que os cDNAs se ligassem a 2 adaptadores diferentes. Para testar se a ligação ao adaptador ocorreu eficientemente, foram feitas reações de PCR a partir de uma diluição 1/200 da ligação. Uma das reações de PCR, usa um par de iniciadores ("primers") que são internos ao sítio de digestão por *RsaI* no cDNA do gene correspondente a GAPDH. O outro usa "primers" para o adaptador e para um dos sítios internos descritos acima. A razão entre a banda gerada pelos dois PCRs, fornece uma

Figura 10. Fracionamento dos cDNAs dupla fita sintetizados antes e após a digestão com *RsaI*, em gel de 1% agarose. Canaletas 1 e 3: cDNAs de células ST1 não tratadas; 5 e 7: cDNAs de células ST1 tratadas com ATRA. Canaletas: 2, 4, 6 e 8, produtos de digestão dos respectivos cDNAs. Canaleta 9: padrão de tamanho molecular.

Figura 11. Teste da eficiência de ligação aos adaptadores. Fracionamento em gel de 1% agarose, do produto de PCR dos fragmentos de GAPDH, amplificados a partir dos cDNAs ligados aos adaptadores. Canaletas 1 e 5: “primers” para GAPDH e adaptador 1. Canaletas 3 e 7: “primers” para GAPDH e adaptador 2. Canaletas 2, 4, 6 e 8: “primers” 5’ e 3’ para GAPDH. Canaletas 5, 6, 7 e 8: PCR a partir de cDNAs da célula ST1 tratada com ATRA. Canaletas 1, 2, 3 e 4: PCR a partir de cDNAs da célula ST1 não tratada. Canaleta 9: padrão de tamanho molecular.

indicação de quanto de fragmento de GAPDH foi ligado ao adaptador, em relação ao total de fragmentos de GAPDH da amostra.

Na Figura 11 encontram-se os resultados de eletroforese dos fragmentos de PCR de GAPDH, conforme descrito acima, para a ligação aos dois adaptadores. São visíveis duas bandas, sendo uma maior (1,2Kb), correspondente a amplificação usando iniciador ("primer") para GAPDH e para o adaptador, e uma menor (0,5 Kb) usando "primers" exclusivos para GAPDH. Como pode ser notado, a banda superior tem, pelo menos, 25% da intensidade da inferior. Isto sugere que pelo menos ~25% dos cDNAs devem ter sido ligados aos adaptadores. Este valor é o mínimo sugerido pelos autores da técnica para se prosseguir para o próximo passo.

Com os fragmentos de cDNAs preparados adequadamente, foi feita a hibridização subtrativa.

5.4.2. Hibridização subtrativa e PCRs primário e secundário

Foram realizadas duas hibridizações subtrativas, sendo uma para clonar genes induzidos pelo ATRA (hibridização "Forward") e outra para clonar genes reprimidos (hibridização "Reverse") pelo tratamento. Na hibridização "Forward", alíquotas dos cDNAs provenientes do mRNA extraído da célula tratada (cDNA "Tester"), ligados separadamente a cada um dos 2 adaptadores diferentes são desnaturados na presença de excesso (30X) de cDNA sem adaptadores vindo do mRNA da célula não tratada (cDNA "Driver"), em dois tubos separados. Os cDNAs foram renaturados parcialmente a 68°C por 8h. Após este período de tempo, os dois tubos foram misturados e os cDNAs renaturados totalmente, na presença de quantidade adicional de cDNA Driver. Nesta etapa, os genes diferencialmente expressos formam duplo híbrido contendo um tipo de adaptador diferente ligado a cada fita. Na subtração

Figura 12. Fracionamento dos produtos de PCR primário e secundário da subtração, em gel de 2% agarose. Canaletas 2 e 3: subtração Forward. Canaletas 4 e 5: subtração Reverse. Canaletas 2 e 4: PCR primário. Canaletas 3 e 5: PCR secundário. Canaleta 1: padrão de tamanho molecular.

Figura 13. Teste da eficiência de normalização/subtração. Fracionamento em gel de 2% agarose, do produto de amplificação de GAPDH a partir dos fragmentos de subtração, em vários ciclos de PCR. Painel A, canaletas 1, 2, 3 e 4: PCR dos fragmentos “forward”; Painel B, canaletas 1, 2, 3 e 4: fragmentos “reverse”. Canaletas 5, 6, 7 e 8: fragmentos não subtraídos. Canaletas 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8: 18, 23, 28 e 33 ciclos de PCR, respectivamente. O padrão de tamanho molecular (PM) está indicado na figura.

"Reverse", o cDNA "Tester" corresponde ao mRNA das células não tratadas, e o cDNA "Driver" ao mRNA das células tratadas. A próxima etapa foi a amplificação seletiva das seqüências diferencialmente expressas, usando PCR. Foram feitas duas reações, sendo que a última usa iniciadores ("primers") mais internos ao adaptador ("nested PCR"), visando uma maior especificidade dos produtos gerados.

A Figura 12 corresponde à eletroforese dos produtos de PCR gerados após a subtração.

Como pode ser observado nesta figura, o "arraste" dos fragmentos de cDNA subtraídos vai de ~200 bp até ~1.000 bp, sendo que o tamanho médio é de ~500 bp. O PCR secundário apresenta intensidade maior que o primário, conforme o esperado.

5.4.3. *Teste da eficiência de subtração/normalização*

Espera-se que após a subtração haja normalização dos fragmentos, com redução da abundância relativa de seqüências correspondentes a genes de expressão abundante e aumento das seqüências de baixa expressão. Um modo de testar a eficiência desta normalização é fazer uma diluição grande do conjunto de fragmentos subtraídos, e, utilizando PCR com iniciadores ("primers") para um gene de expressão abundante como GAPDH, determinar em quantos ciclos a banda de amplificação se torna visível. Pode-se realizar a comparação entre os fragmentos subtraídos e não subtraídos, tendo-se uma idéia de quantas vezes foi enriquecido o conjunto de cDNAs.

Na Figura 13, pode ser observado o fracionamento do PCR feito a partir dos fragmentos da subtração "Forward", "Reverse" e de fragmentos não subtraídos, com iniciadores ("primers") de GAPDH, após um número variável de ciclos de amplificação. A banda de ~1,2 Kb, correspondente a amplificação do fragmento de GAPDH é visível na Figura 13. Esta banda aparece a partir

de 18 ciclos de PCR nos fragmentos não subtraídos, enquanto que nos fragmentos da subtração "Forward", aparecem somente após 28 ciclos. No PCR dos fragmentos "Reverse", a banda de GAPDH aparece após 23 ciclos. Cada 5 ciclos de diferença entre o aparecimento da banda no PCR dos fragmentos de subtração e daqueles não subtraídos, correspondem, grosseiramente, a 20X de enriquecimento. Assim, aparentemente, os fragmentos da subtração "Forward" foram enriquecidos 400X enquanto que os da "reverse" 20X.

5.5. Rastreamento ("screening") da biblioteca de subtração

As ESTs obtidas pela técnica de SSH foram clonadas em vetor plasmidial e transformadas. Os clones bacterianos resultantes foram coletados, crescidos em placas de 96 poços e estocados a -70°C.

Para o "screening" (rastreamento), cerca de 4.000 ESTs da biblioteca "Forward" foram amplificadas a partir dos clones bacterianos e aplicadas em membranas de nylon. Inicialmente, estas aplicações foram feitas em conjuntos de 96, utilizando o sistema robotizado Hydra® de aplicação. Posteriormente, passou-se a usar o sistema manual "ExpreCISION™ DNA Arraying System" (BIOINFORMÁTICA™). Este último aparelho tem a vantagem de permitir a aplicação de 1.536 clones de cDNA em uma membrana de 8X12 cm. Com uma quantidade maior de clones por membrana tornou-se viável a aplicação em duplicata de cada EST.

As membranas duplicatas preparadas, foram rastreadas através de hibridização com sondas produzidas a partir de fragmentos de cDNA das subtrações "Forward" e "Reverse". Para se evitar o risco de hibridização cruzada entre os adaptadores presentes nas pontas dos fragmentos, estes foram digeridos e removidos, conforme descrito em Métodos. Estes fragmentos

Figura 14. Rastreamento de 96 clones de cDNAs em “macroarrays”. Aplicação de clones da biblioteca Forward, hibridizados com fragmentos “forward” e “reverse”, em tamanho reduzido. Painei A: hibridização “forward”; Painei B: hibridização “reverse”. Os clones na mesma posição em membranas lado a lado são equivalentes.

Figura 15. Rastreamento de 768 clones de cDNAs em “macroarrays”, em duplicatas. Aplicação de clones da biblioteca “Forward”, hibridizados com fragmentos das bibliotecas “Forward” e “Reverse”.

foram então usados na síntese de sondas radioativas, as quais foram hibridizadas com os cDNAs das membranas. Resultados representativos de um experimento com membrana de 96 clones e outro com membrana de 768 clones estão apresentados nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

Como pode ser notado, quase todo clone apresenta sinal de hibridização, comprovando a boa sensibilidade da hibridização com fragmentos normalizados. No caso das membranas de 768 clones, os sinais de hibridização das duplicatas estão visualmente semelhantes, mostrando a boa reprodutibilidade do sistema. São observados, também, sinais de intensidade diferente, entre os mesmos clones, comparando as duas hibridizações, indicando possíveis genes diferencialmente expressos. Na membrana onde foi aplicada a amostra controle negativo, correspondente a um gene que não é expresso nestas células, ligado aos adaptadores usados na subtração, nenhum sinal é visível (Figura 14). Isto indica que a remoção do adaptador da sonda foi bem sucedida e que as condições usadas na hibridização foram apropriadas.

As hibridizações foram densitometradas usando o programa ImageQuant (Molecular Dynamics). Os resultados de densitometria das hibridizações "Forward" e "Reverse" dos clones de uma das placas (F30) usadas no preparo da membrana 768 da figura anterior, são apresentados nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Conforme pode ser observado nas Tabelas 2 e 3, os desvios padrões entre as duplicatas são, em geral, baixos. Eles representam, em média, 14% da média das duplicatas. Clones com desvio padrão acima de 30% do valor da média das duplicatas foram desprezados (marcados em laranja nas Tabelas). Nesta placa, 16 clones foram descartados por este motivo, ficando na média de descarte de clones por placa (15% do total).

Tabela 2. Densitometria da hibridização Forward da membrana de 768 clones (representação de 1 placa de 96 clones).

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	38812	60300	204360	154496	25325	66709	112528	130635
	44496	35543	145897	109605	37818	51473	80182	70640
média	41654	47921	175129	132050	31572	59091	96355	100637
Drel (%)	10	37	24	24	28	18	24	42
2	145770	164429	98587	33733	51092	28357	29205	71106
	76030	114403	68438	33045	36931	25548	24936	113799
média	110900	139416	83512	33389	44012	26953	27071	92452
Drel (%)	44	25	26	1	23	7	11	33
3	63702	39607	23184	39259	40701	26034	41158	25908
	42467	36615	19438	35963	47438	22220	44228	35099
média	53084	38111	21311	37611	44069	24127	42693	30503
Drel (%)	28	6	12	6	11	11	5	21
4	39811	86875	60305	41521	37261	24030	22090	77534
	46443	80406	37069	39781	36828	22651	22256	96272
média	43127	83640	48687	40651	37045	23340	22173	86903
Drel (%)	11	5	34	3	1	4	1	15
5	77440	106590	41481	43444	37538	44648	49406	65700
	72369	126901	32976	38765	26697	47657	53719	60527
média	74905	116745	37228	41105	32118	46152	51563	63114
Drel (%)	5	12	16	8	24	5	6	6
6	107018	71530	966717	90298	65848	51799	34508	72263
	58736	69475	391496	85305	72311	63411	44152	80703
média	82877	70503	679107	87802	69080	57605	39330	76483
Drel (%)	41	2	60	4	7	14	17	8
7	71363	90606	28180	24414	46977	49689	41937	44619
	59715	76685	31269	28494	50996	30900	51200	51005
média	65539	83646	29724	26454	48986	40294	46569	47812
Drel (%)	13	12	7	11	6	33	14	9
8	158593	40955	27573	24721	42095	48785	41404	85868
	158833	40861	29042	19709	174192	36255	44678	123521
média	158713	40908	28308	22215	108143	42520	43041	104695
Drel (%)	0	0	4	16	86	21	5	25
9	22890	19473	19355	29046	28180	26088	23981	31965
	21260	19236	20620	34377	31219	27589	25642	30620
média	22075	19354	19987	31712	29700	26838	24811	31293
Drel (%)	5	1	4	12	7	4	5	3
10	30296	36106	33016	28632	120926	21822	25763	33516
	36047	53314	31594	34589	106794	23611	52442	47351
média	33172	44710	32305	31611	113860	22717	39102	40433
Drel (%)	12	27	3	13	9	6	48	24
11	629816	61554	52179	35964	18567	30576	31692	52254
	552013	97478	67360	49796	18074	37934	57414	80983
média	590914	79516	59769	42880	18320	34255	44553	66618
Drel (%)	9	32	18	23	2	15	41	30
12	26789	33892	53248	81204	60943	500718	33272	69852
	26002	35413	75975	94508	78201	541024	42423	86623
média	26396	34652	64611	87856	69572	520871	37848	78237
Drel (%)	2	3	25	11	18	5	17	15

Tabela 3. Densitometria de hibridização reverse da membrana de 768 clones (representação de 1 placa de 96 clones).

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	24931	26881	70573	25910	18169	39859	85548	119700
	23913	26281	92019	63671	18891	44253	104082	178539
média	24422	26581	81296	44790	18530	42056	94815	149120
Drel (%)	3	2	19	60	3	7	14	28
2	124514	32081	44165	23139	47555	21937	21129	145144
	129226	43107	42689	47050	65540	25321	38872	147252
média	126870	37594	43427	35094	56547	23629	30000	146198
Drel (%)	3	21	2	48	22	10	42	1
3	21146	32903	16078	24361	20709	16115	32281	18415
	21989	27472	16658	25551	23897	17301	29449	22901
média	21568	30187	16368	24956	22303	16708	30865	20658
Drel (%)	3	13	3	3	10	5	6	15
4	22560	23877	18429	20499	20974	17575	18609	39708
	24679	24282	21307	18964	31751	17905	18779	32921
média	23619	24079	19868	19732	26363	17740	18694	36314
Drel (%)	6	1	10	6	29	1	1	13
5	22998	25864	18043	24687	18421	27163	39437	24862
	27723	24185	20219	26477	20321	26691	31433	33667
média	25360	25025	19131	25582	19371	26927	35435	29264
Drel (%)	13	5	8	5	7	1	16	21
6	84814	35830	16097	28257	30312	48095	36993	30070
	102117	32259	17657	28975	31724	44372	30939	34436
média	93466	34045	16877	28616	31018	46233	33966	32253
Drel (%)	13	7	7	2	3	6	13	10
7	52535	35550	17392	17204	36586	30529	77436	25943
	48162	30822	16068	21473	35219	50311	29314	23784
média	50349	33186	16730	19338	35903	40420	53375	24864
Drel (%)	6	10	6	16	3	35	64	6
8	339535	22558	21960	14686	26979	29538	63570	49073
	325863	20661	44248	18463	27083	29296	41852	41876
média	332699	21609	33104	16575	27031	29417	52711	45474
Drel (%)	3	6	48	16	0	1	29	11
9	15680	14282	15092	16133	20157	17379	17071	18692
	15602	14258	14854	17947	19175	17926	17291	18439
média	15641	14270	14973	17040	19666	17652	17181	18565
Drel (%)	0	0	1	8	4	2	1	1
10	22676	25450	31848	35458	76882	25517	26167	57346
	20676	21683	31078	60306	66635	25513	20356	57105
média	21676	23567	31463	47882	71758	25515	23262	57226
Drel (%)	7	11	2	37	10	0	18	0
11	53524	24777	35635	75509	16468	17526	24158	41712
	53561	22885	33366	62675	14793	23662	20222	33750
média	53543	23831	34501	69092	15630	20594	22190	37731
Drel (%)	0	6	5	13	8	21	13	15
12	23032	26431	40983	29766	32900	19111	70511	37150
	25974	28123	34734	29160	27479	17526	77619	35008
média	24503	27277	37859	29463	30190	18319	74065	36079
Drel (%)	8	4	12	1	13	6	7	4

Tabela 4. Média densitométrica das intensidades da hibridização dos clones aplicados no macroarray, e correlação (“Forward/Reverse”) entre os sinais da hibridização “Forward” e “Reverse”.

