MARI CLEIDE SOGAYAR ARMELIN

ANÁLISE DO PAPEL DE HORMÔNIOS E FATORES DE
CRESCIMENTO NO CONTROLE DA PROLIFERAÇÃO
CELULAR EM MAMÍFEROS

Tese de Doutorado apresentada
ao Departamento de Bioquímica do
Instituto de Química da Universi-
dade de São Paulo.

SÃO PAULO

1977

Para Salomão e Evelyn Sogayar

Para Hugo A., Lia S. e Hugo S. Armelin

AGRADECIMENTOS

À Hugo Aguirre Armelin - amigo, companheiro e orientador desta tese.

Aos companheiros de laboratório: Angelo G. Gabarini, Sonia T.S. Funck, Sandra E. Farias, Eico Kimura e Antonio Evaldo, pela colaboração e amizade.

À Sonia T.S. Funck, pela carinhosa ajuda na manutenção dos camundongos "nude".

À Dra. Lélia Mennucci, pela generosidade com que transmitiu seus conhecimentos na determinação de CAMP.

Ao Dr. Mario Mariano (Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo) pela colaboração na análise histopatológica dos tumores.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	ix
RESUMO	xiii
SUMMARY	xvii
I. INTRODUÇÃO	1
1. Sistemas "in vivo" versus sistemas "in vitro"	1
2. Estabelecimento de células em cultura	3
3. Fatores de crescimento para células em cultura	5
4. Fatores de crescimento e ciclo celular	8
5. Ciclo celular	9
6. Análise genética de células de mamíferos em cultura	16
7. Mutantes regulatórios do crescimento celular	23
II. MATERIAL E MÉTODOS	26
1. Linhagens de células	26
2. Meios e condições de cultura	27
3. Manutenção e congelamento de estoques	28
4. Contagem de células	29
5. Medidas de incorporação de timidina ³ H em DNA	29
6. Autorradiografia e teste para detecção de micoplasma	30
7. Medidas de eficiência de plaqueamento	30
8. Clonagem de células	31
9. Determinação do índice mitótico	32
10. Determinação do cariótipo de uma linhagem de células	32
11. Ensaio de crescimento em suspensão	33
12. Estabelecimento de uma colônia de camundongos "nude"	33
13. Ensaio de tumorigenicidade e análise histopatológica dos tumores	35
14. Determinação do conteúdo intracelular de cAMP	35
15. Purificação de fatores de crescimento da pituitária (PF)	37

	Pág.
16. Tratamento de enzimas, soro e fatores de crescimento com PMSF	38
17. Protocolo para obtenção de células carencia - das para soro ou células em repouso	38
18. Ensaio para medida da atividade estimulatória da síntese de DNA	39
19. Protocolo básico para teste de variantes	39
20. Protocolo para determinação do tamanho da fase pré-replicativa (G1)	40
21. Protocolo para medida da queda de síntese de DNA	40
22. Hormônios, enzimas, inibidores e outros reagen <u>tes</u>	40
III. RESULTADOS	43
1. Atividade estimulatória da síntese de DNA por soro e fatores de crescimento	43
1.1. Atividade de soro	43
1.2. Atividades de EFG e PF	45
1.3. Resposta de células carenciadas	49
2. Análise do comportamento de células 3T3	51
2.1. Parâmetros de crescimento	51
2.2. Efeito de soro, hormônios e fatores de crescimento	53
2.3. Efeito da densidade da população sobre a resposta celular à reestimulação da sínt <u>ese</u> de DNA	55
2.4. Cinética da entrada de células em S após estimulação	60
2.5. Efeitos da diminuição da concentração de soro no meio de cultura	63
3. Análise do comportamento do mutante ST1 deriva <u>do</u> de células 3T3	65
3.1. Isolamento da linhagem ST1	65
3.2. Parâmetros de crescimento	65
3.3. Efeito de hidrocortisona	69
3.4. Análise da atividade de diversos esterói- des sobre células ST1	77

	Pág.
3.5. Ação de hidrocortisona no ciclo celular	82
3.6. Efeito de hidrocortisona sobre a reest <u>i</u> mulação de células ST1 carenciadas para soro	88
3.7. Ação de fatores de crescimento sobre c <u>e</u> lulas ST1	88
3.8. Ação de hidrocortisona sobre tumores in <u>i</u> duzidos por células ST1	93
3.9. Níveis intracelulares de cAMP em células ST1	96
3.10. Alterações morfológicas de células ST1: efeito de soro, cAMP e hidrocortisona	97
4. Análise do comportamento de células adrenais Y-1	105
4.1. Efeito de soro	105
4.2. Efeito de hormônios e fatores de cresc <u>i</u> mento	108
4.3. Efeito de ACTH e cAMP	109
4.4. Cinética da reestimulação de síntese de DNA	111
4.5. Ação de ACTH no ciclo celular	111
5. Análise do comportamento do variante AR-1 deri <u>i</u> vado de células adrenais Y-1 e resistente a ACTH	115
5.1. Isolamento da linhagem AR-1	116
5.2. Efeito de soro, hormônios e fatores de crescimento	117
5.3. Efeito de cAMP	119
IV. DISCUSSÃO	121
1. Células normais e células transformadas	121
2. Natureza dos fatores de crescimento	122
3. Fatores de crescimento e ciclo celular	125
4. Efeito de hidrocortisona no mutante ST1	125
5. Efeito de ACTH em células adrenais	131
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

ABREVIATURAS

ACTH : adrenocorticotropina
Ara C : citosina arabinosídeo
ATP : trifosfato de adenosina
BAPNA : α -N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida HCl
BSA : albumina de soro bovino
BUdR : bromodesoxiuridina
cAMP : 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina
5'-AMP : 5'-monofosfato de adenosina
cGMP : 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina
Ci : Curie ($2,2 \times 10^{12}$ dpm)
cpm : contagens por minuto; medida de radiatividade
CS : "calf serum" (soro de vitelo)
DME : "Dulbecco's modified Eagle's Minimal Medium"
DNA : ácido desoxirribonucleico
EDTA : ácido etilenodiaminotetraacético
EGF : "epidermal growth factor"
FCS : "fetal calf serum" (soro fetal bovino)
FGF : "fibroblast growth factor"
FSH : hormônio estimulador do folículo
FUdR : fluordesoxiuridina
GH : hormônio de crescimento
GMP : monofosfato de guanosina
IMP : monofosfato de inosina
LH : hormônio luteinizante
MSA : "multiplication stimulating activity"
NGF : "nerve growth factor"

NSILA : "non suppressible insulin-like activity"

OGF : "ovarian growth factor"

PBS : solução salina fosfato pH 7,0

PBSA : solução salina fosfato pH 7,0 sem Ca^{2+} e Mg^{2+}

PF : fator de crescimento extraído de pituitária

$\text{PGF}_{2\alpha}$: Prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$

PMSF : fluoreto de fenilmetilsulfonila

POPOP : 1,4-bis-2-(5-feniloxazolil)-benzeno

PPO : 2,5-difeniloxazol

RNA : ácido ribonucleico

TCA : ácido tricloroacético

Timidina ^3H : timidina tritiada

TSH : hormônio estimulador da tireóide

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar o processo pelo qual hormônios e fatores de crescimento controlam a proliferação celular em mamíferos. O modelo experimental utilizado foi linhagens de células estabelecidas em cultura. Os estudos centraram-se em dois tipos básicos de células: fibroblastos e células adrenais e o ataque experimental foi feito sob dois pontos de vista: bioquímico e genético.

O ataque bioquímico envolveu desenvolver estudos cinéticos da síntese de DNA não só durante o carenciamento de células para soro, como também durante a reestimulação de células carenciadas por: soro, hormônios e fatores de crescimento. Medidas do conteúdo intracelular de cAMP foram efetuadas com o intuito de adquirir informações à respeito do mecanismo de ação destes fatores.

Um modelo de ciclo celular foi proposto no qual o controle do crescimento seria exercido através de reguladores positivos e negativos que agiriam estimulando ou inibindo a passagem de células do estado de repouso (G_0) para a fase proliferativa. Entre os reguladores positivos (estimuladores) do sistema fibroblasto, encontra-se hormônios clássicos, como esteróides e insulina, e fatores de crescimento de natureza hormonal como EGF, PF (fator proteico extraído de glândulas pituitárias) e prostaglandina $F_{2\alpha}$. O esteróide hidrocortisona pode agir como regulador negativo, inibindo o crescimento de fibroblastos.

Medidas do período de tempo transcorrido desde a estimulação de células carenciadas (Go), até o aparecimento da onda de síntese de DNA (período definido operacionalmente como G1) foram feitas. Em fibroblastos 3T3 este período foi de 12 a 13 horas tanto para células estimuladas com soro como com hormônios clássicos (hidrocortisona, insulina) ou fatores de crescimento (EGF, PF) ou ainda com combinações deles (EGF + PF + insulina; PF + hidrocortisona; PF + hidrocortisona + insulina). No sistema células adrenais, adrenocorticotropina (ACTH) foi o único hormônio clássico que apresentou atividade sobre o crescimento destas células e também o único efetuator negativo encontrado. Neste sistema PF mostrou-se como o único fator com atividade estimulatória sobre o crescimento. G1 aqui foi de 11 horas tanto para células estimuladas com soro como com PF. Além disso os hormônios clássicos hidrocortisona e insulina não apresentaram atividade estimulatória por si só ou em combinação com PF.

A análise da ação de hidrocortisona no sistema fibroblasto e de ACTH no sistema células adrenais estimuladas, forneceu evidências de que após deixar Go, em direção a S, numa certa altura de G1 as células tornam-se irreversivelmente comprometidas com o processo replicativo. Este comprometimento parece ocorrer 5 horas antes de S, sendo referido como G1^C.

Em face destes resultados foi proposto que os reguladores agem estimulando ou inibindo a transição Go → G1^C.

Na tentativa de obter maior definição do sistema de controle do crescimento, aproveitamo-nos das vantagens oferecidas pelo modelo experimental usado, para a busca de

mutantes do tipo regulatório. Esta busca resultou no isolamento das linhagens ST1 e AR-1, derivadas, respectivamente, de fibroblastos 3T3 e células adrenais Y-1.

Entre os vários aspectos interessantes da linhagem ST1 destaca-se: a) o dramático efeito de hidrocortisona causando mudança nas características das células as quais passam de um fenótipo tipicamente transformado para normal. Este fenômeno foi observado tanto "in vitro" (através de medidas de parâmetros de crescimento) como "in vivo" (através de ensaios de tumorigenicidade); b) as alterações morfológicas de caráter antagônico provocadas, por um lado, pela adição de hidrocortisona (causando achatamento) e, por outro, pela retirada do soro ou adição de CAMP ao meio de cultura (arredondamento). Através do estudo da ação de inibidores, obteve-se evidências do envolvimento de microtúbulos nestas alterações morfológicas.

A análise do conteúdo intracelular de CAMP indicou que este nucleotídeo não atua como mediador da ação de hidrocortisona. Sua ação parece ser devida à indução de alterações no sistema superfície celular - membrana - citoesqueleto.

Ao contrário de outros variantes de células Y-1 resistentes à ACTH, células AR-1 mostraram-se também resistentes a CAMP. A utilidade destas células nos estudos da postulada mediação deste nucleotídeo na ação de ACTH, é óbvia.

SUMMARY

The aim of this work was to study the process by which hormones and growth factors control proliferation of mammalian cells. Cell lines established in culture were used as the experimental model. The studies were centered on two basic types of cells: fibroblasts and adrenal cells and the experimental approach was made from two viewpoints: biochemical and genetic.

The biochemical approach involved kinetic studies of the DNA synthesis process not only during serum starvation but also during restimulation of serum starved cells by serum, hormones and growth factors. Intracellular cyclic AMP determinations were made in order to gain informations on the mechanism of action of these factors.

A cell cycle model was proposed in which cell growth control would be exerted by positive and negative regulators that would act by stimulating or inhibiting the flow of cells from a resting state (G_0) to the proliferative phase. Among the positive regulators (stimulators) found for the fibroblast system are: classical hormones, like steroids and insulin, and growth factors of homonal nature, like EGF, PF (protein factor extracted from pituitary glands) and prostaglandin $F_{2\alpha}$. The steroid hydrocortisone can also act as a negative regulator, inhibiting fibroblast growth.

Measurements of the time interval between stimulation of serum starved (G_0) cells and the onset of DNA synthesis (period that is operationally defined as G_1) were made. In 3T3

fibroblasts this period was 12 to 13 hours for cells stimulated not only by serum but also by classical hormones (hydrocortisone, insulin) or growth factors (EGF, PF) or even by combinations of these factors (EGF + PF + insulin; PF + hydrocortisone; PF + hydrocortisone + insulin). In the adrenal system, adrenocorticotropin (ACTH) was the only classical hormone to present activity on the growth of these cells and also the only negative regulator found. In this system PF was shown to be the only factor with growth stimulatory activity. G1 was estimated as 11 hours for cells stimulated with serum or PF. Moreover hydrocortisone and insulin had no stimulatory activity "per se" or in combination with PF.

The analysis of hydrocortisone action on the fibroblast system on one hand and of that of ACTH on the adrenal system, on the other, indicated that upon leaving G₀, towards S, at a certain point in G₁, cells become irreversibly committed to the replicative process. This commitment seems to occur 5 hours before S and is referred to as G₁^C.

In view of these data we proposed that regulators act by stimulating or inhibiting the transition G₀ → G₁^C.

In an attempt to obtain a better definition of the growth control system and taking advantage of the experimental model utilized, we searched for mutants of the regulatory type. This search resulted in the isolation of the lines ST1 and AR-1 from 3T3 fibroblasts and Y-1 adrenal cells, respectively.

Among several interesting aspects of the ST1 cell line, we point out: a) the dramatic effect of hydrocortisone changing the characteristics of these cells from a typically transformed phenotype to a normal pattern. This phenomenon

was observed both "in vitro" (by measuring a number of growth parameters) and "in vivo" (by tumorigenicity assays). b) morphological alterations of antagonistic nature caused by hydrocortisone (flattening) on one hand, and by the removal of serum or cAMP addition to the culture medium (rounding) on the other. Evidence for the involvement of microtubules in these alterations were obtained through studies on the action of several inhibitors.

Quantitative analysis of intracellular cAMP indicated that this nucleotide does not act as a mediator of hydrocortisone action. Rather, this action seems to be due to the induction of alterations on the cell surface-membrane-cytoskeleton system.

Contrary to other variants of the Y-1 line which are resistant to ACTH, AR-1 cells are also resistant to cAMP. The usefulness of these cells in studies of the postulated mediation by cAMP of the ACTH action, is obvious.

I. INTRODUÇÃO

1. SISTEMAS "IN VIVO" VERSUS SISTEMAS "IN VITRO"

Num indivíduo adulto, enquanto alguns tecidos estão em contínua proliferação (como as células epiteliais da cripta do intestino delgado) outros são incapazes de se dividir (como os neurônios do tecido nervoso) e outros ainda possuem células que raramente se dividem mas que podem ser estimuladas a fazê-lo após estímulos apropriados (como o fígado após hepatectomia parcial). Além disso o crescimento de um animal constitui-se em processo altamente ordenado e regulado, onde a integração dos diversos sistemas e o delicado balanço homeostático são atingidos graças ao sistema endócrino.

A endocrinologia clássica estabeleceu o conceito de que a proliferação celular em mamíferos é controlada por reguladores endócrinos ou hormonais trópicos (gonadotropinas, estrôgeno, etc). A metodologia empregada envolvia: a) demonstração de que um dado órgão tem papel endócrino na economia do organismo. Isto era feito através da criação de uma deficiência (por ablação cirúrgica ou química) e superação da deficiência (por administração de extratos crús ou transplantes de órgãos; b) determinação da natureza química do material ativo. Uma vez disponível ponto de ensaio para medida da atividade, partir para o isolamento, purificação, identificação e eventualmente síntese da espécie ativa; c) determinação dos mecanismos de biossíntese e secreção do hormônio; d) determinação do mecanismo de ação do

hormônio (tecido alvo, número e tipos de efeitos ao nível celular e molecular).

Entretanto os estudos feitos "in vivo" apresentam uma série de dificuldades práticas as quais limitaram muito o progresso nas investigações sobre os fatores que afetam o crescimento celular assim como seus mecanismos de ação. Muitas destas dificuldades poderiam ser superadas se fosse possível isolar e manter as células-alvo em cultura. Infelizmente até o momento não se dispõe de um método definido para o estabelecimento de células-alvo para os hormônios trópicos em cultura. Porém já se pode contar com uma série de linhagens de células que apresentam, em cultura, respostas de crescimento que, no mínimo, mimetizam algumas respostas fisiológicas encontradas "in vivo". A importância dos métodos de cultura de células para a elucidação de uma série de problemas básicos da endocrinologia pode ser ilustrada com a descoberta do mecanismo de ação de GH (hormônio de crescimento) via fator de sulfatação ou somatomedina (SALMON & DAUGHADAY, 1957; HALL & VAN WYCK, 1974; UTHNE, 1973) e a descoberta e isolamento dos fatores liberadores hipotalâmicos (BURGUS et al., 1969). Além disso a disponibilidade de células isoladas e com tempo de geração relativamente curto abriu perspectivas do emprego, em mamíferos, da metodologia anteriormente desenvolvida pela genética de microrganismos.

O trabalho aqui descrito teve como objetivos gerais usar células em cultura para estudar os fatores ambientais que desencadeiam proliferação celular (hormônios clássicos, fatores de crescimento extraídos de pituitária e soro) e seus

mecanismos de ação, procurando associar ao enfoque bioquímico o enfoque genético com a busca de mutantes do tipo regulatório para células somáticas.

A fim de melhor situar o problema uma breve análise da literatura será feita.

2. ESTABELECIMENTO DE CÉLULAS EM CULTURA

Praticamente qualquer tipo de célula pode ser colocada em cultura após submeter o tecido a tratamento mecânico ou enzimático (tripsina, collagenase, etc) adequados, passando esta a constituir uma cultura primária. Estas culturas, no entanto, são de valor limitado devido a: 1º) terem curta duração podendo ser subcultivadas um número restrito de vezes; 2º) perderem rapidamente as características do tecido de origem. Este fenômeno, inicialmente aceito como desdiferenciação, colocou sérios entraves na utilização de células em cultura como modelo experimental. Coube a SATO et al. (1960) mostrar que a "desdiferenciação" nada mais era que a multiplicação seletiva de células oriundas de tecido conectivo (fibroblastos) as quais passam, assim, a constituir maioria na população. O isolamento de células funcionais em cultura dependia do emprego de técnicas de seleção adequadas.

Usando a técnica de passagem alternada animal-cultura (BUONASSISSI et al., 1962) de tumores funcionais, um grande número de linhagens diferenciadas estáveis foram desenvolvidas: células de pituitária que secretam ACTH (BUONASSISSI et al., 1962); células adrenais que respondem a ACTH (YASUMURA et al., 1966); células de glia (BENDA et al., 1968), células

pituitárias que secretam GH e prolactina (YASUMURA et al., 1966; TASHJIAN et al., 1968); células de neuroblastoma (AUGUSTI-TOCCO & SATO, 1969). Aqui deve ser também destacado o trabalho de TODARO & GREEN (1963), os quais, por um processo sistemático, estabeleceram em cultura diversas linhagens de fibroblastos de embrião de camundongo, das quais a mais importante é a linhagem 3T3. Esta linhagem estabelecida tem, em cultura, um comportamento que lembra aquele de culturas primárias de células normais: ao atingir confluência param de crescer mantendo-se, porém, viáveis por longos períodos de tempo. Este fenômeno, conhecido por inibição de crescimento por contacto ou inibição de contacto, foi tomado como o reflexo, em cultura, dos mecanismos de controle de crescimento que operam no animal (AARONSON & TODARO, 1968). Devido a isto as células 3T3 passaram a ser usadas em muitos laboratórios como um protótipo de células normais.

Células da linhagem 3T3 assim como outras linhagens em cultura requerem a presença de soro no meio de cultura. TODARO et al. (1965) e HOLLEY & KIERNAN (1968) mostraram que o crescimento de fibroblastos 3T3 é diretamente controlado por fatores do soro. O papel do soro no meio de cultura é fornecer substâncias reguladoras do crescimento celular - hormônios do tipo clássico ou fatores de crescimento do tipo hormonal (ARMELIN, 1975). A existência de algumas linhagens que crescem em meio quimicamente definido na ausência de soro é devida ao fato de serem capazes de sintetizar em cultura fatores de crescimento (DULAK & TEMIN, 1973) ou terem sido selecionadas para crescer na ausência de reguladores.

3. FATORES DE CRESCIMENTO PARA CÉLULAS EM CULTURA

Grande quantidade de esforços tem sido empregado na tentativa de definir os fatores do soro que são essenciais para o crescimento das células. Essencialmente três tipos de enfoque foram usados: a) tratamento do soro para extração seletiva de hormônios e fatores de crescimento (ARMELIN, 1973; NISHIKAWA et al., 1975); b) emprego de soro extraído de animais operados (hipofisectomizados, adrenalectomizados, tireoidectomizados, ovariectomizados, etc) e, portanto, deficiente em certos tipos de hormônios (SAMUELS et al., 1974); c) fracionamento do soro para purificação e isolamento dos fatores reguladores de crescimento (JAINCHILL & TODARO, 1970; PAUL et al., 1971; LIPTON et al., 1971). O grande número e quantidade de proteínas presentes no soro contrastando com as baixíssimas concentrações de fatores de crescimento tornaram a tarefa de purificação e isolamento destes fatores a partir de soro extremamente difícil (HOLLEY & KIERNAN, 1971).

O estudo de fatores de crescimento tomou novo impulso quando, investigando as exigências de células 3T3 para crescimento, foi verificado (ARMELIN, 1973) que extratos de pituitária continham atividade promotora de crescimento para estas células. Neste mesmo trabalho foram apresentadas evidências de que a atividade era devida a um fator de natureza proteica o qual era diferente dos hormônios conhecidos da hipófise e potencialmente fácil de purificar. Devido ao fato de células 3T3 serem altamente dependentes de soro, culturas mantidas em baixa concentração (ou na total ausência) de soro param de se dividir e entram num estado de repouso. A reestimulação destas

células consistia num ensaio extremamente eficiente de substâncias reguladoras extracelulares que promovem iniciação de crescimento. O desenvolvimento deste trabalho teve como consequências o surgimento da possibilidade de obtenção de fator de crescimento puro e de usá-lo como instrumento na investigação de mecanismos de controle de crescimento e ainda de usar a glândula pituitária como fonte de outros fatores de crescimento ainda desconhecidos.

Uma vez dispondo de um ensaio adequado e de evidências para uma fonte potencial da atividade, um fator de crescimento de pituitária foi purificado até homogeneidade por GOSPODAROWICZ (1974) e designado FGF ("fibroblast growth factor"). A partir de hipófise bovina ARMELIN et al. (1976, 1977) têm obtido uma preparação designada PF ("pituitary factors") a qual contém umas poucas proteínas e possui atividade estimuladora do crescimento de diversos tipos de células.

Outros fatores regulatórios do crescimento de fibroblastos 3T3 foram descobertos. Verificou-se por exemplo (ARMELIN, 1973) que os hormônios clássicos hidrocortisona e insulina tinham efeito sinérgico sobre a atividade do fator de pituitária e ainda que o fator de crescimento epitelial (EGF) isolado e purificado por COHEN (1962) apresentava atividade estimulatória para células 3T3. No entanto, a combinação de fator de pituitária, hidrocortisona e insulina embora extremamente eficiente na estimulação da iniciação de crescimento revelou-se insuficiente para terminação da divisão celular (ARMELIN & ARMELIN, 1975). Estes dados sugeriam que o soro devia fornecer outros reguladores os quais seriam essenciais para propiciar crescimento e sobrevivência das células.

Além daqueles acima citados, vários outros polipeptídeos com atividade de fator de crescimento para células em cultura foram isolados (de fontes diversas tais como soro, plasma, sobrenadante de células em cultura, glândula salivar, etc) entre os quais: OGF ou "ovarian growth factor" (GOSPODAROWICZ et al., 1974), NGF ou "nerve growth factor" (LEVI-MONTALCINI & ANGELETTI, 1968), MSA ou "multiplication stimulating activity" (DULAK & TEMIN, 1973), somatomedinas ou fatores de sulfatação e de timidina (VAN WICK et al., 1971; HALL & UTHNE, 1971), NSILA ou "non suppressible insulin like activity" (RINDERKNECHT & HUMBEL, 1976) e ainda um fator de plaquetas (ROSS et al., 1974) o qual parece ser o mesmo purificado por ANTONIADES & STATHAKOS, 1975. Alguns destes polipeptídeos (como MSA, NSILA, somatomedina C e possivelmente também somatomedinas A e B) guardam estreita relação com insulina, competindo pelo receptor específico de insulina e apresentando analogias de sequência mas podem ser distinguidos de insulina por reação com anticorpos de alta afinidade por insulina.

Outras substâncias têm sido implicadas como reguladores do crescimento de fibroblastos. Alguns autores sugeriram que tratamentos breves de fibroblastos em repouso com tripsina e outras proteases desencadeavam o processo de divisão celular (BURGER, 1971, 1973; SEFTON & RUBIN, 1970; BURGER et al., 1972; SCHNEBLI & BURGER, 1972; NOONAN & BURGER, 1973; CHEN & BUCHANAN, 1975). Estes resultados, entretanto não puderam ser confirmados por outros laboratórios (GLYNN et al., 1973; HOLLEY & KIERNAN, 1974; ARMELIN et al., 1976; nesta tese). Assim, a decisão de colocar proteases entre os fatores reguladores

da proliferação celular em fibroblastos deve aguardar um ataque mais sistemático e a análise comparativa dos diversos sistemas empregados.

