**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE GENES
DIFERENCIALMENTE REGULADOS POR
GLICOCORTICÓIDES E ANÁLISE DO PROTEOMA
EM LINHAGEM DE GLIOMA SENSÍVEL À
HORMÔNIOS ANTI-TUMORAIS
GLICOCORTICÓIDES**

MARCOS ANGELO ALMEIDA DEMASI

Orientadora: Profa. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR

**Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Bioquímica - USP**

**Data de depósito do trabalho na SPG: 05/04/2005
Cinco de abril de dois mil e cinco**

Aos meus pais Angelo (*in memoriam*) e Ivone, pelo amor, carinho, dedicação e incentivo...

Às minhas irmãs Elisangela e Marilene pelo amor, carinho e amizade...

Ao meu amor e companheira Elaine...

Ao meu filho Marcus Vinícius por todas as alegrias...

AGRADECIMENTOS

À Profa. Mari C. Sogayar, pela oportunidade, confiança, orientação, amizade e constante incentivo durante todos estes anos.

À Lúcia Helena de Carvalho e Regina Maki Sasahara pela orientação durante a iniciação científica e pela amizade.

Ao Wagner R. Montor por toda sua ajuda com os experimentos de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas, e pela amizade.

Ao Antero F. de Almeida Macedo, Christian Colin, Fernando Abdulkader e Marilene Demasi pela revisão desta tese, críticas e sugestões.

À Gabriela Bonfim Ferreira por toda sua ajuda em vários experimentos e pela amizade.

À Theri Leica Degaki pela ajuda com os experimentos de citometria de fluxo e com os retrovírus e pela amizade.

À Rita de Cássia Sávio Figueira pela ajuda com os experimentos e análise dos dados de citometria de fluxo e pela amizade.

À Letícia Labriola pela ajuda com os experimentos de espectrometria de massas e pela amizade.

À Ana Paula Guedes Hasegawa e Fernanda Festa pela ajuda com os sequenciamentos e pela amizade.

Ao Cléber Giovanni Vedoy pelas discussões e sugestões.

Ao Antero F. de Almeida Macedo, Christian Colin, Fernanda Ortis, Mario H. Bengtson, Sheila Maria Brochado e Juan Carlos Bustos Valenzuela pelas longas e agradáveis discussões (científicas ou não) e pela amizade.

À Débora C. J. Costa, Helena M. F. Ribeiro, Irenice Cairo da Silva, Luana Campos, Patrícia Barros, Sandra Regina de Souza e Zizi de Mendonça pelo excelente apoio técnico e amizade.

Ao laboratório do Prof. Rui Curi e à Thaís Martins de Lima pela ajuda com os experimentos de citometria de fluxo.

Ao laboratório do Prof. Antônio Carlos Martins de Camargo e em especial ao Daniel Carvalho Pimenta pela ajuda com os experimentos de espectrometria de massas.

Aos professores, colegas e funcionários do Instituto de Química pelo apoio, atenção e amizade.

A todos os amigos do laboratório da professora Mari, por todos estes anos de convivência agradável, pela amizade, discussões, apoio e tantos momentos de descontração. Sempre vou guardar ótimas lembranças de todos vocês.

APOIO FINANCEIRO

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos.

PRP-USP: Pró-Reitoria de Pesquisa - USP.

Índice

Resumo.....	i
Summary.....	iii
Abreviaturas.....	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O ciclo celular	1
1.1.1 As quinases dependentes de ciclina (CDKs) e a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular.....	3
1.1.2 As vias inibitórias da progressão no ciclo celular	4
1.1.3 As vias de sinalização mitogênica	6
1.1.4 Diferenciação celular	8
1.1.5 Alterações no controle da transição G1/S e o câncer	8
1.1.6 Controle tecido-específico da progressão G1/S e a tumorigênese.....	10
1.2 Estratégias terapêuticas para o câncer	12
1.3 Os hormônios glicocorticóides como agentes inibitórios do crescimento celular	14
1.3.1 O receptor de hormônios glicocorticóides.....	14
1.3.2 Mecanismos moleculares da ação anti-proliferativa de GCs.....	18
1.4. As células ST1 como modelo de estudo do mecanismo de GC como agentes anti-tumorais.....	20
1.4.1 A eletroforese bidimensional de alta resolução (2D-PAGE).....	21
1.4.2 Análise funcional da Ciclina G na reversão fenotípica das células ST1 promovida por GCs	24
2. OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 MATERIAIS	29
3.1.1 Plasmídeos	29
3.1.2 Linhagens celulares.....	30
3.1.3 Meios de cultura, soluções e reagentes para células de mamífero	31
3.1.4 Meio de cultura para bactérias	31
3.1.5 Anticorpos.....	32
3.1.6 Isótopos radioativos	32
3.1.7 Soluções	32
3.1.8 Reagentes	35
3.1.9 Equipamentos	35
3.2 MÉTODOS	35
3.2.1 Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares	35
3.2.2 Congelamento e descongelamento de células	35
3.2.3 Transformação das bactérias com DNA plasmidial por eletroporação	36
3.2.4 Preparação de DNA plasmideal em pequena escala.....	36
3.2.5 Preparação de DNA plasmideal em média escala	37
3.2.6 Esquema de tratamento das células ST1 com hidrocortisona para extração de proteínas nucleares	38
3.2.7 Extração de proteínas nucleares (Dignam <i>et al</i> , 1983 modificado).....	38
3.2.8 Precipitação das proteínas nucleares	39
3.2.9 Eletroforese bidimensional.....	40
3.2.10 Reação de transcriptase reversa.....	44
3.2.11 Reação de PCR para amplificação da região codificadora da ciclina G (CycG _{CDS}).....	45
3.2.12 Reação de PCR para amplificação da região codificadora da Anexina2.....	45
3.2.13 Preparo do inserto CycG _{CDS} para clonagem no vetor pLPCX.....	46
3.2.14 Preparo da região codificadora da proteína EGFP para clonagem no vetor pLPCX.....	46
3.2.15 Preparo da região codificadora da Anexina 2 para clonagem no vetor pLPCX-EGFP.....	46
3.2.16 Preparo do vetor pLPCX para subclonagem do inserto CycG _{CDS} e da região codificadora da proteína EGFP.....	47
3.2.17 Subclonagem dos insertos CycG _{CDS} e EGFP no vetor pLPCX	47
3.2.18 Preparo do vetor pLPCX-CycGAS a partir do vetor pLPCX-CycG clone A10.....	49
3.2.19 Clonagem da região codificadora da Anexina 2 (ANX2) no vetor pLPCX-EGFP, para geração da proteína de fusão EGFP-ANX2.	50
3.2.20 Sequenciamento	52
3.2.21 Extração de RNA total	52
3.2.22 Fracionamento do mRNA obtido em gel de agarose-formaldeído e transferência para membrana de nylon (Sambrook <i>et al</i> , 1989, com modificações).....	53
3.2.23 Northern Blot radioativo	53
3.2.24 Extração de proteínas celulares totais	54
3.2.25 Extração de proteínas nucleares	55
3.2.26 Fracionamento de proteínas celulares (Fey <i>et al</i> , 1984 com modificações).....	55

3.2.27 Western blot	56
3.2.28 Coloração de géis de poliacrilamida com Coomassie® blue	57
3.2.29 Transfecção de células empacotadoras mediada por lipossomos	57
3.2.30 Coleta e titulação dos sobrenadantes virais	58
3.2.31 Concentração das partículas virais por centrifugação	58
3.2.32 Transdução de células ST1 com retrovirus	59
3.2.33 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo	59
3.2.34 Curvas de crescimento	60
3.2.35 Análise estatística	60
4. RESULTADOS	61
4.1 Análise dos perfis de expressão protéica das células ST1 tratadas com hidrocortisona	61
4.1.1 Geração de perfis de expressão protéica das células ST1 tratadas com hidrocortisona	61
4.1.2 Análise dos polipeptídeos diferencialmente representados por espectrometria de massas	68
4.2 Confirmação da expressão diferencial da Anexina 2 nas células ST1 após o tratamento com hidrocortisona ..	74
4.3 Análise da localização sub-celular da proteína Anexina 2 utilizando uma construção contendo a proteína de fusão EGFP-Anexina 2 (pLPCX-EGFP-ANX2)	79
4.4 Análise da expressão diferencial da Ciclina G nas células ST1	81
4.5 Geração das populações celulares de ST1 geneticamente modificadas para superexpressar ou atenuar a expressão de Ciclina G de rato	83
4.5.1 Construção e caracterização dos vetores de expressão contendo a região codificadora da Ciclina G ou o fragmento de cDNA "antisense" para ciclina G de rato no vetor retroviral pLPCX	84
4.5.2 Transdução das células ST1 com as construções retrovirais	87
4.5.3 Caracterização das populações ST1-CycGB8, ST1-CycGB12 e ST1-CycG-AS quanto à expressão da Ciclina G	88
4.6 Análise do efeito da super-expressão da Ciclina G em células ST1: proliferação celular e resposta a glicocorticóides	93
4.7 Análise do perfil de expressão de p21 durante a reversão fenotípica das células ST1	99
5. Discussão	106
6. CONCLUSÕES	114
6.1 Análise proteômica do efeito de glicocorticóides sobre as células ST1	114
6.2 Análise do papel da Ciclina G na reversão fenotípica das células ST1 promovida por hidrocortisona	115
7. BIBLIOGRAFIA	116

Índice de figuras e tabelas

Figura 1: Perfis 2D a partir de extrato nuclear de células ST1 não tratadas (A e B) (controle) e tratadas (C e D) com hidrocortisona (100ng/ml) por 5 h.....	62
Figura 2: Perfis 2D a partir de extrato nuclear de células ST1 não tratadas (A e B) (controle) e tratadas (C e D) com hidrocortisona (100ng/ml) por 24 h.....	63
Figura 3: Montagem mostrando polipeptídeos detectados como tendo seus níveis aumentados nos perfis correspondentes ao tratamento com hidrocortisona em relação aos géis controle.....	66
Figura 4: Montagem mostrando polipeptídeos detectados como tendo seus níveis diminuídos nos perfis correspondentes ao tratamento com hidrocortisona em relação aos géis controle.....	67
Figura 5: Montagem mostrando polipeptídeos detectados como tendo seus níveis diminuídos (polipeptídeo 118) e aumentado (polipeptídeo 235) nos perfis obtidos após o tratamento de 5 e 24 h com hidrocortisona.....	67
Figura 6: Perfis de digestão trípica obtidos por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF.....	72
Figura 7: Análise da expressão da Anexina 2 nas células ST1.....	75
Figura 8: Ensaio de Western blot para a análise da regulação da expressão protéica da Anexina 2 nas células ST1.....	76
Figura 9: Análise da expressão e localização celular da Anexina 2 nas células ST1.....	77
Figura 10: Análise da localização sub-celular da proteína de fusão EGFP-ANX2.....	80
Figura 11: Ensaio de Northern e Western blot para a análise da regulação da expressão da <i>Ciclina G</i> durante o tratamento das células ST1 com hidrocortisona.....	82
Figura 12: Representação parcial do alinhamento múltiplo presente em Horne <i>et al</i> , 1996, contendo a <i>Ciclina G</i> de rato, camundongo e humana, a <i>Ciclina G2</i> humana, a <i>Ciclina A</i> de camundongo e humana e as proteínas <i>Cig1</i> e <i>Cig2</i> de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	85
Figura 13: Células ST1 transduzidas com o vírus pLPCX-EGFP.....	88
Figura 14: Ensaio de Western blot contra <i>Ciclina G</i> para a análise das populações ST1-CycGB8, ST1-CycGB12 e ST1-CycG-AS.....	89
Figura 15: Ensaio de Western blot contra <i>Ciclina G</i> para a análise das populações ST1-CycGB8, ST1-CycGB12 e ST1-CycG-AS.....	91
Figura 16: Ensaio de Western blot contra <i>Ciclina G</i> para a análise das populações ST1-CycGB8 e ST1-CycGB12.....	92
Figura 17: Curvas de crescimento das células ST1 e das populações ST1-pLPCX, ST1-EGFP, ST1-CycGB8-C, ST1-CycGB12-A e ST1-CycGAS-B.....	94

Figura 18: Análise, por citometria de fluxo, do padrão de distribuição no ciclo celular das células ST1, ST1-pLPCX, ST1-EGFP, ST1-CycG-AS-B, ST1-CycGB12-A e ST1-CycGB8-C tratadas com hidrocortisona.....	96
Figura 19: Análise, por citometria de fluxo, do padrão de distribuição no ciclo celular das células ST1-pLPCX, ST1-EGFP, ST1-CycGB8-C, ST1-CycGB12-A e ST1-CycG-AS-B carenciadas em meio DMEM-SFB 0,2% por 24h, tratadas com hidrocortisona por 24h em meio DMEM-SFB 0,2% e re-estimuladas em meio DMEM-SFB 5% por 24 h na ausência de hidrocortisona.....	97
Figura 20: Ensaio de Northern e Western blot para a análise da regulação da expressão de <i>p21</i> durante o tratamento das células ST1 com hidrocortisona.....	100
Tabela 1: Tamanho dos fragmentos esperados para as reações de PCR, visando verificar a presença dos insertos CycG _{CDS} e EGFP.....	48
Tabela 2: Combinação de "primers" e tamanho dos fragmentos esperados para as reações de PCR para checagem da orientação do inserto CycG _{CDS}	48
Tabela 3: Fragmentos esperados a partir da PCR utilizando os "primers" ANX2F e pLPCXR para os vetores recombinantes possíveis da clonagem da ANX2 no sítio HindIII do vetor pLPCX-EGFP.....	52
Tabela 4: Polipeptídeos diferencialmente expressos entre os géis controle (1A, 1B e 2B) e os géis representando tratamento com hidrocortisona por 5 h (1C e 1D) e por 24h (2D).....	65
Tabela 5: Picos de massa (Da) referentes ao perfil de digestão trípica dos polipeptídeos 48, 67, 75, 118, 118, 128 e 246.....	69
Tabela 6: Resumo dos polipeptídeos identificados por MALDI-TOF. Estão representados os dados da análise do perfil de digestão trípica dos polipeptídeos 48, 67, 75, 118, 128 e 246 pelo programa Aldente (www.expasy.org/tools/aldente), usando o banco de digestão de proteínas de rato.....	72

RESUMO

O efeito dos hormônios glicocorticóides (GC) de suprimir o crescimento celular é exercido através de cascatas celulares nas quais a transcrição de genes de resposta primária, mediada direta ou indiretamente pelo receptor de GC, regulam a transcrição e a atividade de um conjunto de genes, incluindo fatores importantes para a progressão no ciclo celular. Entretanto, a conexão funcional entre diversos dos genes ativados ou inibidos por GC e a inibição da proliferação de determinados tipos celulares ainda não é completamente conhecida. Nosso laboratório isolou a variante ST1, a partir da linhagem C6 de glioma de rato, utilizando-a como modelo de estudo do mecanismo de ação de GC como agentes anti-tumorais. O tratamento com GC confere, às células ST1, um crescimento totalmente dependente de soro e ancoragem, morfologia em cultura semelhante à de fibroblastos normais e incapacidade de gerar tumor em camundongos da linhagem "nude", caracterizando uma completa reversão fenotípica tanto in vitro como in vivo. Como abordagens para o entendimento do mecanismo molecular da ação de GCs, o laboratório vem buscando a clonagem de produtos gênicos diferencialmente expressos através do uso de técnicas que permitam a análise da abundância relativa dos mRNAs, e mais recentemente, empregando-se a análise da abundância relativa das proteínas através da eletroforese bidimensional (2D-PAGE). As seqüências isoladas por estas metodologias são alvos potenciais para uma posterior análise funcional.

Os objetivos gerais deste trabalho foram: a) identificar genes que estão diferencialmente expressos durante a reversão fenotípica das células ST1 induzida por GC, através da análise proteômica (2D-PAGE e espectrometria de massas) e b) determinar a função de um dos genes (Ciclina G) identificado anteriormente no laboratório como sendo induzido durante o tratamento das células ST1 com GC.

A metodologia empregada se baseou na comparação dos perfis 2D de proteínas nucleares das células ST1 tratadas ou não (controle) com GC por 5 e 24h. Após análise de imagem, 33 polipeptídios foram considerados como diferencialmente representados após 5h de tratamento, 16 dos quais foram também identificados após 24h de tratamento. Seis destes polipeptídios foram identificados através da análise dos seus perfis de digestão triptica (PMF). Evidências obtidas por ensaios de Western blot sugerem que um destes polipeptídeos, a Anexina 2 (ANX2), possui a sua localização sub-celular modulada pela ação de GC nas células ST1.

A análise do papel da Ciclina G na reversão fenotípica tumoral-normal das células ST1 induzida por GC, foi feita através da sua super-expressão nestas células, utilizando um sistema retroviral, e avaliando-se os efeitos desta super-expressão sobre a resposta das células ST1 a GC, através de ensaios de curva de crescimento e citometria de fluxo. Os dados sugerem que a super-expressão da Ciclina G nas células ST1 intensifica e prolonga o efeito de GC nestas células.

SUMMARY

The glucocorticoids (GC) growth suppression response is controlled through cellular cascades in which the transcription of primary response genes regulates the expression and activity of a diverse set of genes including important factors for cell cycle progression. However, the functional connection between the GC-regulated transcriptional events and cell cycle arrest of determined cells is poorly understood at the molecular level. In this context, our lab has isolated the ST1 variant of the C6 rat glioma cell line to study the mechanism of action of GC as anti-tumor agents. GC treatment leads ST1 cells to a dramatic tumoral to normal phenotypic reversion, characterized by inhibition of their growth rate in monolayer, loss of their ability to form colonies in semi-solid medium and to induce tumor formation in nude mice, and morphological changes (flattening). As part of the strategy to understand the anti-tumor action of GC, differentially represented proteins, associated with the phenotypic reversion displayed by ST1 cells have been isolated through mRNA-based blind cDNA cloning and, more recently, by two dimensional electrophoresis (2D-PAGE). The sequences isolated by these two methodologies are potential targets for functional analysis.

In the present study, we aimed at a) identifying genes which are differentially expressed during the GC-induced phenotypic reversion of ST1 cells, using the proteomic approach (2D-PAGE and mass spectrometry) and b) determining the functional role of a gene (Cyclin G) which had previously being identified as being induced during GC-treatment of the ST1 cells.