		A		B		C		D		E		F		G		H	
		F/R		F/R		F/R		F/R		F/R		F/R		F/R		F/R	
1	F	41654	2	47921	2	175129	2	132050	3	31572	2	59091	1	96355	1	100637	1
	R	24422		26581		81296		44790		18530		42056		94815		149120	
2	F	110900	1	139416	4	83512	2	33389	1	44012	1	26953	1	27071	1	92452	2
	R	126870		37594		43427		35094		56547		23629		30000		146198	
3	F	53084	2	38111	1	21311	1	37611	2	44069	2	24127	1	42693	1	30503	1
	R	21568		30187		16368		24956		22303		16708		30865		20658	
4	F	43127	2	83640	3	48687	2	40651	2	37045	1	23340	1	22173	1	86903	2
	R	23619		24079		19868		19732		26363		17740		18694		36314	
5	F	74905	3	116745	5	37228	2	41105	2	32118	2	46152	2	51563	1	63114	2
	R	25360		25025		19131		25582		19371		26927		35435		29264	
6	F	82877	1	70503	2	679107	40	87802	3	69080	2	57605	1	39330	1	76483	2
	R	93466		34045		16877		28616		31018		46233		33966		32253	
7	F	65539	1	83646	3	29724	2	26454	1	48986	1	40294	1	46569	1	47812	2
	R	50349		33186		16730		19338		35903		40420		53375		24864	
8	F	158713	2	40908	2	28308	1	22215	1	108143	4	42520	1	43041	1	104695	2
	R	332699		21609		33104		16575		27031		29417		52711		45474	
9	F	22075	1	19354	1	19987	1	31712	2	29700	2	26838	2	24811	1	31293	2
	R	15641		14270		14973		17040		19666		17652		17181		18565	
10	F	33172	2	44710	2	32305	1	31611	2	113860	2	22717	1	39102	2	40433	1
	R	21676		23567		31463		47882		71758		25515		23262		57226	
11	F	590914	11	79516	3	59769	2	42880	2	18320	1	34255	2	44553	2	66618	2
	R	53543		23831		34501		69092		15630		20594		22190		37731	
12	F	26396	1	34652	1	64611	2	87856	3	69572	2	520871	28	37848	2	78237	2
	R	24503		27277		37859		29463		30190		18319		74065		36079	

As médias das duplicatas da hibridização "Forward" foram divididas pelas médias da "Reverse". Estes resultados para a placa indicada estão apresentados na Tabela 4.

Um grande número de clones apresenta relação entre a intensidade da hibridização com a sonda "Forward" e a intensidade da hibridização com a sonda "Reverse" de 1-3X. Apenas uma pequena parte possui relação aproximadamente igual ou superior a 5X. Na densitometria da placa F30 (Tabela 4), por exemplo, são visíveis 3 clones nestas condições (destacados em cor verde). Segundo a empresa fabricante do kit de subtração (Clontech), apenas os clones com relação de sinal superior a 5X devem ser usados para confirmação de expressão diferencial por Northern Blot.

A densitometria dos sinais de hibridização da membrana da Figura 15 revela cerca de 14 clones com relação igual a 5X ou mais, ou seja, em torno de 2% dos clones aplicados.

Para auxiliar a visualização dos clones diferencialmente expressos, foram desenhados gráficos nos quais as linhas e as colunas, da placa de 96 poços são representadas nas ordenadas e na abscissa, respectivamente, e a relação intensidade da hibridização "Forward"/intensidade da hibridização "Reverse" representada no eixo z. Um gráfico da placa F30, representativo dos demais, está apresentado na Figura 16.

Conforme pode ser observado, o gráfico facilita a visualização rápida dos clones que apresentam relação igual ou superior a 5X, neste caso F30C6, F30A11 e F30F12.

Dos cerca de 4.000 clones rastreados, foram selecionados em torno de 104 (~3%) para posterior seqüenciamento e análise de expressão nas células ST1 tratadas ou não com ATRA por 10h.

Figura 16. Representação gráfica da relação de intensidade da hibridização “Forward/Reverse” para 1 placa contendo 96 clones.

5.6. Confirmação da expressão diferencial

Inicialmente, cerca de 74 clones selecionados no “screening” foram amplificados por PCR e usados para a síntese de sondas radiativas em ensaios de Northern blot.

Nestas hibridizações, 39 clones foram confirmados como sendo induzidos pelo tratamento de ST1 com ATRA por 10h.

O seqüenciamento destes clones revelou que 36 clones correspondiam à uma mesma EST e os outros 3 correspondiam à 2 diferentes ESTs.

Diante desta alta redundância, os 30 clones restantes foram seqüenciados antes de serem analisados por Northern blot. Destes, apenas 14 correspondiam a ESTs diferentes das já conhecidas como reguladas. Nenhuma das novas ESTs teve sua indução confirmada.

Na Figura 17 estão apresentados resultados das análises de expressão das 3 ESTs diferentes, identificadas como reguladas, com RNA de células ST1 tratadas ou não com ATRA. Além da sonda de cada EST, os RNAs também foram hibridizados com sonda para o gene de expressão constitutiva GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). O uso da sonda de GAPDH visa permitir a obtenção de uma banda que sirva de controle de quantidade de RNA para corrigir diferenças que possam ter ocorrido durante aplicação das amostras no gel, ou em outras etapas da técnica.

Conforme pode ser observado nesta figura, a banda de GAPDH está visualmente muito semelhante entre cada par de amostras de RNA comparadas, indicando que a mesma quantidade de RNA foi aplicada nas membranas. Duas ESTs possuem regulação do tipo "tudo ou nada" enquanto uma apresenta expressão basal a qual é aumentada após o tratamento. Os

Figura 17. Northern blot de clones isolados no rastreamento da biblioteca de SSH. Expressão de genes regulados pelo tratamento (T) de ST1 com ATRA (10^{-5} M) por 10h em relação à controles (C). As bandas de GAPDH e dos RNAs ribossomais 28S e 18S estão indicadas.

tamanhos aproximados dos transcritos visualizados são 4,7 Kb, 3,7 Kb e 2,5 Kb.

Apesar de, nestas condições, a indução de um dos clones não ser muito alta, ela é reprodutível. Foi confirmada pelo menos 2 vezes, com amostras de RNA obtidas de experimentos diferentes, bem como as 2 outras ESTs. A densitometria das bandas é normalização pelas intensidades das bandas de GAPDH mostra uma indução de 5 vezes.

O seqüenciamento destes 3 cDNAs foi utilizado para a busca, no banco de dados de seqüências não redundantes (nr), através do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Uma das ESTs apresentou alta homologia com *vegf* (fator de crescimento vasculo-endotelial, número de acesso U22372.1) na posição 1344-1530 Kb ($e=3 \times 10^{-57}$). A outra EST apresentou alta homologia com o gene *spi-3* (inibidor de serina proteinase 3, número de acesso gi|6678096|), na posição 643-1053 ($e=10^{-141}$). A última não possuía homologia com genes conhecidos, se alinhando apenas com uma seqüência do genoma humano (número de acesso AC007002).

5.7. Análise da seqüência do clone FIB8

A seqüência obtida no seqüenciamento do clone FIB8, foi comparada com o banco de dados do Genbank, através do programa BLAST. O alinhamento obtido está apresentado na Figura 18.

Conforme pode ser visto, a EST apresentou alta homologia com um clone genômico humano, NHO493L16 (número de acesso AC007002), no qual ainda não havia sido anotada uma seqüência expressa.

A seqüência de NHO493L16 foi usada no programa GENSCAN do MIT (ccr-081.mit.edu/GENSCAN.html), em busca da identificação das regiões expressas, bem como remoção dos “introns”. Este programa emprega

Sequences producing significant alignments:			Score	E
			(bits)	Value
gb AC007002.2 AC007002	Homo sapiens clone NH0493L16, comple...		<u>270</u>	3e-70
gb G27492.1 G27492	human STS SHGC-32318		<u>212</u>	6e-53
gb G25291.1 G25291	human STS EST226455		<u>212</u>	6e-53
gb AE003498.1 AE003498	Drosophila melanogaster genomic scaf...		<u>42</u>	0.14
gb AE003689.1 AE003689	Drosophila melanogaster genomic scaf...		<u>42</u>	0.14
gb AC022333.11 AC022333	Homo sapiens Chr3 NOVECTOR RP11-640...		<u>40</u>	0.54
gb AF152365.1 AF152365	Homo sapiens constitutive fragile re...		<u>40</u>	0.54
gb AE003829.1 AE003829	Drosophila melanogaster genomic scaf...		<u>38</u>	2.1
gb AF049236.1 AF049236	Arabidopsis thaliana putative transm...		<u>38</u>	2.1
gb AC004561.2 AC004561	Arabidopsis thaliana chromosome II s...		<u>38</u>	2.1
gb AC006019.2 AC006019	Homo sapiens PAC clone RP5-1048B16 f...		<u>38</u>	2.1
gb M62877.1 PPHDNA	Human papilloma virus type 51 genomic DN...		<u>38</u>	2.1
gb AC005965.1 AC005965	Arabidopsis thaliana BAC T19G15, fro...		<u>38</u>	2.1
gb AC005696.1 AC005696	Homo sapiens chromosome 17, clone h...		<u>38</u>	2.1
gb AC002316.1 AC002316	Homo sapiens chromosome 17, clone HC...		<u>38</u>	2.1
gb U21247.1 HSU21247	Human spumaretrovirus complete genome		<u>38</u>	2.1

Figura 18. Busca de seqüências homólogas a FIB8 no banco de dados nr, usando o programa Blast.

redes neurais e prevê os sítios de “splicing”, poli-adenilação e a posição da região promotora de clones genômicos. Ao que parece, a porção codificante do clone genômico se localiza entre as posições 7.000 e 37.000 bp do total de 140.000 bp. O fragmento clonado parece se localizar na região 3' UTR do gene. Por meio do programa, foi possível gerar uma proteína virtual que está apresentada na Figura 19.

Esta proteína foi cruzada contra o banco de dados nr, usando o BLAST novamente, e o resultado desta busca está apresentado na Figura 20.

Conforme pode ser observado, a proteína predita apresenta grande homologia (43% de identidade e 61% de similaridade) com um citocromo P450 da via de metabolização do ATRA. Isto sugeriu que a enzima clonada pudesse ser um novo membro da família de citocromos, envolvido na sua metabolização.

5.8. Construção de biblioteca de cDNA utilizando a técnica de RDA (Representational Differential Analysis)

5.8.1. Síntese de cDNA

Para construir uma biblioteca utilizando a tecnologia de RDA, os cDNAs dupla fita de células ST1 tratadas (ou não) com ATRA por 24h, foram sintetizados através do kit “Smart cDNA synthesis kit” (Clontech). Esta síntese ocorre em duas etapas: transcrição reversa do RNA com ancoramento de iniciadores 5' e 3' e amplificação, por PCR de longa distância, com "primers" para as seqüências ancoradas. Isto permite gerar cDNAs mais completos e de alta qualidade, a partir de pequenas quantidades de amostra de RNA.

Um dos cuidados importantes no PCR que se segue à síntese da primeira fita é de não ultrapassar a fase exponencial de amplificação dos

MLFEGLDLVSALATLAACLVSVTLLAVSQQLWQL
RWAATRDKSCKLPIPKGSMGFPLIGETGHWLLQG
SGFQSSRREKYGNVFKTHLLGRPLIRVTGAENVRK
ILMGEHHLVSTEWPRSTRMLLGPNTVSN SIGDIHR
NKRKVFSKIFSHEALESYLPKIQLVIQDTLRAWSSH
PEAINVYQEAQKLTFRMAIRVLLGFSIPEEDLGHLF
EVYQQFVDNVFSLPVDLPFSGYRRGIQARQILQKG
LEKAIREKLQCTQGKDYLDALDLLIESSEH GKEMT
MQELKDGTLELIFAAYATTASASTSLIMQLLKHPTVL
EKL RDELRAHGILHSGGCPCEGTLRLDTLSGLRYL
DCVIKEVMRLFTPISGGYRTVLQTFELDGFQIPKGW
SVMYSIRDTHDTAPVFKDVNVFDPDRFSQARSEDK
DGRFH YLPFGGGVRTCLGKHLAKLFLKVLAVELAS
TSRFELATRTFPRITLVPVLHPVDGLSVKFFGLDSN
QNEILPETEAMLSATV

Figura 19. Sequência da proteína virtual deduzida a partir do clone genômico NHO493L, usando o programa GENSCAN.

Figura 20. Alinhamento da proteína virtual com banco de dados nr, usando o programa BLAST.

cDNAs, o que poderia criar seqüências artefatuais, além de alterar a representatividade de cada cDNA em relação ao total. Assim, é necessária uma padronização do PCR, na qual amostras amplificadas, por diferentes números de ciclos, são separadas em gel de agarose, lado a lado, para identificação do platô. O resultado deste experimento está apresentado na Figura 21.

Na Figura 21 são visíveis arrastes de cDNA que possuem tamanho de ~0.4 kb-8Kb, mostrando uma síntese eficiente de cDNA mesmo para transcritos de alto tamanho molecular. À medida que a amplificação ultrapassa 18 ciclos, a intensidade do arraste aumenta muito pouco, sugerindo que o platô já foi atingido. Portanto, 17 ciclos foram usados para gerar os cDNAs usados no RDA.

5.8.2. *Construção das Representações*

Representação é um nome genérico usado no RDA para uma população amplificável de fragmentos de cDNAs. A representação é gerada através da digestão da população total de cDNAs, sua ligação a adaptadores específicos e amplificação por PCR. Na próxima etapa, as representações são hibridizadas, permitindo a construção de uma biblioteca de subtração.

Desta forma, os cDNAs sintetizados no item anterior foram digeridos com *Sau3AI*. Os fragmentos gerados após digestão com *Sau3AI* são apresentados na Figura 22, ao lado dos mesmos cDNAs não digeridos.

Como pode ser observado, o tamanho dos cDNAs é reduzido de 400bp-8Kb para 400bp~2Kb. Estes fragmentos foram ligados a adaptadores e, em seguida, amplificados para gerar uma quantidade grande de material que é utilizado nos passos seguintes. Esta amplificação não deve atingir o platô do PCR. Caso isto aconteça, além de enriquecer a população de cDNAs para

Figura 21. Fracionamento, em gel de 1% agarose, dos cDNAs sintetizados a partir de RNA de células ST1 tratadas (ou não) com ATRA 10^{-5} M por 24h, usando-se o kit “Smart”. Canaletas 1-4: cDNAs das células não tratadas com ATRA. Canaletas 5-8 cDNAs das células tratadas com ATRA. Canaletas 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8: 15, 18, 21 e 24 ciclos de PCR, respectivamente. PM: padrão de tamanho molecular.

Figura 22. Fracionamento, em gel de agarose 1,2%, dos cDNAs sintetizados a partir de RNA de células ST1 tratadas (ou não) com ATRA a 10^{-5} M por 24h, usando-se o kit “Smart”. Nas canaletas 3 e 4 estão os cDNAs completos gerados. Canaletas 1 e 3: cDNAs de células não tratadas com ATRA. Canaletas 2 e 4: cDNAs de células tratadas. Canaletas 1 e 2: fragmentos gerados pela digestão dos cDNAs com *Sau3AI*. PM: padrão de tamanho molecular.

fragmentos pequenos, cria distorções na representação de cada cDNA, podendo gerar artefatos.

Assim, para determinar o melhor ciclo de amplificação, alíquotas dos diversos ciclos diferentes deste PCR foram fracionadas em gel de agarose (Figura 23). Como pode ser observado nesta figura, após 16 ciclos de PCR, a massa de cDNA não apresentou aumento significativo, sugerindo que o platô foi atingido. Por este motivo, foram utilizados 15 ciclos para construção das representações.