Tem sido mostrado que glicocorticóides (THRASH & CUNNINGHAM, 1973; ARMELIN, 1973) e prostaglandina $F_{2\alpha}$ (ASUA et al., 1977) agem como estimuladores da proliferação celular no sistema fibroblasto 3T3. Papel semelhante tem ainda sido atribuído a substâncias de baixo peso molecular como nutrientes (HOLLEY & KIERNAN, 1974) e nucleotídeos cíclicos (SEIFERT & RUDLAND, 1974).

4. FATORES DE CRESCIMENTO E CICLO CELULAR

Apesar da lista de reguladores para o sistema 3T3 ter se estendido consideravelmente nos últimos anos, completa substituição do soro por combinações de hormônios e fatores de crescimento constitui-se em meta ainda não alcançada (algum sucesso neste sentido foi relatado recentemente por HAYASHI & SATO, 1976, para algumas linhagens de células). Entretanto a disponibilidade de fatores puros permitia agora o ataque ao problema do mecanismo pelo qual estas substâncias desencadeavam o processo proliferativo. As questões que pareciam mais fundamentais eram: o que acontece ao ciclo de vida de uma célula quando esta é colocada em condições de carência de soro? De que maneira os diversos efetadores interferem com este ciclo? É importante notar que durante muito tempo os investigadores preocupados com fatores de crescimento estiveram dissociados daqueles voltados para a elucidação dos vários eventos que ocorrem no ciclo

de vida de uma célula. Vejamos agora o "status" de conhecimento no campo de ciclo celular.

5. CICLO CELULAR

Embora duas fases distintas - mitose e interfase - tenham sido reconhecidas desde muito tempo, a divisão do ciclo celular em 4 fases só surgiu com o trabalho clássico de HOWARD & PELC (1953). Estes autores propuseram as designações G₁ (para o período que antecede a replicação de DNA); S (para a fase de síntese de DNA); G₂ (para a etapa que sucede a replicação de DNA e precede a divisão celular) e M (para o período de divisão celular). Vários métodos para medidas da duração das diversas fases do ciclo celular foram desenvolvidos, dos quais o mais importante e o de maior alcance é a análise da fração de mitoses marcadas de QUASTLER & SHERMAN (1959). Este tipo de análise revelou que a maior parte das diferenças observadas para o tempo de geração entre os diversos sistemas podia ser atribuída à variabilidade do período pré-sintético (G₁) uma vez que S, G₂ e M apresentavam variações muito restritas. Durações de G₁ de meses e até anos eram encontrados para sistemas que proliferam lentamente. Além disso variações de G₁ eram encontradas mesmo dentro de populações homogêneas.

A análise cinética do sistema fígado em regeneração (após hepatectomia parcial) levou LAJTHA (1963) a introduzir o termo G₀ para descrever células em repouso ou, por assim dizer, fora do ciclo celular, mas que são capazes de entrar normalmente no ciclo mediante estímulo apropriado (hepatectomia).

Este conceito foi incorporado no modelo de ciclo celular proposto por TEMIN (1971) esquematizado na fig. 1, onde S, G₂ e M têm seus significados usuais porém G₁ é visualizado como: a) fazendo parte do ciclo mitótico (círculo de fora) sendo aqui representado por uma fase logo após a mitose (MG₁) e outra antecedendo S e correspondendo a células estimuladas a dividir (SG₁); b) uma parte fora do ciclo mitótico (círculo interno) ou na interfase (IG₁) e que corresponderia a G₀. Neste modelo após a divisão as células podiam continuar percorrendo o ciclo mitótico passando por MG₁, SG₁, S, G₂, etc ou sair do ciclo replicativo e entrar em IG₁.

Fig. 1: Modelo de ciclo celular segundo TEMIN, 1971.

O conceito estático de G₀ (como formulado por Lajtha) resultou em proposições mais dinâmicas. BURNS & TANNOCK (1970) propuseram o modelo de ciclo celular esquematizado na fig. 2 no qual G₀ seria um estado pelo qual todas as células passariam

necessariamente depois de M. As células sairiam de G_0 ao acaso e com probabilidade por unidade de tempo constante. Após deixar G_0 as células entrariam numa fase C (compreendida por G_1 verdadeiro, S, G_2 e M) de duração constante e que termina com divisão celular. No entanto estes autores se limitaram a tentar explicar o comportamento de tecidos que proliferam lentamente.

Fig. 2: Modelo de ciclo celular segundo BURNS & TANNOCK, 1973.

Outros autores (SMITH & MARTIN, 1973), baseados em medidas do período intermitótico de células individuais, generalizaram o conceito dinâmico de G_0 para todos os tipos de células e sugeriram abandonar o modelo convencional de ciclo celular, substituindo-o por outro (vide fig. 3) no qual as células existiriam em dois estados fundamentalmente diferentes A e B. Após completar a mitose a célula entraria no estado A no qual sua atividade não estaria dirigida para replicação. Durante o tempo que a célula ficasse no estado A, a probabilidade de passar ao estado B permaneceria constante. As células

deixariam o estado A ao acaso passando para a fase B onde suas atividades seriam determinísticas e dirigidas para a replicação e divisão celular. A velocidade de crescimento da população dependeria então da probabilidade com que as células saem do estado A, da duração da fase B e da velocidade de morte celular.

Fig. 3: Modelo de ciclo celular segundo SMITH & MARTIN, 1973.

No modelo proposto por ARMELIN (1975), esquematizado na fig. 4 o estado fundamental da célula seria de repouso (estado R) no qual o programa para divisão celular estaria desligado. Este programa seria a soma das reações citológicas e bioquímicas que ocorrem de maneira sequenciada e que culminam com a divisão da célula em duas células filhas. As células podem sair do estado R ao acaso e entrar no compartimento P de células proliferativas as quais estariam comprometidas com o programa de divisão celular. A entrada em P seria

Fig. 4: Modelo do ciclo celular segundo ARMELIN, 1975.

única e estaria localizada no início de G₁. No caso de células em cultura a proliferação celular dependeria exclusivamente da probabilidade com que células fazem a transição de R para P.

Implícito nestes modelos está a importância atribuída a G₁ - fase extremamente variável e complexa na qual deve se concentrar a regulação do ciclo celular.

Do que foi mencionado acima, parece razoável admitir-se que o comprometimento da célula para com a replicação do seu DNA seja o ponto crítico no controle da proliferação. Portanto seria importante transformar esta idéia básica em uma hipótese simples e passível de teste experimental. Um modelo simples, porém útil, da organização de G₁ pode ser visto na fig. 5. A utilidade deste modelo reside no fato de permitir a

Fig. 5: Modelo de ciclo celular: hipótese proposta para a organização de G1.

redução do controle do ciclo celular à regulação da transição $G_0 \rightarrow G_1^C$. G1 aqui é dividido em duas partes: G_0 e G_1^C (G1 comprometido). Células em G_0 seriam equivalentes a células no estado R, no sentido de estarem no estado fundamental, em repouso e não comprometidas com a divisão celular. As células aí permaneceriam por tempo variável e sairiam daí ao acaso. Por outro lado G_1^C se caracteriza por um comprometimento irreversível com os processos de síntese de DNA e divisão celular. Células que entram em G_1^C progrediriam inexoravelmente por S, G2 e M e as células filhas resultantes cairiam necessariamente em G_0 . O controle do ciclo celular seria então exercido ao nível da transição $G_0 \rightarrow G_1^C$ (transição 1). Esta transição depende de reações que ocorrem ainda em G_0 podendo ser estimulada ou inibida por hormônios clássicos ou fatores de crescimento do tipo hormonal.

Usando este modelo como hipótese de trabalho procuramos investigar o comportamento cinético de dois sistemas diferentes

fibroblastos e células adrenais - frente a ação de seus efetadores (fatores pituitários, EGF, insulina, hidrocortisona, ACTH, etc). Os objetivos deste tipo de enfoque eram adquirir informações sobre o ponto do ciclo celular ao nível do qual os efetadores agem e seus modo de ação. Num primeiro protocolo, células em repouso (estado R) foram estimuladas por efetadores positivos (soro ou hormônios estimuladores) procurando-se observar o tempo que leva para instauração da onda de síntese de DNA e de que maneira este tempo e a amplitude da resposta são afetados pelo tipo e a quantidade do efetador. E ainda adicionar efetador negativo e células estimuladas a fim de verificar quanto tempo após o estímulo (ou antes de S) as células tornam-se insensíveis à ação do inibidor, ou seja, quando ficam comprometidas com o processo de síntese de DNA (transição $G_0 \rightarrow G_1^C$). Num segundo protocolo, células em crescimento exponencial foram colocadas em condições em que o crescimento é inibido (através da carência de soro e/ou da adição de efetadores negativos do tipo hormônio) procurando-se observar o que acontece com os parâmetros celulares (síntese de DNA, divisão celular) quando as células fazem a transição $R \rightarrow P$ e, ainda se os efetadores são específicos para esta fase do ciclo celular.

Usando este tipo de enfoque chegamos às seguintes conclusões: a) os fatores que regulam o crescimento celular agem bloqueando ou estimulando o comprometimento das células com o processo de síntese de DNA (ou seja bloqueando ou estimulando a transição $G_0 \rightarrow G_1^C$); b) este comprometimento ocorre muito antes da fase S; c) o "steady-state" da proliferação é mantido

através da ação dinâmica de reguladores (positivos e negativos) da transição $R \rightarrow P$ ou $G_0 \rightarrow G_1^C$.

6. ANÁLISE GENÉTICA DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS EM CULTURA

O enfoque bioquímico tem alcance limitado. Acreditamos que o estudo de controle de crescimento seria enormemente facilitado se outros tipos de enfoque - o genético, por exemplo - pudessem ser aliados ao bioquímico.

A análise genética do ciclo celular, empreendida por Hartwell e colaboradores em levedura (ver revisão em HARTWELL, 1974) trouxe uma série de contribuições. Estes autores isolaram e caracterizaram mais de 2000 mutantes de S. cerevisiae. Cerca de 10% destes mutantes apresentavam lesões que afetavam o ciclo celular (mutantes cdc) e puderam ser agrupados em 32 grupos de complementação. A análise destes mutantes permitiu concluir que: a) os vários eventos do ciclo celular de levedura (síntese de DNA, brotamento, divisão da placa centriolar, migração do núcleo, cariocinese, citocinese e separação das células filha) dispõem-se em duas vias independentes as quais divergem do mesmo ponto (localizado no início de G_1) e convergem para o mesmo ponto (citocinese); b) é na fase inicial de G_1 que as células ficam sujeitas a sinais (efetadores) que desencadeiam um ou outro processo do programa de desenvolvimento da levedura (meiose, conjugação ou outro ciclo mitótico). A ausência destes sinais implica na permanência de células na fase estacionária, antes de S e, portanto, em G_1 .

O modelo experimental usado por Hartwell apresenta aspectos extremamente favoráveis: a) as fases do ciclo

são facilmente identificadas pela morfologia da célula; b) como este organismo apresenta fases haplóide e diplóide, é possível mutagenizar células haplóides e identificar imediatamente mutações recessivas e ainda usar células diplóides para análises de complementação.

É óbvio que no caso de células de mamíferos em cultura não estamos diante das condições favoráveis encontradas por Hartwell em levedura. Entretanto a procura de mutantes de células somáticas em cultura teve uma motivação muito grande, qual seja - levar a uma metodologia que permitisse a análise genética em mamíferos com eficiência semelhante àquela observada com microrganismos.

Várias técnicas têm sido empregadas para o isolamento de mutantes somáticos, das quais destaca-se: a) Suicídio com BUdR - introduzida e utilizada por PUCK & KAO (1967) para o isolamento de mutantes auxotróficos. O princípio aplicado é o mesmo da genética de microrganismos: uma população mista de células é colocada em meio limitado (na ausência de determinado nutriente) no qual as células que apresentam deficiência nutricional não crescem. A exposição ao agente seletivo (no caso BUdR) e, em seguida, à luz ultravioleta próxima, causa a morte apenas de células em crescimento (que incorporaram BUdR) enquanto aquelas incapazes de crescer na ausência do nutriente (e que, portanto, não incorporaram BUdR) sobrevivem, podendo ser recuperadas e isoladas.

b) Seleção com FUdR (POLLACK et al., 1968). Estes autores verificaram que quando populações de células de mamíferos eram expostas a FUdR, aquelas que estavam em proliferação eram mortas enquanto

células que não estavam se dividindo não eram afetadas podendo, portanto, ser recuperadas. Este método se aplica ao isolamento de células mais sensíveis a qualquer tipo de controle de crescimento, tendo sido usado por Pollack para o isolamento de revertentes de células transformadas (os chamados "flat mutants" porque, ao contrário da linhagem parental, formam colônias achata-das, sem empilhamento de células).

c) Seleção através de análogos de purinas (SHARP, CAPECCHI & CAPECCHI, 1973). A enzima hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT) é responsável pela formação de IMP e GMP, a partir de guanina e hipoxantina, os quais vão ser utilizados na biossíntese de ácidos nucleicos. Fornecendo análogos de purinas (8-asa-guanina ou 6-tioguanina) a uma população de células L foi possível isolar mutantes $HPRT^-$ os quais sobrevivem ao tratamento devido ao fato dos nucleotídeos púricos poderem ser sintetizados "de novo" na ausência de HPRT. A partir da linhagem $HPRT^-$, revertentes $HPRT^+$ puderam ser isolados através do bloqueio da síntese "de novo" de nucleotídeos púricos com ametofterina e adição de hipoxantina ao meio. Nestas condições somente células $HPRT^+$ sobrevivem podendo ser recuperadas em meio contendo hipoxantina, ametofterina e timidina (chamado meio HAT).

O emprego destas técnicas de seleção permitiu o isolamento de um grande número de variantes (auxotróficos, resistentes a drogas, etc). Porém, muito cedo neste campo, a origem genética destas alterações foi questionada principalmente por HARRIS (1971) e MEZGER-FREED (1972). A base das críticas encontrava-se nos seguintes argumentos: a) alguns tipos de variantes não eram estáveis; b) as estimativas de taxas mutacionais

disponíveis eram muito altas (da ordem de 10^{-3}) e o emprego de agentes mutagênicos não permitia aumentá-las; c) a taxa de mutação parecia ser independente da ploidia; d) mutações recessivas não deveriam aparecer em células que são no mínimo diplóides.

A qualidade e a interpretação dada aos dados disponíveis, entretanto, foram questionadas por DE MARS (1974) dissipando, assim, o ceticismo em torno da origem genética das alterações encontradas. A questão ficou novamente em aberto mas dúvidas sobre a ocorrência de mutações recessivas em células que eram no mínimo diplóides permaneciam. Entretanto apesar de análise cariotípica e medidas de conteúdo de DNA de células CHO (chinese hamster ovary) indicarem grande proximidade em relação a células normais de hamster, evidências começaram a se acumular de que embora estruturalmente diplóides estas células mostravam-se funcionalmente hemizigotas para um grande número de genes (o que explicaria a ocorrência de tantas mutações recessivas nesta linhagem).

Como mutações recessivas eram encontradas em várias outras linhagens e como a maioria delas era aneuplóide (com grande número de perdas e rearranjos cromossômicos) SIMMINOVITCH (1976) sugeriu a hemizogozidade parcial como um fenômeno generalizado entre células estabelecidas em cultura.

Tornou-se então importante estabelecer critérios para decidir, em cada caso, se a variação podia ser aceita como devida a alteração genotípica ou tratava-se de um efeito epigenético. Um critério importante é a taxa de mutação: ordem de grandeza, possibilidade de ser aumentada com agentes

mutagênicos e dependência do grau de ploidia da célula. Enquanto os dois primeiros têm sido observados num número razoável de casos, a dependência do grau de ploidia depende da disponibilidade de linhagens com diferentes graus de ploidia o que só foi conseguido até agora com linhagens de Rana (MEZGER-FREED, 1974) não havendo notícia até agora de linhagem haplóide em células de mamíferos. A estabilidade fenotípica é tomada como critério básico para o estabelecimento de mutantes mas o critério mais objetivo e definitivo consiste na possibilidade de correlacionar a alteração fenotípica com alterações do produto gênico (modificação estrutural de uma proteína). Exemplos deste tipo tem se acumulado nos últimos anos. Assim, mutantes resistentes a azaguanina parecem ter mutações estruturais no gene para a enzima HPRT (SHARP et al., 1973) tendo sido possível detectar reatividade dos extratos com anticorpo contra HPRT (BEAUDET et al., 1973). O enzima N-acetilglucosaminil transferase apresenta-se alterado em células resistentes a lectinas (STANLEY et al., 1975; GOTTLIEB et al., 1975) e a resistência a ouabaina tem sido associada a alteração de uma ATPase dependente de sódio e potássio (BAKER et al., 1974).

Mutantes condicionais letais de células de mamíferos só surgiram a partir de 1973. THOMPSON et al. (1973) isolaram um mutante de células CHO que era temperatura sensível (ts) para crescimento e mostraram que os extratos destas células apresentavam atividade de leucil-tRNA sintetase também ts. TONIOLO et al. (1973) isolaram um mutante ts para crescimento de células BHK21 com defeito identificado como sendo no processamento do RNA ribossômico 28S. Estes autores mostraram

ainda que os dois defeitos (crescimento e processamento do rRNA) eram devidos a uma única mutação uma vez que todos os revertentes (capazes de crescer à temperatura não permissiva) apresentavam processamento normal do rRNA.

Mutantes de ciclo celular começaram a aparecer na literatura também a partir de 1973. O protocolo básico usado tem sido o seguinte: a) mutagenização (nitrosoguanidina, etilenometano sulfonato, compostos de acridina) de uma cultura em crescimento exponencial e recuperação dos sobreviventes (cerca de 10%) à temperatura permissiva; b) transferência para a temperatura não permissiva e incubação por tempo suficiente para ocorrer a expressão fenotípica; c) aplicação do agente seletivo (BUdR, FUDR, Ara C, ³HTdR) à temperatura não permissiva provocando a morte de células em crescimento enquanto aquelas bloqueadas em algum ponto do ciclo sobrevivem; d) recuperação, clonagem e caracterização dos sobreviventes.

A caracterização dos variantes envolve aliar técnicas de sincronização com experiências de mudança de temperatura. A sincronização por carência de soro e nutrientes causa bloqueio em G1; hidroxiurêia ou excesso de timidina são usados para obter células bloqueadas no início de S e colchicina para bloqueio em M. Os esquemas em geral consistem em sincronizar as células na temperatura permissiva e, após diferentes tempos, aliviar o bloqueio na temperatura não permissiva ou então sincronizar na temperatura permissiva, aliviar o bloqueio nesta mesma temperatura e, após diferentes tempos, passar para a temperatura não permissiva. A análise dos parâmetros celulares é então feita para identificar o tipo de lesão e o ponto do ciclo onde ocorre.

Teoricamente deveria ser possível, usando o protocolo acima descrito, obter variantes com bloqueios em todas as etapas do ciclo uma vez que estando bloqueadas (seja em G1, S, G2 ou M) não estariam sujeitas à ação dos agentes seletivos empregados. No entanto dos inúmeros mutantes ts para crescimento cerca de 8 têm sido bem caracterizados e destes, 4 ficam bloqueados em G1 (ROSCOE et al., 1973a; SMITH & WIGGLESWORTH, 1973; SHEFFLER & BUTTIN, 1973; LISKAY, 1974; BURSTIN et al., 1974; TENNER et al., 1977) 1 parece ter uma lesão que impede a célula de fazer a transição de G1 para S ou seja fica bloqueada no limite G1/S (SMITH & WIGGLESWORTH, 1973) e 3 apresentam defeitos na mitose sendo uma bloqueada em metafase (WANG, 1974) e duas em citocinese (SMITH & WIGGLESWORTH, 1972; HATZFELD & BUTTIN, 1975). Portanto até o momento nenhum mutante para G2 ou S foi encontrado.

ROSCOE et al. (1973b) desenvolveram outro método para o isolamento de células bloqueadas em qualquer ponto do ciclo, baseado na facilidade com que células mitóticas despregam-se da superfície. Estes autores conseguiram isolar um mutante com bloqueio em G1 mas nenhum em S, G2 ou M.

O problema básico parece residir no fato dos protocolos utilizados para o isolamento de variantes exigirem a permanência de células em condições desfavoráveis por longos períodos de tempo. Células bloqueadas em G1 teriam maior chance de sobrevivência uma vez que G1 (ou, mais especificamente início de G1 ou Go) constitui-se numa parada natural com balanceamento metabólico favorável. Além disso a porcentagem de células jovens (em G1) numa população em crescimento exponencial é bem maior

do que células mais velhas ou seja em G2 ou M (PAINTER & MARR, 1968). Parece óbvio que o emprego de técnicas de seleção em células previamente sincronizadas permitiria contornar estes problemas e aumentar a probabilidade de isolamento de mutantes G2 e S.

7. MUTANTES REGULATÓRIOS DO CRESCIMENTO CELULAR

O enfoque empregado por nós consistiu na busca de variantes de células somáticas que ou não respondem ou apresentam respostas diferentes a hormônios ou fatores de crescimento. A premissa básica é que este tipo de variante teria sistemas de controle parcialmente ativos, constituindo-se, assim, em bons candidatos a mutantes regulatórios do mecanismo de controle de crescimento. Estes mutantes seriam úteis não só para a identificação de novos fatores de crescimento como também para a caracterização e identificação dos componentes dos mecanismos de controle do crescimento.

É importante mencionar que o termo "variante" será usado neste texto com o seguinte sentido: qualquer linhagem de células com fenótipo alterado em relação à linhagem parental, cujo fenotipo é mantido por muitas gerações, mesmo após repetidas recloneagens, na ausência de qualquer agente seletivo. Tais "variantes" não são necessariamente mutantes no sentido genético, entretanto, nesta tese, variante ou mutante serão usados como sinônimos sempre tendo em vista a definição operacional proposta acima.

Usando este tipo de enfoque pudemos isolar mutantes tanto do sistema fibroblasto como do sistema células adrenais. O

mutante ST1 derivado de fibroblastos 3T3 apresenta uma série de características extremamente interessantes entre as quais: a) perda de resposta a todos os reguladores positivos conhecidos para a linhagem parental; b) aquisição de resposta inibitória e, portanto, contrária à da linhagem parental, a glicocorticóides; c) resposta estimulatória frente a um fator de crescimento diferente dos já conhecidos e, portanto, potencialmente um novo fator de crescimento; d) reversão fenotípica causada por um único hormônio: hidrocortisona provoca mudança do padrão de crescimento (do tipo transformado para um padrão normal) tanto "in vitro" como "in vivo" (quando as células são injetadas em animais); e) alterações morfológicas, provavelmente devidas a mudanças na superfície celular, causadas por hidrocortisona, retirada de soro ou adição de CAMP.

No sistema células adrenais a linhagem Y-1 responde a ACTH com uma estimulação da função diferenciada-esteroidogênese (SATO et al., 1970) acompanhada de inibição do crescimento (MASUI & GARREN, 1971). Estes últimos autores verificaram ainda que o efeito inibitório de ACTH nestas células pode ser mimetizado por adição de CAMP. Mutantes resistentes a ACTH têm sido descritos (SCHIMMER, 1969) nos quais, entretanto a resposta a CAMP é mantida. Estes dados têm sido usados como evidências da mediação por CAMP dos efeitos causados por ACTH. Por outro lado, o mutante AR-1 isolado por nós a partir de células Y-1, embora também resistente a ACTH (quanto à resposta inibitória do crescimento), não responde à adição de CAMP. A adição de ACTH a células AR-1 provoca entretanto uma estimulação do crescimento, sugerindo a existência de outra via, além da mediada por CAMP, para a ação do hormônio.

A exploração destes mutantes e estudos comparativos com as linhagens parentais permitiram a obtenção de informações relevantes sobre os componentes do sistema de controle de crescimento e seus mecanismos de ação.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. LINHAGENS DE CÉLULAS

Tabela I: Propriedades das linhagens estabelecidas utilizadas

Linhagem	Tipo	Origem	Nº de cromos./célula	Comportamento
3T3 (Swiss) (TODARO & GREEN, 1963)	fibroblasto	Embrião de camundongo	$80 \pm 2,5$	"normal"
SV3T3 (Swiss) (TODARO & GREEN, 1964)	fibroblasto	Embrião de camundongo transformadas (em cultura) por vírus SV40	$75,6 \pm 4,8$	tumorigênica
Y-1 (YASSUMURA et al., 1966)	adrenal	Tumor funcional de camundongo	$36,5 \pm 4,0$	tumorigênica sintetiza cetosteróides responde a ACTH

Os estoques das linhagens 3T3 e Y-1 foram iniciados a partir de amostras obtidas da American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, Estados Unidos) e a linhagem SV3T3 foi obtida do laboratório do Dr. R. Dulbecco (Salk Institute, La Jolla, Califórnia, Estados Unidos). Amostras destas e de outras linhagens são mantidas congeladas em reservatório de nitrogênio líquido.

2. MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTURA

O meio de cultura consiste numa fração quimicamente definida e uma fração complexa. A parte quimicamente definida consistiu de DME ("Dulbecco's modified Eagle's medium") adquirido sob a forma de pó da Grand Island Biological Co., New York (Gibco), suplementado com 1,2 g/l de bicarbonato de sódio, 5×10^5 unidades de penicilina/l, 25 mg/l ampicilina e 100 mg/l estreptomicina. Após dissolução em água bidestilada este meio era esterilizado por filtração através de filtros Millipore (poros 0,22 μ), distribuído em garrafas de vidro de 100 ml e armazenado na geladeira por não mais que 2 meses. A fração complexa do meio de cultura é representada por soro. Neste trabalho foram utilizadas diferentes partidas de 2 tipos de soros: de vitelo (CS) e fetal bovino (FCS) adquiridos da Gibco, New York ou da Flow Laboratories, Colorado. Inicialmente adotou-se inativar o soro (1 hora à 55°C) mas com o desenrolar deste trabalho verificou-se não ser isto necessário passando-se, então, a dividir o conteúdo de uma garrafa de 0,5 l em pequenas alíquotas (10 ml) que eram mantidas congeladas até o momento de serem utilizadas.

Os estoques foram mantidos em meio dito 10% FCS DME (10% de soro fetal bovino + 90% DME) ou meio 5 + 5 DME (5% de soro fetal bovino + 5% soro de vitelo + 90% DME). Estes meios eram preparados imediatamente antes do uso por mistura de soro e DME em condições estéreis.

As culturas estoque foram mantidas em frascos de vidro com tampa de baquelite enquanto que para experiências as

células eram semeadas (plaqueadas) em placas de Petri de vidro ou de plástico do tipo descartável (Falcon Plastics, Califórnia) ou em lamínulas ($3,2 \text{ cm}^2$). As placas de plástico eram recicladas por lavagem e esterilização por luz ultravioleta.

Culturas em placa foram mantidas em caixas de plástico transparente (ATMA) adaptadas a funcionar como câmara úmida através de uma camada de espuma (0,5 cm espessura) embebida em água que era colocada no fundo da caixa. Mistura de 5% CO_2 + 95% ar comprimido era injetado e a caixa, devidamente vedada com vaselina, era incubada a 37°C . Esta mesma mistura de gases era injetada nos frascos de cultura estoque os quais eram incubados também a 37°C .

Medidas severas de segurança foram adotadas na rotina do laboratório para evitar contaminação por microrganismos (bactérias, fungos ou Mycoplasma) e também para impedir contaminações cruzadas entre linhagens de células.

3. MANUTENÇÃO E CONGELAMENTO DE ESTOQUES

A subcultura dos estoques era feita por inoculação de meio fresco com alíquotas de uma suspensão homogênea de células. Esta suspensão era obtida através da remoção do meio velho, lavagem da camada de células com solução salina fosfato sem Ca^{2+} e Mg^{2+} (PBSA) e tripsinização com solução salina contendo 0,1% tripsina (Nutritional Biochemicals) e 1 mM EDTA.

Para o congelamento de estoques, alíquotas de 1 ml de uma suspensão homogênea de células ($1-2 \times 10^6$ células/ml) em meio de cultura + 10% DMSO (Riedel-de Haën AG Seelze-Hannover)

eram distribuídas em ampolas de vidro ou tubos de plástico com tampa rosqueável. Depois de devidamente vedados as ampolas ou tubos eram incubados por 30 min a 4°C, transferidos para um congelador à -70°C (Virtis Deep Freezer, The Virtis Co., New York) por 24 horas e daí mergulhados no reservatório de nitrogênio líquido (LR-21, Union Carbide).

4. CONTAGEM DE CÉLULAS

Suspensões homogêneas de células, obtidas por tripsinização conforme descrito no item 3 eram contadas em hemocitômetro (câmara de Neubauer) ou Contador Coulter (Coulter Electronics). Neste último caso diluições apropriadas eram feitas em PBSA (para evitar aglutinação das células) e contadas na faixa de 10^3 a 10^4 células/ml onde a linearidade e a equivalência com contagens feitas em hemocitômetro era maior.

5. MEDIDAS DE INCORPORAÇÃO DE TIMIDINA ^3H EM DNA

Timidina ^3H (48,5 Ci/mmol) da New England Nuclear era adicionada ao meio de cultura numa concentração final variável dependendo do tipo de experiência. Decorrido o tempo de incorporação o meio era removido e TCA 5% adicionado para extração do material ácido solúvel. Após incubação por 15 minutos à frio (4°C) o TCA era removido e as células dissolvidas em pequeno volume de NaOH 0,5 N (0,5 ml por placa de 35 mm ou 1 ml por placa de 60 mm). Uma alíquota (0,1 - 0,3 ml) deste material era aplicado em filtro de papel Whatman nº 17 (4 cm²). Os filtros eram lavados em TCA 5% à frio, álcool 95% e acetona

e, depois de secos, mergulhados em líquido de cintilação (4 g/l PPO + 0,1 g/l POPOP dissolvidos em tolueno). A radiatividade incorporada em DNA era então determinada usando-se Contador de Cintilação em meio líquido modelo LS, Beckman Instruments Inc. (Palo Alto, California, E.U.A.).

6. AUTORRADIOGRAFIA E TESTE PARA DETECÇÃO DE MICOPLASMA

A incorporação de timidina ^3H era feita como descrito para o item anterior. Após incorporação, as células, aderidas à superfície da placa, eram submetidas a dois tratamentos com TCA 5% (15 minutos, 4°C), lavadas com etanol 95% e secas ao ar. As placas eram cobertas com filme Kodak AR-10, expostas por tempo variável, reveladas (Revelador D19b), coradas com Giemsa 10% e observadas ao microscópio para determinação do índice de marcação (número de núcleos marcados/número de células).

Todas as linhagens de células eram testadas periodicamente para a presença de Mycoplasma através de métodos autorradiográficos já estabelecidos (NARDONE et al., 1965; STUDZINSKI et al., 1973).

7. MEDIDAS DE EFICIÊNCIA DE PLAQUEAMENTO

A viabilidade das células numa dada população foi estimada através de sua capacidade de formar colônias. Para tanto uma suspensão homogênea de células era preparada (conforme descrito no item 3 desta seção) e a concentração de células determinada por contagem no homocitômetro. Após

diluição seriada as células eram plaqueadas em baixa densidade (100 - 300 células/placa 60 mm de diâmetro) em meio rico (10% soro DME) e o crescimento acompanhado por 7-10 dias. Após este período as células eram fixadas com formaldeído 10%, coradas com cristal violeta 1% e o número de colônias com mais de 50 células era determinado por contagens à olho nú. A eficiência de plaqueamento é dada pela relação número de colônias desenvolvidas/número de células plaqueadas.

8. CLONAGEM DE CÉLULAS (SEGUNDO O MÉTODO CLÁSSICO DE PUCK & MARCUS, 1955)

Após obtenção de colônias (como descrito no item 7), algumas delas eram selecionadas e marcadas, sob microscópio de fase, com auxílio de pincel mágico de ponta fina. O meio de cultura era removido e a placa lavada com PBSA. Após a remoção do PBSA, pequenos anéis de vidro (4 mm diâmetro) previamente esterilizados em placa de Petri contendo uma fina camada de graxa de silicone (Corning Co.), eram colocados ao redor da colônia demarcada. O bordo engraxado do anel permite adesão do mesmo à placa e impermeabilização e isolamento da colônia. Em seguida algumas gotas de tripsina (0,1%) era adicionado a cada um dos anéis e a placa incubada por alguns minutos a 37°C para remoção das células da superfície. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur o conteúdo de cada um dos anéis (com as células correspondentes a um única colônia) era transferido para uma placa de Petri pequena (35 mm de diâmetro) contendo meio de cultura fresco. Após incubação por

alguns dias esta placa era tripsinizada e o processo era repetido (reclonagem) para garantir a origem à partir de uma única colônia.

9. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE MITÓTICO

Células aderidas à superfície de placas ou lâminas eram fixadas em TCA 5% ou formol 10%, coradas com Giemsa 10% e observadas ao microscópio. O índice mitótico era determinado através da relação: número de células mitóticas/número total de células após a contagem de no mínimo 2000 células/placa.

10. DETERMINAÇÃO DO CARIÓTIPO DE UMA LINHAGEM DE CÉLULAS (SEGUNDO MÉTODO DE HSU & POMERAT, 1953)

Para a determinação do número médio de cromossomos por célula, colchicina (Sigma Chem. Co.) numa concentração de 0,1 g/ml era adicionada a culturas crescendo exponencialmente as quais eram incubadas por 1 h a 37°C. Ao final deste período as células eram tripsinizadas, lavadas com PBS para remoção da tripsina e suspensas em solução hipotônica (KCl 0,56%). Após 15 minutos à temperatura ambiente as células eram fixadas por sucessivas lavagens com mistura de metanol-ácido acético (3:1) e centrifugação. O sedimento final de células era ressuspensão em pequeno volume (0,2 - 0,5 ml) do fixador e a suspensão aplicada a lâminas previamente tratadas com metanol. As placas metafásicas eram observadas ao microscópio de fase e o número médio de cromossomos determinado após contagem de pelo menos 50 destas placas.

11. ENSAIO DE CRESCIMENTO EM SUSPENSÃO

O protocolo adotado foi uma modificação do método estabelecido por STOKER, 1968. Placas de agar sólido (0,9% agar em 10% FCS DME) e meio metocel (1% metilcelulose em 10% FCS DME) eram preparados com antecedência. Culturas em crescimento exponencial eram tripsinizadas e a concentração da suspensão determinada por contagens no hemocitômetro. Diluções seriadas desta suspensão foram feitas em meio metocel e as células foram plaqueadas nas placas de agar em 4 ml de meio metocel nas seguintes densidades: 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 células/placa. As placas eram realimentadas semanalmente através da remoção cuidadosa do meio velho e adição de 5-10 ml de meio metocel fresco. Como as células crescem na interface agar-metocel este procedimento não altera a distribuição das células ou o desenvolvimento das colônias. O número de colônias visíveis à olho nu era determinado (normalmente após 21 dias de incubação) com auxílio de uma caixa escura provida de iluminação lateral.

12. ESTABELECIMENTO DE UMA COLÔNIA DE CAMUNDONGOS "NUDE"

Camundongos "nude" são mutantes atímicos que possuem sistema imunológico extremamente reduzido devido a ausência de linfócitos do tipo T. Desde seu isolamento (ISAACSON & CATTANACH, 1962; FLANAGAN, 1966) estes animais têm sido utilizados para ensaios de tumorigenicidade uma vez que não apresentam os inconvenientes de rejeição devidos à presença de antígenos de histocompatibilidade.

A colônia foi iniciada à partir de animais (do tipo Swiss) trazidos do laboratório do Dr. Gordon Sato (Universidade da Califórnia San Diego, La Jolla, Califórnia, Estados Unidos). Normalmente estes animais são mantidos por cruzamento entre macho homozigoto (nu/nu) com fêmea heterozigota (nu/+) da mesma linhagem (RYGAARD, 1973). Como não dispunhamos da linhagem Swiss da qual os animais se originaram optamos por cruzar os homozigotos entre si.

A baixíssima resistência destes animais à infecções exigiu condições especiais de manutenção. Os animais eram mantidos em sala a mais asséptica possível, à temperatura constante, em gaiolas especiais providas de filtro de ar. Gaiolas, forragem (palha de pinho), garrafas de água, ração, etc eram autoclavados e os animais manuseados em condições assépticas.

Como a fêmea "nude" tem a tendência a atacar e comer seus próprios filhotes, logo após o nascimento estes filhotes eram transferidos para gaiolas contendo fêmeas normais da linhagem A que haviam tido filhotes na mesma época. Os filhotes "nude" eram criados pela mãe adotiva até os 21 dias de idade sendo, daí para a frente, mantidos em grupos de não mais de 4 animais/gaiola em condições especiais. A alimentação dos animais consistia de ração (Produtor nº 49, Anderson Clayton S/A) autoclavada, aveia em flocos e leite em pó, sendo suplementada por complexo vitamínico.

Apesar do tipo de cruzamento adotado acarretar em fertilidade reduzida, as ninhadas eram em média de 12 e os

animais apresentaram sobrevida relativamente alta (por volta de 400 dias).

13. ENSAIO DE TUMOROGENICIDADE E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS TUMORES

Uma suspensão homogênea de células era obtida por tripsinização de uma cultura subconfluenta. Alíquotas de 0,25 ml desta suspensão (contendo $1-2 \times 10^6$ células) eram injetadas na região escapular de camundongos "nude" de 4 semanas. Crescimento tumoral era seguido por palpação periódica. Ao final de uma experiência os animais eram sacrificados e os tumores cuidadosamente dissecados, pesados e fixados em formaldeído 10% para posterior análise histopatológica.

Análise histopatológica era feita por observação ao microscópio de cortes de 3-4 μ de espessura corados com hematoxilina-eosina.

14. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO INTRACELULAR DE CAMP PELO MÉTODO DE GILMAN (1970)

As culturas foram feitas em placas de vidro (9 cm diâmetro). Uma placa de cada vez era colocada em gelo picado e, após rápida remoção do meio, a superfície celular era lavada com PBS à frio e 3 ml de TCA 5% adicionado por placa a qual era então incubada por 30 minutos à 4°C. Ao cabo deste período o extrato ácido era transferido para um tubo cônico com tampa rosqueável. Para eliminação de TCA do extrato, 6 ml de éter gelado previamente saturado com água eram

adicionados por tubo. Após adição de HCl numa concentração final de 0,1 N o tubo era agitado mecanicamente por 5 minutos à frio. A extração com éter era repetida mais 4 vezes e o éter residual da amostra eliminado por evaporação. O extrato aquoso era então congelado em nitrogênio líquido e liofilizado (New Brunswick Scientific Lyophilizer, New Brunswick, New Jersey, E.U.A.). A amostra liofilizada correspondente a uma placa era dissolvida em 250 μ l de H₂O bidestilada e alíquotas de 25 μ l eram usadas para determinação da quantidade de CAMP por placa. Após extração com TCA as placas eram lavadas com etanol 95% e as células dissolvidas em NaOH 0,5 N. Amostras deste material eram usadas para determinação de proteína pelo método de LOWRY, 1951.

O ensaio de CAMP era feito num volume final de 210 μ l com a seguinte mistura de reação: tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,0; 1,5 pmole de CAMP ³H (10.000 cpm), 50 μ g de inibidor de proteína quinase e amostras do extrato celular. A reação era iniciada por adição de 1 μ g de proteína quinase e incubada por 90 minutos à 4°C. Após interrupção da reação por diluição com tampão fosfato de potássio 20 mM pH 6,0, a mistura era filtrada em filtros de nitrocelulose Millipore do tipo HA (0,45 μ). Os filtros eram extensivamente lavados com tampão fosfato e, depois de secos, a radiatividade determinada em aparelho de cintilação (Beckman).

Proteína quinase e inibidor de proteína quinase, preparadas à partir de músculo de coração de boi pelos métodos de MIYAMOTO et al., 1969 e APPLEMAN et al., 1966 respectivamente, foram gentilmente cedidos pela Dra. Lélia Mennucci (deste Departamento).

As determinações de cAMP eram feitas através de uma curva padrão de cAMP que seguia concomitantemente.

15. PURIFICAÇÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO DA PITUITÁRIA (PF)

A obtenção do PF utilizado neste trabalho esteve principalmente a cargo de A.G. Gambarini e H.A. Armelin. O processo de purificação encontra-se descrito em ARMELIN et al. (1976, 1977) e compreende as seguintes etapas: glândulas pituitárias congeladas de boi, adquiridas da Companhia de Alimentos do Brasil, eram homogeneizadas em máquina de moer carne do tipo industrial e o homogeneizado era suspenso em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,15 M pH 4,5. Após remoção do material fibroso por filtração em gaze e de partículas grandes por centrifugação o pH do sobrenadante era ajustado para 7,0 com NaOH 2 N. Esta suspensão corresponde ao extrato cru cujo pH era ajustado para 3,0 com HPO_3 0,5 N. O precipitado, coletado por centrifugação, não tinha atividade sendo então descartado. O sobrenadante era ajustado para pH 7,0 e precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 55%. Após coleta do precipitado (P_2), a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ era aumentada para 100% e o precipitado (P_3) novamente coletado. Ambos os precipitados de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eram ricos em atividade e apresentaram atividades específicas muito semelhantes, razão pela qual a precipitação com sulfato de amônio 55% foi considerada etapa desnecessária. Os precipitados de sulfato de amônio eram dissolvidos em água, dialisados, concentrados por ultrafiltração e liofilizados. O material liofilizado era dissolvido em tampão fosfato 0,005 M pH 6,0 e aplicado a uma coluna de carboximetil Sephadex C-50. Eluição era feita por

aumento descontínuo da força iônica; assim quase toda a proteína era eluída em até 0,1 N de NaCl enquanto a atividade permanecia adsorvida. Esta atividade era eluída somente com NaCl 1 M. A fração correspondente a NaCl 1 M era dialisada, liofilizada e chamada PF (fator ou fatores de pituitária). A preparação de PF consiste num pó branco que é rapidamente solúvel em água e contém 7-8 bandas de proteína por eletroforese em gel de poliacrilamida a pH 4,5.

16. TRATAMENTO DE ENZIMAS, SORO E FATORES DE CRESCIMENTO COM PMSF

Solução fresca de PMSF 10 mg/ml em etanol 95% era adicionada às soluções a serem tratadas para concentração final de 1 mg/ml. Após incubação (4 horas, 37°C) as soluções eram dialisadas contra PBS + 5% etanol e depois contra PBS, à 4°C. Paralelamente alíquotas das mesmas soluções eram tratadas da mesma maneira porém na ausência de PMSF. As soluções eram feitas em PBS nas seguintes concentrações: PF 1 mg/ml; soro fetal bovino (FCS) 25%, trombina 5 mg/ml e tripsina 300 µg/ml. Este tratamento inativa totalmente tripsina (tendo como substrato azocaseína) e trombina (usando como indicador a coagulação de fibrinogênio).

17. PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS CARENCIADAS PARA SORO OU CÉLULAS EM REPOUSO

Culturas subconfluentes eram tripsinizadas para obtenção de uma suspensão homogênea de células. Diluições apropriadas

eram feitas e as células eram plaqueadas em meio de cultura contendo 3-5% de soro numa densidade de $1-2 \times 10^4$ células/cm². Após 24 horas as culturas eram lavadas com solução salina fosfato (PBS), meio 0,2% FCS DME era adicionado e a incubação prosseguia por 24 horas. Ao fim deste período as células estavam carenciadas para soro, apresentando uma população enriquecida em células em repouso (ou células Go). Estas culturas carenciadas foram usadas regularmente para ensaios de atividade estimulatória da síntese de DNA.

18. ENSAIO PARA MEDIDA DA ATIVIDADE ESTIMULATÓRIA DA SÍNTESE DE DNA

Células carenciadas para soro (em repouso) eram obtidas como descrito no item 17. Soro, hormônios ou fatores, cujas atividades desejava-se testar, eram adicionados a estas culturas. 12 horas após, timidina ³H (0,25 µc/ml; 10⁻⁷ M) era adicionada e a incorporação prosseguia por 12 horas. Ao final deste período as células eram coletadas para medida da incorporação de timidina ³H em DNA (conforme o item 5 desta seção) ou do índice de marcação (conforme item 6 desta seção).

19. PROTOCOLO BÁSICO PARA TESTE DE VARIANTES

Usando o protocolo descrito no item procurava-se testar a resposta a soro (5 ou 10%), hidrocortisona, insulina, PF e combinações dos mesmos. No caso da resposta apresentada ser igual à da célula parental o clone era descartado, porém, qualquer resposta alterada era explorada até poder-se

estabelecer e caracterizar o clone como variante.

20. PROTOCOLO PARA DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DA FASE PRÉ-REPLICATIVA (G1)

Células em repouso eram obtidas como descrito no item 17 desta seção. Soro, hormônios ou fatores de crescimento eram adicionados ao mesmo tempo que timidina ^3H ($0,5 \mu\text{c/ml}$, $5 \times 10^{-7} \text{M}$) no tempo zero. Após diferentes intervalos de tempo e por um período de 24 horas, amostras eram coletadas para medida da incorporação de timidina ^3H em DNA (item 5) ou do índice de marcação (item 6).

21. PROTOCOLO PARA MEDIDA DA QUEDA DE SÍNTESE DE DNA

Culturas subconfluentes em crescimento exponencial na presença de meio de cultura contendo 5% de soro, eram lavadas com PBS e o meio mudado para 0,2% de soro ou para meio sem soro. Após diferentes intervalos de tempo e por um período de 24 horas, pulsos ($0,5 - 1,0$ hora) de timidina ^3H ($1 \mu\text{c/ml}$; $48,5 \text{ Ci/mM}$) eram feitos em parte das culturas para determinação da incorporação de timidina ^3H em DNA (item 5) ou do índice de marcação (item 6).

22. HORMÔNIOS, ENZIMAS, INIBIDORES E OUTROS REAGENTES

Preparações impuras de hormônio luteinizante (LH), estimulador do folículo (FSH), estimulador de tiróide (TSH), de crescimento (GH) e prolactina, fornecidos gratuitamente pelo U.S.

National Institutes of Health (NIAMD Hormone Distribution Program) eram dissolvidos em PBS pH 7,0 em concentrações de 100 µg/ml e mantidas congeladas. Insulina de porco cristalina (Sigma Chem. Co.) dissolvida em solução salina pH 3,5 para 100 µg/ml era também mantida congelada. Estradiol, Dexametasona, Androstan, 1-Dehidrotestosterona e 11-Deoxycorticosterona eram da Sigma Chem. Co. enquanto Hidrocortisona provinha da Nutritional Biochemical Corp. e Progesterona e Testosterona da Calbiochem. Todos os esteróides eram dissolvidos em etanol 95% a 500 µg/ml e mantidos na geladeira. Adrenocorticotropina (ACTH) Acthar da Armour Pharmaceutical Co. era dissolvida em PBS pH 7,0 a 12 U/ml. Fator de crescimento epitelial (EGF) foi preparado segundo COHEN (1962); Somatomedina B parcialmente purificada e Somatomedina C altamente purificada foram gentilmente cedidas pelo Dr. J. Van Wyck. Prostaglandina $F_{2\alpha}$ (sal de trometamina) era da The Upjohn Co.

Tripsina cristalina era um produto da Sigma enquanto a preparação ativa de trombina foi purificada e gentilmente cedida pelo Dr. J.R. Giglio (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo). O inibidor de protease PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila) foi gentilmente cedido pelo Dr. J.C.C. Maia (deste Departamento). BAPNA (α -N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida HCl), azocaseína e azoalbumina foram gentilmente cedidos pelo Dr. E.P. Camargo (Escola Paulista de Medicina, São Paulo).

Nucleosídeos (timidina), nucleotídeos (cAMP, dibutiril cAMP, 5'-AMP, cGMP), Teofilina, Colchicina e Cicloheximida

eram da Sigma Chem. Co. e Citocalasina B foi adquirida da
Aldrich Chem. Co. Inc.

As frações de soro bovino (α , β e γ Globulina, Albumi
na e fibrinogênio) eram da Nutritional Biochem. Co.

III. RESULTADOS

1. ATIVIDADE ESTIMULATÓRIA DA SÍNTESE DE DNA POR SORO E FATORES DE CRESCIMENTO

1.1. Atividade de Soro

A atividade estimulatória de soro foi regularmente ensaiada usando-se células carenciadas as quais eram obtidas segundo o protocolo descrito em Métodos (item 17). Curvas de dose para soro com células 3T3 e Y-1 são apresentadas nas figs. 6 e 7.

Fig. 6 - Curva de dose de soro (FCS) para células 3T3. Atividade estimulatória da síntese de DNA, conforme descrito em Métodos.

Fig. 7 - Curva de dose de soro (FCS) para células Y-1. Atividade estimulatória da síntese de DNA, conforme descrito em Métodos.

Note-se que o nível de síntese de DNA é proporcional à concentração de soro até atingir um "plateau". Os diferentes níveis de resposta são devidos à diferentes proporções de células que iniciam a fase S, conforme foi verificado por autorradiografia.

Para a atividade do soro contribuem hormônios clássicos e fatores de crescimento, cuja identificação ainda não foi feita,

porém admite-se que sejam de natureza hormonal. O efeito de hormônios clássicos no crescimento de células 3T3 e Y-1 será considerado mais adiante. Quanto aos fatores de crescimento, dois foram estudados: EGF e PF. Embora não tenha sido efetivamente demonstrado que estes fatores sejam componentes do soro, seu estudo é absolutamente necessário por se constituírem em protótipos dos postulados fatores de crescimento.

1.2. Atividades de EGF e PF

EGF é uma pequena proteína ácida descoberta por COHEN (1962) em glândulas salivares de camundongos, a qual tem sua estrutura química totalmente caracterizada mas cujo papel fisiológico é ainda obscuro.

Recentemente (ARMELIN, 1973) foi pela primeira vez demonstrado que EGF é ativo na estimulação de fibroblastos. A fig.8a mostra uma curva de dose para EGF na estimulação de células 3T3 (as células Y-1 não respondem a este fator). As atividades de EGF e PF, em concentrações saturantes, sobre células 3T3, é somatória (fig. 8b) sugerindo que estes fatores agem por mecanismos independentes.

Ao contrário de EGF, PF está ainda quimicamente mal caracterizado. O fator (ou fatores) de pituitária utilizado nesta tese foi preparado a partir de hipófises bovinas. Extratos de pituitária foram obtidos e fracionados conforme descrito no item 15 de Métodos. Atividade estimulatória da síntese de DNA foi ensaiada para as diversas frações obtidas, inclusive a preparação final chamada PF. Curvas de dose das diversas frações,

Fig. 8 - Curva de dose de EGF para células 3T3. Atividade estimulatória da síntese de DNA, conforme descrito em Métodos.

ensaiadas com células 3T3 e Y-1, são apresentadas nas figs. 9 e 10 respectivamente. PF mostrou-se mais ativo que a preparação de NIH-LH-B8, mais ativo que o extrato cru e, além disso, não contém inibidores da síntese de DNA para estas células. Outras preparações de PF apresentaram comportamento semelhante com pequenas diferenças na atividade específica.