The analytical methodology used relied on the comparison of sets of 2D nuclear protein profiles of ST1 cells, maintained in the absence (control) and in the presence of GC for 5 and 24h. After image analysis and visual validation, 33 polypeptides were considered as differentially represented 5 h after treatment, 16 of which were also differentially represented after 24 h. Six of those polypeptides were identified by peptide mass fingerprinting (PMF). Evidence obtained by Western blot analysis indicates that one of those polypeptides, Annexin 2 (ANX2), has its sub-cellular location modulated by GC-treatment of ST1 cells.

The role of Cyclin G in the tumoral to normal phenotypic reversion induced by GC in

ST1 cells was analyzed by over-expression of Cyclin G using a retroviral system and evaluation of the effects of this over-expression over ST1 cells response to GC, by growth curve and flow cytometry assays. The data suggest that Cyclin G over-expression leads to a more intense and prolonged effect of GC on ST1 cells.

ABREVIATURAS

2D-PAGE: “Two-Dimensional-Polyacrylamide Gel Electrophoresis”

36B4: Fosfoproteína PO ribossomal ácida

ALL: “Acute Lymphoblastic Leukemia”

AMP: “Adenosine Monophosphate”

APC: “Adenomatous Polyposis Coli”

AP-1: “Activator Protein-1”

ARF: “Alternative Reading Frame”

ATP: “Adenosine Triphosphate”

BRG-1: “Brahma Related Gene-1”

CDK: “Cyclin-Dependent Kinase”

C/EBPa: “CCAAT/Enhancer Binding Protein”

CHAPS: “3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate”

CIAP: “Calf Intestine Alkaline Phosphatase”

CIP: “CDK Inhibitory Proteins”

CREB: “Cyclic-AMP Response Element Binding protein”

CTP: “Cytosine Triphosphate”

DMEM: “Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: “Deoxyribonucleic Acid”

dNTP: “Dideoxynucleotides”

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Ácido etilenodinitrilotetracético sal disódico

EGF: “Epidermal Growth Factor”

EGFP: “Enhanced Green Fluorescent Protein”

ENC-1/NRP/B: “Ectodermal-neural cortex-1 protein/ Nuclear matrix Related Protein/Brain”

ERK: “Extracellular signal-Related Kinase”

FOXO: “Forkhead Box protein O1A”

GADD45: “Growth Arrest and DNA-Damage-inducible protein 45”

GC: “Glucocorticoid”
GR: “Glucocorticoid Receptor”
GSK3 β : “Glycogen Syntase Kinase 3 β ”
GTP: “Guanosine Triphosphate”
HDM2: “Human Double Minute 2”
hnRNP: “heterogeneous Ribonucleoprotein”
HSP: “Heat Shock Protein”
IEF: “Isoelectric Focusing”
IPG: “Immobilized pH Gradient”
INK4: “Inhibitor of Kinase 4”
LB: Meio Lúria-Bertani
LTR: “Long Terminal Repeat”
MALDI-TOF: “Matrix Assisted Laser Desorption-Time of Flight”
MAPKK: “Mitogen Activated Protein Kinase Kinase”
MMLV: “Moloney Murine Leukemia Vírus”
MOI: “Multiplicity of Infection”
MOPS: Ácido 3-[N-Morfolina]propanosulfônico
NF- κ B: “Nuclear Factor κ B”
OD: Densidade óptica
pb: Pares de base
P/CAF: “p300/CBP Associated Factor”
PCR: “Polimerase Chain Reaction”
PDI: “Protein Disulfide Isomerase”
PDGF: “Platelet-Derived Growth Factor”
PDK-1: “3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1”
PI3K: “Phosphatidylinositol-3-OH Kinase”
PIP3: “Phosphatidylinositol 3-4-5-triphosphate”
pRb: “Retinoblastoma protein”
PMSF: “Phenylmethylsulphonyl fluoride”
PTEN: “Phosphatase and Tensin homolog”

RNA: “Ribonucleic Acid”
mRNA: “messenger RNA”
Rpm: Rotações por minuto
RT: "Reverse Transcriptase"
SDS: “Sodium Dodecyl Sulphate”
SFB: Soro fetal bovino
Shh: “Sonic hedgehog”
SHIP: “SH2 containing Inositol-5 Phosphatase”
SMAD-4: “Mothers Against DDP homolog 4”
SSH: “Suppression Subtractive Hybridization”
TGF- β : "Tumor Growth Factor- β "
TNF- α : “Tumor Necrosis Factor- α ”
TTP: “Timine Triphosphate”
UTR: “Untraslated Region”
UV: Luz ultravioleta

1.INTRODUÇÃO

O processo de tumorigênese envolve várias etapas de alterações sucessivas na função dos produtos gênicos, as quais acabam levando à transformação progressiva de células normais em células cancerosas. Nas últimas décadas, vários produtos gênicos, cujas funções se encontram alteradas no estado tumoral, foram descritos, e esta lista continua aumentando. Com a elucidação da função molecular de vários desses genes, verificou-se que estes poderiam ser agrupados em classes funcionais relacionadas ao controle de processos básicos que governam os mecanismos de proliferação celular e manutenção da homeostase. Sendo assim, foi proposto que as alterações progressivas da função de diversos produtos gênicos, encontradas no estado tumoral, refletiriam certas mudanças, essenciais para o estabelecimento do tumor. Estas alterações seriam a auto-suficiência quanto a sinais mitogênicos, a insensibilidade a sinais inibitórios da proliferação, a perda da capacidade de execução da morte celular programada (apoptose), o potencial replicativo ilimitado, a capacidade de promover angiogênese, a capacidade de invasão de tecidos e o estabelecimento de sítios metastáticos. O resultado final destas alterações é um desbalanço entre os processos de proliferação, diferenciação e morte celular, culminando com a divisão celular descontrolada e a formação da massa tumoral (Hanahan and Weinberg, 2000; Sherr, 2004). O controle desse balanço entre proliferação, diferenciação e morte celular está intimamente ligado ao controle da transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Sendo assim, muitas das alterações moleculares associadas ao câncer, e conseqüentemente, das estratégias terapêuticas disponíveis para o seu tratamento, estão relacionadas com os mecanismos que controlam esta transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular, como vai ser discutido nos próximos itens.

1.1 O ciclo celular

Durante as fases iniciais da embriogênese, o ciclo celular oscila praticamente entre duas fases, a fase de duplicação do material genético ou de síntese do DNA, conhecida como fase S, e uma seqüência de eventos muito bem definida, que culmina com a divisão celular, conhecida como a fase M, resultando na geração de duas células-filhas, com

material genético idêntico ao da célula-mãe. Durante o desenvolvimento, são introduzidas mais duas fases, uma entre a fase S e a fase M, conhecida como G2, e a outra entre a fase M e a fase S, conhecida como G1. A introdução destas fases reflete uma adaptação das células, durante o processo de desenvolvimento, à crescente complexidade ambiental na qual elas se inserem (revisto em Massagué, 2004).

Na fase G2 existem mecanismos que asseguram que a célula só entre no processo de divisão celular após ter todo o seu material genético duplicado e sem erros. Caso ocorra, durante o processo de síntese do DNA, alguma anormalidade que leve, por exemplo, à introdução de erros durante a replicação, a duração da fase G2 pode ser ajustada com a finalidade de permitir que ocorra o reparo destes erros antes que a célula entre no processo de mitose. Este tipo de resposta é conhecido como “checkpoint” (revisto em Massagué, 2004).

O intervalo G1 também possui essas respostas do tipo “checkpoint”, que consistem em um constante monitoramento do contexto geral da célula quanto ao seu estado metabólico, a integridade do DNA, e aos diversos tipos de sinais recebidos do meio extracelular, os quais, por sua vez, irão determinar se a célula entrará ou não no processo de divisão celular (revisto em Massagué, 2004). Além disto, é durante a fase G1 do ciclo celular que múltiplos sinais anti-proliferativos atuam para que ocorra a manutenção da homeostase tecidual. Basicamente, essa sinalização anti-proliferativa faz com que as células saiam do ciclo celular na fase G1 e entrem num estado quiescente, conhecido como G0, do qual as células podem, dependendo da presença de certos sinais extracelulares e do contexto celular, sair e voltar ao estado proliferativo. Alternativamente, as células podem ser induzidas à deixar o estado proliferativo e entrar em processo de diferenciação, que é geralmente associado com a aquisição de funções celulares específicas geralmente associadas à restrição, ou mesmo perda definitiva, do potencial proliferativo (revisto em Hanahan and Weinberg, 2000; Sherr, 2004).

1.1.1 As quinases dependentes de ciclina (CDKs) e a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular

Um evento necessário para a progressão da fase G1 do ciclo celular para a fase S de replicação do DNA em todos os tipos celulares é a ativação das quinases dependentes de Ciclinas (CDKs – Cyclin-Dependent Kinases). As CDKs são uma família de proteínas que necessitam da ligação de uma sub-unidade regulatória para terem sua atividade catalítica. Essas sub-unidades regulatórias constituem uma outra família de proteínas, conhecida como Ciclinas. Diferentes membros da família das CDKs se associam com diferentes Ciclinas, controlando os mais diversos aspectos relacionados à progressão em todas as fases do ciclo celular. A atividade dos diferentes complexos Ciclinas/CDKs pode ainda ser regulada através de fosforilação e interação com outras proteínas, modulando de forma mais precisa o momento e a duração da ativação destes complexos.

Uma CDK que tem um papel central na progressão pela fase G1 do ciclo celular de eucariotos superiores é a CDK2, que interage com as Ciclinas E1, E2 e A. Uma das funções da CDK2 é a ativação da replicação do DNA a partir de sítios específicos, conhecidos como origens de replicação, onde se encontram complexos protéicos conhecidos como complexos pré-replicativos (revisto em Massagué, 2004).

Vários mecanismos fazem com que a fase G1 do ciclo celular ocorra através da manutenção da CDK2 inativa, até que esta seja estimulada pela ação de agentes mitogênicos. Um destes mecanismos implica na manutenção de níveis baixos das Ciclinas E. A expressão destas Ciclinas é dependente da atividade de uma família de fatores de transcrição, conhecida como E2Fs. Estes fatores de transcrição possuem um papel-chave na regulação da expressão coordenada de vários genes necessários para o início e a progressão pela fase S do ciclo celular. A ligação da proteína Retinoblastoma (pRb), ou membros da sua família, como p107 e p130, aos E2Fs inibe a atividade destes fatores de transcrição, fazendo com que as Ciclinas E e outros genes necessários para a transição G1/S não sejam expressos (Massagué, 2004; Sherr & McComick, 2002; Sherr, 2004).

A fosforilação de pRb pelas CDKs 4 e 6 inibe a atividade repressora dessa proteína sobre os E2Fs. Por sua vez, as CDKs 4 e 6 são ativadas pela associação com as Ciclinas D, cuja expressão é controlada por agentes mitogênicos (figura 1).

A proteína pRb pode ser fosforilada, também, pelo complexo Ciclina E/CDK2, criando um ciclo de retro-alimentação positiva, que acaba levando à entrada na fase S. Sendo assim, a regulação da atividade de pRb, exercida através de fosforilação, é um dos mecanismos pelos quais ocorre o acoplamento entre a sinalização extracelular e a maquinaria molecular de controle da iniciação da replicação do DNA (Sherr, 2004).

1.1.2 As vias inibitórias da progressão no ciclo celular

Um mecanismo que controla a transição G1/S se baseia na atividade inibitória de certas proteínas sobre alguns complexos Ciclina/CDK. Algumas dessas proteínas, como p27, fazem parte do mecanismo de progressão durante a fase G1, outras, como p21 e p16, são mediadoras de vias de sinalização citostática.

Uma das funções de p27 é inibir a atividade da CDK2, o que pode ocorrer em células quiescentes ou durante a fase inicial de G1. Os estímulos mitogênicos podem inibir esta atividade de p27 de várias maneiras, através da inibição da sua transcrição, tradução, estabilidade, ou ainda da sua localização nuclear (revisto em Vogelstein & Kinzler, 2004; Massgué, 2004).

As proteínas que estão envolvidas em vias de sinalização citostática regulam diversos processos celulares, entre os quais encontram-se as respostas de "checkpoint" durante o ciclo celular, detecção e reparo de dano ao DNA, sinalização mitogênica e diferenciação celular. Um dos produtos gênicos que tem uma função central em vários destes processos é p53.

A proteína p53 é um fator de transcrição que tem sua função ativada por vários tipos de estímulos, geralmente associados ao estresse celular, entre os quais hipóxia, dano ao DNA causado por agentes genotóxicos e por irradiação, e na presença de sinais mitogênicos incompatíveis com o contexto proliferativo celular, o que ocorre devido à ativação descontrolada de várias destas vias no processo de tumorigênese. Uma vez

ativada, p53, na forma de homotetrâmeros, induz diversos genes que fazem parte da resposta citostática a estes estímulos, induzindo ou um bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1 ou, mais dramaticamente, o processo de apoptose, sendo o principal efetor da resposta de "checkpoint" nesta fase do ciclo celular. Um dos genes, induzidos por p53 e que está envolvido no bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1, é o p21, que faz parte de uma família de genes conhecida como CIPs (CDKs Inhibitory Proteins), da qual faz parte a p27 citada acima. A função de p21 é se ligar e inibir a atividade dos complexos Ciclina/CDK, principalmente o complexo Ciclina E/CDK2 (figura 1) (revisto em Sherr, 2004; Vogelstein & Kinzler, 2004).

Vários produtos gênicos, que controlam a atividade tanto de pRb como de p53, fazem parte, também, de sinalizações citostáticas específicas. Um exemplo clássico é o gene *p16*, que faz parte de uma família de genes conhecida como inibidores da quinase dependente de ciclina 4 (INK4). A proteína p16 inibe a atividade dos complexos das Ciclinas D com as CDKs 4 e 6. Curiosamente, no mesmo locus do gene *p16* (*INK4a*), está situado, também, um potente regulador da função de p53, conhecido como p14 ou ARF (Alternative Reading Frame). Estes dois produtos gênicos, p16 e p14, têm sua transcrição iniciada em promotores separados, e se iniciam em primeiros exons diferentes, os quais são incorporados, por "splicing", a exons que contêm em comum, sendo traduzidos em diferentes fases de leitura. A proteína p14 possui a função de inibir a atividade de uma outra proteína, que também é induzida por p53, a HDM2 (Human Double Minute 2), a qual, por sua vez, induz a degradação de p53 via proteossoma através de sua atividade de ubiquitina ligase. Desta forma, a atividade de p14 promove a estabilização de p53 através da inibição da atividade da proteína HDM2. Um dos exemplos mais caracterizados de estímulos que controlam a expressão tanto de p16 como de p14 é a ativação simultânea de várias vias de transdução de sinal mitogênico pela disfunção do oncogene Ras, o que, conseqüentemente, leva à ativação de pRb e p53, bloqueando, desta forma, a progressão no ciclo celular (revisto em Sherr & McCormick, 2002; Sherr, 2004) (figura 1).

Figura 1: Papel das proteínas pRb, p53, p16 e p14 no controle da transição das fases G1/S do ciclo celular. Ver texto para mais detalhes.

Resumidamente, pRb, p53, p16 e p14 fazem parte de uma rede de sinalização controlada por diversos estímulos, desempenhando um papel central no controle da progressão G1/S do ciclo celular.

1.1.3 As vias de sinalização mitogênica

As vias de sinalização mitogênica controlam as concentrações tanto de efetores positivos, como as Ciclinas, como, também, dos inibidores do ciclo celular. As vias de sinalização que controlam a progressão G1/S mais bem descritas são as vias compostas pelas proteínas Ras e pela proteína quinase PI3K (Phosphatidylinositol-3-OH Kinase).

Uma variedade de sinais mitogênicos, atuando tanto via receptores com atividade intrínseca de tirosina quinase como através de receptores acoplados à proteína G, ativa as vias de Ras e da PI3K, estimulando, desta forma, processos relacionados com a proliferação, crescimento e sobrevivência celular (revisto em Massagué, 2004; Vogelstein & Kinzler, 2004).

A proteína Ras, na sua forma ativa, promove a ativação de uma rede complexa de efetores, sendo que uma destas, composta pelas quinases Raf, MAPKK (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase) e ERK (Extracellular signal-Related Kinase), possui um papel central no controle da atividade das CDKs. Uma das funções da proteína MAPK, um dos efetores finais desta via, é a fosforilação, e com isso a estabilização de c-Myc, um fator de transcrição que, entre outras funções, induz a expressão da Ciclina D1 e reprime a expressão de alguns inibidores da atividade das CDKs (revisto em Massagué, 2004).

A proteína PI3K é recrutada para a membrana plasmática através de resíduos de tirosina fosforilados tanto em receptores como em proteínas acessórias fosforiladas. Na membrana, a atividade catalítica da PI3K gera o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), um processo contrabalanceado pela atividade de duas fosfatases de lipídeos, conhecidas como PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) e SHIP (SH2 containing Inositol-5 Phosphatase). Os sítios contendo PIP-3 na membrana servem como atratores para diversas proteínas, entre as quais uma proteína quinase conhecida como Akt, que, uma vez ligada à membrana, é ativada através de fosforilação por uma outra quinase conhecida como PDK (3-Phosphoinositide Dependent protein Kinase 1). A proteína Akt auxilia na manutenção da atividade das CDKs de duas formas, sendo uma através da fosforilação e inativação da Glicogênio Sintase Quinase 3 β (GSK3 β), o que previne que esta fosforile e desestabilize as Ciclinas D. A outra consiste na fosforilação e inibição da translocação citoplasma-núcleo do fator de transcrição FOXO (Forkhead Box protein O1A), inibindo, assim, a transcrição de inibidores da atividade de CDK como p27 e p21 (revisto em Massagué, 2004).

Resumidamente, as vias de sinalização mitogênicas constituem o elo entre sinais extracelulares e a maquinaria molecular de controle da progressão pela fase G1 do ciclo

celular em células de mamíferos.

1.1.4 Diferenciação celular

Outra classe de vias que têm influência sobre a transição entre as fases G1/S do ciclo celular é aquela que controla programas de diferenciação celular. Estão incluídos nesta classe genes que fazem parte do controle do fluxo de informações de receptores de superfície para famílias de fatores de transcrição que modulam tanto programas de diferenciação como de proliferação. Duas destas vias são compostas pelas proteínas Wnt e Shh (Sonic hedgehog), sendo que ambas controlam processos relacionados com a especificação celular durante a embriogênese e a renovação celular em tecidos adultos. A ativação de ambas as vias leva à ativação de fatores de transcrição através da supressão de eventos proteolíticos. O efeito proliferativo destas duas vias envolve a ativação do fator de transcrição c-Myc (Sherr, 2004; Vogelstein & Kinzler, 2004; Massagué, 2004).