As representações geradas foram digeridas com *Sau3AI* para remoção dos adaptadores. As amostras "Tester" foram ligadas a novos adaptadores, semelhantes aos primeiros.

5.8.3. Hibridizações e obtenção dos produtos diferenciais I e II

Na primeira hibridização foi usada uma relação de "Tester:Driver" de 1:100 (100ng:10µg). Nesta etapa, as seqüências presentes apenas na amostra Tester tendem a formar duplo-híbrido "Tester:Tester", enquanto aquelas que não são diferencialmente expressas formam principalmente híbridos Tester:Driver. Após preenchimento dos adaptadores, os híbridos "Tester:Tester" geram fitas com sítios nas duas extremidades, o que permite sua amplificação exponencial por PCR.

O produto deste PCR é o produto diferencial I (DPI). Em geral, o DPI já apresenta algum enriquecimento para seqüências diferencialmente expressas, mas ainda contém muitas seqüências não diferenciais. Este produto foi amplificado, seus adaptadores foram removidos e os fragmentos foram ligados a novos adaptadores semelhantes aos anteriores, constituindo o novo Tester. A hibridização foi repetida em uma relação de Tester:Driver 1:800 (12,5ng:10µg) e um novo produto diferencial obtido (DPII). Os resultados do

Figura 23. Fracionamento em gel de 1% agarose dos fragmentos de cDNAs das células ST1 tratadas (ou não) com ATRA a 10^{-5} M por 24h, amplificados por PCR por um número variado de ciclos. Nas canaletas 1-5 estão os cDNAs das células não tratadas (controle). Nas canaletas 6-10 estão os cDNAs das células tratadas. Canaletas 1 e 6: 10 ciclos de PCR. Canaletas 2 e 7: 12 ciclos. Canaletas 3 e 8: 14 ciclos. Canaletas 4 e 9, 15 ciclos. Canaletas 5 e 10, 16 ciclos. PM: padrão de tamanho molecular.

Figura 24. Fracionamento em gel de 1% agarose dos produtos diferenciais I e II obtidos pelo RDA. No painel A está o DPI, enquanto que o DPII está no Painel B. PM: padrão de tamanho molecular.

fracionamento dos DPI e DPII em gel de agarose 1% estão apresentados na Figura 24.

Conforme pode ser observado, o arraste de cDNA obtido em DPI apresenta um bandejamento intenso se comparado com as representações originais (Figura 23). Algumas destas bandas são intensificadas em DPII, sugerindo um enriquecimento específico de alguns fragmentos. Em DPII também pode ser notada uma intensa redução do arraste de fundo, sugerindo eliminação eficiente de seqüências não diferencialmente expressas.

Como DPII apresenta poucas bandas nítidas, sugerindo um bom enriquecimento de ESTs diferencialmente expressas, os fragmentos foram clonados, dando origem à biblioteca de subtração.

5.9. Caracterização da biblioteca de RDA

As bibliotecas de RDA se caracterizam por uma alta redundância de ESTs diferencialmente expressas, com poucos clones falso-positivos. Assim, optou-se por realizar a caracterização da biblioteca por seqüenciamento, para depois confirmar a expressão diferencial por Northern blot.

Desta forma, foram seqüenciados 35 clones da biblioteca enriquecida para genes induzidos. As regiões de boa qualidade obtidas, foram usadas em buscas no banco de dados nr. Os resultados obtidos e a freqüência de cada fragmento estão sumarizados na Tabela 5.

Como pode ser observado, alguns genes são representados por mais de uma EST. Este dado é confirmado pelo tamanho dos PCR de colônia obtidos antes do seqüenciamento. Conforme o esperado, a biblioteca obtida apresenta alta redundância, assim, dos 35 clones seqüenciados, 7 genes diferentes foram encontrados. Um dos clones obtidos apresenta homologia com DNA genômico de humano e de camundongo, o que tanto poderia representar

contaminação da biblioteca de cDNA com DNA genômico, quanto um novo gene, ainda não descrito. A busca em banco de ESTs revela que este clone apresenta homologia com outras ESTs, mas nenhuma delas foi relacionada a algum gene. Nenhum dos genes encontrados foi anteriormente descrito como regulado por ATRA.

Tabela 5 - Genes encontrados no RDA, posição de alinhamento das ESTs clonadas correspondentes e sua frequência de aparecimento.

Identidade do gene e descrição	Posição no genoma	Frequência da posição
gb BC013540.1 BC013540 Mus musculus, retinal short-chain dehydrogenase/reductase 1, clone	197-409	1
	409-524	2
gb U13053.1 MMU13053 Mus musculus Ras-like protein (kir) mRNA, compete cds	233-582	4
	637-1071	1
	1406-1469	1
gb AF215660.1 AF215660 Mus musculus CDV-3A mRNA, complete cds; alternatively spliced	2643-2917	8
	3029-3385	12
ref XM_007829.4 Homo sapiens pregnancy-induced growth inhibitor (OKL38), mRNA	516-640	1
emb AJ277957.1 RNO277957 Rattus norvegicus mRNA for aldose reductase-like protein	822-1213	3
gb AC084407.10 Mus Musculus Strain C57BL6/J Chromosome 11	89755-89471	1
gb BC003755.1 BC003755 Mus musculus, eyes absent 2 homolog (Drosophila), clone MGC:5883	1182-1586	1

5.10. Confirmação da expressão diferencial

Clones representantes dos 7 diferentes genes encontrados no seqüenciamento, foram amplificados, por PCR, e hibridizados com RNA total das células ST1 tratadas (ou não) com ATRA, em ensaios de Northern blot. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 25.

Figura 25. Northern blot de clones isolados no RDA. Expressão de genes regulados pelo tratamento (T) de ST1 com ATRA (10^{-5} M) por 24h em relação aos controles (C). As bandas de GAPDH e dos RNAs ribossomais 28S e 18S estão indicadas.

Conforme pode ser observado nesta figura, a visualização da banda do RNA ribossômico 28S indica que aproximadamente a mesma quantidade de RNA foi aplicada em todas membranas usadas. Todos os genes testados apresentam regulação de sua expressão por ATRA em células ST1. Quatro deles possuem regulação do tipo "tudo-ou-nada", enquanto que 3 são induzidos a partir de uma expressão basal.

Assim, dos 7 genes isolados pelo RDA e identificados no seqüenciamento, todos são regulados pelo ATRA nas células ST1.

5.11. Análise das seqüências dos clones regulados por ATRA

Dos 7 genes diferencialmente expressos encontrados no RDA, 2 deles (OKL38 e CDV-3A), apesar de conhecidos, não tinham função conhecida, nem possuíam dados de análise por Bioinformática na literatura. O clone Stran não apresentava homologia com genes conhecidos. Desta forma, suas seqüências foram analisadas, em busca de informações que pudessem prever suas possíveis funções.

A seqüência do clone Stran foi comparada com o genoma humano, na homepage do BLAT (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>). Nesta homepage estão organizados os dados de alinhamento do genoma humano com bancos de ESTs e os dados de dedução de genes usando programas de predição, tais como Fgenesh++ e Genescan. Através do programa Fgenesh++, foi possível deduzir um transcrito no qual a EST clonada alinha na região 3'UTR, a 40 bp do códon de término da tradução. A região codificante deste transcrito está apresentada na Figura 26.

A região codificante encontrada foi usada no programa CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>), em busca de domínios conservados em outras proteínas. Com este programa, deduziu-se que a

MAAQGAPRLLTFDFDETIVDENSDDIVRAAPGQRLPESLRATYRE
GFYNEYMQRVFKYLGEQGVRPRDLSAIYEAIPLSPGMSDLLQFVA
KQGACFEVILISDANTFGVESSLRAAGHHSLFRRILSNPSGPDARGL
LALRPFHTHSCARCPANMCKHKVLSDYLRERAHDGVHFERLFYV
GDGANDFCPMGLLAGGDVAFPRRGYPMHRLIQEAQKAEPSSFRA
SVVPWETAADVRLHLQQVLKSC

Figura 26. Sequência de aminoácidos da proteína virtual STRAN deduzida a partir do clone genômico.

possível proteína possui um domínio de Hidrolase (família das haloácido dehalogenases/epóxi-hidrolase), que se distribui por quase toda sua extensão, com um valor de E de 10^{-7} . O valor de E é um parâmetro que descreve a probabilidade de se obter um alinhamento semelhante, em um banco de dados de determinado tamanho. Quanto menor seu valor, menor a chance do alinhamento obtido ser apenas casual.

O alinhamento desta provável proteína com seqüências do banco de dados nr (de seqüências não redundantes) identifica, com 61% de identidade e $E=2 \times 10^{-91}$, uma fosfatase putativa de galinha (gi:3218467). Esta seqüência alinha, também, com 30% de identidade e $E=7 \times 10^{-23}$, com uma fosfatase ácida putativa de tomate (*Lycopersicon esculentum*).

A seqüência do gene CDV-3A foi analisada no programa CDD, no programa SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) e no Hits (<http://hits.isb-sib.ch/>), porém nenhum domínio conservado foi encontrado.

A proteína codificada por CDV-3A, deduzida a partir de sua seqüência nucleotídica, foi alinhada com o banco de dados nr, com a finalidade de encontrar proteínas homólogas. Este alinhamento identificou uma putativa proteína humana (gi:8923710) com 68% de identidade e valor de E de 2×10^{-47} . Pela alta homologia, provavelmente esta deve ser a proteína ortóloga humana de CDV-3A.

Usando o programa CDD, foi possível identificar um domínio de piridina nucleotídeo-disulfito oxiredutase entre os aminoácidos 140-350 da proteína OKL38. O valor de E nesta busca foi de 8×10^{-8} .

Esta proteína não possui homologia significativa com qualquer outra presente nos bancos testados (nr e Swissprot).

6. DISCUSSÃO

6.1. Caracterização da reversão fenotípica das células ST1 de glioma de rato

Os experimentos realizados permitiram observar que as células ST1 respondem ao tratamento com ATRA com profundas alterações morfológicas e intensa redução de crescimento em monocamada e em meio semi-sólido, caracterizando uma reversão fenotípica tumoral→normal. Esta reversão não é acompanhada pela indução de apoptose, como observado em outros modelos celulares tratados com ATRA, tais como a linhagem pró-mielocítica HL-60 e o carcinoma embrionário F9 (Martin *et al.*, 1990; Atencia *et al.*, 1994).

Os efeitos morfológicos e de redução de crescimento em monocamada de ATRA já haviam sido relatados anteriormente para as células C6 (Fischer *et al.*, 1987). Neste estudo, o autor observa uma inibição de cerca de 43% no crescimento destas células após 72h de tratamento na presença de 10% de SFB, a qual chega até 85% com a redução da concentração de soro do meio para 2%. A inibição observada em nossos experimentos nestas condições é maior (cerca de 96%). Esta diferença talvez possa ser explicada por terem sido usados experimentos diferentes para a caracterização da inibição de crescimento: o autor usa curva de crescimento, enquanto nós utilizamos incorporação de BrdU. Outra possibilidade é a diferença entre o protocolo de tratamento. Neste trabalho, o autor troca o meio das células tratadas a cada 3 dias, enquanto que trocamos e repusemos o ATRA do meio de 24 em 24h, mantendo a concentração de ATRA mais ou menos constante. A diferença poderia estar relacionada, ainda, a uma maior sensibilidade das células ST1 ao tratamento.

Efeitos semelhantes de ATRA sobre glioblastomas já foram relatados em outros trabalhos que descrevem tratamento de gliomas com ATRA tanto em monocamada, quanto em suspensão de agarose (Rutka *et al.*, 1988; Mukherjee *et al.*, 1995).

6.2. Construção das bibliotecas de subtração

6.2.1. Construção da biblioteca de SSH e rastreamento

A hibridização subtrativa permite a construção de bibliotecas enriquecidas para genes diferencialmente expressos entre duas situações diferentes. Embora existam casos na literatura onde a maior parte dos fragmentos obtidos é de expressão diferencial (Gurskaya *et al.*, 1996; Diatchenko *et al.*, 1996), o que se observa é que, em geral, apenas parte dos clones obtidos é diferencialmente expressa. Isto é dependente, entre outras coisas, dos seguintes fatores: a) número de genes diferentes entre as duas situações; b) abundância relativa dos transcritos c) nível de indução dos genes; e) complexidade do conjunto de genes expressos (quantos genes diferentes a célula expressa); f) magnitude dos níveis basais de expressão dos genes e g) enriquecimento e normalização da biblioteca (Rebrikov *et al.*, 2000; Desai *et al.*, 2000).

Assim, várias formas de rastreamento (“screening”) dos clones regulados existentes na biblioteca de subtração podem ser utilizadas. As mais comuns são: a) rastreamento de biblioteca das células estudadas usando o “pool” de fragmentos gerados como sonda e selecionando os clones com alto sinal de hibridização (kit Subtractor da empresa Invitrogen); b) seqüenciamento de DNA dos clones obtidos e análise da frequência de aparecimento de cada um, ou, simplesmente, a escolha de apenas alguns

clones interessantes para posterior confirmação por Northern (Vedoy & Sogayar, 2002); c) Northern reverso dos clones obtidos na subtração com cDNA proveniente de RNA extraído de células mantidas nas duas situações diferentes (Hedrick *et al.*, 1984; Sakaguchi *et al.*, 1986); d) rastreamento da biblioteca "Forward" usando como sonda os fragmentos da biblioteca "Reverse" e "Forward", buscando genes presentes em maior abundância na biblioteca "Forward" ou, dependendo do que se procura, ao contrário (Shi *et al.*, 2001; Diatchenko *et al.*, 1999).

Os métodos a) e c), apesar de serem eficientes em muitos casos, possuem a desvantagem de serem pouco eficientes para seqüências de baixa expressão. Isto se dá, no caso a) porque, apesar da sonda ser normalizada, a biblioteca não o é, tornando a identificação de seqüências de baixa expressão dependente do rastreamento de grande número de colônias. No caso c), como a sonda não é normalizada, seqüências de baixa expressão produzem sinal de hibridização muito fracos, atrapalhando o rastreamento (Wang & Brown, 1991). Como entre os clones aplicados à membrana, deve haver várias seqüências pouco expressas (devido à normalização), não raramente, apenas uma baixa porcentagem das seqüências colocadas na membrana produz sinais detectáveis pelo método (manual do kit "Clontech PCR-select cDNA subtraction kit").

O método b) é mais eficiente para bibliotecas onde a maior parte dos fragmentos é diferencialmente expressos, pois permite rápida identificação dos clones, evitando-se a redundância comum nestas bibliotecas muito enriquecidas, e reduzindo o número de Northern blots que deverão ser feitos para confirmação dos resultados. Já em bibliotecas pouco enriquecidas em genes de expressão diferencial, o método b) torna-se pouco eficiente, uma vez que grande parte das seqüências identificadas será descartada quanto à

expressão diferencial. Além disto, nesta situação, tempo importante pode ser perdido na tentativa de confirmação de seqüências aparentemente interessantes no modelo, mas que não são diferencialmente expressas. Outra desvantagem, ainda, é que, ao limitar a busca a genes de interesse, genes que aparentemente não tem importância no modelo estudado são deixados para trás, por vezes impedindo correlações importantes.

A metodologia d) envolve hibridização de biblioteca normalizada com sondas normalizadas, o que favorece a identificação de seqüências diferencialmente expressas, mesmo as menos abundantes (Diatchenko *et al.*, 1999). Além disto, permite rápida eliminação de genes cuja expressão não é diferencial, restringindo o trabalho à realização de Northern das seqüências positivas no “screening” e seu seqüenciamento. Como desvantagem, ela apresenta um nível maior de falso-positivos do que a metodologia c). Esta metodologia parece ser a mais apropriada para identificação dos clones procurados em bibliotecas onde o número de genes diferencialmente expressos é baixo. Assim, foi feita a opção por esta alternativa.