Alguns autores (BURGER, 1970; SEFTON & RUBIN, 1970) apresentaram resultados indicando que proteases estimulam síntese de DNA e divisão celular em fibroblastos de embrião de galinha. Por outro lado é sabido que proteases podem contaminar preparações de hormônios proteicos da pituitária (ELLIS, 1958). Em

Fig. 9 - Curvas de dose das frações obtidas de glândulas pituitárias, para células 3T3. Atividade estimulatória da síntese de DNA, conforme descrito em Métodos. O—O extrato cru; □—□ precipitado de sulfato de amônio 55%; Δ—Δ precipitado de sulfato de amônio 100%; ◊—◊ NIH-LH-B8; ●—● PF.

face disso foi necessário verificar se a atividade estimulatória da síntese de DNA exibida por PF não era devida a proteases presentes na preparação. Esta possibilidade foi testada da seguinte maneira: primeiro, ensaios de atividade proteolítica foram feitos em preparações de PF e, segundo, tripsina e trombina foram usadas no nosso ensaio padrão com células carenciadas na tentativa de mimetizar a atividade de PF. Atividade proteásica não foi detectada em preparações de PF usando azoalbumina, azocaseína e BAPNA como substratos a pH 5,6; 7,0 e 8,0, com concentrações de PF de até 150 μ g de proteína por

ml. Além disso a atividade estimulatória de PF não se altera se for previamente tratado com PMSF (Tabela II). Verificou-se também que tripsina e trombina não apresentam qualquer atividade estimulatória da síntese de DNA em células 3T3 e Y-1. Dados estes resultados concluímos que a atividade estimulatória de PF provavelmente não é devida a proteases.

Fig. 10 - Curvas de dose das frações obtidas de glândulas pituitárias, para células Y-1. Atividade estimulatória da síntese de DNA, conforme descrito em Métodos. ○—○ extrato cru; □—□ precipitado de sulfato de amônio 55%; △—△ precipitado de sulfato de amônio 100%; ◆—◆ NIH-LH-B8; ●—● PF.

Tabela II - Efeito de PMSF sobre a atividade estimulatória de soro e PF

	Incorporação de Timidina ^3H em DNA (cpm/placa)	
	Células 3T3	Células Y-1
Controle (0,2% FCS)	8400	4000
1% FCS dializado	17700	9600
1% FCS dializado/PMSF	13200	6800
1 $\mu\text{g/ml}$ PF dializado	12500	10400
1 $\mu\text{g/ml}$ PF dializado/PMSF	13000	11400

Tratamento de soro (FCS) e PF com PMSF, conforme descrito em Mé todos.

1.3. Resposta de Células Carenciadas

Na resposta de células carenciadas à estimulação é de interesse examinar duas variáveis: a) a extensão do "lag" que precede a onda de síntese de DNA e b) a velocidade com que as células entram na fase S (início da replicação).

A fig. 11 mostra uma cinética de estimulação com soro, medida em termos da porcentagem de núcleos marcados após incorporação contínua de timidina ^3H . Note-se que o "lag" é claro e igual a 14 horas. Se estes resultados forem lançados em termos de 100 - % de núcleos marcados (ou células que ainda não entraram em S) em função do tempo, num gráfico semilogaritmico, obtém-se a curva da fig. 12. Este gráfico mostra que a entrada de células em S segue uma cinética de primeira ordem.

Fig. 11 - Cinética de reestimulação da síntese de DNA por soro, em fibroblastos (ST1) carenciados para soro. Protocolo descrito em Métodos. ■—■ culturas controle (não estimuladas); □—□ estimuladas com 5% FCS em $t = 0$. Gráfico da % de núcleos marcados (células que entraram em S) em função do tempo após reestimulação; escalas lineares.

Este padrão parece ser geral sendo um ponto importante o caráter tudo ou nada da resposta celular. O "lag" é o tempo que leva para uma célula deixar o estado G_0 e atingir S passando pela fase G_1^C postulada na introdução. Operacionalmente pode-se referir a este "lag" simplesmente como uma fase G_1 .

Podemos adiantar que na resposta das células carenciadas o "lag" que precede a síntese de DNA é constante e não depende nem do tipo e nem da concentração do estimulador (soro,

hormônio ou fator de crescimento). Já a constante de velocidade da entrada de células em S aumenta com a concentração do estimulador.

Fig. 12 - Cinética de reestimulação da síntese de DNA por soro, em fibroblastos (ST1) carenciados para soro. ●—● culturas controle (não estimuladas); ○—○ estimuladas com 5% FSC em $t = 0$. Neste gráfico semilogarítmico foram lançados os valores de (100 - % de núcleos marcados) os quais correspondem a células que ainda não entraram em S, em função do tempo.

2. ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE CÉLULAS 3T3

2.1. Parâmetros de Crescimento

Os parâmetros de crescimento da linhagem 3T3 encontram-se resumidos na Tabela III. Para comparação foram colocados também nesta tabela, dados referentes à linhagem SV3T3 e a variante ST1 derivada de células 3T3 e discutida mais adiante. Note-se

Tabela III - Propriedades de células 3T3, ST1 e SV3T3

Linhagem	Densidade de saturação (células/cm ²)		Tempo de dobramento (hora)		Crescimento em Metocel	Número de cromossomos por célula
	10% CS	1% CS	10% CS	1% CS		
3T3	$0,4 \times 10^5$	$0,9 \times 10^4$	18	90	-	$80^{+2,5}$
ST1	$4,1 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	14,5	38	+	40^{+1}
SV3T3	$4,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	13	13	+	$75,6^{+4,8}$

Densidade de saturação e tempo de dobramento foram determinados através de curvas de crescimento. Contagens de células, ensaios de crescimento em suspensão e cariótipos, conforme descrito em Métodos.

que a linhagem 3T3 praticamente não cresce em baixas concentrações de soro (1%), apresenta densidade de saturação em 10% de soro da ordem de 10 vezes menor que a linhagem 3T3 transformada por vírus SV40. Além disso enquanto células SV3T3 crescem em suspensão de metilcelulose formando colônias macroscópicas, células 3T3 não crescem neste meio, chegando, no máximo a formar microcolônias de 6 a 8 células.

É interessante lembrar que estes parâmetros (dependência de soro, densidade de saturação e crescimento em suspensão) têm sido classicamente usados para distinguir os fenótipos "normal" e "transformado". As células 3T3 e SV3T3 tipificam, respectivamente, células "normais" e "transformadas".

2.2. Efeito de Soro, Hormônios e Fatores de Crescimento

O efeito de diferentes concentrações de soro sobre a síntese de DNA de células 3T3 em repouso pode ser visto na fig. 6. "Plateau" é atingido à concentrações entre 2 e 4%.

A atividade estimulatória da síntese de DNA de hormônios e fatores de crescimento foi medida e os resultados estão sumarizados na tabela IV. Esta tabela indica que a modulação do crescimento de células 3T3 é complexa, envolvendo um número ainda indefinido de reguladores extracelulares do tipo endócrino. O efeito destes reguladores é variado podendo combinações deles levar a efeitos somatórios ou sinérgicos. Cabe destacar aqui alguns pontos. Hidrocortisona tem pequeno efeito estimulatório em concentrações fisiológicas; insulina só tem efeito estimulatório significativo em concentrações não

Tabela IV - Atividade estimulatória de diversos fatores sobre a síntese de DNA de células 3T3 e ST1 carenciadas para soro

Fatores de crescimento, hormônios ou soro	Células	Células ST1	
	3T3	- H	+ H
EGF	38	0	0
Insulina (I)	65 ^a ; 4 ^b	15 ^a	0 ^a
Hidro cortisona (H)	15	-	-
PF	44	0	0
Somatomedina B	1,3	0	0
Somatomedina C	0,9	0	0
PGF _{2α}	5	0	0
Albumina (BSA)	105	65	24
PF + H	85	-	-
EGF + H	55	-	-
PF + EGF	70	0	0
PF + I	105 ^a	11	0
EGF + I	103 ^a	NT	NT
BSA + I	106	70 ^a	96 ^a
PGF _{2α} + I	25 ^b	NT	0 ^a
CS	100	100	100
FCS	110	108	178

Todos os fatores foram usados em concentrações saturantes: EGF : 100 ng/ml; Insulina: a 2,5 µg/ml e b 50 ng/ml; hidro cortisona: 300 ng/ml; PF: 1 µg/ml; Somatomedina B: 1 µg/ml; Somatomedina C: 30 ng/ml; PGF_{2α}: 500 ng/ml; BSA (albumina de soro bovino): 10 mg/ml; CS (soro de vitelo): 5%; FCS (soro fetal bovino): 5%. Os valores da tabela representam a média de 3 experimentos. As atividades foram normalizadas em relação à CS. NT: não testado.

fisiológicas (2,5 µg/ml). No entanto ambos, hidrocortisona e insulina, em concentrações fisiológicas, têm efeito sinérgico quando adicionadas junto com PF. Como já mencionado (fig. 8b) EGF e PF têm efeitos somatóricos. Somatomedinas B e C e também $\text{PGF}_{2\alpha}$ têm atividade marginal ou não têm atividade. Já a combinação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ com concentrações fisiológicas de insulina mostra atividade significativa. Preparações comerciais de albumina de soro bovino podem apresentar altas atividades (de 5 lotes testados, 2 tiveram alta atividade, 2 tiveram baixa atividade e 1 não teve atividade). Estas atividades são devidas a fatores contaminantes da albumina de difícil separação. Preparações de albumina de ovo de galinha são isentas de atividade.

2.3. Efeito da Densidade da População Sobre a Resposta Celular à Reestimulação da Síntese de DNA

O efeito da densidade da população sobre o crescimento celular em culturas de fibroblastos foi bastante estudada no passado. À rigor antes da descoberta da ação de hormônios e fatores de crescimento sobre fibroblastos, o efeito de densidade era o único fenômeno considerado digno de estudo no crescimento destas culturas. A literatura é vasta, confusa e frequentemente controversa; daí a situação polêmica em que se encontrou o fenômeno conhecido como inibição de contacto. Como consequência disso o efeito da densidade da população sobre a estimulação da resposta celular é ainda sujeita à dúvidas.

Em nosso ensaio padrão de atividade as culturas são esparsas ($1,0 - 1,5 \times 10^5$ células por placa de 6 cm de diâmetro). Nestas circunstâncias as células estão distribuídas homogeneamente pela superfície da placa, aparecendo isoladas ou em grupos de no máximo quatro células. Com esta distribuição a resposta das células à estimulação é completamente ao acaso: os autorradiogramas mostram que o índice de marcação com timidina ^3H é homogêneo e independente da área considerada. Estes resultados mudam quando as culturas começam a ficar confluentes sendo agora crítico o efeito de contiguidade. Este fato é claramente demonstrado por experiências do seguinte tipo: 200 células são semeadas em placa de 6 cm de diâmetro; permite-se o crescimento de colônias até atingirem o tamanho médio de 1000 células por colônia. Neste ponto o número de células por placa é igual ao usado no ensaio padrão de atividade. Agora, entretanto, as células estão agrupadas em colônias grandes as quais apresentam dois tipos de células quanto à localização: células da periferia (não totalmente circundadas por outras) e células do centro da colônia (totalmente circundadas por células vizinhas). Uma vez obtidas as colônias procedeu-se ao ensaio de atividade de soro e fatores de crescimento por autorradiografia. Os resultados mostraram que as células da periferia da colônia apresentam porcentagens crescentes de núcleos marcados com concentrações crescentes de soro até que, em concentrações saturantes de soro a marcação torna-se homogênea (100% das células apresentando núcleos marcados). A extensão do halo de núcleos marcados é também proporcional à concentração de PF e, para uma dada concentração de PF, o halo é

Fig. 13 - Esquema do padrão de marcação em colônias de células 3T3 reestimuladas com soro, PF ou preparações impuras de NIH-LH-B8. Efeito de hidrocortisona. A área hachurada representa a proporção de núcleos marcados.

Fig. 14 - Fotomicrografias ilustrando o padrão de marcação de colônias de células 3T3 reestimuladas com soro, PF ou NIH-LH-B8. Efeito de hidrocortisona. a) Controle (não estimulado); b) estimuladas com concentrações subótimas de soro, PF ou NIH-LH-B8; c) concentrações subótimas de soro, PF ou NIH-LH-B8 + hidrocortisona (100 ng/ml); d) concentração saturante de soro (5% FCS); o mesmo aspecto é obtido com concentrações subótimas de PF (ou NIH-LH-B8) + hidrocortisona + 0,5% FCS. Aumento: 50X.

maior quando em presença de hidrocortisona (efeito sinérgico). Estes resultados, que encontram-se esquematizados na fig. 13 e ilustrados na fig. 14, mostram, portanto, que a capacidade de resposta das células aos fatores de crescimento diminui-se à medida que vão ficando circundadas por outras. Esta parece ser uma propriedade geral de fibroblastos normais, sendo ausente ou muito menos acentuada em fibroblastos transformados. Não obstante a diminuição da magnitude da resposta, células confluentes mostram a mesma cinética de resposta quando estimuladas (ver seção seguinte).

2.4. Cinética da Entrada de Células em S Após Estimulação

Estudos cinéticos foram feitos a fim de medir o "lag" que ocorre entre a reestimulação por soro ou fatores de crescimento e a síntese de DNA (operacionalmente definido como G1). O protocolo seguido está descrito no item 20 de Métodos. Os resultados, apresentados nas figs. 15 a e b, indicam que: a) a onda de síntese de DNA que ocorre após estimulação com soro, hormônios ou fatores de crescimento é precedida de um "lag" idêntico de 12 a 13 horas; b) o efeito aditivo de PF e insulina sobre a estimulação dada por EGF e o efeito sinérgico de hidrocortisona sobre a estimulação dada por PF (tabela IV) são devidos a um aumento na velocidade de entrada em S sem interferir com o tamanho do "lag"; c) o "lag" (ou G1) é constante e independente do fator estimulatório. Deve-se mencionar ainda que o tamanho do "lag" independe da densidade da cultura sendo o mesmo para células confluentes ou subconfluentes.

Fig. 15 - Cinética de reestimulação da síntese de DNA por soro, hormônios e fatores de crescimento em células 3T3. O—O Controle (não estimuladas); ●—● EGF (0,1 g/ml); □—□ Insulina (2,5 µg/ml); Δ—Δ PF (1 µg/ml); ●—● EGF (0,1 µg/ml) + PF (1 µg/ml) + Insulina (2,5 µg/ml); ▲—▲ PF (1 µg/ml) + hidrocortisona (0,3 µg/ml); ◇—◇ Soro (10% FCS).

Interpretamos estes resultados da seguinte maneira: a) somente células que estão em Go (estado de repouso) respondem à estimulação e b) o estímulo apenas determina se a célula sai ou não de Go mas não interfere com a velocidade com que elas progridem até a fase S. Esta interpretação é ainda melhor evidenciada pela experiência da fig. 16. Neste caso as células foram

Fig. 16 - Cinética da entrada em S de células 3T3 carenciadas para soro, após estimulação com hormônios e fator de crescimento. O—O Controle (não estimuladas); ●—● PF (1 $\mu\text{g/ml}$, adicionado em $t = 0$); □—□ PF (1 $\mu\text{g/ml}$ em $t = 0$) + hidrocortisona (0,3 $\mu\text{g/ml}$ em $t = 0$) + insulina (2,5 $\mu\text{g/ml}$ em $t = 0$); ■—■ PF (1 $\mu\text{g/ml}$ em $t = 0$) + hidrocortisona (0,3 $\mu\text{g/ml}$ em $t = 5$ h) + insulina (2,5 $\mu\text{g/ml}$ em $t = 5$ h).

estimuladas no tempo zero com PF ou com a combinação de PF + insulina + hidrocortisona. Além disso um lote de culturas foi estimulado no tempo zero somente com PF e 5 horas depois insulina e hidrocortisona foram adicionadas. Como era de se esperar as células estimuladas com PF apenas ou com a combinação de hormônios,

em $t = 0$, começaram a entrar em S ao mesmo tempo, somente que no primeiro caso o fluxo de entrada (cinética de primeira ordem) foi muito menor. Já as culturas estimuladas com PF ($t = 0$) e insulina + hidrocortisona ($t = 5$ h) apresentaram uma curva bifásica para entrada em S: inicialmente a velocidade de entrada foi idêntica à de PF apenas e, posteriormente (aproximadamente 5 horas depois) a velocidade passou a ser igual à de culturas estimuladas em $t = 0$ com a combinação de PF + insulina + hidrocortisona.

2.5. Efeitos da Diminuição da Concentração de Soro no Meio de Cultura

Conforme foi indicado pelos dados já apresentados, a redução do soro no meio de cultura leva ao acúmulo das células no estado Go (repouso). Para células em crescimento exponencial este acúmulo é progressivo e a cinética do processo foi seguida através de: a) a frequência de núcleos marcados após pulso de timidina ^3H (estimativa do "pool" de células em S); b) o índice mitótico. Os resultados são apresentados nas figs. 17 a e b. A curva de frequência de núcleos marcados (fig. 17a) revelou que 4 a 5 horas após a redução do soro, o "pool" de células em S cai continuamente. O valor mínimo (menor que 1% de núcleos marcados) só é atingido cerca de 20 horas após a diminuição da concentração de soro. A curva de índice mitótico (fig. 17b) mostrou uma queda brusca após 3 horas para manter-se, então, num patamar. Estes resultados são interpretados da seguinte maneira: a) após a redução do soro, células que estão em G_1^{C} (células em G_1 comprometidas com a síntese de DNA)

Fig. 17 - Cinética da entrada de células 3T3 no estado de repouso (G_0). Pulsos de 30 minutos de timidina- 3H . Detalhes do protocolo em Métodos. O—O Culturas mantidas em 5% de soro (FCS); ●—● Culturas transferidas em $t = 0$ para meio contendo 0,2% FCS.

continuam entrando em S e da fig. 17a obtém-se uma estimativa para G_1^C de 4 a 5 horas; b) o "pool" de células em G_2 flui normalmente para a mitose; c) 3 horas após a redução do soro o índice mitótico cai bruscamente devido a uma queda na velocidade de progressão das células através de S. Esta última inferência está de acordo com o longo tempo (20 horas) para que o índice de marcação atinja o seu nível mínimo, após a redução do soro, comparado com o tempo de duplicação da cultura em alto soro que é de 16 horas.

3. ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DO MUTANTE ST1 DERIVADO DE CÉLULAS 3T3

3.1. Isolamento da linhagem ST1

Estudos do controle do crescimento celular poderiam ser ampliados e enormemente facilitados se pudessemos dispor de mutantes ou variantes de células 3T3 com respostas diferentes a hormônios e fatores de crescimento. A busca deste tipo de variante levou-nos ao isolamento e caracterização da linhagem ST1.

Clones isolados de culturas de células 3T3 mutagenizadas e não mutagenizadas passavam por uma triagem inicial após um teste de resposta a soro, PF e hidrocortisona (fig. 18). Além disso, como rotina, adotava-se também inspecionar monocamadas confluentes para a presença de focos de células empilhadas as quais correspondem a células espontaneamente transformadas. O plaqueamento sucessivo de uma cultura deste tipo, não mutagenizada, em meio contendo baixa concentração de soro, permitiu-nos obter uma população enriquecida em células variantes. Esta população foi clonada e reclonada (de acordo com o item 8 de Métodos) e os clones resultantes foram testados segundo o item 19 de Métodos. Como o comportamento dos clones variantes obtidos era idêntico, escolhemos um, que chamamos ST1, e descartamos os outros. Passamos então à caracterização do variante ST1.

3.2. Parâmetros de Crescimento

O crescimento de células ST1 em diferentes concentrações de soro pode ser visto na fig. 19. A velocidade de crescimento

Fig. 18 - Teste de resposta à soro, hormônios e fator de crescimento para três clones diferentes de células 3T3. Atividade estimulatória da síntese de DNA, medida conforme Métodos.

Fig. 19 - Curvas de crescimento para células ST1 mantidas em 1% FCS (Δ — Δ) ou 10% FCS (O—O).

e a densidade de saturação são proporcionais à concentração de soro, indicando que a linhagem ST1 é dependente de soro. Para comparação apresenta-se resultados obtidos para a linhagem SV3T3 na fig. 20. Estes dados, resumidos na tabela III, mostram que em 10% de soro células ST1 se comportam como a linhagem SV3T3: empilham e atingem alta densidade de saturação (da ordem de 10 vezes maior que células 3T3). Em 1% de soro, entretanto, SV3T3 cresce com o mesmo tempo de dobramento e atinge alta densidade de saturação enquanto o crescimento de células ST1, em baixas

Fig. 20 - Curvas de crescimento para células SV3T3 mantidas em 1% FCS (Δ — Δ) ou 10% FCS (O—O).

concentrações de soro, é reduzido. A tabela III mostra ainda que células ST1, ao contrário da linhagem parental 3T3, são capazes de crescer em suspensão, isto é, não dependem de uma superfície sólida para crescer, e apresentam a metade do complemento cromossômico de células 3T3, ou seja, possuem apenas 40 cromossomos.

A aplicação de nosso teste rotineiro de triagem (fig. 18) revelou que células ST1 são apenas parcialmente dependentes

de soro: a síntese de DNA é reduzida quando a concentração de soro é passada de 5 para 0,2% mas um nível significativo de síntese permanece (20% após 24 horas de incubação em baixo soro), sendo as células carenciadas passíveis de reestimulação por readição de soro. Além disso as células ST1 diferem da linhagem parental por não responderem a PF e serem inibidas por concentrações fisiológicas de hidrocortisona (100 ng/ml) ao invés de estimuladas.

Na verdade experiências posteriores mostraram (tabela IV) que células ST1 não respondem à maioria dos hormônios e fatores que agem sobre a linhagem parental 3T3. Somente hidrocortisona tem efeito sobre ST1 em concentrações fisiológicas, pois insulina só é ativa em doses altas enquanto albumina apresenta um fator ativo de natureza ainda indefinida (ver a seção 3.7).

Resumindo, podemos dizer que a linhagem ST1 exhibe, em cultura, um fenótipo típico de fibroblasto transformado. O interesse nesta linhagem cresceu quando tivemos indícios de que hidrocortisona induzia em ST1 uma transição de um fenótipo transformado para um fenótipo "normal". Dadas as vantagens óbvias de uma célula deste tipo os efeitos de hidrocortisona nestas células foram estudados com cuidado.

3.3. Efeito de Hidrocortisona

O efeito de hidrocortisona na curva de resposta de dose para soro pode ser visto na fig. 21. É possível notar que quando o esteróide é adicionado ao mesmo tempo que o soro à

Fig. 21 - Curva de dose de soro para células ST1 na ausência (O—O) ou na presença (●—●) de hidrocortisona (300 ng/ml). Atividade estimulatória da síntese de DNA, medida conforme Métodos.

célula ST1 em repouso, a curva de dose fica desviada para concentrações mais altas de soro. Além disso o efeito inibitório de hidrocortisona sobre a síntese de DNA é tanto maior quanto menor a concentração de soro (fig. 22). Assim a síntese de DNA residual encontrada em células mantidas em baixo soro (0,2%) é essencialmente abolida por adição de hidrocortisona ao meio. A ação inibitória de hidrocortisona aumenta progressivamente com o tempo de incubação alcançando nível máximo após 20 horas (fig. 23).

Fig. 22 - Efeito da concentração de soro na atividade inibitória da síntese de DNA por hidrocortisona (300 ng/ml) em células ST1.

A inibição da síntese de DNA por hidrocortisona não é devida à morte de células. A eficiência de plaqueamento (determinada segundo o item 7 de Métodos) é a mesma tanto na presença como na ausência de hidrocortisona: 52,0 e 52,7% respectivamente.

Células ST1 crescem bem tanto em soro de vitelo como em soro fetal bovino formando multicamadas de células empilhadas e desorganizadas e alcançando altas densidades de saturação (tabela V). A adição de hidrocortisona causa uma diminuição

Fig. 23 - Cinética da inibição da síntese de DNA por hidrocortisona (300 ng/ml) em células ST1.

Tabela V - Efeito de hidrocortisona na densidade de saturação de células ST1

Tipo de soro	Troca de meio	Densidades de saturação (cél./cm ² x 10 ⁻⁵)	
		+ H	- H
FCS	+	1,6	4,6
	-	0,7	1,9
CS	+	0,6	4,2
	-	0,3	2,2

10⁴ células/cm² foram semeadas em 10% soro fetal bovino ou 10% soro de vitelo. 20 horas depois hidrocortisona (300 ng/ml) foi adicionada à metade das culturas. O meio de algumas placas foi trocado de 2 em 2 dias. Contagens de células, conforme descrito em Métodos.

na densidade de saturação de 3 vezes em soro fetal bovino e 7 vezes em soro de vitelo (tabela V) indicando que na presença de hidrocortisona soro fetal bovino suporta melhor o crescimento que soro de vitelo. Este efeito pode ser visto também na tabela IV em termos de estimulação da síntese de DNA. Na presença do hormônio as células tornam-se achatadas e formam monocamada regular ao atingirem a densidade de saturação (em ambos os tipos de soros).