Uma outra via sinalizadora desta classe é composta pela proteína TGF- β (Tumor Growth Factor- β). A sinalização via TGF- β regula a expressão de vários genes envolvidos com o controle de uma variedade de efeitos biológicos. A fosforilação das proteínas da família das Smads pelos receptores ativados de TGF- β facilita a formação de complexos heterodiméricos entre as proteínas Smads, as quais, juntamente com outros fatores que conferem especificidade celular a esta via de sinalização, induzem ou reprimem a expressão de diversos genes, entre os quais c-Myc, que tem sua expressão reprimida, e p16, que tem sua expressão induzida, em certos tipos celulares (Sherr, 2004).

1.1.5 Alterações no controle da transição G1/S e o câncer

Os itens anteriores ilustram, de forma simplificada, a complexa rede de sinalização que controla a progressão pela fase G1 do ciclo celular e como vários processos celulares, que participam do balanço entre proliferação e diferenciação celular, estão relacionados com a regulação desta progressão.

Tem-se especulado que as células cancerosas são derivadas de populações de células-

tronco tecido-específicas (Reya, 2001). Certas mutações levariam a um desbalanço entre os processos de renovação e diferenciação, afetando, assim, a capacidade destas células progredirem para um estado diferenciado, propiciando que mutações adicionais se acumulem até que, finalmente, ocorra o aparecimento de um fenótipo tumoral. Como o controle da progressão pela fase G1 do ciclo celular tem um papel central na regulação deste balanço entre renovação e diferenciação, diversos dos componentes discutidos acima e que fazem parte deste controle, possuem as funções alteradas em vários tipos de tumores, como por exemplo:

- A super-expressão de fatores mitogênicos ou mutações em seus receptores, que levem à ativação constitutiva de seus receptores são comuns em certos tipos de câncer. Alguns exemplos incluem mutações no receptor do mitógeno EGF (Epidermal Growth Factor), um receptor com atividade intrínseca de tirosina quinase, e que freqüentemente se encontra mutado/super-expresso em tumores de pulmão, cabeça e pescoço, cólon e em glioblastomas; super-expressão do receptor ErbB2 (v-erb-b2 Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2) em câncer de mama; super-expressão do mitógeno PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) em glioblastomas (revisto em Vogelstein & Kinzler, 2004; Sherr, 2004; Massagué, 2004);
- Mutações ativadoras da proteína Ras são encontradas em vários tipos de carcinomas (revisto em Vogelstein & Kinzler, 2004);
- Mutações ativadoras ou amplificações dos genes que codificam para a PI3K e Akt ocorrem, com moderada freqüência, em vários tipos de carcinomas; a inativação de PTEN é freqüente em glioblastoma, melanoma, linfomas e em muitos carcinomas (revisto em Vogelstein & Kinzler, 2004; Massagué, 2004).
- A super-expressão da Ciclina D1 ocorre com freqüência em câncer de mama (revisto em Massagué, 2004);
- Mutações inativadoras no gene *Rb* estão associadas a uma forma hereditária de retinoblastoma e em vários outros tipos de câncer (revisto em Sherr, 2004);
- p53 possui a função alterada em vários tipos de tumores, sendo o gene que se encontra mais freqüentemente alterado em tumores humanos (revisto em Sherr, 2004);

- Mutações, deleções e inativações dos genes *p16* e *p14* são comuns em vários tipos de câncer e estão associadas à uma forma hereditária de melanoma (revisto em Sherr, 2004);
- Mutações que ativam constitutivamente a via de Wnt, como, por exemplo, a inativação do gene *APC* (Adenomatous Polyposis Coli), são muito comuns em câncer de cólon; mutações que ativam constitutivamente a via de Shh estão entre as causas de meduloblastoma e rabdomiossarcoma; mutações no gene *SMAD4*, da via de TGF- β , já foram identificadas em cânceres de cólon (revisto em Sherr, 2004).

De uma forma geral, a perda da função destas classes de genes promove, de certa forma, o desacoplamento do controle sobre a progressão pela fase G1 do ciclo celular, da sinalização extracelular, dificultando a habilidade das células de saírem do ciclo e comprometendo a execução de programas de diferenciação em certos tecidos.

1.1.6 Controle tecido-específico da progressão G1/S e a tumorigênese

O controle da progressão pela fase G1 do ciclo celular é dependente do tipo e contexto celular considerado, o que, na verdade, implica que, dependendo do tecido de origem, as células irão progredir pela fase G1 do ciclo celular sob diferentes circunstâncias, sinais e programas de desenvolvimento. Esta dependência do controle da progressão pela fase G1 quanto ao tipo celular tem, como base, a existência de múltiplas vias de sinalização e alternativas de interação entre as mesmas. Além disso, muitos dos produtos gênicos que compõem estas vias existem em diversas versões que podem, por exemplo, ser codificadas por genes parálogos ou produzidas através de “splicing” alternativo. A expressão destas diferentes versões pode, ainda, depender do tipo celular considerado, e do estágio de desenvolvimento do mesmo, possibilitando, desta forma, uma flexibilidade funcional extremamente complexa em relação a estes produtos gênicos, que contribui, assim, para a variabilidade no controle da progressão pela fase G1 do ciclo.

As consequências imediatas de todas estas possibilidades de controle estão na redundância, robustez e flexibilidade do controle da progressão pela fase G1 do ciclo

celular. Mas também é consequência dessa variedade, a susceptibilidade específica de certos tipos celulares a determinadas disfunções, relacionadas com a tumorigênese, em um dado produto gênico. Isso faz com que certas alterações relacionadas com o câncer sejam encontradas mais freqüentemente em determinados tipos celulares. Por exemplo, certas alterações em vias de sinalização envolvidas em programas de diferenciação são restritas a certos tipos celulares, como na relação entre a disfunção do gene APC e a gênese do carcinoma de cólon. Outro exemplo é a alteração em componentes de vias de sinalização comuns a vários tipos celulares, mas que contribuem com o processo de tumorigênese, quando ocorre a disfunção dos mesmos, apenas em certos tipos celulares. Sendo assim, no caso de mutações ativadoras em genes que participam da sinalização mitogênica, estas serão tumorigênicas somente se conferirem uma vantagem seletiva quanto à sobrevivência ou proliferação em certos contextos celulares específicos. Já no caso de produtos gênicos que fazem parte de vias inibitórias da progressão no ciclo celular, especula-se que a suscetibilidade de certos tipos celulares quanto à inativação destes genes depende da redundância funcional destas vias sinalizadoras presentes em determinados tipos celulares. Um complicante adicional neste cenário é a existência de evidências que apontam para a possibilidade de que, uma vez que o primeiro evento tumorigênico tenha ocorrido, as mutações pro-neoplásicas adicionais que necessitam ocorrer durante a progressão tumoral podem depender tanto da natureza daquele primeiro evento como do estágio de desenvolvimento do tipo celular que tenha sustentado aquela primeira alteração (revisto em Vogelstein & Kinzler, 2004; Sherr, 2004; Massagué, 2004).

Um dos grandes desafios, atualmente, no estudo da biologia molecular do câncer é justamente entender as bases dessa especificidade no processo de tumorigênese. Apesar do crescente conhecimento sobre as funções bioquímicas de vários produtos gênicos envolvidos na gênese dos tumores, certas peculiaridades e alternativas funcionais da maioria destes produtos gênicos ainda não são conhecidas, bem como a relação de outros genes com esse processo, o que, na verdade, pode ser o determinante da especificidade tecidual no processo de carcinogênese.

Um exemplo marcante de como ainda necessita ser aprimorado o conhecimento sobre

os mecanismos que controlam a progressão G1/S, apesar de todo avanço das últimas décadas, vem de dados recentes da literatura indicando que a relação clássica, aparentemente linear, entre as CDKs 2, 4 e 6, as Ciclinas D e E, os E2Fs e pRb no controle do ciclo celular, discutida acima, é muito mais complexa do que se imaginava. Em dois desses trabalhos, foram gerados camundongos “knock-out” para as três Ciclinas D (D1, D2 e D3) simultaneamente (Kozar *et al*, 2004) e para as CDKs 4 e 6 (Malumbres *et al*, 2004). Um dado surpreendente destes trabalhos é a conclusão de que tanto as funções das CDKs 4 e 6 como das Ciclinas D, são dispensáveis para a progressão no ciclo celular e desenvolvimento tecidual para a maioria dos tipos celulares, com exceção das linhagens hematopoiéticas. Em outro trabalho, foi demonstrado que camundongos “knock-out” para a CDK2 se desenvolvem normalmente e que fibroblastos derivados desses camundongos proliferam normalmente *in vitro* (Ortega *et al*, 2003). Estes trabalhos sugerem que, em certos contextos celulares, deve ocorrer um intercâmbio funcional entre as diferentes CDKs e Ciclinas. Assim, contrariando a concepção anteriormente aceita, estes trabalhos sugerem que existem outros mecanismos importantes, além do controle dos níveis das Ciclinas D e da atividade da CDK2, que atuam como elo entre a sinalização mitogênica e a maquinaria de controle da transição G1/S (Kozar *et al*, 2004; Malumbres *et al*, 2004).

Estas e outras observações quanto à função de outros produtos gênicos envolvidos no processo de tumorigênese indicam que vários destes genes desempenham múltiplas funções alternativas, as quais podem ser controladas de várias maneiras, e que podem variar até no mesmo tipo celular, sendo que muitas destas funções ainda são desconhecidas. Portanto, uma determinação mais ampla da função gênica é necessária, não só para o entendimento das bases do processo de transformação maligna, mas, também, para o desenvolvimento de ferramentas mais eficazes para o tratamento do câncer, como será discutido no próximo item.

1.2 Estratégias terapêuticas para o câncer

Resumidamente, os exemplos acima ilustram alguns dos genes que estão sendo

alterados durante o processo de tumorigênese e como eles estão relacionados com os mais diferentes aspectos do controle do balanço entre proliferação e diferenciação celular. Um outro destaque dos exemplos discutidos acima é a disposição na forma de vias de sinalização destes genes, o que traz conseqüências muito importantes quando se considera a possibilidade de se traçar estratégias que permitam a intervenção nessas vias como forma de tratamento do câncer.

Vários exemplos na literatura, utilizando células em cultura, e outros exemplos *in vivo*, demonstram que aparentemente o estado tumoral pode ser modulado quanto às suas características proliferativas e de diferenciação. Em outras palavras, apesar de certas alterações estarem presentes em determinado tumor, pode-se atuar estimulando ou inibindo a ação ou mesmo restabelecendo a função de certos produtos gênicos-chaves em determinadas vias alteradas, permitindo, assim, restaurar o controle sobre a progressão pela fase G1 do ciclo celular, e, assim, restabelecer, nas células tumorais, a capacidade de bloqueio nas fases G0/G1 do ciclo, ou mesmo, de diferenciar ou entrar em apoptose (revisto em Spira & Carducci, 2003; Sawyers, 2004).

Uma abordagem possível consiste na utilização de agentes que interferem com a função de proteínas codificadas por genes freqüentemente mutados no câncer. Exemplos desta classe de agentes são anticorpos terapêuticos e certos compostos que interferem com a função de receptores do tipo tirosina-quinase, ou com a função de seus ligantes, ou, ainda, com a estabilidade dos mesmos. Um exemplo é o anticorpo terapêutico monoclonal humanizado Trastuzumab (Herceptin), que reconhece e interfere com a função do receptor ErbB2 citado anteriormente, e que tem sido utilizado, principalmente, no tratamento de câncer de mama, onde, freqüentemente, ocorre a super-expressão deste receptor. Ainda na mesma classe, está o composto Imatinib (Gleevec), que interfere com a função da proteína tirosina-quinase de fusão Bcr-Abl, causadora da leucemia mielóide crônica. Outros anticorpos terapêuticos e inibidores de tirosina-quinases vêm sendo desenvolvidos e testados em outros tipos de câncer (revisto em Sawyers, 2004). Este tipo de abordagem ilustra como o conhecimento gerado nas últimas décadas sobre os mecanismos que controlam a transição G1/S pode ser aplicado no desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento do câncer.

Outro tipo de abordagem terapêutica consiste na utilização de compostos que atuem na modulação das vias inibitórias de proliferação, fazendo com que seja restabelecida, nas células tumorais, a capacidade de bloqueio nas fases G0/G1, ou mesmo de diferenciar ou entrar em apoptose. Um dos exemplos mais bem sucedidos deste tipo de abordagem tem sido o uso do ácido retinóico na sua forma "all-trans" no tratamento da leucemia promielocítica aguda, induzindo a diferenciação e/ou apoptose das células tumorais (revisto em Altucci & Gronemeyer, 2001). Outros agentes que possuem a capacidade de interferir com o potencial proliferativo das células tumorais, e que são objeto de estudo do presente trabalho, são os hormônios glicocorticóides (GCs), como será discutido mais adiante.

1.3 Os hormônios glicocorticóides como agentes inibitórios do crescimento celular

Os hormônios glicocorticóides regulam vários processos fisiológicos, entre os quais o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, desenvolvimento, inflamação, proliferação e diferenciação (Greenberg, 2002). Quanto ao controle da proliferação, os hormônios glicocorticóides podem, dependendo do tipo celular considerado, tanto inibir como estimular a divisão celular de células normais e tumorais. Este seu efeito anti-proliferativo é observado em vários tipos celulares, e está mais bem caracterizado em células do fígado e em células epiteliais de origem mamária (Ramos *et al*, 1999). GCs também exercem um efeito anti-proliferativo em várias linhagens de células tumorais das mais diversas origens (Cha *et al*, 1998). Seu uso mais difundido na clínica é no caso das leucemias linfóides agudas (ALL – Acute Lymphoblastic Leukemia), exercendo seu efeito através de inibição da proliferação e indução de apoptose (Addeo *et al*, 2004).

1.3.1 O receptor de hormônios glicocorticóides

Os GCs exercem seus efeitos sobre as células através da regulação da atividade do receptor de hormônios glicocorticóides (GR), cuja principal função é a modulação da expressão gênica. Uma questão imediata que surge quando se considera a ação de GCs

sobre GR é: como um receptor pode promover uma variedade tão grande de respostas, sendo que muitas são específicas para certos tecidos e tipos celulares?

Toda esta diversidade de efeitos controlada por GR está relacionada com a complexidade do mecanismo molecular pelo qual este receptor atua, além da complexidade de isoformas do próprio receptor, como será discutido a seguir.

GR é um membro da superfamília de receptores hormonais nucleares cuja atividade, como fator de transcrição, é modulada pela ligação de ligantes específicos. A organização estrutural desta família de receptores é razoavelmente conhecida. O domínio de ligação ao DNA (60-70 aminoácidos) se localiza na região central da molécula, sendo flanqueada, na porção C-terminal, pelo domínio de ligação aos hormônios (LBD - Ligand Binding Domain), de cerca de 250 aminoácidos, e na porção N-terminal, por um domínio de tamanho variável não muito conservado entre os diferentes membros da família (Yudt & Cidlowski, 2002). Pelo menos duas regiões de GR possuem atividade intrínseca de ativadores de transcrição (AFs - Activation Functions), ou seja, possuem a capacidade de ligação a outras proteínas e induzirem a transcrição gênica em um promotor específico. A região AF-2 se localiza na região LBD de GR, e tem sua atividade diretamente controlada pela ligação de GCs. Já a região AF-1 se localiza na região N-terminal de GR, e sua atividade independe da ligação do hormônio (Jenkins *et al*, 2001).

Existe apenas um único gene GR descrito até o momento. Este gene é composto por nove exons, sendo que a região codificadora se inicia no exon 2 (revisto em Yudt & Cidlowski, 2002). Existem pelo menos três regiões regulatórias distintas que compõem o promotor de GR, e o uso diferencial destas regiões faz com que existam vários mRNAs de GR, contendo regiões 5'UTR distintas, provenientes do primeiro exon, sem, entretanto, afetar o sítio de início de tradução no exon 2 (revisto em Yudt & Cidlowski, 2002). Além disso, por mecanismos de "splicing" alternativo, são geradas várias isoformas de GR. A isoforma α (GR- α) é a clássica de GR, composta por 777 aminoácidos, sendo a mediadora primária dos seus efeitos celulares. A isoforma β (GR- β) é gerada através do "splicing" alternativo do exon 9, gerando uma proteína de 742 aminoácidos, substituindo os 50 últimos aminoácidos da isoforma α por 15 aminoácidos exclusivos desta isoforma. GR- β é incapaz de se ligar a GCs, sendo inativa como fator de

transcrição, sua principal função sendo, aparentemente, a de interferir negativamente sobre a função de GR- α (revisto em Yudt & Cidlowski, 2002). Outras duas isoformas de GR são conhecidas, GR-P, de 676 aminoácidos, gerada por um "splicing" alternativo no exon 7 e parte do intron 7, e GR- γ , que, por um "splicing" alternativo entre o exon 3 e o intron 3, possui a inserção de uma única arginina no domínio de ligação ao DNA em relação à isoforma GR- α . As isoformas γ e P ainda não possuem função conhecida. Além disso, através da utilização de sítios de tradução alternativos, cada isoforma transcricional tem a capacidade de gerar mais duas isoformas de tradução. Finalmente, a atividade de GR pode, ainda, ser modulada através de modificações pós-traducionais, principalmente através de fosforilação (revisto em Yudt & Cidlowski, 2002). Toda esta diversidade de isoformas pode explicar parte da complexidade da ação de GR mencionada acima.