O rastreamento (“screening”) de “lifts” das placas de bactérias da biblioteca gera muito “background”, além de ser difícil controlar se a mesma quantidade de colônia foi transferida para réplicas da mesma placa. Em vista disto, optou-se pela realização do PCR das colônias da biblioteca e aplicação das ESTs amplificadas em membrana de nylon para o rastreamento (“screening”). Para estas aplicações foram usados o robô Hydra® e o sistema manual “Exprecision”. Dados da literatura (Nguyen *et al.*, 1995; Desprez *et al.*, 1998) mostram que utilizando macromatrizes de cDNA em membranas de nylon, semelhantes às utilizadas, é possível detectar moléculas representantes de 0,01% da população de moléculas constituintes da sonda. Esta concentração de moléculas possivelmente representa RNAs mensageiros

presentes na base de poucas dezenas por célula (Diatchenko *et al.*, 1996). Com este nível de detecção e o uso de sondas normalizadas/enriquecidas, provavelmente até mesmo transcritos mais raros poderiam ser detectados no rastreamento usado.

O “screening” realizado revelou que apenas 1% dos clones da biblioteca de SSH das células ST1 tratadas com ATRA por 10h são diferencialmente expressos. Em um estudo semelhante no qual eram procurados genes regulados por glicocorticóides nas células ST1, através de hibridização diferencial, foram rastreados 300.000 clones, dos quais 74 (0,025%) eram diferencialmente expressos (Valentini & Armelin, 1996). Nesta metodologia foi usada biblioteca não subtraída/normalizada. A eficiência 40 vezes maior na identificação de genes regulados sugere que o emprego da SSH, de fato, enriqueceu a biblioteca produzida. A redução da abundância de GAPDH em 400X após a subtração reforça esta observação.

Porém, o enriquecimento obtido não permitiu a identificação eficiente de genes diferencialmente expressos. Provavelmente, um dos principais fatores que contribui para esta baixa eficiência é a alta complexidade da expressão gênica das células ST1. RNAs de tecidos cerebrais, por possuírem uma grande quantidade de transcritos diferentes, são amostras de difícil subtração (Rebrikov *et al.* 2000). Neste ultimo trabalho, foi desenvolvida uma técnica para melhorar a eficiência da SSH denominada "seleção das moléculas com orientação especular" (MOS). Esta metodologia foi usada nas bibliotecas de SSH das células ST1 tratadas por 10h, sem melhora apreciável.

Desta forma, optou-se por empregar outra metodologia de construção de bibliotecas subtraídas que foram enriquecidas para genes diferencialmente expressos, conhecida como RDA (Hubank & Schatz, 1994).

6.2.2. Construção da biblioteca de RDA

A vantagem do SSH sobre o RDA (e outras técnicas de subtração), está em normalizar os fragmentos obtidos, reduzindo a redundância das seqüências abundantes diferencialmente expressas em relação às diferencialmente expressas que são pouco abundantes (Gurskaya *et al.*, 1996). Esta normalização permitiria que clones pouco abundantes pudessem ser clonados mais facilmente do que nas outras técnicas.

Porém, apesar da técnica de SSH ser muito eficiente em alguns modelos, ela permite que apenas 1 ciclo de subtração possa ser realizado, devido ao seu efeito de normalização. Por este motivo, um nível considerável de seqüências background ainda pode permanecer (Luo *et al.*, 1999). Isto representa uma vantagem do RDA sobre a SSH, onde vários ciclos de subtração podem ser realizados, até que um alto nível de enriquecimento de seqüências diferencialmente expressas seja atingido, com um mínimo “background”.

Além disto, o RDA, apesar de não normalizar, é capaz de identificar seqüências diferencialmente expressas que são extremamente raras, representantes de 0,0005% da amostra tester original (O'Neill & Sinclair 1997). Aparentemente, estas seqüências ficam diluídas entre as seqüências dos genes diferencialmente expressos mais abundantes, na biblioteca final. Para contornar este problema, a solução proposta é subtrair os genes diferencialmente expressos mais abundantes, após sua identificação, acrescentando-os à amostra driver (Hubank & Schatz, 1994).

Um fato interessante de se observar é que apesar de normalizar, os 3 genes diferencialmente expressos, isolados da biblioteca de SSH, apresentam alta expressão após o tratamento. Talvez o “background” de seqüências não diferencialmente expressas, devido às razões discutidas no item anterior,

tenham permanecido em nível tão alto que somente as seqüências diferenciais muito abundantes puderam ser identificadas no rastreamento de 4.000 clones.

Comparando a eficiência das duas técnicas no modelo estudado, o RDA foi muito mais efetivo na identificação de clones regulados: 100% dos clones testados se mostraram regulados em uma análise limitada de 30 clones. Estes 30 clones corresponderam a 7 genes diferentes, contra 3 do SSH. Talvez em amostras com um grande número de seqüências diferentes (alta complexidade), o RDA seja mais eficiente que a SSH em identificar genes diferencialmente expressos.

Usando adaptadores do RDA com sítios de *BsmFI*, o que permite gerar "tags" de 14 nucleotídeos como no SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), Welford e colaboradores (1998), encontraram uma diversidade de 621 ESTs distintas em sua biblioteca DAPI de RDA. Noventa por cento das diferentes ESTs testadas, equivalente a 50 seqüências, foram confirmadas como sendo diferencialmente expressas entre as duas condições testadas. A diversidade encontrada sugere que a análise de 30 clones da biblioteca seja muito limitada, indicando que uma análise posterior da biblioteca de RDA possa permitir identificar, rapidamente, outros genes envolvidos na reversão fenotípica das células ST1, induzida por ATRA. Neste mesmo artigo, o autor propõe que seqüências obtidas no RDA sejam aplicadas em micromatrizes de DNA como forma rápida de identificar um grande número de genes diferencialmente expressos (Welford *et al.*, 1998).

6.3. Genes identificados como regulados por ATRA na reversão fenotípica das células ST1

6.3.1. FIB8

A proteína predita a partir da sequência de nucleotídeos do clone genômico humano NHO493L16 possui grande similaridade (61%) com a enzima P450RAI (ou CYP26). Esta enzima é responsável pela conversão de ATRA a compostos mais polares, principalmente 4-hidroxi ácido retinóico e 4-oxo-ácido retinóico (4-oxo-ATRA) (White *et al.*, 1997). Até pouco tempo atrás, estes derivados eram considerados inativos, e sua conversão, uma forma de inativação de ATRA (Williams *et al.*, 1987). Porém, mais recentemente, foi demonstrado que 4-oxo-ATRA é capaz de se ligar ao RAR β , além de modular a especificação posicional em embriões de anfíbios (Pijnappel *et al.*, 1993). Este composto também é capaz de inibir o crescimento de células NB4 de leucemia promielocítica (Idres *et al.*, 2001). Assim, estes metabólitos de ATRA passaram a ser reconhecidos como ativos e potencialmente relacionados com os efeitos biológicos de ATRA. A constatação desta atividade também abriu a possibilidade de que metabólitos diferentes possam estar regulando processos biológicos diferentes (Pijnappel *et al.*, 1993).

Mais recentemente, foi demonstrado que além de metabolizar o ATRA, P450RAI também é capaz de metabolizar acetato de retinol (vitamina A) para 4-oxiretinol (Lane *et al.*, 1999). Esta substância é um dos principais retinóides presentes em embriões de *Xenopus* em desenvolvimento, enquanto que a forma ATRA não é detectada (Blumberg *et al.*, 1996). Isto reforça a hipótese de que os metabólitos diferentes possam apresentar funções diferentes. Este composto é capaz de ativar receptores RAR de ATRA, mas não os RXR (Achkar *et al.*, 1996).

A superexpressão desta enzima em células P19 de carcinoma embrionário, apesar de reduzir sua sensibilidade a ATRA, é capaz de, em baixas concentrações deste agente, promover sua diferenciação em neurônios. Normalmente, nestas condições de tratamento, estas células se diferenciam em células de endoderme. Este fato levou os autores a propor que os derivados hidroxilados de ATRA, gerados por ação desta enzima, possam estar relacionados com a diferenciação neuronal (Sonneveld *et al.*, 1999).

Antes que nosso resultado de identificação de FIB8 fosse enviado para publicação, um trabalho foi publicado clonando a mesma enzima, chamando-a de P450RAI-2, ou CYP26B1 (White *et al.*, 2000). Neste trabalho, foi determinado, por experimentos de ligação e cinética, que P450RAI-1 e P450RAI-2 possuem a mesma especificidade de ligante e um K_M bastante próximo. Os produtos gerados pela metabolização dos retinóides são iguais para as duas enzimas, conforme determinado por HPLC. A maior diferença entre as duas parece ser a distribuição tecidual de expressão. P450RAI-2 é expressa principalmente no cérebro em adultos (cerebelo), enquanto que P450RAI-1 é expressa nos outros tecidos mas não neste. Outros trabalhos publicados mostram que esta distribuição de expressão é bem diferente durante a organogênese (Maclean *et al.*, 2001; Abu-Abed *et al.*, 2002).

Como P450RAI-1 tem ação sobre diferenciação neuronal e P450RAI-2 é muito semelhante a ela funcionalmente, é provável que esta última também esteja envolvida em processo de diferenciação. Neste caso, seria interessante estudar o efeito da superexpressão desta enzima em células ST1, para determinar sua contribuição para a reversão fenotípica. Outra abordagem interessante seria avaliar o efeito dos metabólitos gerados por esta enzima sobre células ST1, na tentativa de estabelecer a relação de sua produção com os efeitos gerados nestas células. O tratamento com agonistas seletivos, não

metabolizados por P450RAI-2 poderia permitir a diferenciação dos efeitos gerados por ATRA e seus metabólitos.

Outra possibilidade que poderá ser avaliada nas células transfectadas é a de que esta enzima seja parte do mecanismo de metabolização de ATRA, visando à redução de sua atividade.

6.3.2. VEGF

VEGF é um fator de crescimento caracterizado por sua grande especificidade sobre células vasculo-endoteliais e sua ação angiogênica *in vivo* (Leung *et al.*, 1989). Trata-se de uma glicoproteína dimérica secretada, ligada por pontes dissulfeto, que existe em 4 formas diferentes de 121, 165, 189 e 206 aminoácidos (Ferrara *et al.*, 1992). A ativação da multiplicação das células endoteliais ocorre pela ligação de VEGF a receptores de superfície específicos flt-1 e flk-1 (De Vries *et al.*, 1992; Millauer *et al.*, 1993).

Os fatores angiogênicos produzidos por células tumorais são responsáveis por aumentar a vascularização local e, com isto, promover maior aporte de nutrientes e remoção de produtos metabólicos tóxicos produzidos. Sem sua produção, os tumores sólidos param de crescer após atingir alguns milímetros (Folkman *et al.*, 1985).

Assim, à primeira vista, a indução de VEGF por ATRA parece contraditória em relação às outras alterações observadas. Por um lado, ATRA inibe as características tumorais da célula e, por outro, promove aumento da vascularização, favorecendo o crescimento tumoral *in vivo*.

O tratamento com ATRA de ratos nos quais foram implantadas células C6 no córtex cerebral, promove redução do volume do tumor em 62% (Rodts & Black, 1994). Se VEGF for induzido de forma semelhante em células C6, os efeitos de inibição de crescimento devem suplantiar os efeitos que o maior

aporte de nutrientes promove sobre o crescimento celular. Porém, talvez o tratamento simultâneo com inibidores de receptores de VEGF e ATRA possam reduzir ainda mais o volume do tumor.

O significado da indução de VEGF pelo tratamento com ATRA talvez seja de que, sendo um agente importante durante o desenvolvimento cerebral, ATRA induza as células a se comportarem como se estivessem na fase de diferenciação embrionária da glia. Durante a embriogênese, os níveis de VEGF cerebral são altos, refletindo o desenvolvimento concomitante do cérebro e de sua vascularização (Breier *et al.*, 1992).

6.3.3. *SPI-3*

O gene *spi-3*, homólogo murino do gene humano *pi-6* (inibidor de protease 6), pertence à família dos inibidores de serina-proteases (serpinas). Esta família de proteínas está envolvida na regulação de muitos processos fisiológicos tais como fibrinólise, coagulação sanguínea, ativação do sistema complemento, remodelação tecidual, citotoxicidade mediada por célula, migração celular, diferenciação e plasticidade neuronal (Shiosaka & Yoshida, 2000; Kato *et al.* 2001).

A maioria destes inibidores é secretada, diferente de SPI-3, o qual não possui seqüência sinal de secreção, nem é encontrado extracelularmente em ensaios de imuno-histoquímica. Isto sugere que seus alvos devam ser intracelulares (Scott *et al.*, 1996). Apesar disto, SPI-3 é capaz de inibir, *in vitro*, a atividade de proteases extracelulares tais como tripsina, trombina, e uroquinase (Sun *et al.*, 1995). Até o momento, nenhuma proteinase intracelular foi identificada como sendo alvo desta proteína, sendo, seus alvos naturais, incertos.

Através de imunoprecipitação de neuropsina em extratos protéicos de hipocampo e córtex cerebral, Kato e cols, 2001 identificaram SPI-3 como sendo um potente inibidor natural desta proteinase extracelular implicada na plasticidade sináptica (Kato *et al.*, 2001). Neste trabalho, os autores propõem que a interação entre as proteínas deva acontecer antes da secreção da neuropsina, ou após sua internalização.

Outro alvo de *spi-3*, que foi identificado recentemente, é a calicreína 2 (HK2), uma protease secretada que possui 80% de identidade com os aminoácidos do antígeno prostático específico (PSA). HK2 foi recentemente identificada como marcador de câncer prostático, podendo também estar envolvida na progressão tumoral e metástase (Saedi *et al.* 2001). Os resultados deste trabalho sugerem que a interação entre SPI-3 e HK2 ocorre apenas após a liberação de SPI-3 por lise celular, uma vez a pró-HK2 não interage com *spi-3* e que a pró-enzima só é convertida em HK2 após secreção.

SPI-3 parece estar envolvido, também, em inflamação, uma vez que sua transcrição é induzida fortemente neste processo (Hill & Hastie, 1987; Le Cam & Le Cam, 1987). Reforçando esta observação, sua expressão é modulada por interleucina 1 (Chen *et al.*, 1999) e interleucina 6 (Kordula *et al.*, 1994).

Outro processo no qual este inibidor de protease pode estar envolvido é no desenvolvimento cerebral, uma vez que padrões de expressão temporal e espacialmente distintos, foram observados (Nakaya *et al.*, 1998).

Este último relato da literatura é muito interessante, uma vez que ATRA está envolvido no desenvolvimento do sistema nervoso central podendo, portanto, estar regulando genes envolvidos na diferenciação de células ST1.

A relação entre o aumento da expressão de SPI-3 e a reversão fenotípica das células ST1 induzida por ATRA, ainda não é bem compreendida. Talvez a

busca dos alvos de SPI-3, por sistema duplo híbrido ou mesmo por imunoprecipitação, seguida de identificação de proteínas ligantes, possa levar a um maior entendimento do papel deste inibidor de protease na reversão fenotípica.

6.3.4. CDV-3A

O gene CDV-3A depositado no banco de dados ainda não foi descrito em revista científica. Na ficha do Genbank deste gene, ele está associado a um estudo que relata a clonagem de CDV-1 (Masuda *et al.*, 1997), um gene com expressão reduzida em relação ao normal, no ventrículo de camundongos com esteatose visceral juvenil (JVC). Na ficha de CDV-3A ele está como um gene de expressão aumentada no ventrículo destes camundongos. A síndrome se caracteriza por fígado gorduroso, hiperamonemia, hipoglicemia, retardo de crescimento e hipertrofia cardíaca, sendo causada pela ausência de expressão do transportador de carnitina renal (Kuwajima *et al.*, 1991). Todos estes sintomas desaparecem com o tratamento dos camundongos com carnitina (Horiuchi *et al.*, 1992).

O provável ortólogo humano deste gene foi descrito como um gene induzido pela superexpressão do proto-oncogene Her-2/neu (c-erbB-2) em células MCF-7 de tumor de glândulas mamárias e de ovário (Oh *et al.*, 1999). A superexpressão deste gene está associada com aumento de crescimento de células MCF-7 em monocamada e em suspensão (Chazin *et al.*, 1992). Neste trabalho são detectados 4 diferentes transcritos para o gene ortólogo, enquanto, em nosso modelo, só detectamos um deles.