Fig. 24 - Efeito de hidrocortisona na velocidade de crescimento de células ST1. A seta indica o ponto em que hidrocortisona (300 ng/ml) foi adicionada ●—●. Controle: O—O.

O tempo de duplicação (T_D) é também alterado por hidrocortisona. Quando o hormônio é adicionado a uma cultura em crescimento exponencial T_D passa de 15 para 20 horas (fig. 24). Esta alteração na velocidade de crescimento ocorre 13 a 14 horas após a adição de hidrocortisona.

O efeito de hidrocortisona foi estudado também em colônia de células ST1, obtidas segundo protocolo descrito no item 7 de Métodos. Na ausência de hidrocortisona as colônias são desorganizadas, frouxas (com células fracamente aderidas umas às outras) e apresentam maior grau de empilhamento no centro da colônia. Na presença do hormônio as células da região central da colônia são isométricas e fortemente aderidas umas às outras. Colônias de células ST1 crescendo em 10% de soro foram submetidas a tratamento com baixo soro ou baixo soro + hidrocortisona por 24 horas e, neste ponto, reestimuladas por adição de diferentes concentrações de soro. A análise do padrão de distribuição de núcleos marcados, por autorradiografia, encontra-se esquematizada na fig. 25 e ilustrada na fig. 26. Na ausência de hidrocortisona a frequência de núcleos marcados é proporcional à concentração de soro mas estes se encontram distribuídos homogeneamente por toda a colônia. Por outro lado na presença de hidrocortisona os núcleos marcados ficam restritos à periferia da colônia sendo que aqui (como em colônias de células 3T3) o halo de núcleos marcados é proporcional à concentração de soro.

Ao contrário da linhagem parental 3T3, células ST1 plaqueadas em suspensão de metilcelulose (item 11 de Métodos)

Fig. 25 - Esquema do padrão de marcação em colônias de células ST1 submetidas à diferentes concentrações de soro na presença e na ausência de hidrocortisona (300 ng/ml). Os pontos escuros representam núcleos marcados.

Fig. 26 - Fotomicrografia ilustrando o padrão de marcação em co-lônias de células ST1 na ausência (a, b, c) e na presença (d, e, f) de hidrocortisona (300 ng/ml). a) e d) 0,2% FCS; b) e e) 0,7% FCS; c) e f) 5% FCS. Aumento: 100X.

desenvolvem colônias macroscópicas de cerca de 3 mm de diâmetro em 21 dias (ver ilustração na fig. 27). Eficiências de plaqueamento de 1 a 5% foram obtidas em meio metocel contendo 10% de soro enquanto com 0,2 a 5% de soro a eficiência de plaqueamento foi sistematicamente zero. Células ST1 plaqueadas em meio metocel + hidrocortisona não formaram colônias. Esta inibição da formação de colônias por hidrocortisona não é devida à morte das células uma vez que a remoção da hidrocortisona (por lavagem e realimentação das placas com meio metocel sem hidrocortisona) 21 dias após o plaqueamento levou, aos 46 dias de plaqueamento, ao surgimento de colônias do mesmo tamanho e com a mesma eficiência de plaqueamento apresentada, aos 21 dias, por culturas paralelas mantidas na ausência do hormônio.

3.4. Análise da Atividade de Diversos esteróides Sobre Células ST1

A ação inibitória de uma série de esteróides sobre a síntese de DNA foi investigada a fim de determinar quais os grupos funcionais necessários para a atividade inibitória. Os resultados são apresentados na fig. 28 e na tabela VI onde foram colocados dados comparativos da estimulação de células 3T3 pelos diversos esteróides. É possível verificar que: a) a configuração do C-20 e C-21 de hidrocortisona (comum a todos os glicocorticóides) é necessária porque a substituição de $-CH_2OH$ em hidrocortisona por $-CH_3$ em progesterona causa uma diminuição acentuada na atividade inibitória e porque os esteróides sexuais (que não possuem C-20 e C-21) foram completamente inativos; b) o grupo $-OH$ do C-11 que é essencial para atividade glicocorticóide

Fig. 27 - Aspecto d colônias desenvolvidas em suspensão de me
tilcelulose por células a) 303; b) SV3T3; c) S11 na ausência
de hidrocortisona; ST1 na presença de hidrocortisona (300
ng/ml). Aumento:

Fig. 28 - Inibição da síntese de DNA em células ST1 por diversos esteróides; curvas de dose. Os esteróides foram adicionados a células carenciadas para soro. Após 20 horas de incubação, timidina ^3H foi incorporada por 4 horas e a incorporação em DNA medida como descrito em Métodos. % de inibição foi obtida por comparação de culturas tratadas com culturas não tratadas. □—□ dexametasona; ●—● hidrocortisona; ■—■ desoxicorticosterona; ○—○ cortisona; △—△ progesterona; ▽—▽ 17,β-estradiol; ◆—◆ testosterona; ◇—◇ dihidrotestosterona.

(BUSH & MALESH, 1959) não é necessário para a atividade inibitória em células ST1 porque desoxicorticosterona (que não possui -OH no C-11) e cortisona (que possui C=O no C-11) são bastante ativos. Portanto a atividade inibitória de esteróides em células ST1 não correlaciona perfeitamente com suas atividades glicocorticóides, enquanto a atividade estimulatória destes esteróides sobre células 3T3 segue perfeitamente a atividade glicocorticóide (THRASH et al., 1974 e resultados obtidos por nós, apresentados na tabela VI).

Tabela VI - Estimulação da síntese de DNA em células 3T3 e inibição da síntese de DNA em células ST1 por diferentes esteróides

Esteróide	Estimulação de células 3T3 "normais"		Inibição de células "variantes" ST1	
	Concentração para 50% de estimulação (ng/ml)	Estimulação relativa máxima (%)	Concentração para 50% de inibição (ng/ml)	Inibição relativa máxima (%)
Dexametasona	1	100	1	100
Hidro cortisona	6	100	2	100
Desoxicorticosterona	40	13	7	88
Cortisona	-	inativo ^a	20	86
Progesterona	-	inativo ^a	100	56
Estradiol	-	inativo ^a	-	30 ^b
Testosterona	-	inativo ^a	-	inativo ^a
Dihidrotestosterona	-	-	-	inativo ^a

Os valores representam a média de 3 experimentos e foram calculados à partir de curvas de dose como da fig. 28. Esteróides foram adicionados a células carenciadas para soro, como descrito em Métodos. a: inativo à concentrações de até 10^3 ng/ml; b: à 10^3 ng/ml (nenhuma inibição significativa abaixo desta concentração).

3.5. Ação de hidrocortisona no ciclo celular

Resultados como os das figs. 23 e 24 sugeriram-nos que a ação de hidrocortisona podia ser específica para um ponto do ciclo celular anterior à fase S. Particularmente interessava-nos saber se este ponto estaria na transição $G_0 \rightarrow G_1^C$. Para testar esta hipótese, hidrocortisona foi adicionada às culturas crescendo exponencialmente na presença de 5% de soro. Durante as 13 horas seguintes o "pool" de células em S foi estimado através de pulsos de timidina 3H e autorradiografia. Os resultados, apresentados na fig. 29, revelaram que: a) a porcentagem de células em S permanece constante pelas primeiras 5 horas; b) à partir daí a porcentagem de células em S cai progressivamente por 6 horas atingindo então um novo "plateau". Estes resultados seriam exatamente os esperados se hidrocortisona apenas afetasse células em G_1 , 5 ou mais horas antes de S; é provável que só não sejam afetadas as células que estão em G_1^C . Se esta interpretação estiver correta, os dados da fig. 29 permitem estimar G_1^C , como sendo de 5 horas, e S entre 6 e 7 horas (à partir do tempo necessário para a porcentagem de núcleos marcados ir de um "plateau" a outro).

Os dados das figs. 24 e 29 indicam que hidrocortisona não deve interferir com o fluxo de células através da mitose. Portanto, se hidrocortisona for adicionada a uma cultura em crescimento exponencial, é de se prever que o índice mitótico permanecerá constante por um período de tempo igual a $G_1^C + S + G_2+M$. Esperava-se que este tempo fosse maior que 11 horas ($G_1^C + S$) e menor que 15 horas (T_D na ausência de hidrocortisona, que representa uma boa aproximação do tempo médio de geração (PAINTER &

Fig. 29 - Cinética do efeito de hidrocortisona sobre células ST1 crescendo exponencialmente: Medidas do índice de marcação. Hidrocortisona (300 ng/ml) adicionada em $t = 0$. Pulsos de timidina ^3H (1 hora, 10^{-7} M). Detalhes do protocolo em Métodos.

MARR, 1968). Experiências deste tipo foram realizadas e os resultados encontram-se na fig. 30. Conforme a previsão anterior o índice mitótico cai somente 14 horas após a adição do hormônio. Era de se esperar que a queda fosse brusca uma vez que a mitose é, em geral, de curta duração. Note-se que o tempo de mitose pode ser calculado, com boa aproximação, a partir do índice mitótico (0,053) e do T_D (15 horas) em crescimento exponencial e "steady-state", obtendo-se o valor de 0,6 horas. Levando-se

em conta que $G1^C + S = 11$ horas (da fig. 29), $G1^C + S + G2 + M = 14$ horas (da fig. 30) e que $M = 0,6$ horas, calcula-se que $G2$ deve ser igual a 2,4 horas. Aceitando-se o raciocínio desenvolvido acima, é razoável concluir-se que hidrocortisona causa diminuição na velocidade de crescimento (T_D passando de 15 para 20 horas) por aumentar o tempo médio de residência das células no estado G_0 ou por diminuir a probabilidade da transição $G_0 \rightarrow G1^C$.

Fig. 30 - Cinética do efeito de hidrocortisona sobre células ST1 crescendo exponencialmente: Medidas do índice mitótico. O—O Controle (5% FCS); ●—● 5% FCS + hidrocortisona (300 ng/ml).

Fig. 31 - Cinética do efeito da redução do soro e/ou adição de hidrocortisona sobre células ST1 crescendo exponencialmente; Medidas do índice de marcação. Pulso de timina ^3H (1 hora, 10^{-7}M). Detalhes do protocolo em Método. $\square-\square$ 0,2% FCS; $\bullet-\bullet$ 0,2% FCS + hidrocortisona (300 ng/ml); $\circ-\circ$ 5% FCS + hidrocortisona (300 ng/ml).

Dado que o efeito de hidrocortisona é muito mais acentuado em baixas concentrações de soro, um outro tipo de experiência também foi feito. Células crescendo exponencialmente em

5% de soro foram transferidas para 0,2% de soro ou 0,2% de soro + hidrocortisona e a porcentagem de núcleos marcados (fig. 31) e o índice mitótico (fig. 32) foram medidos periodicamente.

Fig. 32 - Cinética do efeito da redução do soro e/ou adição de hidrocortisona sobre células ST1 crescendo exponencialmente: Medidas de índice mitótico O—O Controle (5% FCS); □—□ 0,2% FCS; Δ—Δ 0,2% FCS + hidrocortisona (300 ng/ml).

A curva da fig. 31 mostra que: a) como para o caso de 5% de soro, o índice de marcação não cai durante as primeiras 5 horas; b) na verdade em culturas transferidas para 0,2% de soro sem hormônio existe uma tendência para aumentar o índice de marcação nas primeiras horas; c) após 5 horas o índice de marcação cai continuamente até níveis negligenciáveis no caso de

0,2% + hidrocortisona, levando cerca de 20 horas para atingir o mínimo. Comparando as curvas da porcentagem de núcleos marcados para 5% de soro + hidrocortisona (fig. 29) e 0,2% de soro + hidrocortisona (fig. 31), deve-se destacar dois pontos: a) o ombro, durante o qual o índice de marcação é constante, é o mesmo (5 horas) e corresponderia a G_1^C ; b) o tempo durante o qual o índice de marcação cai (desde o "plateau" das primeiras 5 horas até o seu valor mais baixo, período este que deve ser igual ao comprimento de S) é muito maior para 0,2% de soro + hidrocortisona (de 6 a 7 horas). Este último resultado sugere que a redução do soro no meio de cultura diminui a velocidade com que as células atravessam S, muito embora não interfira com a entrada em S das células que já estão comprometidas com a replicação do DNA. Situação equivalente já foi focalizada no caso de células 3T3 (fig. 17a).

Os dados de índice mitótico (fig. 32) estão de acordo com estas interpretações. Três horas após a transferência das culturas para 0,2% de soro + hidrocortisona (ou para 0,2% de soro somente) o índice mitótico cai bruscamente para atingir um patamar cujo valor é 50% mais baixo e que é mantido por cerca de 17,5 horas (e à 24 horas o índice mitótico é praticamente nulo). Se o "pool" de células em G_2 não fosse afetado pelo tratamento mas o fluxo de células através de S fosse diminuído, os resultados da fig. 32 seriam exatamente os esperados.

Em conclusão pode-se dizer que há dados convincentes indicando que hidrocortisona interfere apenas com a passagem de células de G_0 para G_1^C , enquanto a redução do soro parece causar dois efeitos: diminui a probabilidade da transição

$G_0 \rightarrow G_1^C$ e aumenta o tempo necessário para as células atravessarem S.

3.6. Efeito de Hidrocortisona Sobre a Reestimulação de Células ST1 Carenciadas para Soro

Uma vez verificado que hidrocortisona interfere com a transição $G_0 \rightarrow G_1^C$, tornou-se de interesse saber se a resposta de células carenciadas à reestimulação por soro, era alterada pelo hormônio. Células ST1 foram carenciadas por 24 horas em 0,2% de soro ou 0,2% de soro + hidrocortisona e, em seguida, reestimuladas por adição de soro. O "lag" que precede a síntese de DNA foi medido pela incorporação da timidina 3H em DNA (fig. 33) ou pela porcentagem de núcleos marcados (fig. 34a e b). Estes resultados mostram claramente que o "lag" é maior (14 horas) na presença de hidrocortisona do que na sua ausência (10 horas). A onda de mitoses (fig. 35) das células tratadas com o hormônio também apareceu defasada de 4 horas em relação às células não tratadas, indicando que a diferença se encontra no período anterior a S (ver tabela VII). Estes resultados são, portanto, coerentes com a proposição de que hidrocortisona interfere somente com a transição $G_0 \rightarrow G_1^C$.

3.7. Ação de Fatores de Crescimento Sobre Células ST1

O corpo de resultados apresentados até aqui mostra que é inapropriado chamar o efeito de hidrocortisona sobre células ST1 de ação inibitória como o fizemos inicialmente. Na verdade o hormônio induz uma alteração estrutural nestas células, que

Fig. 33 - Cinética de reestimulação da síntese de DNA em células ST1 tratadas ou não com hidrocortisona. ●—● 0,2% FCS; ○—○ 5% FCS; ■—■ 0,2% FCS + hidrocortisona (300 ng/ml); □—□ 5% FCS + hidrocortisona (300 ng/ml); Δ—Δ 0,2% FCS + hidrocortisona; esteróide removido em $t = 0$.

leva à transição do fenótipo transformado para o "normal". É desnecessário enfatizar a importância que teria a elucidação do mecanismo envolvido nesta ação de hidrocortisona.

Fig. 34 - Cinética (após reestimulação) da entrada em S por células ST1 não tratadas (a) ou tratadas com 300 ng/ml de hidrocortisona (b). O—O 0,2% FCS; ●—● 5% FCS

Fig. 35 - Cinética (após reestimulação) da entrada em M por células ST1 não tratadas (b) ou tratadas com 300 ng/ml de hidrocortisona (a). ■—■ e ●—● 0,2% FCS; □—□ e ○—○ 5% FCS.

Tabela VII - Estimativas de G1 e T (G1 + S + G2) na reestimulação de células STL por soro

			$(G1^{+H} - G1^{-H})$	T^{+H}	T^{-H}	$(T^{+H} - T^{-H})$
Cinética de incorporação de timidina 3H em DNA	1)	14,5	1) 10,4			
	2)	14,5	2) 10,6	-	-	-
Índice de marcação	2)	13,9	2) 10,1	-	-	-
			2) 3,8			
Índice mitótico	-	-	-	2) 21,8	2) 18,0	2) 3,8

$G1^{+H}$ e $G1^{-H}$ representam o tamanho do "lag" que precede a síntese de DNA (em horas) para células tratadas com hidrocortisona ou não tratadas, respectivamente. T^{+H} e T^{-H} são o período de tempo equivalente a $G1 + S + G2$ para células tratadas e não tratadas, respectivamente. $G1$ foi estimado graficamente a partir de curvas como aquelas apresentadas nas figs. 34 a e b. Estimativas de T foram feitas a partir de curvas de índice mitótico como as da fig. 35. Os números 1) e 2) correspondem a estimativas obtidas de 2 experimentos totalmente independentes.

Procurando levar avante a análise deste mecanismo, tornou-se lógico perguntar se hidrocortisona alterava a resposta de células ST1 a fatores de crescimento de natureza conhecida. Assim, a atividade de diversos fatores que estimulam a síntese de DNA da linhagem parental 3T3 foi testada em células ST1, na presença e na ausência de hidrocortisona. Um resumo dos dados obtidos é apresentado na tabela IV. Verificou-se que apesar de hidrocortisona induzir, em células ST1, alta dependência para soro e "inibição de contacto", a célula permanece sem resposta a EGF, PF, somatomedinas e $\text{PGF}_{2\alpha}$. Somente insulina e albumina bovina são ativas: na ausência de hidrocortisona a atividade destes fatores é somatória (fig. 36a) e, na presença do hormônio, é sinérgica (fig. 36b). A atividade da albumina parece ser devida a um contaminante não dializável, o qual pode ser um fator de crescimento ainda desconhecido.

Fig. 36 - Atividade estimulatória de insulina e albumina de soro bovino (BSA) sobre a síntese de DNA de células ST1 a) na ausência de hidrocortisona; b) na presença de hidrocortisona (300 ng/ml) O—O e □—□ BSA; ●—● e ■—■ BSA + Insulina (1 µg/ml).

A atividade de proteases, como tripsina e trombina, na estimulação da síntese de DNA de células ST1 foi testada. Os resultados foram negativos tanto na ausência como na presença de hidrocortisona.

3.8. Ação de Hidrocortisona Sobre Tumores Induzidos por Células ST1

Como vimos, células ST1 em cultura apresentam uma série de características de células transformadas: empilhamento, alta densidade de saturação, crescimento em suspensão, etc. Testes de tumorigenicidade em camundongos "nude" (item 13 de Métodos) revelaram que, ao contrário da linhagem parental 3T3, células ST1 são capazes de induzir tumores em animais (fig. 37 e tabela III). A análise histopatológica destes tumores (item 13 de Métodos) indicou tratar-se de fibrosarcomas com alto grau de anaplasia, alto índice mitótico e com propriedades invasivas acentuadas (fig. 38). Vimos ainda que, em cultura, hidrocortisona induz, reversivelmente, a transição do estado transformado para o estado normal (crescimento ordenado, baixa densidade de saturação, incapacidade de crescer em suspensão, etc). A definição destes fenótipos em cultura é, entretanto, operacional, não se sabendo se têm correspondência com a fisiologia do animal intacto. Daí ser necessário efetuar testes "in vivo".

Procuramos investigar, então, se esteróides ativos em cultura eram capazes de inibir o crescimento de tumores induzidos em animais. Os resultados, que podem ser vistos na tabela VIII, mostram claramente a inibição de crescimento tumoral

Fig. 37 - Efeito de hidro cortisona no crescimento de tumores induzidos por células ST1 em camundongos "nude". Aspecto dos animais aos 38 dias de experiência a) Controle (não tratado); b) Injetado periodicamente com dexametasona (10 μ g/animal).

Fig. 38 - Cortes histológicos de tumores induzidos por células ST1 em camundongos "nude": a) Controle (não tratado); b) injetado periodicamente com dexametasona (10 μ g/animal). A seta indica células em divisão. Aumento: 640X.

Tabela VIII - Efeito de dexametasona no crescimento de tumores induzidos em camundongos "nude" por células ST1

Animal número	Injeções de dexametasona	Peso do animal (g)	Peso do tumor (mg)
1	-	22,1	194
2	-	23,7	202
4	-	20,7	242
5	-	18,5	86
6	+	15,3	22
7	+	15,0	29

7 animais de 4 semanas foram inoculados com $1,5 \times 10^6$ células cada um. Aos 20 dias todos os animais apresentavam tumores palpáveis (de 0,5-1,0 cm). Neste ponto alguns animais passaram a receber injeções subcutâneas de dexametasona (10 µg/animal cada 2 ou 3 dias). 18 dias depois os animais foram sacrificados e os tumores dissecados. Animal nº 3 morreu antes do término da experiência.

provocado por dexametasona. Além disso a análise histopatológica revelou crescimento bloqueado (virtual ausência de mitoses) e um grau muito menor de malignidade (fig. 38). Estes resultados são encorajadores pois indicam que o hormônio é ativo também "in vivo".

3.9. Níveis Intracelulares de cAMP em Células ST1

Evidentemente estávamos interessados em obter informações sobre o mecanismo de ação da hidrocortisona ao nível bioquímico. Como cAMP tem sido apontado como mediador importante

na regulação do crescimento celular (SHEPPARD & BANNAL, 1974) pareceu-nos razoável investigar se o hormônio induzia altera - ções nos níveis intracelulares de cAMP em células ST1.

Medidas de cAMP foram feitas pelo método de GILMAN (1970). Células ST1 crescendo exponencialmente em meio contendo 5% de soro apresentam $9,5 (\pm 0,5)$ pmoles de cAMP por mg de proteína. A adição de hidrocortisona a culturas neste estã-gio não alterou significativamente o nível de cAMP. Já o ca - renciamento das células por 24 horas em 0,2% de soro, levou a um aumento do nível de cAMP para $20,5 (\pm 0,5)$ pmoles/mg de pro - teína. Na verdade a redução do soro no meio de cultura leva a um rápido aumento de cAMP. Assim, 1 hora após a transferên - cia de células de meio contendo 5% de soro para meio sem soro, o nível de cAMP atinge 26,0 pmoles/mg de proteína. Este aumen - to do cAMP intracelular de células ST1, em resposta à redução do soro no meio de cultura, tem sido encontrado entre todas as linhagens de fibroblastos estudadas, devendo ser, portanto, uma propriedade comum. Quando hidrocortisona esteve presente duran - te o carenciamento (24 horas em 0,2% de soro), o nível de cAMP foi o mesmo que aquele encontrado na ausência do hormônio, isto é, 21,0 pmoles/mg de proteína. Portanto não conseguimos detec - tar nenhum efeito de hidrocortisona sobre os níveis intracelula - res de cAMP em células ST1.

3.10. Alterações Morfológicas de Células ST1: Efeito de Soro, cAMP e Hidrocortisona

A ação de hidrocortisona sobre células ST1 é do tipo pleiotrópico; logo era importante fazer uma inspeção cuidadosa

dos efeitos do hormônio sobre a célula, na tentativa de encontrar indicações de seu efeito primário.

Como já foi mencionado, hidrocortisona torna as células ST1 mais achatadas e aumenta sua adesão tanto à superfície da placa de cultura como às células vizinhas. Estas observações indicam que estão ocorrendo alterações na superfície celular. Na verdade ST1 apresenta alterações morfológicas incomuns para fibroblastos, alterações estas que dependem do complexo membrana-citoesqueleto e que fornecem sugestões interessantes sobre o possível efeito primário de hidrocortisona.

Um aspecto muito interessante de células ST1 é a dramática alteração morfológica que sofre quando o soro é retirado do meio. Assim, quando transferidas para meio sem soro, 100% das células se arredondam em apenas 30 minutos adquirindo o aspecto da fig. 39.

Este fenômeno de arredondamento não é bloqueado por inibidores de síntese de proteína ou RNA. Citocalasina B também não interfere com o fenômeno mas colchicina bloqueia completamente o arredondamento, mostrando que se trata de processo dependente de microtúbulos.

Concentração de 0,2% de soro é suficiente para evitar o arredondamento das células. Albumina bovina substitui parcialmente o soro, porém os diversos hormônios ou fatores proteicos testados (insulina, ACTH, somatomedinas e PF) ou combinações deles, não tiveram qualquer efeito sobre o arredondamento provocado pela retirada de soro.

Fig. 39 - Alteração morfológica provocada pela retirada do soro ou por adição de cAMP a culturas de células ST1. a) Controle (não tratado); b) tratado por 30 minutos em meio sem soro ou 30 minutos em meio contendo 5% de soro + 100 mM cAMP. Aumento: 150X.

Durante estas experiências uma observação interessante foi feita: verificou-se que a adição de cAMP ao meio de cultura contendo altas concentrações de soro causa 100% de arredondamento (fig. 39) mimetizando o efeito da retirada do soro. Tanto cAMP como dibutiril-cAMP provocam o arredondamento na presença de 5% de soro, porém 5' AMP ou cGMP não têm qualquer efeito. Esta observação sugere que cAMP desencadearia o arredondamento agindo a nível de microtúbulos.

Como mostra a fig. 40a hidro cortisona não impede que o arredondamento provocado pela retirada do soro ocorra mas acelera o retorno das células ao estado natural (achatadas). Na ausência de hidro cortisona, albumina, em baixas concentrações (0,2 mg/ml) não tem efeito sobre o arredondamento (fig. 40b) porém em concentrações de 1 e 5 mg/ml o arredondamento é retardado (100% atingido apenas depois de 5 horas), como mostram as figs. 40 c e d. Na presença de hidro cortisona, porém, albumina (1 e 5 mg/ml) inibe totalmente o arredondamento.