Entretanto, outra fonte importante para a complexidade dos efeitos promovidos por GR, é o seu próprio mecanismo de ação. A ativação de GR pela ligação de GCs é um processo que envolve várias etapas, sendo que cada uma delas é controlada pela interação de GR com várias outras proteínas. Na ausência do hormônio, GR permanece complexado no citoplasma à várias outras proteínas, sendo que a proteína hsp-90 (Heat Shock Protein-90), possui um papel central neste complexo. A interação com hsp-90 faz com que GR assuma uma conformação que permite sua ligação a GCs, mas inibe sua atividade como modulador da expressão gênica. Outros fatores são necessários para a estabilização deste complexo, tais como p23, p60, hsp-40 e hsp-70 (revisto em Whitfield *et al*, 1999). A ligação de GCs ao seu receptor causa uma alteração conformacional deste, o que leva à dissociação do complexo e à translocação de GR do citoplasma para o núcleo. Uma vez no núcleo, GR pode atuar como fator de transcrição, na forma de homodímero, em seqüências específicas no DNA, conhecidas como elementos responsivos a glicocorticóides ou GREs (Glucocorticoids Responsive Elements). Dependendo da natureza dos GREs, GR pode tanto ativar como inibir a transcrição gênica. O GRE que leva à indução da transcrição gênica é uma seqüência palindrômica parcial, com o consenso sendo GGTACANNNTGTTCT. Já a natureza do GRE negativo não é bem conhecida e não existe uma seqüência consenso para esse elemento, sendo que em promotores onde ocorre a inibição promovida por GR, como nos promotores dos

genes osteocalcina e prolactina, a ligação de GR parece interferir com a ligação de outros fatores de transcrição aos promotores destes genes (revisto em Whitfield *et al*, 1999).

Para promover a expressão gênica, GR tem que se associar a vários co-fatores, entre os quais BRG-1 (Brahma Related Gene 1), P/CAF (p300/CBP-Associated Factor) e p300, os quais, seja por suas atividades intrínsecas de acetiltransferases (pCAF, p300), seja através de processos que requerem o uso de ATP (BRG-1), promovem a modificação da estrutura da cromatina, facilitando o recrutamento da maquinaria basal de transcrição (Kinyamu & Archer, 2003).

Além de sua atividade como fator de transcrição, uma característica funcional fundamental de GR, é a sua capacidade de interagir com outros fatores de transcrição, o que faz com que tanto a sua atividade como as atividades destes fatores de transcrição sejam moduladas. Como os fatores de transcrição com os quais GR interage fazem parte de vias de sinalização, GR acaba exercendo uma atividade moduladora sobre estas vias. As interações entre GR e vários outros fatores de transcrição já foram descritas, como, por exemplo, a interação com AP-1 (Activator Protein-1), NF- κ B (Nuclear Factor κ B), CREB (Cyclic AMP Response Element Binding protein), entre outros (revisto em Göttlicher *et al*, 1998). A mais bem descrita destas interações, é a com o fator de transcrição AP-1. O fator de transcrição AP-1 é um complexo dimérico, formado pelas proteínas das famílias Fos e Jun. Esse fator de transcrição faz parte de vias de sinalização mitogênicas e desempenha um papel crítico na regulação da expressão de genes celulares específicos para o controle da progressão do ciclo celular. A maneira pela qual GR e AP-1 interagem e como esta interação influi nas suas atividades, são processos complexos e ainda não totalmente conhecidos, dependendo de vários fatores, como o tipo celular considerado, o contexto da região promotora considerada, a composição do complexo AP-1 e a disponibilidade de co-ativadores comuns (revisto em Göttlicher *et al*, 1998). A inibição da atividade de AP-1, na sua forma heterodimérica Fos/Jun, por GR, parece ser o resultado mais comum desta interação, embora, como citado anteriormente, em alguns contextos, ocorra o sinergismo entre estes fatores, como, por exemplo, quando AP-1 se encontra na sua forma homodimérica Jun/Jun (revisto em Göttlicher *et al*, 1998).

1.3.2 Mecanismos moleculares da ação anti-proliferativa de GCs

Como discutido no item anterior, vários fatores relacionados ao mecanismo molecular de ação de GR são determinantes no tipo de resposta proliferativa de um tipo celular específico a GCs, entre eles, fatores que controlem a interação de GR com seqüências específicas no DNA e com outros fatores de transcrição e/ou proteínas acessórias, além do contexto do promotor do gene regulado e da disponibilidade de reguladores transcricionais, sendo que muito destes eventos são regulados de forma tecido-específicas.

De uma forma geral, o efeito de GCs de suprimir o crescimento celular é exercido através de cascatas celulares nas quais a ativação ou inibição da transcrição de genes de resposta primária, mediada direta ou indiretamente pelo receptor de GC, regulam a transcrição e/ou atividade de um conjunto de genes, incluindo fatores importantes para a progressão no ciclo celular (Cha *et al*, 1998).

Um dos genes que freqüentemente tem sua transcrição induzida durante a inibição da proliferação promovida pela ativação de GR, em diversos tipos celulares, é *p21*, o qual, como citado anteriormente, possui um papel-chave na regulação da progressão pela fase G1 do ciclo celular. Esta indução da expressão da *p21* é observada em células de carcinoma de pulmão, hepatoma, osteosarcoma e em fibroblastos (Cha *et al*, 1998; Rogatsky *et al*, 1997; Ramalingan *et al*, 1997), e, parece envolver, pelo menos na linhagem de hepatoma testada, dois mecanismos distintos. Um deles é através da ligação de GR a outros fatores de transcrição na região promotora de *p21*, e o outro, através da indução da transcrição do fator de transcrição C/EBPa (CCAAT/Enhancer Binding Protein), o qual, por sua vez, promove a transcrição de *p21* (Cha *et al*, 1998; Cram *et al*, 1998).

Além da indução de *p21*, outros eventos são observados durante o bloqueio nas fases G1 do ciclo celular promovido pela ativação de GR. Assim, por exemplo, a atividade do fator de transcrição AP-1 é inibida na linhagem celular Jurkat de leucemia linfóide de células T, bem como a atividade do fator de transcrição NF- κ B, um dos fatores que controlam a proliferação principalmente em células de origem linfóide. Ainda, a ativação

de GR causa a inibição da expressão de várias proteínas importantes para a progressão no ciclo celular, como as ciclinas *D1* e *D3*, as *CDKs* 2 e 4, e *c-Myc*. Estes eventos foram observados em células de origem linfóide e de carcinoma de pulmão (revisto em Almawi & Melemedjian, 2002; Greenberg *et al*, 2002). Nas células derivadas da ALL, observa-se a indução da expressão tanto de *p21* como de *p27*, e a inibição da expressão da *ciclina D3* e de *c-Myc*. (Addeo *et al*, 2004; Renner *et al*, 2003).

Recentemente, foi descrita a relação de GR com outro potente regulador da progressão pela fase G1 do ciclo celular, p53. Dependendo do contexto celular, esta relação pode ser tanto antagônica como sinérgica (revisto em Sengupta & Waslyk, 2004). Em uma linhagem de células de origem neuronal (HT-22), foi observado que a ativação de GR resulta na translocação de p53 para o núcleo e a indução da transcrição de alguns de seus alvos transcricionais, como *p21* e *GADD45* (Growth Arrest Damage-DNA inducible protein 45) (Crochemore *et al*, 2002). Um ponto interessante desta interação sinérgica entre GR e p53 é que GR parece estar modulando a atividade basal de p53, já que não ocorre indução nem dos seus níveis de mRNA nem de proteína (revisto em Sengupta & Waslyk, 2004). Esta relação entre GR e p53 pode, inclusive, ser mais um dos mecanismos pelos quais GR induz a ativação da transcrição do *p21*, como ocorre, por exemplo, em uma linhagem de carcinoma de pulmão, onde a transcrição de *p21*, induzida por GR, é dependente da funcionalidade e dos níveis basais de p53 (Urban *et al*, 2003).

Resumindo, o efeito inibitório de GC sobre a proliferação celular é mediado através da regulação da transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular, resultando num bloqueio na fase G1 do ciclo. Aparentemente, este efeito pode ser obtido, pelo menos em parte, através da modulação da função de um grupo de genes importantes para o controle da progressão pela fase G1 do ciclo, sendo que o exato mecanismo desta modulação depende do tipo celular considerado. Entretanto, a conexão funcional entre vários dos genes ativados ou inibidos por GC e a inibição da proliferação em determinados tipos celulares ainda não é completamente conhecida. A caracterização destes mecanismos poderia levar ao melhor entendimento da relação funcional de determinados genes e o processo de controle da proliferação, além de possibilitar a determinação de alvos moleculares específicos para se traçar melhores estratégias terapêuticas.

1.4 As células ST1 como modelo de estudo do mecanismo de GC como agentes anti-tumorais

Com o intuito de se entender as bases moleculares da ação anti-tumoral de GCs, o nosso laboratório vem utilizando, como modelo, a linhagem celular ST1, que é uma variante da linhagem celular C6 de glioma de rato (Benda *et al*, 1968). A linhagem ST1 foi isolada pela Dra. Mari Sogayar com o intuito de se estudar o controle da proliferação celular e o mecanismo de ação de GCs como agente anti-proliferativo (Armelin *et al*, 1982; Armelin & Armelin 1983). O tratamento com hidrocortisona (hormônio glicocorticóide) confere, às células ST1, um crescimento totalmente dependente de soro e ancoragem, morfologia, em cultura, semelhante à de fibroblastos normais e incapacidade de gerar tumor em camundongos da linhagem "nude", caracterizando uma completa reversão fenotípica tumoral-normal tanto *in vitro* como *in vivo* (Armelin *et al*, 1982; Armelin & Armelin, 1983).

Como discutido anteriormente, para se estabelecer a conexão funcional entre produtos gênicos modulados por GC e a inibição da proliferação de tipos celulares específicos, é necessário determinar como a função destes produtos gênicos está sendo modulada de forma global. A modulação da função dos produtos gênicos é um processo extremamente complexo, e que pode ser exercida em diversos níveis, que vão desde a regulação da expressão gênica, o que envolve a regulação de processos como a iniciação da transcrição e terminação da transcrição, passando pelo processamento, estabilidade, transporte núcleo-citoplasma, localização do mRNA e tradução dos mesmos, até processos diretamente relacionados com aspectos estruturais das proteínas, como modificações pós-traducionais (fosforilação, glicosilação, metilação, acetilação, miristoilação, palmitoilação, sulfatação, ubiquitinação), renovação protéica ("turnover"), interação com outras proteínas e localização sub-celular (Celis *et al*, 1995).

Neste sentido, como abordagens para o entendimento do mecanismo molecular da ação de GCs sobre as células ST1, nosso laboratório vem empregando técnicas de clonagem de genes diferencialmente expressos, tais como: hibridização diferencial e hibridização subtrativa seguida por PCR supressivo (SSH – Suppression Subtractive

Hybridization) (Valentini *et al*, 1994; Valentini & Armelin, 1996; Vedoy & Sogayar, 2002), e, mais recentemente, a técnica de SSH aliada à tecnologia dos "microarrays", e a eletroforese bidimensional de alta resolução (2D-PAGE) aliada à espectrometria de massas, possibilitando tanto a análise de processos relacionados à abundância relativa dos transcritos, como de processos relacionados ao controle da abundância relativa das proteínas e sua localização sub-celular. Faz parte desta estratégia, ainda, a análise funcional dos genes que estão sendo isolados como sendo diferencialmente regulados durante a reversão fenotípica das células ST1 mediada por GCs.

Neste contexto, os objetivos gerais deste trabalho foram:

a) análise dos perfis de expressão protéica das células ST1 tratadas (ou não) com GCs através da técnica de 2D-PAGE e identificação dos polipeptídios diferencialmente representados por espectrometria de massas;

b) análise funcional da Ciclina G na reversão fenotípica das células ST1. A Ciclina G foi previamente isolada no laboratório como tendo a sua expressão induzida durante a reversão fenotípica das células ST1 mediada por GCs (Vedoy & Sogayar, 2002).

1.4.1 A eletroforese bidimensional de alta resolução (2D-PAGE)

A eletroforese bidimensional, acoplada à espectrometria de massas, é uma metodologia bastante empregada na análise da expressão protéica em tecidos, células e compartimentos sub-celulares, e a resposta a agentes regulatórios, como, por exemplo, na resposta frente a um estímulo hormonal. Esta abordagem vem sendo empregada na identificação de alterações no perfil de expressão protéica relacionada a vários estados patológicos, como câncer, diabetes e doenças inflamatórias (Li *et al*, 2003; Jiang *et al*, 2003; He *et al*, 2003; Laz *et al*, 2004).

A eletroforese bidimensional de alta resolução envolve a separação das proteínas em função de seu ponto isoelétrico, em géis de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado, e de seu peso molecular através de eletroforese SDS-PAGE, permitindo uma alta resolução, o que faz, desta técnica uma das mais empregadas em análises proteômicas (Görg *et al*, 2004).

Um protocolo básico de eletroforese bidimensional, utilizando gradiente de pH imobilizado em géis de poliacrilamida foi, descrito em 1988 (Görg *et al*, 1988). Desde então, este tem se tornado o procedimento padrão no estudo do proteoma, permitindo uma maior resolução, maior reprodutibilidade para comparação entre diferentes laboratórios e maior capacidade de amostra (Dunn, 1997; Görg *et al*, 2004).

Para se visualizar as alterações na expressão protéica de forma global, a técnica de eletroforese bidimensional deve resolver e separar milhares de formas protéicas que estão presentes em linhagens celulares ou tecidos. Idealmente, este objetivo requer a extração de todos os componentes protéicos, incluindo proteínas hidrofóbicas de membrana de difícil solubilização, proteínas com pI extremo e a detecção de proteínas com baixo número de cópias na presença de proteínas mais abundantes, além de uma separação de alta resolução, evitando, assim, a presença de diversas proteínas por "spot". Mesmo com todo o poder de resolução da eletroforese bidimensional, não é possível atingir todos os objetivos listados acima. O principal problema em se visualizar um extrato celular (ou de tecidos) de proteínas totais é a grande diversidade nos níveis de expressão e de propriedades físico-químicas das proteínas ao longo de diferentes valores de peso molecular, ponto isoelétrico e solubilidade. Devido à essa complexidade, muitas vezes é necessário um pré-fracionamento da amostra para redução da complexidade da mesma e enriquecimento de proteínas menos expressas. Este pré-fracionamento pode ser feito de várias formas, como, por exemplo, o isolamento de compartimentos ou organelas celulares, extração protéica sequencial através da utilização de agentes com crescente poder solubilizante, ou, ainda, por cromatografia ou purificação de afinidade de complexos protéicos específicos (Görg *et al*, 2004; Mann & Jensen, 2003; Hebert, 1999; Celis, 1998; Weiss *et al*, 1992; Weiss *et al*, 1993; Görg *et al*, 1997). Mesmo com suas limitações, a técnica de eletroforese bidimensional de alta resolução ainda é a principal tecnologia no estudo do proteoma.

A tecnologia de espectrometria de massas aplicada a macromoléculas biológicas, como, por exemplo, proteínas e peptídeos, desenvolveu-se de forma significativa na última década, sendo, atualmente, a metodologia de escolha na identificação e caracterização protéica. Isto se deve ao grande avanço tecnológico dos espectrômetros de

massas atuais e, também, ao imenso acúmulo de informação nos bancos de dados de seqüências de DNA e proteína (revisto em Aebersold & Mann, 2003).

A espectrometria de massas é uma técnica empregada para a formação de íons em uma fase gasosa a partir de moléculas neutras intactas, com a subsequente determinação de suas massas moleculares. Basicamente, os espectrômetros de massas são compostos de: a) um ionizador, o qual faz com que as moléculas a serem analisadas sejam levadas à fase gasosa e sejam ionizadas; b) um analisador de massas que resolve estas moléculas, baseando-se na relação massa/carga (m/z) das moléculas ionizadas; e c) um detector, que determina o número de íons com uma relação m/z específica (Ausubel *et al*, 1999).

Para análise de proteínas e/ou peptídeos, os ionizadores mais utilizados atualmente são o “electrospray” e a dessorção/ionização a laser mediada por matriz orgânica, conhecida como MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization). Os analisadores de massas empregam campos elétricos e/ou magnéticos para uma separação dependente da massa de cada íon gerado, sendo que os mais utilizados, atualmente, são o TOF (Time-Of-Flight), quadrupolo (Q), “Ion Trap” (IT) e o FT-ICRMS (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance). Esses analisadores de massas podem ser utilizados de forma isolada ou em várias combinações entre eles, sendo que cada uma destas possibilidades possui suas vantagens e desvantagens. Como, neste trabalho, foi utilizado o ionizador do tipo MALDI acoplado a um analisador de massas do tipo TOF, a descrição que se segue ficará restrita à essa configuração (revisto em Aebersold & Mann, 2003).

Na ionização do tipo MALDI, os peptídeos são co-cristalizados com um vasto excesso molar de ácidos orgânicos, usualmente referidos como matriz, que absorvem fortemente a radiação eletromagnética na região UV. O vasto excesso molar da matriz faz com que ocorra a separação das moléculas a serem analisadas, reduzindo a interação entre as mesmas. A esta matriz, são aplicados vários pulsos de laser na região UV. A matriz absorve rapidamente uma enorme quantidade de energia da radiação UV aplicada, resultando numa espécie de explosão da estrutura do cristal, fazendo com que tanto as moléculas da matriz como do analito passem para a fase gasosa. Acredita-se que a ionização ocorra na fase gasosa através da transferência de prótons das moléculas da matriz para as do analito (Ausubel *et al*, 1999).

O analisador de massas do tipo TOF consiste de um tubo de vôo, onde os íons gerados no ionizador são acelerados devido à aplicação de um forte campo elétrico, fazendo com que tenham essencialmente a mesma energia cinética ao entrarem no tubo. Sendo assim, a velocidade final de cada íon, e, conseqüentemente, o tempo que cada íon leva para atravessar o tubo e atingir o detector, depende da sua relação m/z (revisto em Aebersold & Mann, 2003).

Esta configuração de espectrômetro de massas MALDI-TOF tem sido uma das mais empregadas na identificação de proteínas a partir de géis 2D. Os polipeptídios presentes nos perfis 2D são retirados dos géis e submetidos à uma digestão enzimática, geralmente trípica. Os peptídeos resultantes são extraídos e analisados por espectrometria de massas, obtendo-se um perfil de massas desta digestão trípica, o qual pode ser utilizado na identificação de uma determinada proteína através da comparação com perfis de digestão teóricos das seqüências contidas em bancos de dados públicos (revisto em Aebersold & Mann, 2003).

1.4.2 Análise funcional da *Ciclina G* na reversão fenotípica das células ST1 promovida por GCs

A *Ciclina G* foi inicialmente identificada em sondagens para a identificação de membros da família de quinases *c-src* (Tamura *et al*, 1993) e, logo depois, em sondagens para a identificação de alvos transcripcionais de p53 (Okamoto & Beach, 1994). Em nosso laboratório, a *Ciclina G* foi isolada, em células ST1, como tendo sua expressão aumentada sob a ação de hormônios glicocorticóides durante o processo de reversão fenotípica (Vedoy & Sogayar, 2002).