Como não existem dados na literatura que permitam esclarecer a função do gene CDV-3A, não é possível estabelecer sua contribuição na reversão fenotípica induzida por ATRA. Ensaios de transfecção das células ST1 com

este gene poderão mostrar se ele tem ação sobre a multiplicação celular, bem como contribuir para o entendimento de sua função biológica.

6.3.5. *Aldose reductase like*

A aldose redutase-like é uma enzima recém identificada, que foi clonada por hibridização de baixo rigor com sonda para aldose redutase. Ela possui 71% de identidade com a aldose redutase e parece estar induzida em 54% dos tumores de fígado (Cao *et al.*, 1998).

A aldose redutase (E.C. 1.1.1.21) é uma enzima dependente de NADPH, que foi identificada, inicialmente, por sua capacidade de reduzir glicose a sorbitol. Posteriormente, foi visto que ela é mais eficiente na redução de vários aldeídos alifáticos e aromáticos tais como gliceraldeídos, benzaldeídos, aldeídos de piridina, etc (Inazu *et al.*, 1994). Por esta ação, tem sido envolvida em reações de detoxicação (Maser, 1995). Outra função biológica importante parece ser a de proteção em relação a perturbações anisotônicas, uma vez que é fortemente induzida em ambientes hiper-osmóticos (Mizisin *et al.*, 1996).

Recentemente, foi descrita a clonagem de uma enzima de galinha com 69% de identidade com a aldose redutase-like, que é capaz de converter todo-trans-retinal a todo-trans-retinol (Crosas *et al.*, 2001).

Assim, a indução desta enzima poderia estar relacionada com um mecanismo de proteção da célula contra a produção de quantidades excessivas de ATRA, assim como retSDR1. Outra possibilidade seria a de inativar produtos tóxicos produzidos pelo metabolismo, durante a reversão fenotípica.

6.3.6. *retSDR1*

retSDR1 é uma enzima da superfamília das desidrogenases/redutases de cadeia curta, responsável pela regeneração de todo-trans-retinol a partir de todo-trans-retinal (Haeseleer *et al.*, 1998). A reação oposta faz parte do primeiro passo da síntese de ATRA a partir de retinol. Esta reação reversível é considerada o passo limitante na síntese de ácido retinóico, sendo, provavelmente, um dos pontos de controle da mesma (Chai *et al.*, 1995). O segundo passo da síntese de ATRA é a conversão do todo-trans-retinal a ATRA, sendo esta uma reação irreversível (Duester, 1996).

Desta forma, a indução desta enzima parece ocorrer devido a um mecanismo de proteção da célula à produção de quantidades excessivas de ATRA, uma vez que a forma todo-trans-retinol não se liga aos receptores de ATRA (Gudas, 1992).

6.3.7. *Stran*

O clone *Stran* corresponde a um novo gene que não havia sido descrito anteriormente. A seqüência protéica putativa deste gene apresenta um domínio de hidrolase que compreende quase toda sua extensão.

A família das hidrolases se divide em halo-alcane dehalogenases e haloácido dehalogenases (HAD). O domínio encontrado em *Stran* é característico das HADs. As HADs constituem uma família grande de proteínas com especificidades para diferentes substratos. Fazem parte desta família epóxido-hidrolases, fosfoglicolato fosfatases, histidinol fosfato fosfatases, nitrofenil fosfatases e um número grande de proteínas novas ainda não caracterizadas funcionalmente (Koonin & Tatusov, 1994).

O alinhamento da proteína com o banco nr identificou uma fosfatase putativa de galinha (61% identidade) e uma fosfatase ácida de tomate (31% de identidade).

A fosfatase putativa de galinha foi identificada, por “differential display”, como sendo induzida em condrócitos em diferenciação (Houston *et al.*, 1999). Neste estudo, comparando a expressão desta enzima em vários tecidos, foi constatado que, apesar de ser expressa de forma ubíqua, ela é 100 X mais expressa em condrócitos hipertróficos do que em tecidos não-condrogênicos. Nenhum ensaio funcional foi realizado para comprovar a atividade de fosfatase da proteína, nem para identificar seus substratos.

LEPS2, a fosfatase ácida de tomate, foi clonada a partir de uma biblioteca de cDNAs enriquecida para genes induzidos pela falta de fosfato, construída por hibridização subtrativa (Baldwin *et al.*, 2001). A depleção rápida e acentuada de fosfato promove a indução da enzima, sugerindo que deve estar envolvida na manutenção dos níveis de fosfato livre. Esta proteína foi expressa em bactérias e a atividade de fosfatase, apesar de baixa, foi confirmada.

Assim, a homologia com estas duas enzimas sugere fortemente que Stran seja uma nova fosfatase. Porém, como o domínio de hidrolase compreende quase toda sua extensão, parte da homologia pode estar associada ao compartilhamento deste domínio com estas enzimas.

O domínio de hidrolase também é compartilhado pelas epóxido-hidrolases. Estas enzimas adicionam água aos epóxidos, formando os dióis correspondentes (Koonin & Tatusov, 1994). Como o ATRA pode ser metabolizado a epóxidos (McCormick *et al.*, 1980), a possibilidade de esta enzima estar envolvida na metabolização destes epóxidos deve ser avaliada.

Os mecanismos de eliminação destes compostos não são bem conhecidos fora do fígado.

A expressão de Stran em sistema bacteriano, ou em células de inseto, permitirá a comprovação da atividade desta nova enzima, bem como a busca de seus substratos específicos.

O envolvimento desta enzima na reversão fenotípica das células ST1 também deverá ser avaliado através de ensaios de inibição de sua expressão “antisense” durante a reversão fenotípica e superexpressão em células não tratadas.

6.3.8. GEM/Kir

A superfamília das proteínas GTPásicas monoméricas semelhantes a Ras é classificada em 6 subgrupos principais: famílias Ras, Rho, Rab, Ran, Arf e RGK (Bourne *et al.*, 1991; Finlin & Andrés, 2000). Esta última família é nova, sendo nomeada pelas GTPases Rad, Gem e Kir (RGK). Ela difere das outras famílias por uma série de características.

As RGKs possuem modificações significativas nos domínios G3, importante para a ligação a GTP, e em G2, responsável pela comunicação com as proteínas efetoras (Maguire *et al.*, 1994; Finlin *et al.*, 1997). Outra diferença é que elas apresentam notáveis extensões C e N-terminal do core protéico de Ras. A extensão C-terminal inclui um sítio de ligação de calmodulina, o qual conecta estas proteínas à via de sinalização de cálcio (Fischer *et al.*, 1996; Moyers *et al.*, 1997). O N-terminal possui uma provável função regulatória sobre o C-terminal, estando envolvido na localização celular (Moyers *et al.*, 1997). Este grupo não apresenta sítio de isoprenilação, aparentemente não sofrendo nenhum tipo de alteração lipídica, as quais são importantes no ancoramento, na membrana, das outras proteínas semelhantes

a Ras (Bilan *et al.*, 1998). Uma característica importante deste grupo é sua regulação transcricional em diferentes situações fisiológicas, que é incomum nos outros membros da superfamília (Cohen *et al.* 1994; Maguire *et al.*, 1994; Finlin & Andrés 1997).

GEM apresenta 98,4% de identidade nucleotídica com Kir, diferindo significativamente apenas em sua região 5'UTR (Cohen *et al.*, 1994). Rad possui 61% de identidade protéica com Gem (Maguire *et al.*, 1994).

Gem foi clonada inicialmente como sendo um dos genes induzidos por ativação mitogênica de células T (Zipfel *et al.*, 1989). Em um estudo posterior do mesmo grupo, o efeito da superexpressão desta GTPase no crescimento celular foi analisado em células 3T3 (Maguire *et al.* 1994). Os resultados obtidos mostram uma intensa redução (de cerca de 1.000 vezes) no número de clones selecionados na transfecção de GEM em relação ao vetor vazio, o que sugere que este gene pode estar envolvido no crescimento celular.

A superexpressão desta proteína em neuroblastoma é capaz de promover achatamento celular e extensão de neuritos, o que sugere que ela pode estar envolvida na diferenciação morfológica ou/e reorganização de citoesqueleto (Leone *et al.*, 2001). Similarmente, Ges, um novo membro da família das RGKs, quando superexpresso em células endoteliais, promove achatamento celular e o aparecimento de extensões citoplasmáticas. O achatamento celular é acompanhado por reorganização das fibras de actina do citoesqueleto, evidenciada por coloração com rodamina-faloidina. A transfecção de um dominante negativo de Ges inibe o achatamento celular destas células induzida por Matrigel, mostrando que a função normal deste gene é essencial para que ocorra este fenômeno (Pan *et al.*, 2000).

Na busca do entendimento da função de Gem, algumas proteínas foram identificadas como interagindo fisicamente com ela. Através de análise por

"gel-shift", Fischer e colaboradores mostraram a interação desta proteína com calmodulina, de uma maneira cálcio-dependente. Esta ligação parece inibir em 40% sua capacidade de ligação com GTP (Fischer *et al.*, 1996). Em outro trabalho, foi demonstrado que, *in vitro*, Gem é fosforilada por ação da proteína quinase dependente de calmodulina (Moyers *et al.*, 1997). Estes dois estudos sugerem que Gem pode participar na via de transdução de sinal de Ca^{2+} .

Usando a técnica de imunofluorescência, foi possível determinar que Gem se associa com actina e microtúbulos do citoesqueleto (Piddini *et al.*, 2001). Neste mesmo estudo, usando o sistema de duplo-híbrido foi descoberta a interação entre Gem e a cinesina 9 (KIF9). KIF9 é uma proteína motriz hipotética, associada a microtubulos, que poderia participar da reorganização do citoesqueleto promovida por Gem.

Outro trabalho mostra que NM23, uma putativa proteína supressora de metástase é capaz de catalizar a trans-fosforilação do GDP ligado a Gem para GTP, modulando sua ativação (Zhu *et al.*, 1999).

Além da via de cálcio, análise genética da superexpressão de Kir/Gem em leveduras, sugere que esta proteína pode ativar a via de MAP quinase, resultando no desenvolvimento de pseudo-hifas (Dorin *et al.*, 1995).

Desta forma, aparentemente, Gem pode participar na reversão fenotípica das células ST1 contribuindo para o achatamento celular e inibição de crescimento em suspensão induzidos por ATRA. Como parece interagir com vias importantes de crescimento, talvez possa atuar, ainda, sobre crescimento em monocamada e diferenciação destas células. Experimentos de inibição da expressão deste gene com "antisense" durante o tratamento e/ou superexpressão em células não tratadas poderão comprovar estas possibilidades.

6.3.9. *EYA2*

O gene *Eya2* (eyes absent 2) é um dos genes de mamífero que são ortólogos do gene *Eya* de *Drosófila*. Este gene, juntamente com *So* (ortólogo dos membros da família *Six* de mamífero), *Ey* (ortólogo dos membros da família *Pax*), *Dac* (ortólogo de *Dach1* e *Dach2*), faz parte do mecanismo complexo que regula a formação de olhos em *Drosófila*. Este mecanismo é conservado evolutivamente em mamíferos, sendo, porém, mais complexo devido à existência de uma grande quantidade de ortólogos (Hanson *et al.*, 2001).

A expressão ectópica de *Eya* é capaz de promover a formação de olhos ectópicos em *Drosófila* (Bonini *et al.*, 1997). Similarmente, a perda de sua função, resulta em *Drosófilas* sem olhos (Leiserson *et al.*, 1994). Estes fatos indicam sua importância no mecanismo de morfogênese dos olhos. Juntamente com os membros descritos acima é considerado um gene mestre no controle da formação dos olhos (Halder *et al.*, 1995).

Mais recentemente, *Eya2*, e outros membros da via de desenvolvimento do olho, foram associados, também, a miogênese em mamíferos (Heanue *et al.*, 1999; Ridgeway & Skerjank, 2001), o que mostra que esta via pode estar envolvida na diferenciação de outros tecidos.

A família *Eya* (*Eya1*, *Eya2*, *Eya3* e *Eya4*) possui um domínio de 271 aminoácidos na porção C-terminal, que é altamente conservado, sendo conhecido como domínio *Eya*. Este domínio medeia a interação com o domínio *Six*, presente na família *Six* e com as proteínas da família *Dach* (Ohto *et al.*, 1999).

Acredita-se que *So* e *Eya* sejam duas metades de um fator de transcrição, onde *So* fornece o domínio de ligação ao DNA (homeodomínio) e *Eya* forneça o domínio (região N-terminal) de trans-ativação (Pignoni *et al.*,

1997). Esta observação é reforçada pela constatação de que Eya2 em mamíferos é citoplasmático, migrando para o núcleo apenas após interação com membros da família Six (Ohto *et al.*, 1999).

Os mecanismos de controle da atividade deste complexo transcricional começaram a ser descobertos recentemente. Usando o sistema de duplo-híbrido, Fan e colaboradores, 2000 identificaram Eya2 como ligante da subunidade $G\alpha_z$ de proteína G heterotrimérica. A ligação desta subunidade ativada com Eya2, inibe sua interação com membros da família Six, inibindo a atividade transcricional do complexo (Fan *et al.*, 2000).

Hsiao e colaboradores, localizaram um sítio de fosforilação por MAPK na sequência das proteínas da família Eya (Hsiao *et al.*, 2001). Uma mutação sítio dirigida, que elimina este sítio, é capaz de reduzir a capacidade de Eya induzir a formação de olhos ectópicos em *Drosófila*. Outra mutação no resíduo de serina do sítio para ácido aspártico, visando mimetizar a carga negativa associada ao grupo fosfato, aumenta esta capacidade de Eya. Este trabalho mostra que a fosforilação mediada por MAPK ativa a função de Eya.

A identificação deste gene como sendo regulado por ATRA em células ST1 sugere fortemente que o processo de reversão fenotípica pode envolver a ativação de uma via de diferenciação destas células. Zhang e colaboradores, mostraram que as células C6 tratadas com AMPc passam a expressar GFAP (proteína ácida fibrosa de glia), e quando tratadas com ATRA, passam a expressar PLP (proteína proteolipídica mielínica) (Zhang *et al.*, 2001). A primeira é um marcador de diferenciação terminal de astrócitos, enquanto que a segunda é um marcador de diferenciação de oligodendrócito.

Assim, aparentemente, o tratamento com ATRA pode estar induzindo a diferenciação das células ST1 em oligodendrócitos. Neste caso, Eya2 parece ser um fator importante nesta indução. Este é o primeiro indício, na literatura,

do envolvimento de Eya2 na diferenciação de células de glia e de sua regulação por ATRA. A indução da expressão de PLP durante a reversão fenotípica deverá ser testada em ensaios de Northern blot. Seria interessante, também, verificar se a indução de diferenciação para astrócitos também induz este gene.

Como Eya2 precisa interagir com membros da família Six e Dach para exercer sua função, é interessante analisar a expressão destes genes na célula ST1, na tentativa de definir os componentes do mecanismo da diferenciação induzida por ATRA.

A observação de que Gem ativa a via de MAPK (Dorin *et al.*, 1995) e que a via de MAPK ativa Eya2 (Hsiao *et al.*, 2001), torna interessante o estudo desta via durante o processo de reversão fenotípica.

A transdução de Eya2 para células ST1 permitirá determinar se esta proteína pode, sozinha, induzir a diferenciação das células ST1, para esclarecer seu papel na parada de crescimento destas células.

6.3.10. OKL38

OKL38 é um gene novo, recém descrito, havendo, na literatura, apenas 1 trabalho publicado (Huynh *et al.*, 2001). Neste trabalho, OKL38 foi identificado, pela técnica de “differential display”, como sendo induzido na glândula mamária de ratas prenhas. A expressão deste gene é muito baixa em linhagens celulares de tumores de mama, sendo quase que completamente inibida em tumores desta glândula, induzidos por dimetilantracenos. Sua superexpressão na linhagem MCF-7 de tumor mamário, promove redução acentuada de crescimento em monocamada e redução da formação de tumores em camundongos nude. Devido a estas características os autores concluem que ele deve ser um novo gene supressor de tumor.