Na fig. 41 encontram-se as cinéticas do processo de arredondamento provocado por diversas concentrações de cAMP na presença e na ausência de hidro cortisona. Foi possível verificar que este esteróide bloqueia o arredondamento provocado por cAMP. E mais ainda: este efeito bloqueador é dependente da síntese de proteína, uma vez que cicloheximida impede totalmente a ação inibitória de hidro cortisona, conforme mostra a fig. 42.

Fig. 40 - Cinética do processo de arredondamento em: a) meio sem soro (MSS); b) MSS + 0,2 mg/ml albumina; c) MSS + 1,0 mg/ml albumina; d) MSS + 5,0 mg/ml albumina. $\square$ — $\square$ na ausência de hidrocortisona; $\blacksquare$ — $\blacksquare$ na presença de hidrocortisona (300 ng/ml).

Neste ponto tornou-se interessante verificar se estas alterações morfológicas podiam interferir com a reestimulação da síntese de DNA em células carenciadas para soro. Culturas carenciadas foram reestimuladas, por adição de soro, e, após diferentes intervalos de tempo transferidas para meio

Fig. 41 - Cinética do processo de arredondamento induzido por cAMP na presença de soro. Com concentrações de cAMP: a) 10^{-5} M; b) 10^{-4} M; c) 10^{-3} M. $\square$ — $\square$ na ausência de hidrocortisona; $\blacksquare$ — $\blacksquare$ na presença de hidrocortisona (300 ng/ml).

Fig. 42 - Efeito de hidrocortisona e cicloheximida no arredondamento provocado por cAMP em células ST1. Hidrocortisona (300 ng/ml) e cicloheximida (1,5 mM) adicionados em $t = 0$. Nos tempos indicados cAMP (10^{-4} M) foi adicionado e a % de células arredondadas determinada 1 hora depois.

sem soro. Os resultados de medidas da síntese de DNA, encontram-se na fig. 43. Detalhes do protocolo para este tipo de experiência podem ser vistos na legenda da mesma figura. Estes resultados indicam que se a transferência para meio sem soro for feita até 3 horas de reestimulação (células no início de G1) a reestimulação não ocorre. Se a transferência for feita 14 horas após a adição de soro, a reestimulação da síntese de DNA ocorre normalmente. É importante lembrar que 14 horas após a adição de soro a maior parte das células já está, no mínimo, comprometida (G1^C) com o processo de síntese de

de DNA (e uma boa parte já está em S). Estes resultados indicam, portanto, que o arredondamento não interfere com o processo de síntese de DNA se este já tiver sido desencadeado ou com o seu desencadeamento em células já comprometidas. Deve-se lembrar que a reestimulação de células carenciadas com soro durante 3 horas, seguida de transferência para 0,2% de soro, leva a uma eficiente estimulação da síntese de DNA.

Fig. 43 - Efeito de arredondamento sobre a reestimulação de células ST1 carenciadas para soro. a) Adição de soro (5% FCS) em $t = 0$. Nos tempos indicados (45 min, 3 h, 14 h) culturas foram lavadas e transferidas para meio sem soro. Incorporação de timidina 3H em DNA, entre 15 e 24 horas. Culturas não reestimuladas transferidas para meio sem soro; culturas reestimuladas transferidas para meio sem soro. b) Controles: sem lavar ou lavadas porém transferidas para meio contendo 0,2% de soro (hachurado) ou 5% de soro (branco).

Numa tentativa de conclusão final podemos dizer que as observações relatadas nesta seção sugerem que hidrocortisona pode estar causando todos os seus efeitos através da indução de uma alteração estrutural (dependente da síntese de proteína) ao nível do sistema superfície celular-membrana-citoesque

4. ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE CÉLULAS ADRENAIS Y-1

4.1. Efeito de Soro

Células adrenais Y-1 crescendo exponencialmente, quando submetidas à remoção total ou parcial do soro, respondem com uma diminuição da síntese de DNA (fig. 44). No entanto um nível significativo de síntese de DNA permanece mesmo após

Fig. 44 - Cinética do efeito da redução do soro sobre a síntese de DNA em células Y-1. Pulsos de timidina ^3H de 30 minutos. De talhes do protocolo em Métodos. O—O Culturas mantidas em 5% de soro (FCS); ●—● culturas transferidas em $t = 0$ para meio contendo 0,2% FCS; Δ—Δ culturas transferidas em $t = 0$ para meio sem soro.

Fig. 45 - Alteração morfológica provocada por ACTH e cAMP em células Y-1. a) Controle (não tratadas); b) após 5 horas em ACTH (0,6 U/ml); c) após 5 horas em cAMP (10^{-3} M); d) aspecto da variante AR-1 (na presença ou na ausência de ACTH 0,6 U/ml). Aumento: 150X.

48 horas na total ausência de soro, indicando que as células entram num estado de repouso parcial ou relativo. Estas células podem ser reestimuladas e na fig. 45 encontra-se resultados da resposta à diferentes concentrações de soro quanto à síntese de DNA. Esta resposta foi proporcional à concentração de soro sendo máxima em 10% de soro (estimulação de 7 vezes). O grau de estimulação de células Y-1 com alta concentração de soro foi variável: comumente conseguia-se 4 a 10 vezes, porém valores de 30-40 vezes foram encontrados. Esta variabilidade é devida a diferentes níveis de síntese residual de DNA antes da reestimulação.

4.2. Efeito de Hormônios e Fatores de Crescimento

O efeito de uma série de hormônios e fatores de crescimento na síntese de DNA de células Y-1 foi testado, conforme descrito no item 18 de Métodos. Hidrocortisona (100-300 ng/ml), preparações impuras de TSH (até 5 µg/ml), FSH (até 5 µg/ml) e GH até 5 µg/ml) foram totalmente inativos. Preparações de LH, por outro lado, foram estimulatórias à 0,5 µg/ml e inibitórias à 2 µg/ml (fig. 10) indicando a presença de substâncias de efeito antagônico nestas preparações. Como mostra a fig. 10, a preparação de PF é 200 vezes mais ativa que extrato cru de pituitária, 10-20 vezes mais ativa que preparações impuras de LH e, além disso, não contém inibidores da síntese de DNA. É impor-tante ressaltar que hidrocortisona e insulina não alteram o efeito estimulatório dado por PF. Assim, o efeito sinegístico de hidrocortisona sobre a atividade de PF, observado com fibroblasto 3T3, não ocorre com células adrenais Y-1.

4.3. Efeito de ACTH e cAMP

O único hormônio clássico que apresentou efeito sobre a síntese de DNA destas células foi ACTH. Conforme ilustrado na fig. 45 este hormônio provoca também uma resposta morfológica dramática de arredondamento em células Y-1 e este efeito pode ser mimetizado por adição de cAMP ao meio. A cinética do processo de arredondamento provocado por diferentes concentrações de ACTH em 2 concentrações diferentes de soro, pode ser vista na fig. 46. É possível notar que: a) resposta máxima é conseguida após 5 horas de exposição ao hormônio; b) concentrações mais altas de ACTH são necessárias na presença de 10% de soro do que em 0,2% de soro; c) o efeito tende a ser reversível na presença de concentrações subótimas de ACTH.

Fig. 46 - Cinética do processo de arredondamento provocado por diferentes concentrações de ACTH em meio contendo 0,2% FCS (a) ou 10% FCS (b). Concentrações de ACTH em mU: O—O 0,1; ●—● 10; □—□ 100; ■—■ 600; △—△ 1200.

O efeito de ACTH sobre a síntese de DNA de células Y-1 pode ser visto nas curvas de dose apresentadas na fig. 47. Este hormônio teve atividade inibitória tanto em baixa como em alta concentração de soro. Em 0,2% de soro, 0,1 mU/ml causou 25% de inibição e 50% de inibição foi atingida com 3 mU/ml. Em altas concentrações de soro foram necessárias concentrações mais altas de ACTH; assim, em 10% de soro, 10 mU/ml causaram apenas 10% de inibição e 50% de inibição exigiu 70 mU/ml. Nas mesmas condições, ACTH não teve efeito algum sobre a síntese de DNA de células 3T3 ou ST1.

Fig. 47 - Curvas de dose de ACTH para células Y-1 na presença de 0,2% FCS (Δ — Δ) e 5% FCS (O—O).

O efeito inibitório de ACTH sobre células Y-1 foi primeiro observado por MASUI & GARREN (1971) os quais postularam que a ação deste hormônio era mediada por cAMP. Podemos verificar que cAMP e dibutiril cAMP inibem a síntese de DNA em concentrações maiores que 10^{-3} M (10^{-4} M tendo efeito muito reduzido e 10^{-5} M não tendo qualquer efeito) enquanto cGMP não teve qualquer efeito (estimulatório ou inibitório).

4.4. Cinética da Reestimulação de Síntese de DNA

A resposta de células Y-1 a soro e PF foi analisada em experiências cinéticas. Os resultados, apresentados na fig. 48 a e b indicam que: a) células Y-1 em repouso respondem à adição de soro ou PF com uma onda de síntese de DNA a qual ocorre apenas após um "lag" (G1); b) este "lag" é o mesmo para células estimuladas com soro ou com PF (e igual a 11 horas); c) G1 é idêntico ainda para células estimuladas com diferentes concentrações de soro; d) a velocidade de entrada em S é proporcional à concentração de soro e PF; e) diferenças na magnitude de resposta são devidas a diferente número de células entrando em S (fig. 48 b). Portanto respostas de magnitudes diferentes não são devidas à alteração no tamanho de G1 mas sim à diferente proporção de células entrando em S.

4.5. Ação de ACTH no Ciclo Celular

A ação inibitória de ACTH sobre a estimulação dada por PF foi investigada usando o protocolo descrito na legenda da fig. 49. Os resultados, apresentados nesta figura, mostram

Fig. 48 - Cinética de reestimulação da síntese de DNA por soro e PF em células Y-1 carenciadas para soro. a) Incorporação de timidina ³H em DNA; b) índice de marcação □—□ Controle (não estimulado); ○—○ 5% FCS; ●—● 0,75% FCS; Δ—Δ 1 µg/ml PF.

que ACTH adicionado 2 horas antes ou até 2 horas depois de PF bloqueia totalmente a estimulação dada por PF. A adição de ACTH de 6 horas em diante, porém, permitiu a expressão da atividade estimulatória de PF com magnitudes crescentes. Estes resultados sugerem que após estimulação com PF as células que progridem em direção a S ficam resistentes à ação de ACTH apenas após 6 horas de estimulação. A partir deste ponto o número de células resistentes a ACTH aumenta progressivamente da mesma forma que a função entrada de células em S. Como o "lag" observado para entrada em S foi de 11 horas, pode-se dizer que as células estimuladas por PF ficam resistentes à ação de ACTH 5 horas antes da entrada em S.

Fig. 49 - Cinética da inibição, por ACTH, da atividade estimulatória de PF. a) Células Y-1 carenciadas para soro foram estimuladas com 1 g/ml PF em $t = 0$. Nos tempos indicados, ACTH (0,6 U/ml) foi adicionado a culturas estimuladas ($\square$) e não estimuladas ($\square$); b) Contrles (sem adição de ACTH). Timidina ³H foi incorporada entre 13 e 32 horas.

Os resultados apresentados acima nos indicaram que células Y-1 só seriam sensíveis a ACTH se estivessem num período anterior a G1^C. Procurando analisar esta idéia mais a fundo, outro tipo de experiência foi feito: células em crescimento exponencial, em meio contendo 10% de soro, receberam ACTH. Periodicamente foram efetuados pulsos de timidina ³H e a porcentagem de núcleos marcados foi medida. Os resultados são apresentados na fig. 50. Verificou-se que o índice de marcação permanece constante pelas primeiras 5 horas e depois cai continuamente pelas 7 horas seguintes até atingindo níveis negligenciáveis.

Fig. 50 - Efeito de ACTH no índice de marcação de células Y-1 crescendo exponencialmente. O—O Controle (10% FCS); ●—● Tratadas com ACTH (0,6 U/ml).

Durante as primeiras 14 horas após a adição de ACTH a velocidade de crescimento não se altera e o índice mitótico permanece constante conforme mostram os dados da fig. 51. Estes resultados mostram claramente que somente células pós-mitóticas que estão 5 horas antes de S são sensíveis a ACTH. A situação de ACTH em relação à células adrenais é, portanto, muito semelhante à de hidrocortisona em células ST1. Logo, podemos adotar a mesma interpretação, isto é, células em G₀ são bloqueadas por ACTH mas assim que entram em G₁^C tornam-se resistentes a ACTH.

Fig. 51 - Efeito de ACTH na velocidade de crescimento e no índice mitótico de células Y-1 crescendo exponencialmente. Curvas de crescimento de culturas não tratadas (O—O) ou tratadas com 0,6 U/ml ACTH (Δ—Δ). Índice mitótico de culturas não tratadas (●—●) ou tratadas com 0,6 U/ml ACTH (▲—▲).

5. ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DO VARIANTE AR-1 DERIVADO DE CÉLULAS ADRENAIS Y-1 e RESISTENTE A ACTH

Desde que foi descoberta (MASUI & GARREN, 1971) que ACTH inibe o crescimento de células adrenais, foi proposto que esta ação do hormônio era mediada por CAMP. Entretanto, após esta sugestão inicial, nenhum progresso foi feito.

Levando em conta que: a) o efeito de ACTH sobre células Y-1 é muito semelhante ao efeito de hidrocortisona em

células ST1; b) como vimos, o efeito primário de hidrocortisona parece ser a nível do citoesqueleto; c) cAMP pode exercer "atividade" ao nível de componentes do citoesqueleto; d) o citoesqueleto parece ser um mediador (e talvez o mediador central) importante na transição $G_0 \rightarrow G_1^C$; e) ACTH leva ao arredondamento de células Y-1, alteração esta que depende da atividade do citoesqueleto - ocorreu-nos tentar um método de seleção de mutantes de células Y-1 resistentes a ACTH. Estes mutantes seriam muito úteis ao estudo dos mecanismos de ação de ACTH em células adrenais.

5.1. Isolamento da Linhagem AR-1

O método de seleção consistiu no isolamento de células Y-1 que não se arredondavam com ACTH e posterior teste de resposta a ACTH e cAMP.

A seleção envolveu tratamentos sucessivos de culturas de células Y-1 com o hormônio, remoção das células arredondadas e recuperação das células achatadas. Uma vez obtida uma população enriquecida em células achatadas na presença do hormônio, procedeu-se à clonagem (item 8 de Métodos) e isolamento de colônias com morfologia alterada em relação à linhagem parental Y-1. Este procedimento levou ao isolamento do variante designado AR-1 o qual apresenta as seguintes características: a) morfologia do tipo fibroblasto; b) alta eficiência de plaqueamento (maior que 50%); c) baixa densidade de saturação; d) T_D de 24 horas em meio contendo 10% de soro; e) ausência de arredondamento na presença de ACTH.

Os variantes de células Y-1 resistentes a ACTH isoladas anteriormente (SHIMMER, 1969, 1972) respondem a cAMP. Por outro lado o variante isolado por nós não arredonda na presença de cAMP (em concentrações de até 1 mM).

5.2. Efeito de Soro, Hormônios e Fatores de Crescimento

Os resultados, apresentados na tabela IX mostram que a carência de soro leva à diminuição acentuada da síntese de DNA (as células entram em repouso) e que estas células podem ser reestimuladas por soro e PF. ACTH não altera a estimulação dada por soro e PF. O resultado mais surpreendente, porém, foi a estimulação da síntese de DNA dada por ACTH (de 250%) uma vez que a linhagem parental Y-1 é totalmente inibida por este hormônio e que outras linhagens testadas (3T3 e ST1) não mostraram qualquer resposta a ACTH. A curva de resposta de dose a ACTH na presença de 0,2% de soro é apresentada na fig. 52. Concentrações mais altas (1,2 U/ml) causaram alteração morfológica após 6 horas e lise de 100% das células após 20 horas de incubação. A mesma curva, feita em 8% de soro, não revelou efeito algum de ACTH sobre a síntese de DNA.

A resposta a outros hormônios foi também testada. Insulina não teve efeito algum enquanto hidrocortisona apresentou estimulação de cerca de 45% da síntese de DNA (resultados não mostrados). Além disso a estimulação dada por PF não é potenciada por hidrocortisona (à semelhança da linhagem parental Y-1 e ao contrário do observado para fibroblastos 3T3).

Tabela IX - Atividade estimulatória de soro, PF e ACTH sobre a síntese de DNA de células AR-1

	cpm/placa
Controle (0,2% FCS)	1350
Soro (10% FCS)	14100
PF (1,0 µg/ml)	14400
ACTH (300 mU/ml)	3300
Soro (10% FCS) + ACTH (300 mU/ml)	12500
PF (1,0 µg/ml) + ACTH (300 mU/ml)	12300

Atividades medidas de acordo com protocolo descrito em Métodos

Fig. 52 - Curva de dose de ACTH para células AR-1 na presença de 0,2% FCS. Atividade estimulatória da síntese de DNA medida como descrito em Métodos.

5.3. Efeito de cAMP

O efeito de cAMP sobre a síntese de DNA pode ser visto na tabela X. Verificou-se que a adição deste nucleotídeo a células em repouso não causa efeito algum (o pequeno efeito inibitório observado não parece significativo). Além disso a estimulação dada por PF não é afetada por cAMP.

Tabela X - Efeito de cAMP sobre a atividade estimulatória de PF e soro na síntese de DNA de células AR-1

	cpm/placa
Controle (0,2% FCS)	670
cAMP (10^{-3} M)	680
cAMP (10^{-4} M)	570
cAMP (10^{-5} M)	670
PF (1 µg/ml)	6470
PF (1 µg/ml) + cAMP (10^{-3} M)	6420
Soro (10% FCS)	5400
Soro (10% FCS) + cAMP (10^{-3} M)	5050

Atividades medidas de acordo com protocolo descrito em Métodos.

Medidas do efeito de ACTH no conteúdo de cAMP intracelular foram feitas pelo método descrito no item 14 de Métodos. Resultados preliminares mostraram que o cAMP intracelular de células crescendo exponencialmente na presença de 5% de soro é de 15,5 pmoles/mg de proteína e que 3 vezes este valor foi obtido quando as células foram incubadas durante 1 hora com ACTH.

É possível notar, portanto, que o variante postulado no início desta seção pode ser obtido. Este resultado por si só sugere que ACTH e/ou cAMP bloqueiam a transição $G_0 \rightarrow G_1^C$, agindo ao nível do citoesqueleto. Além disso esperamos que a exploração destes mutantes traga, no futuro, novas informações importantes.

IV. DISCUSSÃO

1. CÉLULAS NORMAIS E CÉLULAS TRANSFORMADAS

Fibroblastos 3T3 em cultura apresentam pelo menos dois tipos de manifestações do controle de crescimento: a) cessação reversível de crescimento na presença de altas concentrações de soro, após formação de uma monocamada confluenta de células (TODARO et al., 1965); b) alto requerimento para soro, ou seja, o crescimento é dependente de altas concentrações de soro (HOLLEY & KIERNAN, 1968). Por outro lado, células 3T3 transformadas (por agentes químicos e físicos ou por infecção com vírus SV40) não param de crescer ao atingir confluência (SAMBROOK, 1972) ou ao serem submetidas à carência de soro (ARMELIN, 1973).

Estas diferenças foram, por muito tempo, correlacionadas com a habilidade de células SV3T3 de induzir a formação de tumores em animais apropriados (AARONSON & TODARO, 1968) e ausência desta propriedade em células 3T3.

Além da perda de controle de crescimento outros parâmetros, medidos em cultura, como produção de ativador de plasminogênio e habilidade de crescer em meio semi-sólido (POLLACK et al., 1975) foram correlacionados com tumorigenicidade.

A tentativa de correlacionar transformação, medida em cultura, com estado neoplásico tem encontrado algumas dificuldades. Assim, BOONE (1975) relatou que a linhagem 3T3

que, em cultura, apresenta manifestações de controle de crescimento (dependência de soro e densidade), sob determinadas condições, podia desenvolver hemangioendoteliomas em animais. Por outro lado, linhagens de células humanas tipicamente transformadas, por vários critérios, deixaram de produzir tumores quando injetadas em camundongos "nude" (STILES et al., 1975). Estes resultados, entretanto não devem ser tomados como indicação de que não é possível correlacionar transformação com estado neoplásico uma vez que: a) a indução de hemangioendotelioma por células 3T3 não tem podido ser reproduzida em outros laboratórios e, além disso, poderia ser explicada por interferências do sistema inflamatório uma vez que as condições experimentais envolviam a implantação nos animais de esferas de vidro em cuja superfície cresciam as células; b) outros autores (KOPROWISKI, 1977) puderam mostrar que as linhagens transformadas que STILES et al. (1975) relataram como não tumorogênicas eram de fato tumorogênicas se o inóculo empregado fosse maior. É importante notar também que a primeira série de linhagens de células 3T3 desenvolvida por TODARO & GREEN (1963) foi a partir de embriões da "linhagem" alogênica de camundongos Swiss. Posteriormente AARONSON & TODARO (1968) desenvolveram outra série de linhagens 3T3, pelo mesmo processo, mas agora de embriões de camundongos da linhagem isogênica Balb C. Assim, algumas das contradições, encontradas nos resultados de vários laboratórios, podem ser devidas ao emprego de células de diferentes origens ou até de células da mesma origem porém mantidas em condições diferentes pelos diversos laboratórios.

O estabelecimento definitivo da correlação transformação em cultura - estado neoplásico deve aguardar, porém, um estudo mais sistemático. A disponibilidade de camundongos "nude" permitindo ensaios de tumorigenicidade, vem facilitar estes estudos.

Os limites de "normalidade" ou transformação em cultura são às vezes bastante difusos mas de uma maneira geral o estudo do comportamento de diversas linhagens frente à carência de soro permite agrupá-las em três categorias (ARMELIN & ARMELIN, 1977): a) não reguladas: onde a síntese de DNA sofre pequena ou nenhuma alteração quando submetidas à baixa concentração ou ausência total de soro. Células deste tipo são representadas pela linhagem SV3T3; b) totalmente reguladas: onde a carência de soro conduz a níveis negligenciáveis da síntese de DNA, exemplificado pela linhagem 3T3; c) parcialmente reguladas: nas quais a síntese de DNA diminui (de 3 a 10 vezes) quando carenciadas para soro. Um exemplo deste tipo de células é a linhagem Y-1 de células adrenais. As células tumorogênicas examinadas até agora mostram-se ou não reguladas ou parcialmente reguladas. A linhagem ST1 aqui descrita, por sua vez, comporta-se como parcialmente ou totalmente regulada conforme esteja na ausência ou na presença de hidrocortisona, respectivamente.

2. NATUREZA DOS FATORES DE CRESCIMENTO

Operacionalmente podemos definir fator de crescimento como substâncias que limitam o crescimento quando presentes em concentrações sub-ótimas.

A endocrinologia clássica estabeleceu que o controle de crescimento "in vivo" é exercido por hormônios, substâncias que apresentam as seguintes características: a) produzidos e secretados em pequenas quantidades por glândulas endócrinas; b) agem ao nível celular em concentrações muito baixas (da ordem de ng/ml) produzindo efeitos definidos em células-alvo específicas; c) capazes de desencadear reações bioquímicas que persistem mesmo quando não é mais possível detectar sua presença.

É razoável supor que o crescimento de células em cultura está na dependência de substâncias reguladoras presentes no soró, uma vez que outras substâncias essenciais (nutrientes) são adequadamente supridas pela parte quimicamente definida do meio de cultura.

A abordagem experimental utilizada para identificação de substâncias reguladoras do crescimento de células em cultura levou ao isolamento do fator de pituitária (PF).

Os resultados aqui apresentados e outros já publicados (ARMELIN, 1973; ARMELIN & ARMELIN, 1975; ARMELIN et al., 1976, 1977) apontam para a natureza hormonal deste fator de crescimento uma vez que: a) age em concentrações fisiológicas, ou seja, comparáveis aos níveis hormonais detectados "in vivo"; b) age ao nível celular; c) é capaz de desencadear reações bioquímicas as quais resultam em multiplicação celular; d) o efeito é dependente da concentração; e) sua ação pode ser potenciada por hormônios clássicos (insulina e hidro cortisona).

3. FATORES DE CRESCIMENTO E CICLO CELULAR

No modelo de ciclo celular proposto (fig. 4) o controle de crescimento seria exercido através de reguladores positivos ou negativos que agiriam estimulando ou inibindo a passagem de células de um estado de repouso (Go) para a fase proliferativa. Esta idéia foi corroborada pelos resulta-dos aqui apresentados nos quais: a) o tamanho da fase pré-replicativa ("lag" ou G1) é o mesmo para culturas estimula-das com soro ou PF ou ainda combinações de PF com outros fa-tores de crescimento (EGF) ou com hormônios clássicos (hidrocortisona, insulina), indicando que todos estes fatores es-tão agindo no mesmo ponto; b) variações na intensidade da resposta são devidas à diferentes proporções de células que estão sendo estimuladas a deixar Go.

O modelo supõe ainda que após deixarem Go em dire -
ção a S, numa certa altura (G1^C), as células tornam-se irre-
versivelmente comprometidas com o processo replicativo. Evi-
dências à favor destas idéias foram obtidas durante o estu-
do da ação de ACTH em células adrenais Y-1 e do efeito provo-
cado por diminuição da concentração de soro e/ou adição de
hidrocortisona em fibroblastos ST1 e 3T3.