As ciclinas representam um grupo de proteínas relacionadas que possuem uma região conservada de aproximadamente 110 aminoácidos, conhecida como “Cyclin Box”, a qual é flanqueada por regiões N e C terminais característica de cada ciclina. Os diferentes tipos de ciclinas exibem cerca de 30 a 50% de identidade na região da “cyclin box” (Horne *et al*, 1996).

Foram identificados 12 sub-tipos de ciclinas até o momento, sendo estas designadas

Ciclina A até K e ainda a Ciclina T. Como citado anteriormente, algumas das ciclinas (Ciclina A, B, D e E) atuam como sub-unidades regulatórias de CDKs, estando intimamente relacionadas com o controle da progressão pelo ciclo celular. A Ciclina F interage diretamente com a Ciclina B, e regula a localização nuclear desta ciclina. Entretanto, as outras ciclinas aparentemente estão envolvidas em outros processos celulares como transcrição e reparo do DNA (Kimura *et al*, 2001).

A ciclina G possui uma maior homologia com a ciclina do tipo B Cig1 de *Schizosacharomices pombe* e com as ciclinas humanas A e I (Horne *et al*, 1996). Ausências tanto de uma seqüência desestabilizadora protéica prototípica (PEST) características das ciclinas D e E, quanto de uma "destruction box" que controla a degradação dependente de ubiquitina das ciclinas A e B, indicam uma regulação alternativa dos níveis de ciclina G (Horne *et al*, 1996).

A Ciclina G foi um dos primeiros alvos transcricionais de p53 a serem identificados, sugerindo que poderia ter alguma função relacionada aos processos mediados por p53 (Okamoto & Beach, 1994; Horne *et al*, 1996; Bates *et al*, 1996; Smith *et al*, 1997; Zauberman *et al*, 1995). Nesse sentido, uma das possibilidades era que a Ciclina G fosse um dos efetores na resposta de "checkpoint" induzida por danos ao DNA, a qual é mediada por p53, através da regulação de genes que estão envolvidos no processo de reparo, como GADD45 (Growth arrest and DNA-damage inducible protein 45) (Smith *et al*, 1994). Sustentando esta hipótese, estão as observações de que a Ciclina G contribui para a parada no ciclo na fase G₂/M em resposta a danos no DNA (Shimizu *et al*, 1998) e que ciclina G se localiza no foco de replicação após a indução de dano ao DNA (Reimer *et al*, 1999). Outra possibilidade, entretanto, seria a participação de Ciclina G como um dos efetores do bloqueio no ciclo celular, principalmente na transição entre as fases G₁/S, promovido durante a indução da atividade de p53 como parte das sinalizações citostáticas discutidas acima. Entretanto, os primeiros estudos funcionais da Ciclina G indicavam que, contrastando com os outros genes alvos de p53 envolvidos com a resposta citostática como, por exemplo, *p21* discutido acima, a Ciclina G parecia não exercer um efeito inibitório sobre o ciclo celular, mas, como outras ciclinas ou produtos de proto-oncogenes, parecia ter um papel positivo no controle do crescimento celular. Esta

observação se baseia em evidências como a sua super-expressão em linhagens de osteosarcoma humano (Wu *et al*, 1994); a inibição do crescimento celular de células de sarcoma osteogênico *in vitro* e num modelo tumoral em camundongos do tipo "nude", através da inibição da sua expressão com a utilização de uma construção “antisense” para Ciclina G (Skotzko *et al*, 1995); a sua expressão aumentada em células tumorais de mama tanto *in vitro* como *in vivo* (Reimer *et al*, 1999); e a sua expressão ectópica na linhagem celular RKO de carcinoma de cólon, provocando a aceleração do seu crescimento celular (Smith *et al*, 1997). Entretanto, ao mesmo tempo, começaram a surgir evidências que indicavam que, em certos contextos, a Ciclina G poderia exercer um efeito negativo sobre a proliferação celular. Uma destas evidências é o fato da Ciclina G estar expressa em altos níveis em células do músculo esquelético, de ovário, rim, cólon e em certas regiões específicas do cérebro. É possível que os níveis de mRNA detectados nestes tecidos reflitam a quantidade de células proliferando nos mesmos, mas vários destes tecidos são compostos, na sua maioria, por células diferenciadas de forma terminal, e a presença de altos níveis de Ciclina G no tecido muscular cardíaco e em neurônios pós-mitóticos de regiões específicas do cérebro, faz com que este efeito proliferativo seja improvável (Horne *et al*, 1996; Campagne *et al*, 1999).

Como citado anteriormente, p53 é também um potente mediador do processo de apoptose. Portanto, uma outra possibilidade funcional para a Ciclina G seria a de ser um dos efetores deste processo. Neste sentido, foi demonstrado que a super-expressão da Ciclina G facilita a indução de apoptose mediada por TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) em células de fibroblasto murino (Okamoto & Prives, 1999).

Trabalhos mais recentes começaram a elucidar o papel de Ciclina G na regulação do ciclo celular e sua relação com p53, explicando alguns dos dados contraditórios discutidos acima. Um destes trabalhos demonstrou que a Ciclina G forma um complexo quaternário com a fosfatase 2A (PP2A – Protein Phosphatase 2A), através da interação com a subunidade regulatória B', recrutando dessa forma PP2A para se associar com MDM2 (Mouse Double Minute 2), o ortólogo murino da HDM2 humana, desfosforilando-o em um sítio específico. A desfosforilação de MDM2 neste sítio estaria levando à sua ativação, o que acarretaria na indução da degradação de p53. O

trabalho sugere então que, em certos contextos celulares, Ciclina G poderia estar atuando como um modulador negativo da estabilidade de p53 (Okamoto *et al*, 2002). Este resultado explicaria alguns dados discutidos acima, nos quais a super-expressão da Ciclina G é associada com um efeito positivo sobre a proliferação celular. Ainda nesta linha, outro trabalho demonstrou que a super-expressão da Ciclina G leva à diminuição dos níveis tanto de p53 como de p73, um membro da família de p53, em resposta a agentes genotóxicos, levando à uma inibição do bloqueio característico na fase G1 do ciclo celular na presença destes agentes (Ohtsuka *et al*, 2003).

Entretanto, em outro trabalho, demonstrou-se que, dependendo do complexo formado, a Ciclina G pode tanto diminuir como aumentar a estabilidade de p53. Quando o complexo formado com MDM2 envolve a proteína ARF, que entre outras funções regula a atividade de MDM2, ocorre o aumento da estabilidade de p53, mas quando o complexo envolve MDM2 e a subunidade β' da PP2A, ocorre desestabilização de p53 (Kimura & Nojima, 2002). Em outro trabalho, foi descrito que a super-expressão transitória da Ciclina G leva à inibição de crescimento celular em células de fibroblasto murino e que a Ciclina G pode potencializar o bloqueio do ciclo celular mediado por ARF, e ainda, que o seu efeito inibitório sobre o crescimento celular não necessita de p53 (Zhao *et al*, 2003).

Aparentemente, o efeito da Ciclina G sobre o ciclo celular parece ser dependente do tipo de estímulo e da formação de certos complexos protéicos em contextos celulares específicos, mas vários aspectos referentes à sua função ainda não são conhecidos.

2. OBJETIVOS

Neste contexto, os objetivos gerais deste trabalho foram:

- a) análise dos perfis de expressão protéica das células ST1 tratadas (ou não) com GCs através da técnica de 2D-PAGE e identificação dos polipeptídios diferencialmente representados por espectrometria de massa;
- b) análise funcional da Ciclina G na reversão fenotípica das células ST1. A Ciclina G foi previamente isolada no laboratório como tendo a sua expressão induzida durante a reversão fenotípica das células ST1 mediada por GCs (Vedoy & Sogayar, 2002).

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O objetivo principal deste trabalho foi estudar os mecanismos moleculares do efeito anti-proliferativo dos hormônios glicocorticóides nas células tumorais ST1. Para tanto, propôs-se a:

- a) Gerar e analisar os perfis de expressão protéica, utilizando extratos enriquecidos para proteínas nucleares, das células ST1 tratadas (ou não), nos períodos de 5 e 24 horas (ou não), com hidrocortisona, através da eletroforese bidimensional de alta resolução;
- b) Identificar, por espectrometria de massas, os polipeptídeos diferencialmente representados durante o tratamento com hidrocortisona;
- c) Analisar o perfil de expressão, ao nível de mRNA e de proteína, da ciclina G durante a reversão fenotípica das células ST1;
- d) Analisar os efeitos da super-expressão da Ciclina G sobre a proliferação e a resposta a glicocorticóides das células ST1;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Plasmídeos

a) pUC18-CycG: Vetor pUC18 contendo o fragmento da Ciclina G de rato clonado a partir da técnica de hibridização subtrativa seguido de PCR supressivo, cedido pelo Dr. Cléber Giovane Vedoy (Vedoy, 2000).

b) pLPCX (Clontech): Vetor de expressão retroviral contendo elementos do vírus Moloney de leucemia murina (MoMuLV) e do vírus Moloney de sarcoma murino (MoMuSV) e um promotor interno do vírus citomegalovírus humano, além de um cassete que confere resistência a puromicina.

c) pLPCX-CycG B12: Vetor de expressão retroviral pLPCX contendo a região codificadora da Ciclina G de rato contendo mutações nos resíduos 83 (leucina→serina) e 129 (treonina→alanina).

d) pLPCX-CycG-B8: Vetor de expressão retroviral pLPCX contendo a região codificadora da Ciclina G selvagem de rato.

e) pLPCX-CycG-AS: Vetor de expressão retroviral pLPCX contendo o fragmento de 180pb a 370pb de parte da região 5'UTR e parte da região codificadora da Ciclina G de rato na orientação "antisense" em relação ao promotor do vetor.

f) pNFκB-d2EGFP (Clontech): Vetor repórter que contém o cDNA da proteína EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), utilizado como fonte do cDNA codificante para EGFP.

g) pLPCX-EGFP: Vetor de expressão retroviral pLPCX contendo o cDNA codificante

para EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein).

h) pLPCX-EGFP-ANX2: Vetor de expressão retroviral pLPCX contendo cDNA codificante para uma proteína de fusão entre as proteínas EGFP e Anexina 2 (ANX2) de rato.

i) pBabePuro: Vetor de expressão retroviral contendo elementos do vírus da leucemia murina de Moloney (MoMuLV), além de um cassete de expressão que confere resistência a puomicina (Morgenstern & Land, 1990).

j) pBabePuro-p21: Vetor de expressão retroviral pBABE-puro contendo o cDNA codificante para a proteína p21 humana (Doado pelo laboratório do Prof. Makoto Noda – Universidade de Kyoto - Japão).

3.1.2 Linhagens celulares

a) ST1: clone variante da linhagem C6, hipersensível ao hormônio glicocorticóide, obtido em nosso laboratório (Armelin *et al*, 1982; Armelin *et al*, 1983).

b) ST1-pLPCX: população das células ST1 transduzida estavelmente com o vetor retroviral pLPCX.

c) ST1-EGFP: população das células ST1 transduzida estavelmente com o vetor retroviral pLPCX-EGFP.

d) ST1-CycGB12: população das células ST1 transduzida estavelmente com o vetor retroviral pLPCX-CycGB12.

e) ST1-CycGB8: população das células ST1 transduzida estavelmente com o vetor retroviral pLPCX-CycGB8.

f) ST1-CycG-AS: população das células ST1 transduzida estavelmente com o vetor retroviral pLPCX-CycG-AS.

g) ST1-EGFP-ANX2: população das células ST1 transduzida estavelmente com o vetor retroviral pLPCX-EGFP-ANX2.

h) NIH-3T3: linhagem de fibroblastos derivada de embrião de camundongo Swiss do NIH (Jainchill *et al*, 1969).

i) ϕ nx-AMPHO: linhagem celular empacotadora anfotrópica derivada da linhagem de rim embrionário humano transformada 293-T, fornecidas pelo Dr. Gary Nolan - Universidade de Stanford - CA - USA.

j) 293-T: Linhagem de rim embrionário humano, transformada com a proteína “large” T de SV40 (DuBridge *et al*, 1987 – referida como 293tsA1609neo).

3.1.3 Meios de cultura, soluções e reagentes para células de mamífero

- Meios de cultura: DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle Medium") (Gibco);
- Soro fetal bovino (SFB): (Cultilab Materiais para cultura de células/ Gibco/HyClone)
- Tripsina: (ICN Pharmaceuticals Inc., Gibco Limited)
- PBSA ("Phosphate Buffered Saline"): Solução salina tamponada pH 7,2 composta por NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na₂PO₄ 8mM e KH₂PO₄ 1,5 mM.

3.1.4 Meio de cultura para bactérias

- LB: Meio de Lúria-Bertani para cultivo bacteriano contendo: 10 g/l de triptona; 6 g/l de extrato de levedura e 10 g/l de NaCl, pH 7,5. Para o preparo de meio sólido (LB-Agar) em placas, adicionou-se ainda 15 g/l de ágar (Merck)

3.1.5 Anticorpos

α -Cyclin G1 (H-46): sc-7865 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

α -p21 (F-5): sc-6246 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

α -Annexin 2 (C-16): sc-1924 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

α -c-fos (H-125): sc-7204 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

α -p300 (C-20): sc-585 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

α -BRG-1 (G-7): sc-17796 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

α -ENC-1/NRP/B (611210) (BD Biosciences)

α -Tubulina: Anticorpo policlonal contra α -tubulina cedido pelo Dr. Frank Solomon - MIT - MA - USA.

3.1.6 Isótopos radioativos

- [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP (3000Ci/mmol) (GE Healthcare)

3.1.7 Soluções

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

- SSC (20 vezes concentrado): 3M NaCl; 300 mM citrato trissódico dihidratado, pH 7,0.

- Tampão de solubilização protéica para eletroforese-2D: Uréia 9 M, CHAPS 2% m/v, DTT 50 mM, Pharmalytes[®] 3-10 1,5% v/v.

- Solução de re-hidratação das fitas IPG: Uréia 8 M, CHAPS 2% m/v, Pharmalytes[®] 3-10 0,5% v/v, DTT 13 mM, azul de bromofenol 0,007% m/v.

- Tampão de equilíbrio I para a segunda dimensão: Tris-HCl 50 mM pH 6,8, uréia 6 M, glicerol 30% m/v, SDS 1% m/v, DTT 2,5 mg/ml.

- Tampão de equilíbrio II para a segunda dimensão: Tris-HCl 50 mM pH 6,8, uréia 6 M, glicerol 30% m/v, SDS 1% m/v, iodoacetamida 45 mg/ml, azul de bromofenol 0,002%.
- Solução de fixação I: Etanol 50% v/v, ácido acético glacial 10% v/v, “Fixative enhancer concentrate” (Bio-Rad) 10% v/v.
- Solução de fixação II: Etanol 50% v/v, ácido acético glacial 10% v/v.
- Solução de preservação: Etanol 30% v/v, glicerol 4% v/v.
- Solução para coloração por Coomassie Blue: Coomassie[®] blue R-250 0,05% m/v, Metanol 50% v/v, Ácido acético glacial 10% v/v.
- Solução para coloração por Coomassie Blue coloidal: Coomassie[®] blue G-250 1 g/l, (NH₄)₂SO₄ 1,27 M, H₃PO₄ 3% v/v, Metanol 34% v/v.
- Solução de descoloração de "spots" corados com prata: 30 mM de ferricianeto de potássio; 100 mM de tiosulfato de sódio (Sigma). Antes do uso estas soluções individuais duas vezes concentradas são misturadas numa proporção 1:1 para obtenção desta solução contendo nas concentrações indicadas acima.
- Solução de digestão para espectrometria de massas: Tripsina (Sequencing grade – Promega) 10 µg/ml em uma solução 25mM de bicarbonato de amônio pH 8,0.
- Tampão de lise para a extração de RNA total: Tiocianato de guanidina 4 M, citrato de sódio pH 7,0 25 mM, 0,1M β-mercaptoetanol.
- Solução de cloreto de cézio: Cloreto de cézio 5,7 M, acetato de sódio 25 mM pH 5,0.
- Tampão MOPS: Acetato de sódio 10 mM; EDTA 1 mM; MOPS 40 mM.
- Tampão de lavagem primário: 2× SSC, 0,1% m/v SDS.
- Tampão de lavagem secundário: 0,1× SSC, 0,1% m/v SDS.
- TBE (5 vezes concentrado): 446 mM Tris-Base; 445 mM ácido bórico; 10 mM EDTA; pH 8,0.
- TE: 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0.
- TBS: NaCl 150 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5.
- TBST: NaCl 150 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; Tween 20[®] 0,05% v/v.
- RIPA⁺: Tris-HCl 10 mM pH 7,5, deoxicolato de sódio 1% m/v, Nonidet P40 1% v/v, NaCl 150 mM, SDS 0,1% m/v, PMSF 1 mM, DTT 1 mM, Aprotinina 1 µg/ml;

Leupeptina 5 µg/ml; Pepstatina 1 µg/ml; NaF 10 mM.

- Tampão de amostra (3 vezes): Tris-HCl 150 mM pH 6,8; SDS 6% m/v; glicerol 30% v/v; β-mercaptoetanol 15% v/v; Azul de bromofenol 0,3% m/v.

- Tampão de transferência: Glicina 39 mM; Tris.HCl 48 mM pH 8,3; SDS 0,037% m/v; Metanol 20% v/v.

- Corante de Ponceau: 0,1% Ponceau m/v; 10% Ácido acético glacial.

- Tampão hipotônico (Item 3.2.7): HEPES 10 mM pH 7,9, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, PMSF 0,2 mM, DTT 0,5 mM.

- Tampão de baixa concentração salina (Item 3.2.7): HEPES 20 mM pH 7,9, 25% glicerol, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 0,02 M, EDTA 0,2 mM, PMSF 0,2 mM, DTT 0,5 mM.

- Tampão de alta concentração salina (Item 3.2.7): HEPES 20 mM pH 7,9, 25% glicerol, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 1,2 M, EDTA 0,2 mM, PMSF 0,2 mM, DTT 0,5 mM.

- Tampão CSK (Item 3.2.26): NaCl 100 mM, Sacarose 300 mM, PIPES 10 mM pH 6,8, MgCl₂ 3 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100[®] 0,5% v/v, PMSF 1,2 mM, Aprotinina 1 µg/ml, Leupeptina 5 µg/ml, Pepstatina 1 µg/ml, NaF 10 mM.