Em busca de domínios conservados que pudessem sugerir sua função biológica, identificamos um domínio de piridina nucleotídeo-disulfito oxiredutase ($E=10^{-6}$, entre os aminoácidos 140-315), usando o programa CD. Nenhum domínio de localização nuclear foi encontrado, sugerindo sua localização citoplasmática. Segundo a ficha do PFAM (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF00070>), o domínio encontrado é um domínio de ligação de NADH e FAD que está presente em uma família de proteínas que incluem as oxiredutases de classes I e II, as NADH oxidases e as peroxidases. Pertencem a esta família, as proteínas glutathione redutase e tioredoxina redutase. Estas enzimas estão relacionadas com a regulação dos níveis de radicais reativos de oxigênio intracelulares.

Assim, aparentemente, este gene pode estar relacionado, diretamente, com a parada de crescimento induzida por ATRA nas células ST1. Ensaios de superexpressão deste gene nas células ST1 poderá mostrar se possui o mesmo efeito de redução de crescimento que possui em MCF-7, além de contribuir para desvendar sua função biológica.

6.4. Comentário geral

As técnicas utilizadas, no desenvolvimento desta tese, permitiram identificar alguns dos genes relacionados com a diferenciação/reversão fenotípica das células ST1 induzida por ácido retinóico. O número de genes identificados ainda é baixo para a construção dos mecanismos moleculares envolvidos neste complexo fenômeno biológico. Apesar disto, forneceram importantes "insights" sobre as vias e processos envolvidos e permitiram a clonagem de genes novos, além de apontarem possíveis alvos para desenvolvimento de novas drogas e terapia gênica para gliomas.

A continuidade do rastreamento em larga escala das bibliotecas construídas, utilizando seqüenciamento automatizado e micromatrizes de cDNA, revelará novos genes envolvidos na reversão, além de fornecer dados sobre suas cinéticas de regulação. Se isto for feito paralelamente com o uso de micromatrizes de cDNA comerciais, aumentará, ainda mais, a velocidade de identificação dos genes envolvidos.

Futura análise funcional dos genes encontrados e ensaios de duplo híbrido permitirão delinear os mecanismos moleculares responsáveis pela reversão fenotípica das células ST1 de glioma de rato induzidas por ácido retinóico.

Diversas destas propostas estão contidas no projeto temático FAPESP N°01/10707-7 e estarão sendo atacadas pela equipe do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do IQ-USP, nos próximos anos.

7. CONCLUSÕES

- ATRA promove profundas alterações fenotípicas nas células ST1, caracterizadas por forte inibição de crescimento em monocamada e suspensão e achatamento celular, promovendo uma reversão fenotípica tumoral-normal.
- Foi possível estabelecer as metodologias de SSH e RDA, e utilizá-las para a clonagem de genes regulados por ATRA na reversão das células ST1.
- Após rastreamento de 4.000 clones, obtidos por SSH, foram clonados 3 genes diferencialmente expressos induzidos pelo tratamento com ATRA por 10h.
- O rastreamento limitado de 30 clones obtidos no RDA, permitiu identificar 7 genes induzidos por ATRA nas células ST1. Continuação posterior deste rastreamento poderá permitir a identificação de um número maior de novos genes.
- As duas metodologias (SSH e RDA) permitiram identificar genes novos, não descritos anteriormente. Um deles corresponde a uma enzima da via de metabolização de ATRA (P450RAI-2) e o outro a uma possível fosfatase.
- Nenhum dos genes identificados havia sido anteriormente relatado como sendo regulado por ATRA.
- Os genes clonados como sendo regulados por ATRA são relevantes para o modelo de glioma, podendo estar intimamente ligados aos efeitos de ATRA sobre células ST1.
- O modelo de trabalho (células ST1 de glioma de rato) se presta muito bem ao estudo molecular da ação de ATRA sobre gliomas e sobre o desenvolvimento das células de glia.

- Futura análise funcional dos genes identificados poderá permitir a construção de novas drogas anti-tumorais e/ou desenho de estratégias de terapia gênica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-ABED, S., MACLEAN, G., FRAULOB, V., CHAMBON, P., PETKOVICH, M. & DOLLE, P. Differential expression of the retinoic acid-metabolizing enzymes CYP26A1 and CYP26B1 during murine organogenesis. *Mech Dev*, 110(1-2): 173-7., 2002.
- ACHKAR, C.C., DERGUINI, F., BLUMBERG, B., LANGSTON, A., LEVIN, A.A., SPECK, J., EVANS, R.M., BOLADO, J., JR., NAKANISHI, K., BUCK, J. & ET AL. 4-Oxoretinol, a new natural ligand and transactivator of the retinoic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(10): 4879-84., 1996.
- AKBASAK, A. & SUNAR-AKBASAK, B. Oncogenes: cause or consequence in the development of glial tumors. *J Neurol Sci*, 111(2): 119-33., 1992.
- ALONSO, A., BREUER, B., STEUER, B. & FISCHER, J. The F9-EC cell line as a model for the analysis of differentiation. *Int J Dev Biol*, 35(4): 389-97., 1991.
- ANGEL, P. & KARIN, M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*, 1072(2-3): 129-57., 1991.
- ARMELIN, H.A., GAMBAARINI, A.G. & ARMELIN, M.C.S. Pituitary fibroblast growth factors and the growth of rat C6 glia cell variants. *Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation*, 9: 987-996, 1982.
- ARMELIN, M.C. & ARMELIN, H.A. Glucocorticoid hormone modulation of both cell surface and cytoskeleton related to growth control of rat glioma cells. *J Cell Biol*, 97(2): 459-65., 1983.
- ARMELIN, M.C. & ARMELIN, H.A. Steroid hormones mediate reversible phenotypic transition between transformed and untransformed states in mouse fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(6): 2805-9., 1978.
- ARMELIN, M.C., STOCCO, R.C. & ARMELIN, H.A. Control of rat C6 glioma cell proliferation: uncoupling of the inhibitory effects of hydrocortisone hormone in suspension and monolayer cultures. *J Cell Biol*, 97(2): 455-8., 1983.
- ATENCIA, R., GARCIA-SANZ, M., UNDA, F. & ARECHAGA, J. Apoptosis during retinoic acid-induced differentiation of F9 embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res*, 214(2): 663-7., 1994.
- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. Boston: John Wiley, 1999.
- BACKHOVENS, H., GHEUENS, J. & SLEGGERS, H. Expression of glial fibrillary acidic protein in rat C6 glioma relates to vimentin and is independent of cell-cell contact. *J Neurochem*, 49(2): 348-54., 1987.
- BALDWIN, J.C., KARTHIKEYAN, A.S. & RAGHOTHAMA, K.G. Leps2, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato. *Plant Physiol*, 125(2): 728-37., 2001.
- BENDA, P., LIGHTBODY, J., SATO, G., LEVINE, L. & SWEET, W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, 161(839): 370-1., 1968.
- BILAN, P.J., MOYERS, J.S. & KAHN, C.R. The ras-related protein rad associates with the cytoskeleton in a non- lipid-dependent manner. *Exp Cell Res*, 242(2): 391-400., 1998.
- BLANER, W., OLSON, J.A. Retinol and retinoic acid metabolism. In SPORN, M.B., ROBERTS, A.B., GOODMAN, D.S. **The retinoids, biology, chemistry and medicine**. New York: Raven Press, 1994, cap 5, p. 229-255.
- BLOOM, D.W., FAWCETT, J. **A Textbook of Histology**. 12th Ed. Chapman & Hall, New York, 1994.
- BLUMBERG, B., BOLADO, J., JR., DERGUINI, F., CRAIG, A.G., MORENO, T.A., CHAKRAVARTI, D., HEYMAN, R.A., BUCK, J. & EVANS, R.M. Novel retinoic acid receptor ligands in *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(10): 4873-8., 1996.
- BONINI, N.M., BUI, Q.T., GRAY-BOARD, G.L. & WARRICK, J.M. The *Drosophila* eyes absent gene directs ectopic eye formation in a pathway conserved between flies and vertebrates. *Development*, 124(23): 4819-26., 1997.
- BOURNE, H.R., SANDERS, D.A. & MCCORMICK, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349(6305): 117-27., 1991.
- BRAUNEWELL, K.H. & GUNDELFINGER, E.D. Low level expression of calcium-sensor protein VILIP induces cAMP- dependent differentiation in rat C6 glioma cells. *Neurosci Lett*, 234(2-3): 139-42., 1997.
- BREIER, G., ALBRECHT, U., STERRER, S. & RISAU, W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development*, 114(2): 521-32., 1992.
- CAO, D., FAN, S.T. & CHUNG, S.S. Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *J Biol Chem*, 273(19): 11429-35., 1998.

- CAVENEY, W.K. High-grade gliomas with chromosome 1p loss. *J Neurosurg*, 92(6): 1080-1., 2000.
- CHAI, X., BOERMAN, M.H., ZHAI, Y. & NAPOLI, J.L. Cloning of a cDNA for liver microsomal retinol dehydrogenase. A tissue-specific, short-chain alcohol dehydrogenase. *J Biol Chem*, 270(8): 3900-4., 1995.
- CHAI, X., ZHAI, Y., POPESCU, G. & NAPOLI, J.L. Cloning of a cDNA for a second retinol dehydrogenase type II. Expression of its mRNA relative to type I. *J Biol Chem*, 270(47): 28408-12., 1995.
- CHAMBON, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J*, 10(9): 940-54., 1996.
- CHAMBON, P. The molecular and genetic dissection of the retinoid signalling pathway. *Gene*, 135(1-2): 223-8., 1993.
- CHAZIN, V.R., KALEKO, M., MILLER, A.D. & SLAMON, D.J. Transformation mediated by the human HER-2 gene independent of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene*, 7(9): 1859-66., 1992.
- CHEN, M.C., SCHUIT, F., PIPELEERS, D.G. & EIZIRIK, D.L. IL-1 β induces serine protease inhibitor 3 (SPI-3) gene expression in rat pancreatic beta-cells. Detection by differential display of messenger RNA. *Cytokine*, 11(11): 856-62., 1999.
- CHIRGWIN, J.M., PRZYBYLA, A.E., MACDONALD, R.J. & RUTTER, W.J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18(24): 5294-9., 1979.
- CHOMIENNE, C., BALLERINI, P., BALITRAND, N., DANIEL, M.T., FENAUX, P., CASTAIGNE, S. & DEGOS, L. All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemias. II. In vitro studies: structure-function relationship. *Blood*, 76(9): 1710-7., 1990.
- COHEN, L., MOHR, R., CHEN, Y.Y., HUANG, M., KATO, R., DORIN, D., TAMANOI, F., GOGA, A., AFAR, D., ROSENBERG, N. & ET AL. Transcriptional activation of a ras-like gene (kir) by oncogenic tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(26): 12448-52., 1994.
- COLES, J.A. & ABBOTT, N.J. Signalling from neurones to glial cells in invertebrates. *Trends Neurosci*, 19(8): 358-62., 1996.
- CROSAS, B., CEDERLUND, E., TORRES, D., JORNVALL, H., FARRES, J. & PARES, X. A vertebrate aldo-keto reductase active with retinoids and ethanol. *J Biol Chem*, 276(22): 19132-40., 2001.
- DE LUCA, L.M. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *Faseb J*, 5(14): 2924-33., 1991.
- DE VRIES, C., ESCOBEDO, J.A., UENO, H., HOUCK, K., FERRARA, N. & WILLIAMS, L.T. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 255(5047): 989-91., 1992.
- DEFER, G.L., ADLE-BIASSETTE, H., RICOLFI, F., MARTIN, L., AUTHIER, F.J., CHOMIENNE, C., DEGOS, L. & DEGOS, J.D. All-trans retinoic acid in relapsing malignant gliomas: clinical and radiological stabilization associated with the appearance of intratumoral calcifications. *J Neurooncol*, 34(2): 169-77., 1997.
- DESAI, N.P., SOJOMI HARDJO, A., YAO, Z., RON, N. & SOON-SHIONG, P. Interpenetrating polymer networks of alginate and polyethylene glycol for encapsulation of islets of Langerhans. *J Microencapsul*, 17(6): 677-90., 2000.
- DESPREZ, T., AMSELEM, J., CABOCHE, M. & HOFTE, H. Differential gene expression in Arabidopsis monitored using cDNA arrays. *Plant J*, 14(5): 643-52., 1998.
- DIATCHENKO, L., LAU, Y.F., CAMPBELL, A.P., CHENCHIK, A., MOQADAM, F., HUANG, B., LUKYANOV, S., LUKYANOV, K., GURSKAYA, N., SVERDLOV, E.D. & SIEBERT, P.D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(12): 6025-30., 1996.
- DIATCHENKO, L., LUKYANOV, S., LAU, Y.F. & SIEBERT, P.D. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol*, 303(349-80), 1999.
- DICKMAN, E.D., THALLER, C. & SMITH, S.M. Temporally-regulated retinoic acid depletion produces specific neural crest, ocular and nervous system defects. *Development*, 124(16): 3111-21., 1997.
- DIMBERG, A., BAHRAM, F., KARLBERG, I., LARSSON, L.G., NILSSON, K. & OBERG, F. Retinoic acid-induced cell cycle arrest of human myeloid cell lines is associated with sequential down-regulation of c-Myc and cyclin E and posttranscriptional up-regulation of p27(Kip1). *Blood*, 99(6): 2199-206., 2002.
- DOBOZY, O., CSABA, G., NAGY, S.U., FEHER, T., SHAHIN, M. & HETENYI, G. Influence of hormonal imprinting on hormone level. Permanent receptor damaging effect of pituitary hormones administered to newly-hatched cockerels. *Acta Physiol Hung*, 70(1): 69-73, 1987.

- DORIN, D., COHEN, L., DEL VILLAR, K., POULLET, P., MOHR, R., WHITEWAY, M., WITTE, O. & TAMANOI, F. Kir, a novel Ras-family G-protein, induces invasive pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Oncogene*, 11(11): 2267-71., 1995.
- DOW, R., HENDLEY, J., PIRKMAIER, A., MUSGROVE, E.A. & GERMAIN, D. Retinoic acid-mediated growth arrest requires ubiquitylation and degradation of the F-box protein Skp2. *J Biol Chem*, 276(49): 45945-51., 2001.
- DRAGNEV, K.H., FREEMANTLE, S.J., SPINELLA, M.J. & DMITROVSKY, E. Cyclin proteolysis as a retinoid cancer prevention mechanism. *Ann N Y Acad Sci*, 952(13-22., 2001.
- DRAGNEV, K.H., RIGAS, J.R. & DMITROVSKY, E. The retinoids and cancer prevention mechanisms. *Oncologist*, 5(5): 361-8, 2000.
- DREXLER, H.G., QUENTMEIER, H., MACLEOD, R.A., UPHOFF, C.C. & HU, Z.B. Leukemia cell lines: in vitro models for the study of acute promyelocytic leukemia. *Leuk Res*, 19(10): 681-91., 1995.
- DUESTER, G. Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry*, 35(38): 12221-7., 1996.
- FAN, X., BRASS, L.F., PONCZ, M., SPITZ, F., MAIRE, P. & MANNING, D.R. The alpha subunits of Gz and Gi interact with the eyes absent transcription cofactor Eya2, preventing its interaction with the six class of homeodomain-containing proteins. *J Biol Chem*, 275(41): 32129-34., 2000.
- FEINBERG, A.P. & VOGELSTEIN, B. "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem*, 137(1): 266-7., 1984.
- FERRARA, N., HOUCK, K., JAKEMAN, L. & LEUNG, D.W. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*, 13(1): 18-32., 1992.
- FINLIN, B.S. & ANDRES, D.A. Rem is a new member of the Rad- and Gem/Kir Ras-related GTP-binding protein family repressed by lipopolysaccharide stimulation. *J Biol Chem*, 272(35): 21982-8., 1997.
- FINLIN, B.S., SHAO, H., KADONO-OKUDA, K., GUO, N. & ANDRES, D.A. Rem2, a new member of the Rem/Rad/Gem/Kir family of Ras-related GTPases. *Biochem J*, 347 Pt 1(223-31., 2000.
- FISCHER, I., NOLAN, C.E. & SHEA, T.B. Effects of retinoic acid on expression of the transformed phenotype in C6 glioma cells. *Life Sci*, 41(4): 463-70., 1987.
- FISCHER, R., WEI, Y., ANAGLI, J. & BERCHTOLD, M.W. Calmodulin binds to and inhibits GTP binding of the ras-like GTPase Kir/Gem. *J Biol Chem*, 271(41): 25067-70., 1996.
- FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res*, 43(175-203, 1985.
- FRAICHARD, A., CHASSANDE, O., BILBAUT, G., DEHAY, C., SAVATIER, P. & SAMARUT, J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci*, 108(Pt 10): 3181-8., 1995.
- FRESHNEY, R.I. Effects of glucocorticoids on glioma cells in culture. Minireview on cancer research. *Exp Cell Biol*, 52(5): 286-92, 1984.
- GIAUME, C. & VENANCE, L. Gap junctions in brain glial cells and development. *Perspect Dev Neurobiol*, 2(4): 335-45, 1995.
- GIMENEZ Y RIBOTTA, M., MENET, V. & PRIVAT, A. The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS. *Prog Brain Res*, 132(587-610, 2001.
- GOTTESMAN, M.E., QUADRO, L. & BLANER, W.S. Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays*, 23(5): 409-19., 2001.
- GUBITS, R.M., YU, H., CASEY, G., MUNELL, F. & VITEK, M.P. Altered genetic response to beta-adrenergic receptor activation in late passage C6 glioma cells. *J Neurosci Res*, 33(2): 297-305., 1992.
- GUDAS, L.J. Retinoids, retinoid-responsive genes, cell differentiation, and cancer. *Cell Growth Differ*, 3(9): 655-62., 1992.
- GURSKAYA, N.G., DIATCHENKO, L., CHENCHIK, A., SIEBERT, P.D., KHASPEKOV, G.L., LUKYANOV, K.A., VAGNER, L.L., ERMOLAEVA, O.D., LUKYANOV, S.A. & SVERDLOV, E.D. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem*, 240(1): 90-7., 1996.
- HAESELEER, F., HUANG, J., LEBIODA, L., SAARI, J.C. & PALCZEWSKI, K. Molecular characterization of a novel short-chain dehydrogenase/reductase that reduces all-trans-retinal. *J Biol Chem*, 273(34): 21790-9., 1998.