4. EFEITO DE HIDROCORTISONA NO MUTANTE ST1

Usando diversos métodos de seleção POLLACK e cola-
boradores (VOGEL & POLLACK, 1973; VOGEL et al., 1973; 1974)
obtiveram duas classes de revertentes ou variantes de célu-
las SV3T3: a) revertentes de densidade que crescem tanto em

1% como em 10% de soro mas cuja densidade de saturação é semelhante à de células 3T3; b) revertentes de soro que crescem apenas em 10% de soro e não em 1% e cuja densidade de saturação é também a de 3T3. Os autores concluíram que a alteração da resposta a soro leva necessariamente à alteração da densidade de saturação uma vez que não foi possível isolar variantes com resposta normal à soro porém que atingisse alta densidade de saturação. Os resultados aqui apresentados mostram que o mutante ST1 por nós isolado é exatamente este tipo de mutante uma vez que atinge alta densidade de saturação (como SV3T3) porém é dependente de soro (como 3T3).

O estudo deste mutante revelou que suas potencialidades vão muito mais longe. A resposta estimulatória de crescimento que apresenta frente à preparações impuras de albumina de soro bovino aliada à total ausência de resposta à inúmeros outros fatores ativos em células 3T3 pode vir a permitir o isolamento de um novo fator de crescimento. A tarefa de purificação desta atividade, usando a resposta estimulatória em células ST1 como ensaio, está sendo levada adiante.

Além disso células ST1 parecem constituir-se em excelente modelo experimental para estudos de mecanismos de regulação do crescimento celular por esteróides. Tem sido mostrado que glicocorticóides estimulam o crescimento de células 3T3 "normais" (ARMELIN, 1973; THRASH & CUNNINGHAM, 1973 e resultados aqui apresentados). Este fato é um tanto intrigante uma vez que fibroblastos normalmente são inibidos por glicocorticóides (DOUGHERTY et al., 1973; FODGE & RUBIN, 1975). Portanto não é de se estranhar que células ST1 sejam inibidas por

glicocorticóides embora a atividade inibitória não pudesse ser perfeitamente correlacionada com atividade glicocorticóide. Seria interessante verificar se o padrão de inibição aqui descrito para células ST1 constituiu-se numa resposta comum para fibroblastos. Esta expectativa é bastante razoável em vista de resultados publicados para células de embrião de galinha (FODGE & RUBIN, 1975) e células L (WIGLER et al., 1975).

O efeito de hormônios esteróides em células ST1 revelou-se dramático: a adição de um único hormônio provoca mudança reversível no fenótipo celular de um padrão de crescimento transformado para um padrão "normal". Embora seja ainda questionável de que maneira os critérios de normalidade, postulados em cultura, se correlacionam com a fisiologia "in vivo" (POLLACK et al., 1975; STILES et al., 1976) parece extremamente significativo o fato da reversão fenotípica causada por hidrocortisona ocorrer tanto "in vitro" como "in vivo".

A frequente associação de altos níveis de cAMP com inibição de crescimento celular (JOHNSON & PASTAN, 1971; OTTEN et al., 1971; 1972; SEIFERT & PAUL, 1972; SHEPPARD & PRASAD, 1973) e de baixos níveis de cAMP com estimulação de crescimento (SHEPPARD, 1972) tem levado à proposição deste nucleotídeo como um importante componente do sistema de controle da proliferação (SHEPPARD & BANNAI, 1974).

Medidas dos níveis de cAMP de células ST1 em condições de inibição por hidrocortisona mostraram que o hormônio não causa alteração nos níveis de cAMP. Isto sugere que este nucleotídeo não é um mediador da ação de hidrocortisona e

que este hormônio deve agir diretamente sobre o sistema de controle central.

Um outro aspecto extremamente interessante do mutante ST1 tem a ver com a profunda alteração morfológica de arredondamento provocada por retirada do soro ou por cAMP exógeno. Como vimos, o arredondamento provocado por cAMP é bloqueado por hidrocortisona mas este bloqueio é, por sua vez, impedido por cicloheximida, indicando que a ação de hidrocortisona é dependente de síntese de proteína. O processo de arredondamento é inibido por colchicina, o que aponta para o envolvimento de microtúbulos no fenômeno. Portanto a ruptura do citoesqueleto torna as células incapazes de responder com esta alteração morfológica.

É importante lembrar que arredondamento, após retirada de soro do meio de cultura, não é observado na linhagem parental nem em outras linhagens e nem em culturas primárias de fibroblastos. Logo, as células ST1 devem possuir uma alteração ou defeito que leva ao aparecimento desta resposta morfológica. Esta mesma alteração talvez seja responsável também pela pouca adesão da célula à superfície ou às células vizinhas e ainda seja também a causa primária do fenótipo transformado. A alteração ou defeito ao qual estamos aludindo deve se localizar no complexo sistema superfície celular - membrana - citoesqueleto. A hipótese que sugerimos é que hidrocortisona exerce sua ação, em células ST1, promovendo um reparo do defeito do sistema membrana-citoesqueleto, reconstituindo, assim, um comportamento normal às células (pelo menos

parcialmente). Esta hipótese pode ser testada através de uma análise dos componentes do sistema membrana - citoesqueleto. Parece-nos que se deve começar estudando os seguintes componentes: mucopolissacarídeos, glicoproteínas e componentes fibrilares (microtúbulos e microfilamentos).

Mucopolissacarídeos têm sido implicados em processos de adesão e reconhecimento celular. Além disso observou-se que a composição de mucopolissacarídeos sulfatados de células normais difere fundamentalmente daquela de células transformadas ou tumorais, sugerindo o envolvimento destas substâncias em processos regulatórios do crescimento (DIETRICH et al., 1976). A análise da composição de mucopolissacarídeos sulfatados de células ST1 na ausência e na presença de hidrocortisona, é, portanto, de grande interesse.

Alterações de certas proteínas da superfície celular têm sido correlacionadas com o fenômeno de transformação (ver HYNES, 1976). Uma destas proteínas foi designada pela sigla LETS ("large external transformation sensitive protein") por apresentar alto peso molecular (da ordem de 250.000), ser passível de marcação por lactoperoxidase e estar ausente ou muito reduzida em superfícies de células transformadas. Além disso foi possível mostrar que esta proteína é sintetizada pela célula (HYNES & HUMPHRIES, 1974; ROBBINS et al., 1974; STONE et al., 1974; CRICHEY, 1974; YAMADA & WESTON, 1974) e está presente na superfície de células crescendo exponencialmente em muito menor quantidade do que em células cujo crescimento é bloqueado por efeitos de densidade ou de retirada do soro (HYNES, 1974; GAHMBERG et al., 1974;

ROBBINS et al., 1974; CRICHLEY, 1974; PEARLSTEIN & WATERFIELD, 1974; HYNES & BYE, 1974). Evidências diretas da indução da síntese de proteínas (do tipo LETS) em células ST1, por hidro cortisona, poderiam ser obtidas por iodação da superfície celular usando lactoperoxidase e eletroforese. Experiências nesse sentido serão levadas a efeito no futuro.

Evidências em favor do envolvimento de estruturas fibrilares (microtúbulos e microfilamentos) num grande número de processos celulares (como crescimento, mobilidade e reconhecimento celular) estão se acumulando (EDELMAN, 1976). "Defeitos" na arquitetura do citoesqueleto de células transformadas têm sido descritos (BRINKLEY et al., 1975; EDELMAN & YAHARA, 1976). É possível que hidrocortisona induza um "reparo" no citoesqueleto de células ST1. Um teste inicial desta possibilidade pode ser feito usando colchicina como ferramenta.

Através de estudos cinéticos do efeito de colchicina na curva de acumulação de mitoses em culturas crescendo exponencialmente PUCK (1964), em trabalho clássico, concluiu que o ponto de ação de colchicina era ao nível da mitose. Desde então colchicina (e também vinblastina, vincristina e outros alcalóides derivados de Vinca) têm sido largamente empregados para sincronização de células em M. Entretanto, se um controle existe ao nível de microtúbulos causando bloqueio da transição $G_0 \rightarrow G_1$, um segundo bloqueio seria esperado além daquele descrito por Puck. Neste caso, células que se encontram além do ponto de bloqueio (ou seja G_1^C , S ou G_2) não seriam afetadas pelo inibidor e, portanto, continuariam a

acumular em M. Por outro lado, células que estão aquém do ponto de bloqueio (em Go) acumulariam em Go, não contribuindo, portanto para a fração de células em M. A função acumulação de mitoses deveria ser linear por um certo tempo (igual a $G1^C + S + G2$) para, depois, atingir um "plateau" que corresponderia à fração de células bloqueadas ao nível de $Go \rightarrow G1$. Assim, se colchicina provocar bloqueio de células em Go, a curva de acumulação de mitoses, para células ST1 crescendo exponencialmente na presença e na ausência de hidrocortisona, deveria fornecer resultados diferentes. Esta possibilidade está sendo investigada em nosso laboratório.

5. EFEITO DE ACTH EM CÉLULAS ADRENAIS

O efeito do hormônio hipofisário ACTH sobre células adrenais tem sido estudado tanto "in vivo" como "in vitro".

Vários autores têm observado estimulação do crescimento de glândulas adrenais em animais injetados com ACTH (FARESE & REDDY, 1963; IMRIE et al., 1965; MASUI & GARREN, 1970). Estes dados e o fato de hipofisectomia levar à atrofia da glândula adrenal e desta poder ser mantida por administração de ACTH tem levado certos autores (GARREN et al., 1971) a propor um papel trópico deste hormônio para células adrenais.

A linhagem tumoral funcional Y-1 responde a ACTH com um aumento de esteroidogênese e uma alteração na morfologia (SATO et al., 1970). O crescimento destas células, porém, é inibido por ACTH (MASUI & GARREN, 1971 e resultados aqui apresentados). Além disso MASUI & LA PORTE (1973) mostraram que ACTH

inibe o crescimento de células Y-1 também "in vivo" (quando transplantadas em camundongos isogênicos).

Assim, efeitos aparentemente contraditórios de ACTH sobre o crescimento de células de cortex adrenal normal e de tumores adrenais estavam sendo obtidos, atribuindo-se o efeito inibitório em células Y-1 a uma resposta anormal de uma célula tumoral.

Contudo resultados obtidos por outros investigadores (RAMACHANDRAN & SUYAMA, 1975) mostraram que a síntese de DNA em culturas primárias de células adrenais normais era também inibida por ACTH. Estes mesmos autores sugeriram que o papel de ACTH estaria ligado a processos de diferenciação da glândula adrenal enquanto a proliferação de células adrenais estaria sob o controle de outros fatores.

Neste contexto torna-se extremamente interessante que a glândula pituitária possua fatores estimuladores da síntese de DNA para células Y-1 (GOSPODAROWICZ & HANDLEY, 1975; ARMELIN, 1975 e resultados aqui apresentados) e também para células adrenocorticais normais de origem bovina (GOSPODAROWICZ et al., 1977) alguns destes fatores apresentando, inclusive, uma certa especificidade para estas células (ARMELIN et al., 1977). Estes resultados levam-nos a indagar se o efeito estimulatório de ACTH observado "in vivo" não poderia ser atribuído a substâncias contaminantes da preparação de ACTH (a partir de glândula pituitária) uma vez que doses muito altas foram usadas nestes estudos.

O papel de ACTH como hormônio diferenciador tem sido bastante explorado. Já em 1957 HAYNES & BERTHET sugeriram o

envolvimento de CAMP na esteroidogênese adrenal. MASUI & GARREN (1971) mostraram que CAMP exógeno era capaz de mimetizar o efeito de ACTH em células Y-1 tanto em relação à síntese de DNA como à alteração morfológica. SHIMMER (1972) verificou que ACTH provocava estimulação da adenilato ciclase em células Y-1 mas não nos variantes Y-6 e OS3 (SHIMMER, 1969) que são insensíveis à adição de ACTH. Entretanto estes variantes mostravam-se sensíveis à adição de CAMP (SHIMMER, 1969, 1972) sugerindo que o defeito nestas células era ao nível de um receptor ou de uma adenilato ciclase sensível a ACTH. Além disso revertentes fenotípicos de células insensíveis a ACTH recuperam a sensibilidade tanto com respeito a adenilato ciclase como a esteroidogênese (SHIMMER, 1976). Estas observações têm levado à postulação de CAMP como um componente obrigatório da esteroidogênese estimulada por ACTH (SHIMMER & ZIMMERMAN, 1976).

O trabalho relatado nesta tese adicionou de novo a este quadro, a demonstração de que ACTH age exclusivamente em células no estado Go. Talvez este dado permita que se comece a entender de que maneira estimuladores e inibidores da divisão celular promovem o controle da proliferação e da citodiferenciação nos tecidos que estão sujeitos à renovação celular, no animal adulto. Mais que isso, os resultados aqui apresentados, indicam que o sistema Y-1 submetido à ação de PF e ACTH representa um modelo realista e útil para o estudo de controle do crescimento e diferenciação de células da cortex suprarrenal.

Muito embora ACTH possa exercer sua ação inibitória sobre a proliferação celular via CAMP, nada se sabe

ainda sobre como cAMP poderia exercer esta mediação. O fato de ACTH causar o arredondamento de células Y-1 sugeriu-nos que este hormônio poderia agir ao nível do citoesqueleto para causar inibição pois o citoesqueleto talvez seja o principal mediador na regulação do crescimento e da divisão celular. Como corolário desta hipótese tínhamos que a seleção de células Y-1 que não se arredondam na presença de ACTH, provavelmente forneceria células resistentes a ACTH e, talvez, também resistentes a cAMP, se este fosse, de fato, o mediador desta ação do hormônio. De fato a linhagem AR-1, selecionada por este processo, revelou ser uma célula cuja síntese de DNA é estimulada por PF ou soro, sem que esta estimulação seja bloqueada por ACTH ou cAMP. Estes resultados fornecem evidências, que embora circunstanciais são sugestivas, indicando que o mediador da ação inibitória de ACTH (via cAMP ou não) é o citoesqueleto.

Quando esta tese estava sendo escrita interessantes observações foram feitas com as células AR-1 (H.A. Armelin, resultados não publicados). Foi observado que apesar de cAMP não inibir a estimulação, por soro, da entrada das células AR-1 em fase S, este nucleotídeo inibe a entrada das células em mitose. Estes dados preliminares indicam que em células AR-1, cAMP não bloqueia a transição $G_0 \rightarrow G_1^C$ mas inibe a transição $G_2 \rightarrow M$. É importante lembrar que foi verificado em fibroblastos 3T3 (WILLINGHAM et al., 1972), células de fígado de rato (NOSE & KATSUTA, 1975) e células adrenais Y-1 (GILL & WEIDMAN, 1977) que cAMP bloqueia a entrada das células em S e, também, ao nível de G₂. Portanto, parece que, com

as células AR-1, isolamos uma célula na qual os dois efeitos de cAMP estão desacoplados. É desnecessário enfatizar a grande importância potencial que esta célula pode ter para os estudos de função e mecanismos de ação de cAMP.

Ao se considerar a exploração futura do sistema AR-1 para estudo dos mecanismos de ação de cAMP, é interessante levar em conta dados atualmente disponíveis na literatura.

Tem sido sugerido que cAMP é um mediador pleiotrópico do crescimento e de outros processos celulares (KRAM et al., 1973; OTTEN et al., 1971; PRASAD & SHEPPARD, 1972) além de agir como segundo mensageiro na mediação de estímulos hormonais e outros sinais regulatórios externos (ROBISON et al., 1971).

O fato de cAMP ser envolvido num grande número de respostas celulares e de ter ampla distribuição entre os sistemas biológicos tem dificultado sua visualização como responsável direto pelos efeitos observados.

Por outro lado evidências em favor do envolvimento da membrana e de proteínas filamentosas da células (microtúbulos, microfilamentos e proteínas do tipo actina) num grande número de processos celulares estão se acumulando (EDELMAN, 1976) e a correlação entre funcionamento de proteínas filamentosas e níveis de cAMP parece estar emergindo (OLSEN, 1975). Assim, tubulina, a proteína de microtúbulos é formada de dímeros cada um dos quais apresenta um resíduo fosforilado de serina (GOODMAN et al., 1970). Estes dímeros servem como substrato em reação de fosforilação mediada por uma quinase estimulada

por cAMP. A fosforilação da tubulina parece ser essencial para su função, interferindo, talvez com sua conformação ou estado de agregação. E ainda cAMP inibe a ligação de colchicina à tubulina (GILLESPIE, 1971) e estabiliza microtúbulos contra dissociação por baixa temperatura (KIRKLAND & BURTON, 1972).

Através de uma abordagem genética INSEL et al. (1975) verificaram que existe um paralelismo perfeito entre a concentração de cAMP necessária para inibição de crescimento (medida por acumulação de células em G1 ou Go ou por número de células) e a concentração de cAMP necessária para estimular a atividade de uma proteína quinase (medida por ligação específica de cAMP ou por estimulação da fosforilação de histona).

Segundo OLSEN (1975) cAMP poderia regular a fosforilação de proteínas filamentosas através da ativação de uma proteína quinase. Esta fosforilação acarretaria em alterações na conformação, estado de agregação e/ou contractibilidade da proteína filamentosa, o que, em última análise controlaria os eventos bioquímicos da célula.

Dadas as sugestões e especulações citadas acima seria interessante analisar as proteínas aceptoras e as quinases dependentes de cAMP em células AR-1. A comparação desta célula com a linhagem parental Y-1 pode ajudar a responder a questão de qual a diferença entre os mecanismos de ação de cAMP ao nível de G1 e G2.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARONSON, S.A. & TODARO, G. - "Basis for the acquisition of malignant potential by mouse cells cultivated in vitro". Science, 162, 1024-1026 (1968).
- ANTONIADES, H.; STATHAKOS, S. & SCHER, C. - "Isolation of a cationic polipeptide from human serum that stimulates proliferation of 3T3 cells". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 2635-2639 (1975).
- APPLEMAN, M.M.; BIRNBAUMER, L. & TORRES, H.N. - "Factors affecting the activity of muscle glycogen synthetase. III. The reaction with triphosphate, Mg^{++} and cyclic 3',5'-adenosine monophosphate". Arch. Biochem. Biophys., 116, 39-43 (1966).
- ARMELIN, H.A. - "Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 2702-2706 (1973).
- ARMELIN, H.A. - "Hormones and Regulation of Cell Division: Mammalian cell cultures as an experimental approach". In Biochemical Actions of Hormones; Ed. G. Litwack, vol. III, 1-21 Academic Press Inc. New York (1975).
- ARMELIN, M.C.S. & ARMELIN, H.A. - "Regulation of fibroblast growth in culture". Biochem. Biophys. Res. Comm., 62, 260-267 (1975).
- ARMELIN, H.A. & ARMELIN, M.C.S. - "Resting-proliferative transition in cultured mammalian cells". Nat. Cancer Inst. Monogr., 48 (1977 in press).
- ARMELIN, M.C.S.; GAMBARINI, A.G. & ARMELIN, H.A. - "Protein factors regulating mammalian cell growth". Arch. Biol. Med. Exper., 10, 122-129 (1976).
- ARMELIN, M.C.S.; GAMBARINI, A.G. & ARMELIN, H.A. - "On the regulation of DNA synthesis in a line of adrenocortical tumor cells: effect of serum, adrenocorticotropin and pituitary factors". J. Cell. Physiol. (in press) (1977).
- ASUA, L.J.; O'FARREL, M.; BENETT, D.; CLINGAN, D. & RUDLAND, P. - "Interaction of two hormones and their effect on observed rate of initiation of DNA synthesis in 3T3 cells". Nature, 265, 151-153 (1977).

- AUGUSTI-TOCCO, G. & SATO, G. - "Establishment of functional clonal lines of neurons from mouse neuroblastoma". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 64, 311-315 (1969).
- BAKER, R.; BRUNETTE, D.; MANKOVITZ, R.; THOMPSON, L.; WHITMORE, G.; SIMMINOVITCH, L. & TILL, J. - "Ouabain-resistant mutants of mouse and hamster cells in culture". Cell, 1, 9-22 (1974).
- BEAUDET, A.; ROUFA, D. & CASKEY, C. - "Mutations affecting the structure of hypoxanthine: guanine phosphoribosyl transferase in cultured Chinese hamster cells". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 320-324 (1973).
- BENDA, P.; LIGHTBODY, J.; SATO, G.; LEVINE, L. & SWEET, W. - "Differentiated rat glial cell strain in tissue culture". Science, 161, 370-371 (1968).
- BOONE, C. - "Malignant hemangioendotheliomas produced by subcutaneous inoculation of Balb/3T3 cells attached to glass beads". Science, 188, 68-70 (1975).
- BRINKLEY, B.R.; FULLER, G.M. & HIGHFIELD, D.P. - "Cytoplasmic microtubules in normal and transformed cells in culture: Analysis by tubulin antibody immunofluorescence". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 4981-4985 (1975).
- BUONASSISSI, V.; SATO, G.H. & COHEN, A.I. - "Hormone-producing cultures of adrenal and pituitary tumor origin". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 48, 1184-1190 (1962).
- BURGER, M. - "Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth". Nature, 227, 170-171 (1970).
- BURGER, M.M. - "The significance of the surface structure changes for growth control under crowded conditions". Ciba Fndn. Symp. Growth Control in Cell Culture (ed. G.E.W. Wolstenholme & J. Knight) p. 45 Churchill Livingstone, London (1971).
- BURGER, M.M. - "Surface changes in transformed cells detected by lectins". Fed. Proc., 32, 91-101 (1973).
- BURGER, M.M.; BOMBIK, B.N.; BRECKENRIDGE, B. & SHEPPARD, J.R. - "Growth control and cyclic alterations of cyclic AMP in the cell cycle". Nature New Biol., 239, 161-163 (1972).
- BURGUS, R.; DUNN, T.; DESIDERIO, D.; VALE, W. & GUILLEMIN, R. - "Structure moleculaire du facteur hypothalamique". C.R. Acad. Sci. Ser. D, 269, 1870-1873 (1969).

- BURNS, F.J. & TANNOCK, I.F. - "On the existence of a G₀ phase in the cell cycle". Cell Tissue Kinet., 3, 321-334 (1970).
- BURSTIN, S.J.; MEISS, H.K. & BASILICO, C. - "A temperature-sensitive cell cycle mutant of the BHK cell line". J. Cell. Physiol., 84, 397-408 (1974).
- BUSH, I.E. & MALESH, V.B. - "Metabolism of 11-oxygenated steroids. 2. 2-methyl steroids". Biochem. J., 71, 718-742 (1959).
- CHEN, L.B. & BUCHANAN, J. - "Mitogenic activity of blood components. I. Thrombin and prothrombin". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 131-135 (1975).
- COHEN, S. - "Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal". J. Biol. Chem., 237, 1555-1562 (1962).
- CRICHEY, D.R. - "Cell surface proteins of NIL 1 hamster fibroblasts labeled by galactose oxidase, tritiated borohydride method". Cell, 3, 121-125 (1974).
- DE MARS, R. - "Resistance of cultured human fibroblasts and other cells to purine and pyrimidine analogues in relation to mutagenesis detection". Mutation Res., 24, 335-364 (1974).
- DIETRICH, C.P.; SAMPAIO, L.O. & TOLEDO, O.M.S. - "Characteristic distribution of sulfated mucopolysaccharides in different tissues and in their respective mitochondria". Biochem. Biophys. Res. Comm., 71, 1-10 (1976).
- DOUGHERTY, T.F.; STEVENS, W. & SCHNEEBELI, G.L. - "Functional and morphological alterations produced in target cells by anti-inflammatory steroids". Rec. Prog. Hormone Res., 29, 287-328 (1973).
- DULAK, N.C. & TEMIN, H.M. - "A partially purified polypeptide fraction from rat liver cell conditioned medium with multiplication-stimulating activity for embryo fibroblasts". J. Cell. Physiol., 81, 153-160 (1973).
- EDELMAN, G.M. - "Surface modulation in cell recognition and cell growth". Science, 192, 218-226 (1976).
- EDELMAN, G.M. & YAHARA, I. - "Temperature-sensitive changes in surface modulating assemblies of fibroblasts transformed by mutants of Rous sarcoma virus". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 2047-2051 (1976).

- ELLIS, S. - "A scheme for the separation of pituitary proteins". J. Biol. Chem., 233, 63-68 (1958).
- FARESE, R.V. & REDDY, W.J. - "Observations on the inter-relations between adrenal protein, RNA and DNA during prolonged ACTH administration". Biochem. Biophys. Acta, 76, 145-148 (1963).
- FLANAGAN, S.P. - "Nude, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse". Genet. Res. (Camb.), 8, 295-309 (1966).
- FODGE, D.W. & RUBIN, H. - "Differential effects of glucocorticoids on DNA synthesis in normal and virus-transformed chick embryo cells". Nature, 257, 804-806 (1975).
- GAHMBERG, C.G.; KIEHN, D. & HAKAMORI, S. - "Changes in a surface-labelled galactoprotein and in glycolipid concentrations in cells transformed by a temperature-sensitive polyoma virus mutant". Nature, 248, 413-415 (1974).
- GARREN, L.D.; GILL, G.N.; MASUI, H. & WALTON, G.M. - "On the mechanism of action of ACTH". Rec. Prog. Horm. Res., 27, 433-474 (1971).
- GILL, G.N. & WEIDMAN, E.R. - "Hormonal regulation of initiation of DNA synthesis and of differentiated function in Y-1 adrenal cortical cells". J. Cell. Physiol., 92, 65-76 (1977).
- GILLESPIE, E. - "Colchicine binding in tissue slices. Decrease by calcium and biphasic effect of adenosine-3',5'-monophosphate". J. Cell Biol., 50, 544-549 (1971).
- GILMAN, A.G. - "A protein binding assay for adenosine 3',5'-cyclic monophosphate". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 305-312 (1970).
- GLYNN, R.; THRASH, C. & CUNNINGHAM, D. - "Maximal concanavalin A-specific agglutinability without loss of density-dependent growth control". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 2676-2677 (1973).