- Tampão RSB-Majic (Item 3.2.26): NaCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,4, Tween[®] 20 1% v/v, Deoxicolato de sódio 0,5% m/v, PMSF 1,2 mM, Aprotinina 1 µg/ml, Leupeptina 5 µg/ml, Pepstatina 1 µg/ml, NaF 10 mM.

- Tampão de digestão (Item 3.2.26): NaCl 50 mM, Sacarose 300 mM, PIPES 10 mM pH 6,8, MgCl₂ 3 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 0,5% v/v, DNase I 30 U, RNase A 50 µg/ml, PMSF 1,2 mM, aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 50 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml, NaF 10 mM.

- Tampão hipotônico (Item 3.2.25): HEPES 10 mM pH 7,9; KCl 10 mM; EGTA 0,1 mM; EDTA 0,1 mM; PMSF 1,2 mM; Aprotinina 1 µg/ml; Leupeptina 5 µg/ml; Pepstatina 1 µg/ml; NaF 10 mM.

- Tampão de extração nuclear (Item 3.2.25): HEPES 20 mM pH 7,9; NaCl 400 mM; EGTA 1 mM; EDTA 1 mM; PMSF 1,2 mM; Aprotinina 1µg/ml; Leupeptina 5µg/ml; Pepstatina 1µg/ml; NaF 10mM.

- Tampão para citometria de fluxo: NaCl 140mM, KCl 3,75mM, KH₂PO₄ 2mM, Na₂HPO₄ 16,5mM, LiCl 10mM, Na-EDTA 1mM, Azida sódica 3mM, pH 7,4.

3.1.8 Reagentes

- Hidrocortisona, iodoacetamida, puromicina, polibreno, aprotinina, leupeptina, pepstatina, PMSF (Sigma).
- Uréia, CHAPS, DTT, Pharmalytes pH 3-10, bicarbonato de amônio (GE Healthcare).
- Tripsina “sequencing grade” (Promega)
- Ponteiras ZIPTIP[®] C18 (Millipore).

3.1.9 Equipamentos

- Unidade de eletroforese horizontal Multiphor II, Fonte EPS 3500XL, circulador termostático Multitemp II, Immobiline DryStrip Kit e Cassete de Reidratação (Reswelling tray) (Amersham Biociences).
- Espectrômetro de massa: MALDI-TOF modelo Ettan (GE Healthcare).
- Espectrômetro: Hitachi 3000U

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares

As células foram cultivadas à 37°C em frascos plásticos descartáveis contendo DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino, 1,2 g/l de bicarbonato de sódio, 25 mg/l de ampicilina e 100mg/l de estreptomicina, em atmosfera de 2% CO₂/98% ar para manutenção do pH próximo ao fisiológico. As células foram sub-cultivadas sempre que atingiam cerca de 80% da confluência, utilizando, para tanto, tripsina 0,1% em PBSA contendo 1mM EDTA e tendo sido a cultura previamente lavada, uma vez, com solução de PBSA. Os estoques celulares são mantidos no meio de cultivo contendo 5% DMSO (dimetilsulfóxido) a -190°C, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

3.2.2 Congelamento e descongelamento de células

3.2.2.1 Congelamento

Primeiramente, o meio de cultura foi retirado, e a monocamada celular foi lavada com PBSA, tripsinizada e ressuspendida em 2ml de meio DMEM-10%SFB para se inativar a

tripsina e centrifugada a 1.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 0,5 ml de meio DMEM-10%SFB contendo 5% DMSO (dimetilsulfóxido estéril) de modo que a concentração celular estivesse entre $1-2 \times 10^6$ células/ml. Esta suspensão de células foi transferida para uma ampola de congelamento (NUNC) e foi incubada por 30 minutos a 4°C. Após este período, a ampola foi transferida para -70°C onde permaneceu de 24 horas a uma semana antes de ser transferida para o reservatório de nitrogênio líquido.

3.2.2.2 Descongelamento

A ampola contendo a cultura de interesse foi retirada do nitrogênio líquido e colocada em banho a 37°C. Logo que o conteúdo da ampola ficou líquido, homogeneizou-se a suspensão de células cuidadosamente e, transferiu-se a suspensão para frascos de cultura contendo meio DMEM-10%SFB fresco, incubando-se a cultura celular descongelada a 37°C em atmosfera 2% CO₂/98% ar até que as células aderissem. Assim que as células aderiram, o meio foi trocado de maneira que as células tivessem permanecido o menor tempo possível em contato com o DMSO, já que este é tóxico para as mesmas.

3.2.3 Transformação das bactérias com DNA plasmidial por eletroporação

O DNA plasmidial de interesse (1 a 50 ng) foi adicionado à uma alíquota de 50 µl de bactérias eletrocompetentes (*Escherichia Coli* DH5α), as quais foram transferidas para uma cubeta de eletroporação (gap entre eletrodos de 2 mm). O eletroporador foi ajustado conforme o manual do aparelho para 2.800 V, aplicando-se o pulso e, logo depois, adicionando 1ml de meio LB. As bactérias foram incubadas à 37°C sob agitação de 200-250 rpm por 1 h. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB-ágar 1,5% com ampicilina (75 µg/ml). As placas foram incubadas à 37°C até o dia seguinte (cerca de 16-20 h).

3.2.4 Preparação de DNA plasmideal em pequena escala

As mini-preparações de DNA plasmideal foram feitas utilizando o Kit GFXTM Micro

Plasmid Prep (GE Healthcare).

Cada colônia foi inoculada em meio LB contendo ampicilina na concentração 75 µg/ml. Esta cultura foi incubada a 37°C, sob agitação de 200-250 rpm por cerca de 16 horas. Após esta etapa, uma amostra da cultura (1,5 ml) foi transferida para um tubo de microcentrífuga e centrifugada por 1 min à velocidade máxima (16.000×g). O sedimento de bactérias foi ressuscitado com 150 µl da solução I do Kit (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, EDTA 10 mM, Rnase I 400µg/ml) e, logo após, foram adicionados 150µl da solução II do Kit (NaOH 0,2 M, SDS 5,3%) seguido de mistura por inversão suave. Foram adicionados 300 µl da solução III (acetato de potássio 5 M), misturando-se por inversão. Logo depois, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 16.000×g. O sobrenadante foi transferido para uma coluna GFX, composta de uma matriz de fibra de vidro, e centrifugado por 16.000×g por 30s. Foram adicionados, à coluna, 400 µl do tampão de lavagem (tampão Tris-EDTA, etanol 80%), e a coluna foi centrifugada novamente nas mesmas condições anteriores. O DNA plasmideal foi eluído em 50 µl de tampão TE ou água Milli-Q[®] após centrifugação a 16.000×g por 1 minuto.

3.2.5 Preparação de DNA plasmideal em média escala

Uma colônia isolada de uma placa de bactérias transformadas com o vetor de interesse foi inoculada em 6ml de meio LB contendo 75 µg/ml de ampicilina e incubada sob agitação de 200-250 rpm, à 37°C por cerca de 6 a 7 h, até a obtenção de uma densidade óptica a 600nm (A_{600nm}) da suspensão bacteriana de 0,6. Este inóculo foi então diluído em 50ml de meio LB contendo 75 µg/ml de ampicilina e incubado nas mesmas condições anteriores, até a obtenção de uma A_{600nm} de 0,8, quando, então, foi adicionado cloranfenicol (170 µg/ml), e esta cultura foi incubada, sob agitação de 200-250 rpm, à 37°C por cerca de 16 h. Para a preparação de DNAs plasmidiais em média escala, foi usado o Kit Flexi Prep (GE Healthcare). O inóculo (50 ml) foi centrifugado a 8.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento de bactérias foi ressuscitado com 5ml da solução I do Kit (Tris-HCl 100 mM pH7,5, EDTA 10 mM, RNase I 400 µg/ml) e logo após foram adicionados 5ml da solução II do Kit (NaOH 1

M, SDS 5,3%), misturando-se por inversão suave. Após a incubação da mistura à temperatura ambiente por 5 minutos, foram adicionados 5ml da solução III (acetato de potássio 5 M), misturou-se por inversão e foi feita a incubação no gelo por 10 minutos. Após este período, a mistura foi centrifugada por 15 minutos à 15.000×g. Ao sobrenadante foram adicionados 10,5 ml de isopropanol 70% (v/v), e, logo após, centrifugou-se a mistura a 15.000×g por 30 min à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de DNA plasmidial foi lavado com etanol e eluído em 300 µl de TE ou água MilliQ®. O DNA plasmidial, assim obtido, foi quantificado à 260nm, sendo que uma A_{260nm} de 1 corresponde à 50 µg/ml de DNA. A pureza deste DNA foi estimada utilizando-se a relação A_{260nm}/A_{280nm} , considerando-se, como uma pureza satisfatória, uma relação 260nm/280nm próxima de 2,0.

3.2.6 Esquema de tratamento das células ST1 com hidrocortisona para extração de proteínas nucleares

Foram plaqueadas cerca de 3×10^6 células em meio de cultura contendo 5% de SFB (Soro Fetal Bovino), em placa de cultura P150. Após cerca de 12-15 h, foi iniciado o carenciamento das células para soro, lavando-se a monocamada celular com PBSA por duas vezes, sendo então adicionado o meio de cultura contendo 0,2% de SFB. A cultura celular foi carenciada por 24 h, quando, então, iniciou-se o tratamento com hidrocortisona (100 ng/ml) pelos períodos escolhidos.

3.2.7 Extração de proteínas nucleares (Dignam *et al*, 1983 modificado)

O meio de cultura foi retirado, e, a camada celular foi lavada por duas vezes, no gelo, com PBSA gelado. Foi adicionado, então, PBSA suficiente para cobrir a superfície da placa e, com a ajuda de um policial, as células foram raspadas e transferidas para tubos gelados. As células foram coletadas, centrifugando-se por 10 minutos a 3.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o volume celular empacotado (VCE) foi estimado. As células foram rapidamente ressuspensas, em um volume aproximadamente de cinco vezes o VCE, em tampão hipotônico e, novamente, centrifugou-se a suspensão celular a

3.000 rpm a 4°C por 5 min. O sobrenadante foi descartado, e as células empacotadas foram ressuspendidas, lentamente, em um volume de tampão hipotônico aproximadamente três vezes o VCE, e essa suspensão foi deixada no gelo por 10 minutos. Após este período, cerca de 10 µl desta suspensão foram misturados com 10 µl de Trypan Blue e, com auxílio de uma câmara de Neubauer, foi checado o progresso da lise da membrana citoplasmática, até que cerca de 80% a 90% das células estivessem lisadas. Os núcleos foram coletados a 4.000 rpm (~3.000×g) por 15 minutos. O sobrenadante (fração citoplasmática) foi coletado, e armazenado a -70°C para posterior processamento. O volume nuclear empacotado (VNE) foi estimado, e os núcleos foram ressuspendidos no tampão de baixa concentração salina com um volume correspondendo à meia vez o VNE. Foi adicionado, gota a gota, e agitando-se suavemente, um volume do tampão de alta concentração salina correspondendo à meia vez o VNE. Após a adição do tampão de alta concentração salina, esta mistura foi deixada no gelo por 30 minutos, agitando-se a mesma eventualmente. Os núcleos extraídos foram coletados à 20.000×g à 4°C por 30 minutos e o sobrenadante (proteínas nucleares) foi coletado e armazenado à -70°C para posterior processamento. A dosagem de proteínas foi feita utilizando-se um kit comercial (BioRad) baseado no método de Bradford (Bradford, 1976).

3.2.8 Precipitação das proteínas nucleares

A dessalinização das amostras através de precipitação foi feita utilizando-se o kit PlusOne 2-D Clean-Up (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as proteínas foram precipitadas na presença do precipitante e co-precipitante (GE Healthcare). Após centrifugação, o sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspendido em água deionizada. Logo após foi efetuada a etapa de lavagem à -20°C por pelo menos 30 min, utilizando o tampão de lavagem fornecido no kit (GE Healthcare). Após centrifugação, o sobrenadante foi removido e o precipitado redissolvido em tampão de solubilização protéica. A amostra foi então centrifugada à 16.000×g por 5 min para retirada dos resíduos insolúveis e o sobrenadante foi estocado à -70°C até o momento da corrida de primeira dimensão.

3.2.9 Eletroforese bidimensional

3.2.9.1 Reidratação das fitas IPG para corrida da primeira dimensão (focalização isoeletrica)

Um volume de amostra, equivalente a cerca de 20-50 μg para os géis analíticos e de 80 a 150 μg para os géis preparativos, foi diluído na solução de re-hidratação para um volume final de 200 μl . Esse volume foi aplicado no cassete de re-hidratação (GE Healthcare), onde foram colocadas, então, as fitas IPG pH 3-10 de 11 cm, de forma que a amostra ficasse distribuída de forma homogênea pela fita. As fitas foram cobertas com óleo mineral e mantidas em re-hidratação por cerca de 16-18 h à temperatura ambiente.

3.2.9.2 Corrida da primeira dimensão

As fitas foram retiradas do cassete de re-hidratação e transferidas para a cuba de corrida (Multiphor II - GE Healthcare), montada de acordo com o manual do fabricante. Após a montagem dos eletrodos, segundo o manual, as fitas foram cobertas com óleo mineral sendo, então, efetuada a corrida, que foi feita à 20°C. As condições de corrida estão representas na tabela abaixo:

Etapa	Tensão (V)	Cor. máx.(mA)	Pot. máx. (W)	Tempo	V/h
1	0-150 gradiente	1	5	1min	1,25
2	150	1	5	30min	75
3	150-300 gradiente	1	5	5min	18,75
4	300	1	5	1h	300
5	300-3500 gradiente	1	5	3h	5700
6	3500	1	5	5h 26min	19005
Total				10h 2min	25100

Após a corrida, foi retirado o excesso de óleo das fitas e estas foram mantidas à 70°C até o momento da corrida da segunda dimensão.

3.2.9.3 Corrida da segunda dimensão

As fitas foram equilibradas nos dois tampões de equilíbrio por 12 min e 30 s cada

incubação. Após esta etapa, foi retirado o excesso de tampão de equilíbrio das fitas e estas foram colocadas sobre o gel de acrilamida ExcelGel SDS contendo gradiente de poliacrilamida 8-18% ou homogêneo de 12,5% (GE Healthcare), montado sobre a cuba (segundo o manual da cuba), para corrida da segunda dimensão. As condições de corrida estão descritas na tabela abaixo, sendo que esta foi efetuada à 15°C:

Etapa	Voltagem Máx. (V)	Corrente máx. (mA)	Potência máx. (W)	Tempo (min)
1	600	20	30	35
2	600	50	30	Final da corrida

A corrida foi finalizada assim que o azul de bromofenol atingiu a fita do tampão anódico.

3.2.9.4 Fixação das proteínas e secagem do gel

Primeiramente o gel foi incubado por 20 minutos na solução de fixação I ou II, dependendo do kit de coloração utilizado, e depois lavado três vezes com água deionizada, 10 minutos cada lavagem. O gel foi então lavado duas vezes, 30 minutos cada lavagem, com solução de etanol a 30% para retirada de vestígios da solução de fixação, e, depois, mais 1 h com solução de preservação. Ao término desta etapa, um pedaço de papel celofane foi embebido na solução de preservação e colocado sobre o gel, o qual foi seco por cerca de 14 horas.

3.2.9.5 Detecção de proteínas através de coloração com prata

A coloração por prata foi realizada utilizando-se os kits Silver Stain Plus (BioRad) e ProteoSilver Plus (Sigma), segundo as instruções do fabricante. Para a coloração do gel com o kit Silver Stain Plus, o gel re-hidratado foi embebido com agitação na solução de revelação contendo nitrato de amônio, nitrato de prata, ácido tungstosilícico, formaldeído e carbonato de sódio, na proporção indicada pelo fabricante. Assim que os "spots" ficaram visíveis, a reação foi interrompida através da lavagem do gel em uma solução de

ácido acético a 5% por 15 minutos. A utilização do kit ProteoSilver Plus foi feita segundo as orientações do fabricante. Após o interrompimento da reação de coloração, os géis foram lavados com água deionizada por 5 minutos, e preservados como descrito no item 3.2.9.4.

3.2.9.6 Detecção de proteínas através de coloração com Coomassie® blue coloidal

A preparação da solução para a coloração por Coomassie® blue coloidal foi feita conforme descrita em Neuhoﬀ *et al*, 1988. Para a coloração os géis foram incubados na solução de coloração por cerca de 12-16 h. Após este período, os géis são mantidos em uma solução de sulfato de amônio 20% v/v a 4°C.

3.2.9.7 Digitalização dos perfis 2D e análise de imagem

Os géis corados por prata foram escaneados em “scanner” de mesa de braço duplo, gerando imagens digitalizadas em escala de cinza de 8 bits dos perfis 2D. A análise de imagem foi feita utilizando-se o programa ImageMaster, versão 4.01 (GE Healthcare), o qual permite, entre outras funções, detecção semi-automática, quantificação e normalização dos “spots”, subtração do “background”, alinhamento e pareamento entre os diferentes perfis 2D obtidos. O software de análise calcula automaticamente o volume de cada “spot” detectado, e após a subtração do “background”, foi feita a normalização do volume de cada “spot”. O algoritmo de normalização utilizado expressa o volume de cada “spot” como uma percentagem da soma dos volumes de todos os “spots” detectados. A comparação entre a intensidade dos “spots” correspondentes é feita pela comparação destes volumes normalizados.