- HALDER, G., CALLAERTS, P. & GEHRING, W.J. New perspectives on eye evolution. *Curr Opin Genet Dev*, 5(5): 602-9., 1995.
- HANSON, I.M. Mammalian homologues of the *Drosophila* eye specification genes. *Semin Cell Dev Biol*, 12(6): 475-84., 2001.
- HEANUE, T.A., RESHEF, R., DAVIS, R.J., MARDON, G., OLIVER, G., TOMAREV, S., LASSAR, A.B. & TABIN, C.J. Synergistic regulation of vertebrate muscle development by *Dach2*, *Eya2*, and *Six1*, homologs of genes required for *Drosophila* eye formation. *Genes Dev*, 13(24): 3231-43., 1999.
- HEDRICK, S.M., COHEN, D.I., NIELSEN, E.A. & DAVIS, M.M. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature*, 308(5955): 149-53., 1984.
- HILL, D.P. & ROBERTSON, K.A. Differentiation of LA-N-5 neuroblastoma cells into cholinergic neurons: methods for differentiation, immunohistochemistry and reporter gene introduction. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2(3): 183-90., 1998.
- HILL, R.E. & HASTIE, N.D. Accelerated evolution in the reactive centre regions of serine protease inhibitors. *Nature*, 326(6108): 96-9., 1987.
- HOFMANN C., EICHELE, G. Retinoids in development. In SPORN, M.B., ROBERTS, A.B., GOODMAN, D.S. **The retinoids, biology, chemistry and medicine**. New York: Raven Press, 1994, cap 10, p. 387-441.
- HOLLAND, E.C. Progenitor cells and glioma formation. *Curr Opin Neurol*, 14(6): 683-8., 2001.
- HONG, W.K., ITRI, L.M., Retinoids and Human Cancer. In SPORN, M.B., ROBERTS, A.B., GOODMAN, D.S. **The retinoids, biology, chemistry and medicine**. New York: Raven Press, 1994, cap 15, p. 597-630.
- HONG, W.K., LIPPMAN, S.M., ITRI, L.M., KARP, D.D., LEE, J.S., BYERS, R.M., SCHANTZ, S.P., KRAMER, A.M., LOTAN, R., PETERS, L.J. & ET AL. Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 323(12): 795-801., 1990.
- HORIUCHI, M., KOBAYASHI, K., TOMOMURA, M., KUWAJIMA, M., IMAMURA, Y., KOIZUMI, T., NIKAI, H., HAYAKAWA, J. & SAHEKI, T. Carnitine administration to juvenile visceral steatosis mice corrects the suppressed expression of urea cycle enzymes by normalizing their transcription. *J Biol Chem*, 267(8): 5032-5., 1992.
- HOUSTON, B., SEAWRIGHT, E., JEFFERIES, D., HOOGLAND, E., LESTER, D., WHITEHEAD, C. & FARQUHARSON, C. Identification and cloning of a novel phosphatase expressed at high levels in differentiating growth plate chondrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1448(3): 500-6., 1999.
- HSIAO, F.C., WILLIAMS, A., DAVIES, E.L. & REBAY, I. Eyes absent mediates cross-talk between retinal determination genes and the receptor tyrosine kinase signaling pathway. *Dev Cell*, 1(1): 51-61., 2001.
- HUBANK, M. & SCHATZ, D.G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res*, 22(25): 5640-8., 1994.
- HUBANK, M., SCHATZ, D.G. Representational difference analysis of cDNA. In HUNT, S.P., LIVESY, R. **Functional genomics: A practical Approach**. Boston : Oxford University Press, 2000, cap 4, p. 45-79.
- HUYNH, H., NG, C.Y., ONG, C.K., LIM, K.B. & CHAN, T.W. Cloning and characterization of a novel pregnancy-induced growth inhibitor in mammary gland. *Endocrinology*, 142(8): 3607-15., 2001.
- IDRES, N., BENOIT, G., FLEXOR, M.A., LANOTTE, M. & CHABOT, G.G. Granulocytic differentiation of human NB4 promyelocytic leukemia cells induced by all-trans retinoic acid metabolites. *Cancer Res*, 61(2): 700-5., 2001.
- INAZU, N., NAGASHIMA, Y., SATOH, T. & FUJII, T. Purification and properties of six aldo-keto reductases from rat adrenal gland. *J Biochem (Tokyo)*, 115(5): 991-9., 1994.
- KABA, S.E., KYRITSIS, A.P., CONRAD, C., GLEASON, M.J., NEWMAN, R., LEVIN, V.A. & YUNG, W.K. The treatment of recurrent cerebral gliomas with all-trans-retinoic acid (tretinoin). *J Neurooncol*, 34(2): 145-51., 1997.
- KAST, B. The best supporting actors. *Nature*, 412(6848): 674-6., 2001.
- KATO, K., KISHI, T., KAMACHI, T., AKISADA, M., OKA, T., MIDORIKAWA, R., TAKIO, K., DOHMAE, N., BIRD, P.I., SUN, J., SCOTT, F., MIYAKE, Y., YAMAMOTO, K., MACHIDA, A., TANAKA, T., MATSUMOTO, K., SHIBATA, M. & SHIOSAKA, S. Serine proteinase inhibitor 3 and murinoglobulin I are potent inhibitors of neuropsin in adult mouse brain. *J Biol Chem*, 276(18): 14562-71., 2001.

- KISHI, H., KURODA, E., MISHIMA, H.K. & YAMASHITA, U. Role of TGF-beta in the retinoic acid-induced inhibition of proliferation and melanin synthesis in chick retinal pigment epithelial cells in vitro. *Cell Biol Int*, 25(11): 1125-9, 2001.
- KOONIN, E.V. & TATUSOV, R.L. Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity. Application of an iterative approach to database search. *J Mol Biol*, 244(1): 125-32., 1994.
- KORDULA, T., BUGNO, M., LASON, W., PRZEWLOCKI, R. & KOJ, A. Rat contrapsins are the type II acute phase proteins: regulation by interleukin 6 on the mRNA level. *Biochem Biophys Res Commun*, 201(1): 222-7., 1994.
- KOZIAN, D.H. & KIRSCHBAUM, B.J. Comparative gene-expression analysis. *Trends Biotechnol*, 17(2): 73-8., 1999.
- KUWAJIMA, M., KONO, N., HORIUCHI, M., IMAMURA, Y., ONO, A., INUI, Y., KAWATA, S., KOIZUMI, T., HAYAKAWA, J., SAHEKI, T. & ET AL. Animal model of systemic carnitine deficiency: analysis in C3H-H-2 degrees strain of mouse associated with juvenile visceral steatosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 174(3): 1090-4., 1991.
- LANE, M.A., CHEN, A.C., ROMAN, S.D., DERGUINI, F. & GUDAS, L.J. Removal of LIF (leukemia inhibitory factor) results in increased vitamin A (retinol) metabolism to 4-oxoretinol in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(23): 13524-9., 1999.
- LANGENFELD, J., KIYOKAWA, H., SEKULA, D., BOYLE, J. & DMITROVSKY, E. Posttranslational regulation of cyclin D1 by retinoic acid: a chemoprevention mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(22): 12070-4., 1997.
- LANGENFELD, J., LONARDO, F., KIYOKAWA, H., PASSALARIS, T., AHN, M.J., RUSCH, V. & DMITROVSKY, E. Inhibited transformation of immortalized human bronchial epithelial cells by retinoic acid is linked to cyclin E down-regulation. *Oncogene*, 13(9): 1983-90., 1996.
- LE CAM, G. & LE CAM, A. Synthesis of the growth hormone-regulated rat liver anti-protease GHR- P63 is inhibited by acute inflammation. *FEBS Lett*, 210(1): 1-5., 1987.
- LEE, J.C., MAYER-PROSCHEL, M. & RAO, M.S. Gliogenesis in the central nervous system. *Glia*, 30(2): 105-21., 2000.
- LEID, M., KASTNER, P. & CHAMBON, P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sci*, 17(10): 427-33., 1992.
- LEISERSON, W.M., BONINI, N.M. & BENZER, S. Transvection at the eyes absent gene of *Drosophila*. *Genetics*, 138(4): 1171-9., 1994.
- LEONE, A., MITSIADES, N., WARD, Y., SPINELLI, B., POULAKI, V., TSOKOS, M. & KELLY, K. The Gem GTP-binding protein promotes morphological differentiation in neuroblastoma. *Oncogene*, 20(25): 3217-25., 2001.
- LEUNG, D.W., CACHIANES, G., KUANG, W.J., GOEDDEL, D.V. & FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246(4935): 1306-9., 1989.
- LIANG, P. & PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257(5072): 967-71., 1992.
- LIN, F., XIAO, D., KOLLURI, S.K. & ZHANG, X. Unique anti-activator protein-1 activity of retinoic acid receptor beta. *Cancer Res*, 60(12): 3271-80., 2000.
- LIPPMAN, S.M. & HONG, W.K. 13-cis-retinoic acid and cancer chemoprevention. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 13(111-5), 1992.
- LIU, S., QU, Y., STEWART, T.J., HOWARD, M.J., CHAKRABORTTY, S., HOLEKAMP, T.F. & MCDONALD, J.W. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(11): 6126-31., 2000.
- LOUIS, D.N., CAVENEE, W. *Molecular Biology of central nervous system neoplasm*. In DEVITA, V. T., Hellman, S. **Cancer: Principles and practice of oncology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2000, p. 2013-2022.
- LOUIS, D.N., POMEROY, S.L., CAIRNCROSS, J.G., Focus on central nervous system neoplasias. *Cancer Cell*, v.1, p.125-129, 2002.
- LOVE, J.M. & GUDAS, L.J. Vitamin A, differentiation and cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 6(6): 825-31., 1994.
- LUO, J.H., PUC, J.A., SLOSBERG, E.D., YAO, Y., BRUCE, J.N., WRIGHT, T.C., JR., BECICH, M.J. & PARSONS, R. Differential subtraction chain, a method for identifying differences in genomic DNA and mRNA. *Nucleic Acids Res*, 27(19): e24., 1999.

- MACLEAN, G., ABU-ABED, S., DOLLE, P., TAHAYATO, A., CHAMBON, P. & PETKOVICH, M. Cloning of a novel retinoic-acid metabolizing cytochrome P450, Cyp26B1, and comparative expression analysis with Cyp26A1 during early murine development. *Mech Dev*, 107(1-2): 195-201., 2001.
- MAGRASSI, L., BUTTI, G., PEZZOTTA, S., INFUSO, L. & MILANESI, G. Effects of vitamin D and retinoic acid on human glioblastoma cell lines. *Acta Neurochir*, 133(3-4): 184-90, 1995.
- MAGUIRE, J., SANTORO, T., JENSEN, P., SIEBENLIST, U., YEWDELL, J. & KELLY, K. Gem: an induced, immediate early protein belonging to the Ras family. *Science*, 265(5169): 241-4., 1994.
- MAHER, E.A., FURNARI, F.B., BACHOO, R.M., ROWITCH, D.H., LOUIS, D.N., CAVENEE, W.K. & DEPINHO, R.A. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev*, 15(11): 1311-33., 2001.
- MAINTZ, D., FIEDLER, K., KOOPMANN, J., ROLLBROCKER, B., NECHEV, S., LENARTZ, D., STANGL, A.P., LOUIS, D.N., SCHRAMM, J., WIESTLER, O.D. & VON DEIMLING, A. Molecular genetic evidence for subtypes of oligoastrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56(10): 1098-104., 1997.
- MARTIN, S.J., BRADLEY, J.G. & COTTER, T.G. HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis. *Clin Exp Immunol*, 79(3): 448-53., 1990.
- MASER, E. Xenobiotic carbonyl reduction and physiological steroid oxidoreduction. The pluripotency of several hydroxysteroid dehydrogenases. *Biochem Pharmacol*, 49(4): 421-40., 1995.
- MASUDA, M., KOBAYASHI, K., HORIUCHI, M., TERAONO, H., YOSHIMURA, N. & SAHEKI, T. A novel gene suppressed in the ventricle of carnitine-deficient juvenile visceral steatosis mice. *FEBS Lett*, 408(2): 221-4., 1997.
- MATSUOKA, I., MIZUNO, N. & KURIHARA, K. Cholinergic differentiation of clonal rat pheochromocytoma cells (PC12) induced by retinoic acid: increase of choline acetyltransferase activity and decrease of tyrosine hydroxylase activity. *Brain Res*, 502(1): 53-60., 1989.
- MCBURNEY, M.W. P19 embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Biol*, 37(1): 135-40., 1993.
- MCCAFFERY, P. & DRAGER, U.C. Regulation of retinoic acid signaling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor. *Cytokine Growth Factor Rev*, 11(3): 233-49., 2000.
- MCCORMICK, A.M., NAPOLI, J.L., YOSHIKAWA, S. & DELUCA, H.F. 5,6-epoxyretinoic acid is a physiological metabolite of retinoic acid in the rat. *Biochem J*, 186(2): 475-81., 1980.
- MILLAUER, B., WIZIGMANN-VOOS, S., SCHNURCH, H., MARTINEZ, R., MOLLER, N.P., RISAU, W. & ULLRICH, A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*, 72(6): 835-46., 1993.
- MIZISIN, A.P., LI, L., PERELLO, M., FRESHWATER, J.D., KALICHMAN, M.W., ROUX, L. & CALCUTT, N.A. Polyol pathway and osmoregulation in JS1 Schwann cells grown in hyperglycemic and hyperosmotic conditions. *Am J Physiol*, 270(1 Pt 2): F90-7., 1996.
- MOYERS, J.S., BILAN, P.J., ZHU, J. & KAHN, C.R. Rad and Rad-related GTPases interact with calmodulin and calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem*, 272(18): 11832-9., 1997.
- MUINDI, J., FRANKEL, S.R., MILLER, W.H., JR., JAKUBOWSKI, A., SCHEINBERG, D.A., YOUNG, C.W., DMITROVSKY, E. & WARRELL, R.P., JR. Continuous treatment with all-trans retinoic acid causes a progressive reduction in plasma drug concentrations: implications for relapse and retinoid "resistance" in patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 79(2): 299-303., 1992.
- MUKHERJEE, P. & DAS, S.K. Action of retinoic acid on human glioblastoma-astrocytoma-14 cells in culture. *Neoplasma*, 42(3): 123-8, 1995.
- MULDER, G.D. & VANDE BERG, J.S. Cellular senescence and matrix metalloproteinase activity in chronic wounds. Relevance to debridement and new technologies. *J Am Podiatr Med Assoc*, 92(1): 34-7., 2002.
- MUTO, Y., MORIWAKI, H., NINOMIYA, M., ADACHI, S., SAITO, A., TAKASAKI, K.T., TANAKA, T., TSURUMI, K., OKUNO, M., TOMITA, E., NAKAMURA, T. & KOJIMA, T. Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprenoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatoma Prevention Study Group. *N Engl J Med*, 334(24): 1561-7., 1996.
- NADERI, S. & BLOMHOFF, H.K. Mad1 expression in the absence of differentiation: effect of cAMP on the B-lymphoid cell line Reh. *J Cell Physiol*, 178(1): 76-84., 1999.
- NAKAYA, N., NISHIBORI, M., WANG, Z., SAKIYAMA, J. & SAEKI, K. The expression and localization of serine proteinase inhibitor PI-6 mRNA in developmental and ischemic mouse brain. *Neurosci Res*, 32(3): 221-30., 1998.