- GOODMAN, D.B.P.; RASMUSSEN, H.; DIBELLA, F. & GUTHROW, C.E.-
"Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-stimulated phospho-
rylation of isolated neurotubule subunits". Proc. Nat.
Acad. Sci. USA, 67, 652-659 (1970).
- GOSPODAROWICZ, D. - "Localisation of a fibroblast growth
factor and its effect alone and with hydrocortisone on
3T3 cell growth". Nature, 249, 123-127 (1974).
- GOSPODAROWICZ, D. & HANDLEY, H.H. - "Stimulation of division
of Y-1 adrenal cells by a growth factor isolated from
bovine pituitary glands". Endocrinology, 97, 102-107
(1975).
- GOSPODAROWICZ, D.; JONES, K.L. & SATO, G.H. - "Purification
of a growth factor for ovarian cells from bovine
pituitary glands". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71,
2295-2299 (1974).
- GOSPODAROWICZ, D.; ILL, C.R.; HORNSBY, P.J. & GILL, G.N. -
"Control of bovine adrenal cortical cell proliferation by
fibroblast growth factor. Lack of effect of epidermal
growth factor". Endocrinology, 100, 1080-1089 (1977).
- GOTTLIEB, C.; BAENZIGER, J. & KORNFELD, S. - "Deficient
uridine diphosphate-N-acetylglucosamine:Glucoprotein
N-acetylglucosaminyltransferase activity in a clone of
chinese hamster ovary cells with altered surface
glycoproteins. J. Biol. Chem., 250, 3303-3309 (1975).
- HALL, K. & UTHNE, K. - "Some biological properties of purified
sulfation factor (SF) from human plasma". Acta Med. Scand.,
190, 137-143 (1971).
- HALL, K. & VAN WYCK, J. - "Somatomedin". Curr. Top. Exp.
Endocrin., 2, 155-178 (1974).
- HARRIS, M. - "Mutation rates in cells at different ploidy
levels". J. Cell. Physiol., 78, 177-184 (1971).
- HARTWELL, L. - "Saccharomyces cerevisiae Cell Cycle". Bacteriol.
Rev., 38, 164-198 (1974).

- HATZFELD, J. & BUTTIN, G. - "Temperature-sensitive cell cycle mutants: a Chinese hamster cell line with a reversible block in cytokinesis". *Cell*, 5, 123-129 (1975).
- HAYASHI, I. & SATO, G.H. - "Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium". *Nature*, 259, 132-134 (1976).
- HAYNES, R.C.Jr. & BERTHET, L. - "Studies on the mechanism of action of the adrenocorticotrophic hormone". *J. Biol. Chem.*, 225, 115-124 (1957).
- HOLLEY, R.W. & KIERNAN, J.A. - "Contact inhibition of cell division in 3T3 cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 60, 300-304 (1968).
- HOLLEY, R.W. & KIERNAN, J.A. - "Studies of serum factors required by 3T3 and SV3T3 cells". *In: Growth Contr. Cell Cult., Ciba Found. Symp.* pp. 3-15 (1971).
- HOLLEY, R.W. & KIERNAN, J.A. - "Control of the initiation of DNA synthesis in 3T3 cells: low-molecular-weight nutrients". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71, 2942-2945 (1974).
- HSU, T.C. & POMERAT, C.M. - "Mammalian chromosomes in vitro. II. A method for spreading the chromosomes of cells in tissue culture". *J. Heredity*, 44, 23-29 (1953).
- HYNES, R.O. - "Role of surface alterations in cell transformation: the importance of proteases and surface proteins". *Cell*, 1, 147-156 (1974).
- HYNES, R.O. - "Cell surface proteins and malignant transformation". *Biochim. Biophys. Acta*, 458, 73-107 (1976).
- Hynes, R.O. & BYE, J.M. - "Density and cell cycle dependence of cell surface proteins in hamster fibroblasts". *Cell*, 3, 113-120 (1974).
- HYNES, R.O. & HUMPHRIES, K.C. - "Characterization of the external proteins of hamster fibroblasts". *J. Cell Biol.*, 62, 438-448 (1974).

- IMRIE, R.C.; RAMAIAH, T.R.; ANTONI, F. & HUTCHISON, W.C. -
"The effect of adrenocorticotrophin on the nucleic acid
metabolism of the rat adrenal gland". J. Endocrinol., 32,
303-312 (1965).
- INSEL, P.A.; BOURNE, H.R.; COFFINO, P. & TOMKINS, G.M. -
"Cyclic AMP-dependent protein kinase: pivotal role in
regulation of enzyme induction and growth". Science, 190,
896-898 (1975).
- ISAACSON, J.H. & CATTANACH, B.M. - "Report". Mouse News
Letter, 27, 31-40 (1962).
- JAINCHILL, J. & TODARO, G. - "Stimulation of cell growth in
vitro by serum with and without growth factor. Relation
to contact inhibition and viral transformation". Exp.
Cell Res., 59, 137-146 (1970).
- JOHNSON, G.S. & PASTAN, I. - "Change in growth and morphology
of fibroblasts by prostaglandins". J. Nat. Cancer Inst.,
47, 1357-1364 (1971).
- KIRKLAND, W.L. & BURTON, P.R. - "Cyclic adenosine mono-
phosphate-mediated stabilization of mouse neuroblastoma
cell neurite microtubules exposed to low temperature".
Nature New Biol., 240, 205-207 (1972).
- KOPROWISKI, H. & CROCE, C.M. - "Tumorigenicity of SV40
transformed human cells and human-mouse hybrids in nude
mice". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 1142-1146 (1977).
- KRAM, R.P.; MAMONT, P. & TOMKINS, G.M. - "Pleiotypic control
by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate: A model for growth
control in animal cells". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70,
1432-1436 (1973).
- LAJTHA, L.G. - "On the concept of cell cycle". J. Cell Comp.
Physiol., 62, suppl. 143-145 (1963).
- LEVI-MONTALCINI, R. & ANGELETTI, P.U. - "Nerve growth factor".
Physiol. Rev., 48, 534-550 (1968).
- LIPTON, A.; KINGER, I.; PAUL, D. & HOLLEY, R.W. - "Migration
of mouse 3T3 fibroblasts in response to a serum factor".
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 2799-2801 (1971).

- LISKAY, R.M. - "A mammalian somatic "cell cycle" mutant defective in G_1 ". J. Cell. Physiol., 84, 49-56 (1974).
- LOWRY, O.; ROSENBROUGH, J.; FARR, A. & RANDALL, R. - "Protein measurement with the Folin phenol reagent". J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951).
- MASUI, H. & GARREN, L.D. - "On the mechanism of action of adrenocorticotrophic hormone. Stimulation of DNA polymerase and thymidine kinase activities in adrenal glands". J. Biol. Chem., 245, 2627-2636 (1970).
- MASUI, H. & GARREN, L.D. - "Inhibition of replication in functional mouse adrenal tumor cells by adrenocorticotropin hormone mediated by cAMP". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 3206-3210 (1971).
- MASUI, H. & LA PORTE, P. - "Inhibition of growth of transplanted functional adrenal tumor cells by adrenocorticotrophic hormone (ACTH)". Abst. 55th Meeting of the Endocrine Soc. Suppl. Endocrinology, 92, A-54 (1973).
- MEZGER-FREED, L. - "Effect of ploidy and mutagens on BUdR resistance in haploid and diploid frog cells". Nature, 235, 245-246 (1972).
- MEZGER-FREED, L. - "An analysis of survival in haploid and diploid cell cultures after exposure to ICR acridine half-mustard compounds mutagenic for bacteria". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 4416-4420 (1974).
- MIYAMOTO, E.; KUO, J.F. & GREENGARD, P. - "Cyclic nucleotide dependent protein kinase. III. Purification and properties of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from bovine brain". J. Biol. Chem., 244, 6395-6402 (1969).
- NARDONE, R.M.; TODD, J.; GONZALES, P. & GAFFNEY, E. - "Nucleoside incorporation into strain L cells: inhibition by Pleuropneumonia-like organisms". Science, 149, 1000-1001 (1965).

- NISHIKAWA, K.; ARMELIN, H.A. & SATO, G. - "Control of ovarian cell growth in culture by serum and pituitary factors".
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 483-487 (1975).
- NOONAN, K.D. & BURGER, M. - "Induction of 3T3 cell division at the monolayer stage". Expl. Cell Res., 80, 405-414 (1973).
- NOSE, K. & KATSUTA, H. - "Arrest of cultured rat liver cells in G2 phase by the treatment with dibutyryl cAMP."
Biochem. Biophys. Res. Comm., 64, 983-988 (1975).
- OLSEN, R. - "Filamentations protein model for cyclic AMP-mediated cell regulatory mechanisms". J. Theor. Biol., 49, 263-287 (1975).
- OTTEN, J.; JOHNSON, G.S. & PASTAN, I. - "Cyclic AMP levels in fibroblasts: relationship to growth rate and contact inhibition of growth". Biochem. Biophys. Res. Comm., 44, 1192-1198 (1971).
- OTTEN, J.; JOHNSON, G.S. & PASTAN, I. - "Regulation of cell growth by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. Effect of cell density and agents which alter cell growth on cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels in fibroblasts". J. Biol. Chem., 247, 7082-7087 (1972).
- PAINTER, P.R. & MARR, A.G. - "Mathematics of microbial populations". Ann. Rev. Microbiol., 22, 519-548 (1968).
- PAUL, D.; LIPTON, A. & KLINGER, I. - "Serum factor requirements of normal and SV40-transformed 3T3 mouse fibroblasts".
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 645-648 (1971).
- PEARLSTEIN, E.S. & WATERFIELD, M.D. - "Metabolic studies on ¹²⁵I-labeled baby hamster kidney cell plasma membranes".
Biochem. Biophys. Acta, 362, 1-12 (1974).
- POLLACK, R.E.; GREEN, H. & TODARO, G.J. - "Growth control in cultured cells: selection of sublines with increased sensitivity to contact inhibition and decreased tumor-producing ability". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 60, 126-133 (1968).

- POLLACK, R.; RISSER, R.; CONLON, S.; FREEDMAN, V.; SHIN, S. & RIFKIN, D. - "Production of plasminogen activator and colonial growth in semisolid medium are in vitro correlates of tumorigenicity in the immune-deficient nude mouse". In: Proteases and Biological Control; Ed. Reich, E.; Rifkin, D.B. & Shaw, E. Cold Spring Harbor Laboratory, 885-897 (1975).
- PRASAD, K.N. & SHEPPARD, J.R. - "Neuroblastoma cell culture: membrane changes during cyclic AMP-induced morphological differentiation". Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 141, 240-243 (1972).
- PUCK, T. - "Studies of the life cycle of mammalian cells". Cold Spring Harbor Symposia, 29, 167-176 (1964).
- PUCK, T.T. & KAO, F.T. - "Genetics of somatic mammalian cells, V. Treatment with 5-bromodeoxyuridine and visible light for isolation of nutritionally deficient mutants". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 58, 1227-1234 (1967).
- PUCK, T.T. & MARCUS, P.I. - "A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: the use of X-irradiated cells to supply conditioning factors". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 41, 432-437 (1955).
- QUASTLER, H. & SHERMAN, F.G. - "Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse". Exp. Cell Res., 17, 420-438 (1959).
- RAMACHANDRAN, J. & SUYAMA, A.T. - "Inhibition of replication of normal adrenocortical cells in culture by adrenocorticotropin". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 113-117 (1975).
- RINDERKNECHT, E. & HUMBEL, R.E. - "Polypeptides with non-suppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization and some biological properties of forms I and II". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 2365-2369 (1976).

- ROBBINS, P.W.; WICKUS, G.G.; BRANTON, P.E.; GAFFNEY, B.J.; HIRSCHBERG, C.B.; FUCHS, P. & BLUMBERG, P.M. - "The chick fibroblast cell surface after transformation by Rous Sarcoma virus". Cold Spring Harbor Symposia, 39, 1173-1180 (1974).
- ROBISON, G.A.; BUTCHER, R.W. & SUTHERLAND, E.W. - "Cyclic AMP". Academic Press, New York (1971).
- ROSCOE, D.H.; ROBINSON, J.J. & CARBONELL, C. - "DNA synthesis and mitosis in a temperature-sensitive Chinese hamster cell line". J. Cell. Physiol., 82, 333-338 (1973a).
- ROSCOE, D.H.; READ, M. & ROBINSON, H.J. - "Isolation of temperature-sensitive mammalian cells by selective detachment". J. Cell. Physiol., 82, 325-332 (1973b).
- ROSS, R.; GLOMSET, J.; KARIYA, B. & HARKER, L. - "A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 1207-1210 (1974).
- RYGAARD, J. - "Thymus and self: Immunobiology of the mouse mutant "nude". F.A.D.L. Copenhagen (1973).
- SALMON, W.D. & DAUGHADAY, W.D. - "A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro". J. Lab. Clin. Med., 49, 825-836 (1957).
- SAMBROOK, J. - "Transformation by polyoma and simian virus 40". Adv. Cancer Res., 16, 141-180 (1972).
- SAMUELS, H.; TSAI, J. & CASANOVA, J. - "Thyroid hormone action: in vitro demonstration of putative receptors in isolated nuclei and soluble nuclear extracts". Science, 184, 1188-1191 (1974).
- SATO, G.; AUGUSTI-TOCCO, G.; POSNER, M. & KELLY, P. - "Hormone-secreting and hormone-responsive cell cultures". Recent Progress Horm. Res., 26, 539-546 (1970).

- SATO, G.; ZAROFF, L. & MILLS, S.E. - "Tissue culture populations and their relation to the tissue of origin". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 46, 963-972 (1960).
- SCHIMMER, B.P. - "Phenotypically variant adrenal tumor cell cultures with biochemical lesions in the ACTH-stimulated steroidogenic pathway". J. Cell. Physiol., 74, 115-122 (1969).
- SCHIMMER, B.P. - "Adenylate cyclase activity in adrenocorticotrophic tumor-sensitive and mutant adrenocortical tumor cell lines". J. Biol. Chem., 247, 3134-3138 (1972).
- SCHIMMER, B.P. - "Adenylate cyclase activity and steroidogenesis in phenotypic revertants of an ACTH-insensitive adrenal tumor cell line". Nature, 259, 482-483 (1976).
- SCHIMMER, B.P. & ZIMMERMAN, A.E. - "Steroidogenesis and extracellular cAMP accumulation in adrenal tumor cell cultures". Molec. Cell. Endocrinol., 4, 263-270 (1976).
- SCHNEBLI, H.P. & BURGER, M. - "Selective inhibition of growth of transformed cells by protease inhibitors". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 3825-3827 (1972).
- SEFTON, B.M. & RUBIN, H. - "Release from density dependent growth inhibition by proteolytic enzymes". Nature, 227, 843-845 (1970).
- SEIFERT, W. & PAUL, D. - "Levels of cyclic AMP in sparse and dense cultures of growing and quiescent 3T3 cells". Nature New Biol., 240, 281-283 (1972).
- SEIFERT, W.E. & RUDLAND, P.S. - "Possible involvement of cyclic GMP in growth control of cultured mouse cells". Nature, 248, 138-140 (1974).
- SHARP, J.D.; CAPECCHI, N.E. & CAPECCHI, M.R. - "Altered enzymes in drug-resistant variants of mammalian tissue culture cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 3145-3149 (1973).

- SHEFFLER, I.E. & BUTTIN, G. - "Conditionally lethal mutations in Chinese hamster cells. I. Isolation of a temperature-sensitive line and its investigation by cell cycle studies". J. Cell. Physiol., 81, 199-216 (1973).
- SHEPPARD, J.R. - "Difference in the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels in normal and transformed cells". Nature New Biol., 236, 14-16 (1972).
- SHEPPARD, J.R. & BANNAI, S. - "Cyclic AMP and cell proliferation". In: Control of Proliferation in Animal Cells. Eds. Clarkson, B. & Baserga, R. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 571-579 (1974).
- SHEPPARD, J.R. & PRASAD, K.N. - "Cyclic AMP levels and the morphological differentiation of mouse neuroblastoma cells". Life Science II, 12, 431-439 (1973).
- SIMMINOVITCH, L. - "On the nature of hereditary variation in cultured somatic cells". Cell, 7, 1-11 (1976).
- SMITH, J.A. & MARTIN, L. - "Do cells cycle?". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 1263-1267 (1973).
- SMITH, B.J. & WIGGLESWORTH, N.M. - "A cell line which is temperature-sensitive for cytokinesis". J. Cell. Physiol., 80, 253-260 (1972).
- SMITH, B.J. & WIGGLESWORTH, N.M. - "A temperature-sensitive function in a Chinese hamster line affecting DNA synthesis". J. Cell. Physiol., 82, 339-348 (1973).
- SMITH, B.J. & WIGGLESWORTH, N.M. - "Studies on a Chinese hamster line that is temperature sensitive for the commitment to DNA synthesis". J. Cell. Physiol., 84, 127-134 (1974).
- STANLEY, P.; SIMMINOVITCH, L.; NARASIMHIAN, S. & SCHACTER, H. - "Chinese hamster ovary cells selected for resistance to the cytotoxicity of phytohemagglutinin are deficient in UDP-N-acetylglucosamine-glycoprotein N-acetylglucosaminyltransferase activity". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 3323-3327 (1975).
- STILES, C.D.; DESMOND, W. Jr.; SATO, G. & SAIER, M.H. Jr. - "Failure of human cells transformed by simian virus 40 to form tumors in athymic nude mice". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 4971-4975 (1975).

- STILES, C.D.; DESMOND, W.; CHUMAN, L.M.; SATO, G. & SAIER, H. Jr. - "Growth control of heterologous tissue culture cells in the congenitally athymic nude mice". Cancer Research, 36, 1353-1360 (1976).
- STOKER, M. - "Abortive transformation by polyoma virus". Nature, 218, 234-238 (1968).
- STONE, K.R.; SMITH, R.E. & JOKLIK, W.K. - "Changes in membrane polypeptides that occur when chick embryo fibroblasts and NRK cells are transformed with avian sarcoma viruses". Virology, 58, 86-100 (1974).
- STUDZINSKI, G.P.; GIERTHY, J.F. & CHOLON, J.J. - "An autoradiographic screening test for mycoplasmal contamination of mammalian cell cultures". In Vitro, 8, 466-472 (1973).
- TASHJIAN, A.; YASUMURA, Y.; LEVINE, L.; SATO, G. & PARKER, M. - "Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone". Endocrinology, 82, 342-352 (1968).
- TEMIN, H.M. - "Stimulation by serum of multiplication of stationary chicken cells". J. Cell. Physiol., 78, 161-170 (1971). BIBLIOTECA IQ | 4980-4982.
- TENNER, A.; ZIEG, J. & SHEFFLER, I.E. - "Glycoprotein synthesis in a temperature-sensitive Chinese hamster cell cycle mutant". J. Cell. Physiol., 90, 145-160 (1977).
- THOMPSON, L.; HARKINS, J. & STANNERS, C. - "A mammalian cell mutant with a temperature-sensitive leucyl-transfer RNA synthetase". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 3094-3098 (1973).
- THRASH, C. & CUNNINGHAM, D. - "Stimulation of division of density inhibited fibroblasts by glucocorticoids". Nature, 242, 399-401 (1973).
- THRASH, C.R.; HO, T.S. & CUNNINGHAM, D.D. - "Structural features of steroids which initiate proliferation of density-inhibited 3T3 mouse fibroblasts". J. Biol. Chem., 249, 6099-6103 (1974).

- TODARO, G. & GREEN, H. - "Quantitative studies on the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines". J. Cell Biol., 17, 299-313 (1963).
- TODARO, G. & GOLDBERG, G. - "Transformation of properties of an established cell line by SV40 and polyoma virus". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 51, 66-73 (1964).
- TODARO, G.; LAZAR, G. & GREEN, H. - "The initiation of cell division in a contact-inhibited mammalian cell line". J. Cell. Comp. Physiol., 66, 325-333 (1965).
- TONIOLO, D.; MEISS, H.K. & BASILICO, C. - "A temperature-sensitive mutation affecting 28S ribosomal RNA production in mammalian cells". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 1273-1277 (1973).
- UTHNE, K. - "Human somatomedins purification and some studies on their biological actions". Acta Endocrinol. (Copenhagen), Suppl., 175, 1-35 (1973).
- VAN WYCK, J.J.; HALL, K.; VAN DER BRANDE, J.L. & WEAVER, R.P. - "Further purification and characterization of sulfation factor and thymidine factor from acromegalic plasma". J. Clin. Endocrinol., 32, 389-396 (1971).
- VOGEL, A.; OEY, J. & POLLACK, R. - "Two classes of revertants isolated from SV40-transformed 3T3 mouse cells". In: Control of Proliferation in Animal Cells Ed. Clarkson, B. & Baserga, R. 125-138 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1974).
- VOGEL, A. & POLLACK, R. - "Isolation and characterization of revertant cell lines. IV. Direct selection of serum-revertant sublines of SV40-transformed 3T3 mouse cells". J. Cell. Physiol., 82, 189-198 (1973).
- VOGEL, A.; RISSER, R. & POLLACK, R. - "Isolation and characterization of revertant cell lines. III. Isolation of density-revertants of SV40-transformed 3T3 cells using colchicine". J. Cell. Physiol., 82, 181-189 (1973).
- WANG, R.J. - "A temperature-sensitive cell line blocked in mitosis". Nature, 248, 76-78 (1974).

- WIGLER, M.; FORD, J. & WEINSTEIN, I.B. - "Glucocorticoid inhibition of the fibrinolytic activity of tumor cells". In: Proteases and Biological Control Eds. Reich, E.; Rifkin, D.B. & Shaw, E. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 849-856 (1975).
- WILLINGHAM, M.E.; JOHNSON, G.S. & PASTAN, I. - "Control of DNA synthesis and mitosis in 3T3 cells by cyclic AMP". Biochem. Biophys. Res. Comm., 48, 743-748 (1972).
- YAMADA, K.M. & WESTON, J.A. - "Isolation of a major cell surface glycoprotein from fibroblasts". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 3492-3496 (1974).
- YASUMURA, Y.; BUONASSISSI, V. & SATO, G. - "Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype". Cancer Res., 26, 529-535 (1966).

Partes do trabalho aqui descrito foram relatadas ou publicadas nas seguintes reuniões ou periódicos:

COMUNICAÇÕES:

1. Mari C.S. Armelin e Hugo A. Armelin "Isolamento de clones de fibroblastos 3T3 para estudos da regulação do crescimento celular". Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Caxambu, Minas Gerais (1976).
2. Angelo G. Gambarini, Mari C.S. Armelin, Sonia T. S. Funck e Hugo A. Armelin "Fatores de crescimento para células de mamíferos em cultura obtidos da hipófise: isolamento, caracterização e especificidade". Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Caxambu, Minas Gerais (1976).
3. Mari C.S. Armelin, Angelo G. Gambarini and H.A. Armelin " Extracellular regulators of cell proliferation in mammalian cell cultures". Tenth International Congress of Biochemistry, Hamburgo, Alemanha (1976). Abstracts pg. 522, 11-1-402.
4. Mari C.S. Armelin and Hugo A. Armelin " G_1 length studies in 3T3 cells: effect of hormones". First International Congress of Cell Biology, Boston, Massachusetts, Estados Unidos (1976) J. Cell Biol. 70, 401a.
5. Mari C.S. Armelin e Hugo A. Armelin "Morfologia e adesão em fibroblastos de camundongo: envolvimento de glicorticóides, cAMP e microtúbulos". Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Caxambu, Minas Gerais (1977).

6. Mari C.S. Armelin, Sandra E. Farias e Hugo A. Armelin "Regulação hormonal do crescimento e tumorigenicidade do mutante ST1 derivado de fibroblastos 3T3 de camundongo". Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Caxambu (1977).

7. Hugo A. Armelin e Mari C.S. Armelin "Ação de hormônios e fatores séricos na regulação da síntese de DNA e divisão celular em células de mamíferos". Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Caxambu, Minas Gerais (1977).

8. Hugo A. Armelin e Mari C.S. Armelin "Isolamento de mutantes de células adrenais resistentes a adrenocorticotropina". Reunião da Academia Brasileira de Ciências Instituto de Química, USP, setembro de 1977.

PUBLICAÇÕES:

1. Mari C.S. Armelin, Angelo G. Gambarini and Hugo A. Armelin "Protein factors which regulate cell growth". Arch. Biol. Med. Exper. 10, 122-129 (1976).

2. Mari C.S. Armelin and Hugo A. Armelin "Serum and hormonal regulation of the transition between resting and proliferative states in a variant of 3T3 fibroblasts". Nature 265, 148-151 (1977).

3. Hugo A. Armelin and Mari C.S. Armelin "Resting-proliferative transition in cultured mammalian cells". Nat. Cancer Inst. Monograph. 48 (1977).

4. Mari C.S. Armelin, Angelo G. Gambarini and Hugo A. Armelin "On the regulation of growth in the Y-1 line of mouse adrenal cells: effects of serum and pituitary factors". J. Cell. Physiol. 48 (1977).

5. Mari C.S. Armelin and Hugo A. Armelin "Steroid hormones mediated reversible phenotypic transition between transformed and untransformed state in mouse fibroblasts" Proc. Nat. Acad. Sci. USA (in press).

6. Hugo A. Armelin and Mari C.S. Armelin. "Cell cycle regulation in mammalian cells: hormones and commitment to DNA synthesis". Arch. Biol. Med. Exper. (in press).