3.2.9.8 Processamento dos “spots” para espectrometria de massas

Para se minimizar a contaminação com queratina, todo procedimento, desde a retirada dos polipeptídeos do gel até a digestão com tripsina, foi realizado em fluxo laminar. Os polipeptídeos de interesse foram retirados do gel, cortados em pedaços menores e transferidos para um tubo de polipropileno. Para os “spots” provenientes dos géis corados

por prata, adicionou-se a solução de descoloração (100 µl) e incubou-se por cerca de 3 min até o desaparecimento da coloração. Após a descoloração, a solução de descoloração foi descartada e os pedaços de gel foram lavados 3 vezes por 15 min em H₂O MilliQ®. Os "spots" descorados e os "spots" provenientes dos géis corados com Coomassie blue coloidal foram então lavados 3 vezes por 15 min em acetonitrila 50%/bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0, e, logo após, os pedaços de géis foram desidratados em acetonitrila 100% por 5 min. A acetonitrila foi retirada e os pedaços de géis foram secos no speed-vac por 20 min. Os pedaços de géis foram então re-hidratados em DTT 10mM/bicarbonato de amônio 100 mM pH 8,0, e incubados por 1 h a 56°C. Após este período, a solução de DTT foi substituída por uma solução contendo iodoacetamida 55 mM/bicarbonato de amônio 100 mM pH 8,0, e incubada por 45min a temperatura ambiente, protegido da luz, vortexando-se ocasionalmente. A solução de iodoacetamida foi retirada, e os pedaços de gel foram lavados duas vezes em bicarbonato de amônio 100 mM e novamente desidratados em acetonitrila 100% por 5 min. Após este período, a acetonitrila foi removida e os pedaços de gel foram secos no Speed-vac por 20 min. Os pedaços de gel foram re-hidratados em solução de digestão para espectrometria de massas (15-20 µl) no gelo por 45 min, e após este período, incubou-se por 37°C por 16 h. A solução de digestão foi transferida para um tubo limpo e aos pedaços de gel, adicionaram-se 20 µl de acetonitrila 50%/TFA 5% para extração dos peptídeos, por 30 min, com agitação ocasional. A extração foi repetida mais uma vez, e os dois extratos foram adicionados à solução de digestão. Esta mistura foi evaporada por completo no Speed-vac. Os peptídeos foram resolubilizados em 10µl de TFA 0,1%. A amostra foi dessalinizada com colunas C18 Zip Tips (Millipore), de acordo com as instruções do fabricante. Os peptídeos foram eluídos em duas etapas, na primeira delas com 5 µl de acetonitrila 50%/ TFA 0,1% e na segunda com 5 µl de acetonitrila 80% / TFA 0,1%. Para análise no espectrômetro de massas, 0,5 µl da amostra foi co-precipitada com 0,5µl da matriz (solução saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico em 50% de acetonitrila e TFA 0,1%). A análise foi feita no espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF modelo Ettan (GE Healthcare). Estas análises foram feitas no laboratório do Prof. Antônio Carlos

Martins de Camargo, com a ajuda do pós-doutorando Dr. Daniel Carvalho Pimenta, no Instituto Butantã.

3.2.9.9 Análise dos perfis de digestão trípica

Os espectros foram analisados utilizando os programas Aldente do Expasy (www.expasy.org/tools/aldente) e Mascot (www.matrixscience.com), usando como parâmetros de busca no banco de digestão trípica de proteínas de rato, tolerância de massa +/- 0,5 Da, digestão com tripsina permitindo até 1 sítio de clivagem perdido, resíduos de cisteína na forma de carbamidometil-cisteína devido a redução destes resíduos com DTT e alquilação com iodoacetamida durante o processamento dos "spots", e os resíduos de metionina podendo ou não estar na sua forma oxidada.

3.2.10 Reação de transcriptase reversa

Para a obtenção da região codificadora da Ciclina G, partiu-se de 1 µg de RNA total extraído a partir de células ST1 crescendo a 0,2% SFB e tratadas com hidrocortisona por 24 h, e para obtenção da região codificadora da Anexina 2 de rato, partiu-se de 0,5 µg de RNA total extraído de células ST1 crescendo a 0,2% SFB. A primeira etapa foi o tratamento da amostra com DNase I, o meio reacional consistindo de tampão de síntese da primeira fita (First Strand Buffer) concentração final 1X (Invitrogen), DNase I 1 U (Invitrogen), RNase OUT[®] 40 U (Invitrogen) e água milliQ[®] suficiente para 10 µl. As reações foram incubadas a 37°C por 10 min e depois a 75°C por 5 min para inativação da DNase. Para a obtenção da região codificadora da Ciclina G foi adicionado 1 µM do "primer" CycGR3 5' CCCCTCGAGCGATCTCACTGGGAAATGTTCT 3', e no caso da Anexina 2, foi adicionado 1µM do "primer" ANX2R 5'-CCCAAGCTTTTCAGTCGTCCCCACCAC-3', e em ambas as reações os dNTPs na concentração final de 0,5 µM. Este meio reacional foi incubado a 75°C por 5 minutos para denaturação do mRNA e, logo em seguida, colocado no gelo. Foi adicionado, então, o tampão de síntese da primeira fita na concentração final 1× (Invitrogen), DTT (0,01 M),

RNAse OUT[®] 40 U (Invitrogen), água MilliQ[®] suficiente para 20 µl. Esta mistura foi incubada a 42°C por 5 minutos, quando foi adicionada a transcriptase reversa do vírus MMLV (Moloney Murine Leukemia Vírus) (200 U) (Invitrogen). A reação foi incubada à 42°C por 2 horas, seguida pela inativação da enzima a 70°C por 15 minutos.

3.2.11 Reação de PCR para amplificação da região codificadora da ciclina G (CycG_{CDS})

Foi utilizada a diluição de 1/10 da reação de transcriptase reversa na reação de PCR. O meio reacional consistiu do PCR buffer 1× (Invitrogen), MgSO₄ 2 mM, dNTPs 0,2 mM, primers na concentração de 0,5 µM, Platinum Taq Polymerase High-Fidelity[®] (HiFi Invitrogen) 1 U e água MilliQ[®] suficiente para 50 µl. O par de "primers" utilizado foi o "primer forward" 5' CCCCTCGAGTGGAGAAGACGTGGCTGTC 3' (CycG F2) e o "primer reverse" 5' CCCCTCGAGCGATCTCACTGGGAAATGTTCT 3' (CycG R3). As condições de reação foram 94°C por 5 minutos, 94°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos, 68°C por 1 minuto e 20 segundos, repetição de 25 ciclos e um período de extensão final a 68°C por 10 minutos. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualizado com transluminador UV.

3.2.12 Reação de PCR para amplificação da região codificadora da Anexina2

Foi utilizada uma diluição de 1/10 da reação de transcriptase reversa na reação de PCR. O meio reacional consistiu do PCR buffer 1× (Invitrogen), MgSO₄ 2 mM, dNTPs 0,2 mM, primers para a região codificadora "forward" ANX2F (5'-CCCAAGCTTATGTCTACTGTCCACGAAATCC-3') e "reverse" ANX2R (5'-CCCAAGCTTTTCAGTCGTCCCCACCAC-3') na concentração de 0,5 µM, Taq polimerase (HiFi Invitrogen) 1 U e água milliQ^R suficiente para 25 µl. As condições de reação foram 94°C por 5 minutos, 94°C por 30 segundos, 56°C por 45 segundos, 68°C por 1 minuto e 20 segundos, repetição de 30 ciclos e um período de extensão final a 68°C por 10 minutos. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualizado com transluminador UV.

3.2.13 Preparo do inserto CycG_{CDS} para clonagem no vetor pLPCX

O fragmento correspondente a CycG_{CDS} de rato, amplificado por PCR, foi separado em gel de agarose e purificado a partir do gel, utilizando-se o kit GFX DNA Purification (GE Healthcare). O fragmento purificado foi concentrado no aparelho Speed-Vac e depois submetido à digestão com a enzima de restrição *Xho*I. O fragmento digerido foi purificado novamente com o kit GFX DNA Purification (GE Healthcare), concentrado no Speed-Vac, quantificado e sua pureza avaliada espectrofotometricamente, utilizando-se pela relação A_{260nm}/A_{280nm} , considerando-se uma relação superior a 1,8 como aceitável.

3.2.14 Preparo da região codificadora da proteína EGFP para clonagem no vetor pLPCX

A região codificadora da proteína EGFP foi obtida a partir da digestão do vetor pNFκB-d2EGFP com a enzima de restrição *Hind*III. O fragmento obtido (~730 pb) foi purificado após fracionamento em gel de agarose, utilizando-se o GFX DNA Purification kit (GE Healthcare). O fragmento purificado foi concentrado no aparelho Speed-Vac, quantificado e teve sua pureza avaliada espectrofotometricamente, como descrito anteriormente.

3.2.15 Preparo da região codificadora da Anexina 2 para clonagem no vetor pLPCX-EGFP

O fragmento correspondente a região codificadora da Anexina 2, amplificado por PCR, foi purificado, separado em gel de agarose e purificado a partir do gel, utilizando-se o GFX DNA Purification kit (GE Healthcare). O fragmento purificado foi concentrado no aparelho Speed-Vac e depois submetido à digestão com a enzima de restrição *Hind*III (4 U) (Fermentas) à 37°C por 1 h. O fragmento digerido foi purificado novamente com o kit GFX DNA Purification (GE Healthcare), e concentrado no Speed-Vac, quantificado, tendo sua pureza avaliada espectrofotometricamente, como descrito anteriormente.

3.2.16 Preparo do vetor pLPCX para subclonagem do inserto CycG_{CDS} e da região codificadora da proteína EGFP

O plasmídeo pLPCX foi linearizado com a enzima de restrição *Xho*I (Fermentas) para clonagem do inserto CycG_{CDS} e com a enzima *Hind*III no caso da clonagem da região codificadora da proteína EGFP. O vetor pLPCX linearizado foi desfosforilado com a enzima fosfatase alcalina intestinal de vitela (3U) (Fermentas) à 37°C por 30 min, seguida pela inativação da enzima à 70°C por 10 min. (Fermentas). Os produtos de clivagem defosforilados foram fracionados por eletroforese em gel de agarose para separar os vetores linearizados, e purificados a partir do gel pelo kit GFX DNA Purification (GE Healthcare). Os fragmentos purificados foram concentrados no aparelho Speed-Vac e quantificados, tendo seu grau de pureza determinado espectrofotometricamente, como descrito anteriormente.

3.2.17 Subclonagem dos insertos CycG_{CDS} e EGFP no vetor pLPCX

Para subclonagem dos insertos CycG_{CDS} e EGFP no vetor pLPCX, seguiu-se com as reações de ligação vetor-inserto através da enzima T4 DNA Ligase (5 unidades Weiss) (Fermentas). As reações de ligação foram incubadas à 16°C por 19 horas e a enzima foi inativada a 65°C por 15 minutos.

Alíquotas das reações de ligação foram usadas para transformação de bactérias *Escherischia coli* (DH5α ou DH10B) por eletroporação.

3.2.17.1 Análise das colônias recombinantes

As bactérias recombinantes, obtidas no item anterior, foram inoculadas em meio LB, contendo 75 µg/ml de ampicilina, e incubadas em estufa a 37°C por 16 horas.

Para verificar a clonagem dos insertos CycG_{CDS} e EGFP no vetor pLPCX, foram feitos dois conjuntos de PCR para cada colônia obtida, sendo um deles para verificação da presença do inserto e o outro, no caso da clonagem do inserto CycG_{CDS}, para verificar a orientação deste no vetor. O par de "primers" utilizados para verificar a presença dos

insertos foi o "primer forward" 5' CGTGTACGGTGGGAGGTCTA 3' (pLPCXF) que se anela na região do promotor de citomegalovírus humano do vetor e o "primer reverse" 5' CCTACAGGTGGGGTCTTTCA 3' (pLPCXR) que se anela no início da região 3' LTR do vírus MoMuLV do vetor. Utilizou-se 1 µl de cada um dos inóculos das bactérias recombinantes nas reações de PCR. O meio reacional consistia do PCR buffer 1× (Biolase), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, primers na concentração de 0,3 µM, Taq polimerase (Biolase) 1 U e água milliQ[®] suficiente para 15 µl. As condições de reação foram 94°C por 5 min, 94°C por 30 s, 60°C por 45 s, 72°C por 1 min e 50 s, repetição de 40 ciclos e um período de extensão final a 72°C por 10 min. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualizado com transluminador UV. Os fragmentos esperados para cada inserto estão representados na tabela 1. O par de "primers" utilizados e os fragmentos esperados para a verificação da orientação dos insertos estão representados na tabela 2. As condições da reação de PCR para verificação da orientação são as mesmas descritas acima.

Inserto	Fragmento esperado (pb)
CycG_{CDS}	1.150
EGFP	921

Tabela 1: Tamanho dos fragmentos esperados para as reações de PCR, visando verificar a presença dos insertos CycG_{CDS} e EGFP.

Inserto/Orientação	Combinação de "primers"	Fragmento esperado (pb)
CycG_{CDS}/"sense"	PLPCXF/CycGR3	1041
CycG_{CDS}/"antisense"	PLPCXF/CycGF2	1041

Tabela 2: Combinação de "primers" e tamanho dos fragmentos esperados para as reações de PCR para checagem da orientação do inserto CycG_{CDS}.

No caso da clonagem de EGFP, a verificação da orientação foi feita a partir da

digestão com a enzima de restrição *EcoRI* de mini-preparações plasmidiais das colônias positivas para o inserto. Os fragmentos esperados, no caso do inserto estar na orientação "sense", eram 730 pb e 6.300 pb e, no caso de orientação "antisense", os fragmentos esperados eram de aproximadamente 7.000 pb e 30 pb.

3.2.18 Preparo do vetor pLPCX-CycG-AS a partir do vetor pLPCX-CycG clone A10

Para a obtenção do vetor pLPCX-CycG-AS, foi feita a digestão do vetor pLPCX-CycG A10, que contém a região codificadora da Ciclina G na orientação "antisense" em relação à região promotora de citomegalovírus do vetor pLPCX, com 10 U da enzima de restrição *BglII* (Invitrogen) a 37°C por 20 h. Após esta etapa, purificou-se o fragmento de 6.494 pb, correspondendo ao vetor pLPCX e a região de 180 pb a 370 pb da Ciclina G na orientação "antisense", após fracionamento em gel de agarose 1%, com o kit GFX (GE Healthcare). Após concentração no Speed-vac e quantificação à 260 nm, seguiu-se com as reações de re-ligação do vetor com a enzima T4 DNA Ligase (5 unidades Weiss) (Fermentas). As reações de ligação foram incubadas à 16°C por 16 h, e a enzima foi inativada à 65°C por 15 min. Alíquotas das reações de ligação foram usadas para transformação de bactérias *Escherichia coli* (DH5 α ou DH10B) por eletroporação.

3.2.18.1 Análise das colônias recombinantes (pLPCX-CycG-AS)

As bactérias recombinantes, obtidas no item anterior, foram inoculadas em meio LB contendo 75 μ g/ml de ampicilina e incubadas em estufa a 37°C por 16 h.

Para análise das colônias recombinantes foram feitos dois conjuntos de PCR, sendo um deles para verificação da presença do inserto e, o outro, para confirmar a orientação deste no vetor. O par de "primers" utilizados para verificar a presença dos insertos foram o par de "primers" pLPCXF e pLPCXR, descritos acima. O par de "primers" utilizados para confirmar a orientação foi o pLPCXF e CycG F2, também descritos acima. As condições da reação de PCR para verificação da presença do inserto e orientação são as mesmas descritas no item 3.2.17.1.

Os fragmentos esperados que indicariam a presença do inserto e a orientação “antisense” eram de 400 pb e 245 pb, respectivamente.

3.2.19 Clonagem da região codificadora da Anexina 2 (ANX2) no vetor pLPCX-EGFP, para geração da proteína de fusão EGFP-ANX2.

3.2.19.1 Preparo do vetor pLPCX-EGFP

O plasmídeo pLPCX-EGFP (~6 µg) foi linearizado através da digestão parcial com a enzima de restrição *HindIII* (2,22 U) (Fermentas) à 37°C por 15min, sendo que a enzima foi inativada a 65°C por 20 min. O vetor digerido foi defosforilado com fosfatase alcalina intestinal de vitela (3 U) (Fermentas) à 37°C por 30 min, seguida pela inativação da enzima a 70°C por 10 min. O vetor, linearizado nos seus dois sítios de *HindIII* individualmente, de cerca de 7000 pb, foi purificado, após ser fracionado em gel de agarose, dos produtos adicionais da digestão parcial do vetor pLPCX-EGFP, ou seja, do vetor não digerido ou digerido nos dois sítios de *HindIII* simultaneamente, utilizando-se o GFX DNA Purification kit (GE Healthcare). O fragmento purificado foi concentrado no aparelho Speed-Vac e quantificado espectrofotometricamente através de medida da absorbância à 260 nm, sendo que sua pureza foi avaliada conforme descrito anteriormente.

3.2.19.2 Subclonagem do inserto Anexina 2 no vetor pLPCX-EGFP

Para subclonagem da região codificadora da Anexina 2 no vetor pLPCX-EGFP, seguiu-se com as reações de ligação vetor-inserto com a enzima T4 DNA Ligase (5 unidades Weiss) (Fermentas). A reação de ligação foi incubada primeiramente a 16°C por 3 h e depois à 22°C por 1 h e 30 min, sendo que após este período a enzima foi inativada à 65°C por 15 minutos.

Alíquotas da reação de ligação foram usadas para transformação de bactérias *Escherichia coli* (DH5α ou DH10B) por eletroporação.

3.2.19.3 Análise das colônias recombinantes

Com a estratégia de clonagem utilizando o sítio de *Hind*III do vetor pLPCX-EGFP, haviam 4 possibilidades de moléculas recombinantes, ou seja, duas delas com a Anexina 2 clonada nas orientações "sense" ou "antisense" no sítio *Hind*III da extremidade 5' do EGFP, e as outras duas com a Anexina 2 clonada no sítio *Hind*III da extremidade 3' do EGFP na orientação "sense" ou "antisense". A molécula de interesse era a Anexina 2 clonada na orientação "sense" no sítio *Hind*III da extremidade 3' do EGFP, sendo que, desta forma a região codificadora da Anexina 2 está na mesma fase de leitura da região codificadora de EGFP, formando a proteína de fusão EGFP-ANX2, com um resíduo de leucina entre as duas proteínas. As bactérias recombinantes, obtidas no item anterior, foram inoculadas em meio LB contendo 75 µg/ml de ampicilina e incubadas em estufa à 37°C por 16 horas.

Devido ao número de moléculas recombinantes possíveis, foram feitos dois conjuntos de PCR, sendo um deles utilizando "pools" de quatro colônias recombinantes para verificação da presença do inserto, e, caso a reação com um determinado "pool" fosse positiva, uma outra para cada colônia componente do "pool". O par de "primers" utilizados para verificar a presença do inserto foi ANX2F e pLPCXR, descritos anteriormente. Foi utilizado 1 µl de inóculo das bactérias recombinantes nas reações de PCR. O meio reacional consistia do PCR buffer 1× (Biolase), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, primers na concentração de 0,3 µM, Taq polimerase (Biolase) 1 U e água milliQ[®] suficiente para 15 µl. As condições de reação foram 94°C por 5 min, 94°C por 30 s, 60°C por 45 s, 72°C por 1 min e 50 s, repetição de 40 ciclos e um período de extensão final à 72°C por 10 min. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualizado com transluminador UV. Os fragmentos esperados para cada uma das combinações possíveis estão representados na tabela 3.