- NGUYEN, C., ROCHA, D., GRANJEAUD, S., BALDIT, M., BERNARD, K., NAQUET, P. & JORDAN, B.R. Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. *Genomics*, 29(1): 207-16., 1995.
- NOCTOR, S.C., FLINT, A.C., WEISSMAN, T.A., DAMMERMAN, R.S. & KRIEGSTEIN, A.R. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*, 409(6821): 714-20., 2001.
- NUGENT, P., MA, L. & GREENE, R.M. Differential expression and biological activity of retinoic acid-induced TGFbeta isoforms in embryonic palate mesenchymal cells. *J Cell Physiol*, 177(1): 36-46., 1998.
- OH, J.J., GROSSHANS, D.R., WONG, S.G. & SLAMON, D.J. Identification of differentially expressed genes associated with HER-2/neu overexpression in human breast cancer cells. *Nucleic Acids Res*, 27(20): 4008-17., 1999.
- OHTO, H., KAMADA, S., TAGO, K., TOMINAGA, S.I., OZAKI, H., SATO, S. & KAWAKAMI, K. Cooperation of six and eya in activation of their target genes through nuclear translocation of Eya. *Mol Cell Biol*, 19(10): 6815-24., 1999.
- O'NEILL, M.J. & SINCLAIR, A.H. Isolation of rare transcripts by representational difference analysis. *Nucleic Acids Res*, 25(13): 2681-2., 1997.
- PAN, J.Y., FIELES, W.E., WHITE, A.M., EGERTON, M.M. & SILBERSTEIN, D.S. Ges, A human GTPase of the Rad/Gem/Kir family, promotes endothelial cell sprouting and cytoskeleton reorganization. *J Cell Biol*, 149(5): 1107-16., 2000.
- PASTORINO, U., SOZZI, G., MIOZZO, M., TAGLIABUE, E., PILOTTI, S. & PIEROTTI, M.A. Genetic changes in lung cancer. *J Cell Biochem Suppl*, 237-48, 1993.
- PFRIEGER, F.W. & BARRES, B.A. What the fly's glia tell the fly's brain. *Cell*, 83(5): 671-4., 1995.
- PHUPHANICH, S., SCOTT, C., FISCHBACH, A.J., LANGER, C. & YUNG, W.K. All-trans-retinoic acid: a phase II Radiation Therapy Oncology Group study (RTOG 91-13) in patients with recurrent malignant astrocytoma. *J Neurooncol*, 34(2): 193-200., 1997.
- PIDDINI, E., SCHMID, J.A., DE MARTIN, R. & DOTTI, C.G. The Ras-like GTPase Gem is involved in cell shape remodelling and interacts with the novel kinesin-like protein KIF9. *Embo J*, 20(15): 4076-87., 2001.
- PIGNONI, F., HU, B., ZAVITZ, K.H., XIAO, J., GARRITY, P.A. & ZIPURSKY, S.L. The eye-specification proteins So and Eya form a complex and regulate multiple steps in Drosophila eye development. *Cell*, 91(7): 881-91., 1997.
- PIJNAPPEL, W.W., HENDRIKS, H.F., FOLKERS, G.E., VAN DEN BRINK, C.E., DEKKER, E.J., EDELENBOSCH, C., VAN DER SAAG, P.T. & DURSTON, A.J. The retinoid ligand 4-oxo-retinoic acid is a highly active modulator of positional specification. *Nature*, 366(6453): 340-4., 1993.
- REBRIKOV, D.V., BRITANOVA, O.V., GURSKAYA, N.G., LUKYANOV, K.A., TARABYKIN, V.S. & LUKYANOV, S.A. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res*, 28(20): E90., 2000.
- RICHARDSON, W.D. Oligodendrocyte development. In JESSEN, K.R., & RICHARDSON, W.D. **Glial Cell Development**. K.R. Jessen and W.D. Richardson editors. Oxford University Press, 2000.
- RIDGEWAY, A.G. & SKERJANC, I.S. Pax3 is essential for skeletal myogenesis and the expression of Six1 and Eya2. *J Biol Chem*, 276(22): 19033-9., 2001.
- RODTS, G.E., JR. & BLACK, K.L. Trans retinoic acid inhibits in vivo tumour growth of C6 glioma in rats: effect negatively influenced by nerve growth factor. *Neurol Res*, 16(3): 184-6., 1994.
- ROSS, S.A., MCCAFFERY, P.J., DRAGER, U.C. & DE LUCA, L.M. Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev*, 80(3): 1021-54., 2000.
- RUBERTE, E., DOLLE, P., CHAMBON, P. & MORRISS-KAY, G. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. II. Their differential pattern of transcription during early morphogenesis in mouse embryos. *Development*, 111(1): 45-60., 1991.
- RUTKA, J.T., DE ARMOND, S.J., GIBLIN, J., MCCULLOCH, J.R., WILSON, C.B. & ROSENBLUM, M.L. Effect of retinoids on the proliferation, morphology and expression of glial fibrillary acidic protein of an anaplastic astrocytoma cell line. *Int J Cancer*, 42(3): 419-27., 1988.
- SAEDI, M.S., ZHU, Z., MARKER, K., LIU, R.S., CARPENTER, P.M., RITTENHOUSE, H. & MIKOLAJCZYK, S.D. Human kallikrein 2 (hK2), but not prostate-specific antigen (PSA), rapidly complexes with protease inhibitor 6 (PI-6) released from prostate carcinoma cells. *Int J Cancer*, 94(4): 558-63., 2001.

- SAKAGUCHI, N., BERGER, C.N. & MELCHERS, F. Isolation of a cDNA copy of an RNA species expressed in murine pre-B cells. *Embo J*, 5(9): 2139-47., 1986.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATS, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SASAHARA, R.M., Efeito anti-tumorigênico de hormônios glucocorticóides sobre células C6 de glioma de rato: bases moleculares. São Paulo, 1995, 93p.
- SCHENA, M., SHALON, D., DAVIS, R.W. & BROWN, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235): 467-70., 1995.
- SCHMIDT, F., GROSCURTH, P., DICHGANS, J. & WELLER, M. Human malignant glioma cell lines are refractory to retinoic acid-mediated differentiation and sensitization to apoptosis. *Cell Physiol Biochem*, 10(3): 159-68, 2000.
- SCHUMMER, M., NG, W., NELSON, P.S., BUMGARNER, R.E. & HOOD, L. Inexpensive handheld device for the construction of high-density nucleic acid arrays. *Biotechniques*, 23(6): 1087-92., 1997.
- SCOTT, F.L., COUGHLIN, P.B., BIRD, C., CERRUTI, L., HAYMAN, J.A. & BIRD, P. Proteinase inhibitor 6 cannot be secreted, which suggests it is a new type of cellular serpin. *J Biol Chem*, 271(3): 1605-12., 1996.
- SHI, J., CAI, W., CHEN, X., YING, K., ZHANG, K. & XIE, Y. Identification of dopamine responsive mRNAs in glial cells by suppression subtractive hybridization. *Brain Res*, 910(1-2): 29-37., 2001.
- SHIOSAKA, S. & YOSHIDA, S. Synaptic microenvironments--structural plasticity, adhesion molecules, proteases and their inhibitors. *Neurosci Res*, 37(2): 85-9., 2000.
- SOARES, M.B. Identification and cloning of differentially expressed genes. *Curr Opin Biotechnol*, 8(5): 542-6., 1997.
- SONNEVELD, E., VAN DEN BRINK, C.E., TERTOOLEN, L.G., VAN DER BURG, B. & VAN DER SAAG, P.T. Retinoic acid hydroxylase (CYP26) is a key enzyme in neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *Dev Biol*, 213(2): 390-404., 1999.
- SPINELLA, M.J., FREEMANTLE, S.J., SEKULA, D., CHANG, J.H., CHRISTIE, A.J. & DMITROVSKY, E. Retinoic acid promotes ubiquitination and proteolysis of cyclin D1 during induced tumor cell differentiation. *J Biol Chem*, 274(31): 22013-8., 1999.
- SUN, J., COUGHLIN, P., SALEM, H.H. & BIRD, P. Production and characterization of recombinant human proteinase inhibitor 6 expressed in *Pichia pastoris*. *Biochim Biophys Acta*, 1252(1): 28-34., 1995.
- TAKAHASHI, J., PALMER, T.D. & GAGE, F.H. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J Neurobiol*, 38(1): 65-81., 1999.
- THOMAS, P.S. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(9): 5201-5., 1980.
- TORRESON, H., MATA DE URQUIZA, A., FAGERSTROM, C., PERLMANN, T. & CAMPBELL, K. Retinoids are produced by glia in the lateral ganglionic eminence and regulate striatal neuron differentiation. *Development*, 126(6): 1317-26., 1999.
- VALENTINI, S.R. & ARMELIN, M.C. Cloning of glucocorticoid-regulated genes in C6/ST1 rat glioma phenotypic reversion. *J Endocrinol*, 148(1): 11-7., 1996.
- VALENTINI, S.R., OLIVEIRA, M.L., SASAHARA, R.M. & ARMELIN, M.C. Glucocorticoid-regulated gene in transformed to normal phenotypic reversion. *Braz J Med Biol Res*, 27(2): 541-6., 1994.
- VEDOY, C.G., BENGTSON, M.H. & SOGAYAR, M.C. Hunting for differentially expressed genes. *Braz J Med Biol Res*, 32(7): 877-84., 1999.
- VEDOY, C.G., SOGAYAR, M.C., Isolation and characterization of genes associated with the antitumor activity of glucocorticoids. *Mol. Brain Research in press*, 2002.
- VELCULESCU, V.E., ZHANG, L., VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K.W. Serial analysis of gene expression. *Science*, 270(5235): 484-7., 1995.
- VILLABLANCA, J.G., KHAN, A.A., AVRAMIS, V.I., SEEGER, R.C., MATTHAY, K.K., RAMSAY, N.K. & REYNOLDS, C.P. Phase I trial of 13-cis-retinoic acid in children with neuroblastoma following bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*, 13(4): 894-901., 1995.
- WAINWRIGHT, L.J., LASORELLA, A. & IAVARONE, A. Distinct mechanisms of cell cycle arrest control the decision between differentiation and senescence in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(16): 9396-400., 2001.
- WANG, Z. & BROWN, D.D. A gene expression screen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(24): 11505-9., 1991.

- WELFORD, S.M., GREGG, J., CHEN, E., GARRISON, D., SORESENSEN, P.H., DENNY, C.T. & NELSON, S.F. Detection of differentially expressed genes in primary tumor tissues using representational differences analysis coupled to microarray hybridization. *Nucleic Acids Res*, 26(12): 3059-65., 1998.
- WHITE, J.A., BECKETT-JONES, B., GUO, Y.D., DILWORTH, F.J., BONASORO, J., JONES, G. & PETKOVICH, M. cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. *J Biol Chem*, 272(30): 18538-41., 1997.
- WHITE, J.A., RAMSHAW, H., TAIMI, M., STANGLE, W., ZHANG, A., EVERINGHAM, S., CREIGHTON, S., TAM, S.P., JONES, G. & PETKOVICH, M. Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans-retinoic acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(12): 6403-8., 2000.
- WILLIAMS, J.B., SHIELDS, C.O., BRETTEL, L.M. & NAPOLI, J.L. Assessment of retinoid-induced differentiation of F9 embryonal carcinoma cells with an enzyme-linked immunoadsorbent assay for laminin: statistical comparison of dose-response curves. *Anal Biochem*, 160(2): 267-74., 1987.
- WILLY, P.J., & MANGELSDORF, D.J. Nuclear Orphan Receptors: the search for novel ligands and signaling pathways. In O'MALLEY, B.T. **Hormones and signaling**. San Diego: Academic Press, 1998, vol. 1, p.307-358.
- YANG-YEN, H.F., CHIU, R. & KARIN, M. Elevation of AP1 activity during F9 cell differentiation is due to increased c-jun transcription. *New Biol*, 2(4): 351-61., 1990.
- YU, V.C., DELSERT, C., ANDERSEN, B., HOLLOWAY, J.M., DEVARY, O.V., NAAR, A.M., KIM, S.Y., BOUTIN, J.M., GLASS, C.K. & ROSENFELD, M.G. RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell*, 67(6): 1251-66., 1991.
- YUE, J. & MULDER, K.M. Transforming growth factor-beta signal transduction in epithelial cells. *Pharmacol Ther*, 91(1): 1-34., 2001.
- YUNG, W.K., KYRITSIS, A.P., GLEASON, M.J. & LEVIN, V.A. Treatment of recurrent malignant gliomas with high-dose 13-cis-retinoic acid. *Clin Cancer Res*, 2(12): 1931-5., 1996.
- YUNG, W.K., LOTAN, R., LEE, P., LOTAN, D. & STECK, P.A. Modulation of growth and epidermal growth factor receptor activity by retinoic acid in human glioma cells. *Cancer Res*, 49(4): 1014-9., 1989.
- ZELENT, A., KRUST, A., PETKOVICH, M., KASTNER, P. & CHAMBON, P. Cloning of murine alpha and beta retinoic acid receptors and a novel receptor gamma predominantly expressed in skin. *Nature*, 339(6227): 714-7., 1989.
- ZHANG, W.L., TSUNEISHI, S. & NAKAMURA, H. Induction of heat shock proteins and its effects on glial differentiation in rat C6 glioblastoma cells. *Kobe J Med Sci*, 47(2): 77-95., 2001.
- ZHU, J., TSENG, Y.H., KANTOR, J.D., RHODES, C.J., ZETTER, B.R., MOYERS, J.S. & KAHN, C.R. Interaction of the Ras-related protein associated with diabetes and the putative tumor metastasis suppressor NM23 provides a novel mechanism of GTPase regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(26): 14911-8., 1999.
- ZHU, W., KANO, M., YE, P., LASZKIEWICZ, I., ROYLAND, J.E., WIGGINS, R.C. & KONAT, G. Retinoic acid-regulated expression of proteolipid protein and myelin-associated glycoprotein genes in C6 glioma cells. *J Neurosci Res*, 31(4): 745-50., 1992.
- ZHU, W., WIGGINS, R.C. & KONAT, G.W. Glucocorticoid-induced upregulation of proteolipid protein and myelin-associated glycoprotein genes in C6 cells. *J Neurosci Res*, 37(2): 208-12., 1994.
- ZIPFEL, P.F., BALKE, J., IRVING, S.G., KELLY, K. & SIEBENLIST, U. Mitogenic activation of human T cells induces two closely related genes which share structural similarities with a new family of secreted factors. *J Immunol*, 142(5): 1582-90., 1989.