Vetor recombinante	Fragmento esperado (pb)
pLPCX-ANX2(S)-EGFP	~1850
pLPCX-ANX2(AS)-EGFP	—
pLPCX-EGFP-ANX2(S)*	~1100
pLPCX-EGFP-ANX2(AS)	—

Tabela 3: Fragmentos esperados a partir da PCR utilizando os "primers" ANX2F e pLPCXR para os vetores recombinantes possíveis da clonagem da ANX2 no sítio HindIII do vetor pLPCX-EGFP.
*Construção de interesse

3.2.20 Sequenciamento

Para as reações de sequenciamento foi utilizado o kit “DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit” (GE Healthcare), baseado no método de Sanger, sendo o sequenciamento realizado no sequenciador modelo ABI 377 (Perkin Elmer).

3.2.21 Extração de RNA total

O meio de cultura foi removido e a camada celular foi lavada rapidamente duas vezes com PBSA à temperatura ambiente. As placas foram invertidas sobre papel toalha úmido, sendo então adicionado, sobre a camada celular, 2 ml do tampão de lise, o qual foi espalhado rapidamente, e com a ajuda de um policial e pipeta Pasteur, o lisado foi coletado e transferido para um tubo cônico limpo. O procedimento foi repetido com mais 1,5 ml do tampão de lise para remoção quantitativa do lisado. O lisado foi mantido à -70°C até a etapa de ultracentrifugação. Para se efetuar a ultracentrifugação, os 3,5 ml do lisado foram depositados sobre 1,5 ml da solução de cloreto de cério em um tubo de polialômero. As condições de ultracentrifugação foram de 37.000 rpm à 20°C por cerca de 20 h. Após a ultracentrifugação, o sobrenadante foi retirado de forma contínua até a camada contendo DNA, sendo o restante decantado. O tubo foi mantido invertido e suas paredes foram limpas com papel absorvente estéril. O RNA sedimentado foi redissolvido em 30 µl de água MilliQ®, quantificado espectrofotometricamente por medida da absorção à 260 nm, no qual um valor de $A_{260}=1,00$ equivale a 40 µg/ml de RNA. A

relação A_{260}/A_{280} também foi determinada para se estimar o grau de pureza. O RNA assim purificado foi estocado e mantido a -70°C .

3.2.22 Fracionamento do mRNA obtido em gel de agarose-formaldeído e transferência para membrana de nylon (Sambrook *et al*, 1989, com modificações)

Alíquotas de 15 a 20 μg de RNA total foram aquecidas à 65°C por 10 min em solução contendo formaldeído 18 %, formamida 50 %, tampão MOPS 1 $\times$ e brometo de etídio e, logo em seguida, transferidas para o gelo. O RNA total foi então fracionado em gel de agarose-formaldeído 1,2 %, em tampão 1 $\times$ MOPS sob voltagem de 70 Volts. Após a eletroforese, o gel foi observado em transluminador UV e fotografado, sendo depois lavado cinco vezes em água MilliQ[®], sob agitação branda, por 10 min. O RNA total foi transferido, por capilaridade, para membrana de nylon (N⁺ Bond – GE Healthcare) em 10 $\times$ SSC por cerca de 15 h. Após transferência, a membrana foi lavada rapidamente em SSC 3 $\times$ e seca ao ar, verificando-se a eficiência da transferência em transluminador UV. Logo após as membranas foram incubadas à 80°C por 2 horas para fixação do RNA fracionado à membrana.

3.2.23 Northern Blot radioativo

A sonda para ciclina G de rato foi produzida, por PCR, a partir do plasmídeo pUC18-CycG, usando os primers que reconhecem os adaptadores utilizados na técnica de hibridização subtrativa e que flanqueiam o fragmento de cDNA clonado. A sequência dos primers utilizados são: N1 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3' e N2 5'-TGTAGCGTGAAGACGACAGAA-3'. A sonda correspondente ao gene *p21* de rato é um fragmento amplificado por PCR a partir de um clone isolado por hibridização subtrativa das células ST1 tratadas com ácido retinóico, cedida pelo Dr. Mário Henrique Bengston. A sonda correspondente ao controle interno 36B4 (fosfoproteína ribossomal ácida humana PO) foi preparada a partir de um fragmento de digestão nos sítios *Pst*I - *Pst*I de 0,8 kpb do cDNA de 36B4. As sondas foram marcadas com $[\alpha^{32}\text{-P}]$ dCTP utilizando o Kit "Ready to go DNA Labelling Kit (dCTP)" (GE Healthcare), baseado na

reação de "Random Primer Extension" (Feinberg & Vogelstein, 1984). Foram adicionados 20 µl de água à mistura de reação liofilizada (dATP, dGTP, dTTP, 4-8 unidades da enzima Klenow e oligonucleotídeos randômicos de 9-mers) e o tubo foi colocado no gelo. A solução (25 µl) contendo o fragmento de cDNA (25-50 ng) foi fervida por 5 min, imediatamente resfriada no gelo por pelo menos 2 min e centrifugada rapidamente. Logo depois, esta solução de DNA foi adicionada à mistura reacional reconstituída, juntamente com 5 µl (50 µCi) de [α^{32} -P] dCTP (3.000 Ci/mmol). Esta mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos. As sondas radioativas foram separadas dos nucleotídeos livres em colunas Sephacryl[®] S-200 ou S-300 HR (GE Healthcare) e desnaturadas em água fervente por 5 minutos antes de serem usadas para a hibridização. As membranas foram pré-hibridizadas a 65°C com a solução de hibridização do kit RapidHybBuffer[®] (GE Healthcare) por, pelo menos, 15 min, e logo após hibridizadas no mesmo meio mais a sonda marcada com [α^{32} P] dCTP (pelo menos 5x10⁵ cpm/ml) por cerca de 16 horas. A seguir, as membranas foram lavadas (uma vez) com o tampão de lavagem primário a 25°C por 20 minutos e 4-5 vezes no tampão de lavagem secundário a 65°C por 15 minutos. As membranas foram reveladas utilizando-se o sistema Storm[®] de análise de imagens da Molecular Dynamics Storm (GE Healthcare).

3.2.24 Extração de proteínas celulares totais

As linhagens celulares foram previamente plaqueadas (10⁶ células) em placas de Petri de 100 mm de diâmetro. No momento da extração, o meio de cultura foi aspirado e a camada celular foi lavada duas vezes com PBSA gelado. Foi adicionado então PBSA em quantidade suficiente para cobrir a superfície da placa e, com a ajuda de um policial, as células foram raspadas delicadamente e transferidas para tubos do tipo "eppendorf" gelados. As células foram coletadas, centrifugando-se por 5 min à 1.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 100 µl do tampão RIPA⁺ e a seguir incubadas por 15 min no gelo para que ocorresse a lise celular. Os lisados foram centrifugados à 16.000xg por 30 min para remoção de debris celulares. Alíquotas de cada lisado foram submetidas à quantificação de proteínas pelo método de

Bradford (kit Bio-Rad Protein Assay).

3.2.25 Extração de proteínas nucleares

Foram plaqueadas cerca de 3×10^6 células ST1 em placas de 150 mm de diâmetro contendo meio DMEM-SFB 5%. Cerca de 16 h depois do plaqueamento, iniciou-se o esquema de tratamento desejado. Para a extração das proteínas nucleares, o meio de cultura foi retirado e a monocamada celular foi lavada duas vezes com PBSA gelado. Após as lavagens, foi adicionado um volume de PBSA gelado suficiente para cobrir a monocamada, e esta foi raspada com auxílio de um policial, sendo que a suspensão celular foi transferida para um tubo tipo “eppendorf” gelado. A suspensão celular foi centrifugada a 1.500 rpm por 5 min a 4°C, sendo que o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 500 µl de tampão hipotônico, seguido de centrifugação à $16.000 \times g$ por 15 seg. O sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspendidas em 400 µl do tampão hipotônico e incubadas a 4°C por 10 min, sendo que logo após foi adicionado 40 µl de NP-40 1% e a suspensão celular foi agitada vigorosamente por 30 seg a velocidade máxima. As células lisadas foram centrifugadas a $16.000 \times g$ por 30 seg, obtendo-se, assim, a fração citoplasmática (sobrenadante) e a nuclear (sedimento). A fração nuclear foi lavada em 100 µl de tampão hipotônico e, em seguida, ressuspendida em 100 µl do tampão de extração nuclear, incubando-se por 30 min a 4°C. Após este período, a mistura foi centrifugada à $20.000 \times g$ por 30 min à 4°C, obtendo-se a fração enriquecida com proteínas nucleares, que foram aliquotadas e estocadas a -70°C. Alíquotas de cada lisado foram submetidas à quantificação de proteínas pelo método de Bradford (kit Bio-Rad Protein Assay).

3.2.26 Fracionamento de proteínas celulares (Fey *et al*, 1984, com modificações)

Foram plaqueadas cerca de 3×10^6 células ST1 em placas de 150 mm de diâmetro contendo meio DMEM-SFB 5%. Cerca de 16 h após o plaqueamento, iniciou-se o esquema de tratamento desejado. Para a extração protéica fracionada, o meio de cultura foi retirado e a monocamada celular foi lavada (duas vezes) com PBSA gelado. Após as

lavagens, foi adicionado um volume de PBSA gelado suficiente para cobrir a monocamada, e esta foi raspada com auxílio de um policial, sendo que a suspensão celular foi transferida para um tubo tipo “eppendorf” gelado. A suspensão celular foi centrifugada a 1.500 rpm por 5 min à 4°C, o sobrenadante foi desprezado, e as células foram ressuspensas em tampão CSK sem Triton e novamente centrifugadas a 1.500 rpm por 5 min à 4°C. O sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em 100 µl do tampão CSK e incubadas a 4°C por 10 min, sendo então centrifugadas a 3.300×g por 15 min a 4°C, obtendo-se, assim, a fração citoplasmática solúvel (sobrenadante). O sedimento foi ressuspendido no tampão RSB-Majic (100 µl) e incubou-se a mistura por 15 min a 4°C. Após este período a mistura foi centrifugada por 20.000×g por 5 min a 4°C, obtendo-se a fração enriquecida com proteínas nucleares (sobrenadante). O sedimento foi lavado duas vezes no tampão de digestão sem DNase e RNase, e logo após ressuspensos no tampão digestão (50 µl), incubando-se a 20°C por 20 min. As proteínas associadas à cromatina foram extraídas, adicionando-se sulfato de amônio, concentração final 0,25 M, e esta mistura foi centrifugada à 20.000×g por 10 min à 20°C, obtendo-se a fração enriquecida de proteínas associadas à cromatina (sobrenadante). As proteínas da matriz nuclear (sedimento) foram extraídas com a solução de ressolubilização por 30 min a temperatura ambiente. Todas as frações foram centrifugadas à 20.000×g por 30 min à 4°C, exceto a fração contendo as proteínas da matriz nuclear que foram centrifugadas a 20°C, aliquotadas e estocadas à -70°C. Alíquotas de cada lisado foram submetidas à quantificação de proteínas pelo método de Bradford (kit Bio-Rad Protein Assay).

3.2.27 Western blot

As amostras de proteínas foram fervidas por 5 min em tampão de amostra 1× e aplicadas em géis de 12 ou 15% SDS-PAGE. Após a corrida, o gel foi colocado em tampão de transferência e as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, via semi-seca, por eletroforese (25V / 90 mA, 1h) em tampão de transferência. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau para avaliar a

eficiência da transferência, e, em seguida, descorada com água destilada.

Os sítios inespecíficos da membrana de nitrocelulose foram bloqueados com 5% m/v leite desnatado em TBST a 4°C, por 16 h, sob agitação. A membrana foi, então, lavada com TBST (seis vezes por 5 min cada) a temperatura ambiente, e incubada com o anticorpo primário apropriado (anticorpo anti-Ciclina G na diluição 1/600; anti-p21, anti-p300, anti-BRG-1, anti-ENC-1/NRP/B e anti-c-fos na diluição 1/250, anti-Anexina 2 na diluição 1/1000 e anti- α -tubulina na diluição 1/1000), em TBST contendo 5% m/v de leite por 1 h a temperatura ambiente sob agitação. A membrana foi novamente lavada (seis vezes) com TBST por 5 min cada e, então, incubada com o anticorpo secundário apropriado (anti-IgG contra coelho ou camundongo), conjugado com peroxidase, na diluição 1:1.000 em TBST contendo 5% m/v de leite por 40 min a temperatura ambiente. Após quatro lavagens com TBST e duas lavagens com TBS, de 5 min cada, a membrana foi revelada com sistema quimioluminescente (kit ECL Plus GE Healthcare). A revelação foi feita através da exposição de um filme de raios-X sobre a membrana até a obtenção do sinal adequado ou através do sistema analisador de imagens Storm (Molecular Dynamics – GE Healthcare).

3.2.28 Coloração de géis de poliacrilamida com Coomassie[®] blue

Após da eletroforese, os géis de poliacrilamida foram incubados por 1 h na solução de coloração por Coomassie[®] blue, e após este período, descorados com lavagens sucessivas com água MilliQ[®] até o desaparecimento do “background”.

3.2.29 Transfecção de células empacotadoras mediada por lipossomos

Células ϕ nx-Ampho foram plaqueadas em placas de p60 ($1,5 - 2 \times 10^6$ células/placa), na presença de 10% SFB (HyClone)-DMEM sem antibióticos e mantidas por cerca de 16 a 24 h antes da transfecção. O DNA plasmídeo de interesse (5 μ g) foi diluído em 300 μ l de meio DMEM sem soro e sem antibióticos. Em um outro tubo eppendorf, 20 μ l do reagente de lipofecção (Lipofectamine 2000 - Invitrogen) foram diluídos em 300 μ l de meio DMEM sem soro e sem antibióticos para cada reação de transfecção. Misturou-se o

conteúdo dos dois tubos e incubou-se a mistura por 20 min. Após este período, adicionou-se a mistura lipossomos/DNA ao meio de cultura da células. Após 5 h foi efetuada a troca do meio para início das coletas.

3.2.30 Coleta e titulação dos sobrenadantes virais

Após a primeira troca de meio depois da transfecção, o sobrenadante de cada placa foi coletado de 12 em 12 horas até 72 h após a transfecção. Para tanto, adicionaram-se 2 ml de DMEM-10%FCS em cada placa. O sobrenadante de cada coleta foi centrifugado a 1000xg por 5 minutos para eliminar restos celulares e, em seguida, congelados à -70°C.

Os sobrenadantes foram titulados em células NIH-3T3 plaqueadas em placas de 6 cavidades (10^5 células/cavidade) e incubadas por 12 h em meio DMEM-SFB 10%. Foram preparados tubos contendo 1,35 ml de DMEM-SFB 10% e 8 µg/ml de polibreno. Ao primeiro tubo foram adicionados 150 µl do sobrenadante viral e, após agitação, foram transferidos 150 µl para o tubo seguinte e assim, sucessivamente, até o último tubo. O meio de cada cavidade da placa foi substituído por 1 ml de cada diluição. Após 6 h de incubação foi adicionado 1 ml de meio DMEM-FCS10%. No caso da construção retroviral pLPCX-EGFP, após 48 h de incubação, foi feita a contagem das colônias fluorescentes, observadas em microscópio de fluorescência Nikon modelo TE-300, com o filtro para o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (excitação 460 - 510nm e emissão 515nm - 565nm). Neste caso, o experimento foi registrado utilizando-se câmara digital acoplada ao microscópio (RS Princeton Instruments). No caso de titulação por antibiótico, após 48 horas de incubação o meio foi trocado por meio contendo puromicina (1 µg/ml), incubando-se as placas por 8 dias para contagem das colônias formadas.

3.2.31 Concentração das partículas virais por centrifugação

Alíquotas do sobrenadante contendo as partículas virais foram descongeladas e centrifugadas a 20.000xg à 4°C por 4 h. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as partículas virais foram ressuspensas em um volume apropriado de meio DMEM-SFB 5% ou DMEM-SFB 10% contendo 9 µg/ml de polibreno.

3.2.32 Transdução de células ST1 com retrovirus

Células ST1 foram plaqueadas em placas de 96 cavidades (2×10^4 células/cavidade) e incubadas por 12 horas em meio DMEM-SFB 5%. Para a transdução, o meio de cultura foi retirado e substituído pelo sobrenadante viral concentrado com título ajustado para cerca de 100 MOIs (Multiplicity Of Infection), em meio DMEM-SFB 5% contendo 9 $\mu\text{g/ml}$ de polibreno. Após incubação por 24 h, as células foram tripsinizadas e plaqueadas novamente em uma placa de 96 cavidades conforme descrito acima, repetindo-se o procedimento de transdução. Após 24 h da segunda transdução, as células foram tripsinizadas e plaqueadas em uma placa de 24 cavidades. Após 12 horas do plaqueamento, iniciou-se a seleção com puromicina (3 $\mu\text{g/ml}$), a qual foi feita por 3 dias. Após a seleção, as células foram mantidas até que atingissem um número suficiente para congelamento em nitrogênio líquido.

3.2.33 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

Foram plaqueadas cerca de 2×10^5 células em meio DMEM-SFB 5% em uma placa de 60 mm de diâmetro. Após terem permanecido nas condições desejadas, as células foram tripsinizadas de modo a se obter uma suspensão celular. As células foram centrifugadas à $100 \times g$ por 5 min e ressuspensas em 500 μL de PBSA e fixadas com a adição de 4,5 ml de etanol absoluto por 15 min. As células fixadas foram centrifugadas e novamente ressuspensas em 500 μL de PBSA. As células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em 500 μL da solução contendo iodeto de propídio para análise no citômetro de fluxo (Iodeto de propídio 20 $\mu\text{g/ml}$, Triton X-100[®] 0,1%, citrato de sódio 0,1%), incubando-se por 15 min a 37°C para permeabilização celular e marcação do DNA nuclear. Após este período, foi feita a leitura no citômetro de fluxo (FACSCalibur Benton-Dickinson), sendo que os dados obtidos foram analisados através do programa CellQuest. Após a captura dos dados os gráficos foram analisados com auxílio do programa ModFit que permite a delimitação e quantificação da população de células nas diferentes fases do ciclo celular. Estas análises foram feitas no laboratório do Prof. Rui Curi, com a ajuda da doutoranda Thaís Martins de Lima.

3.2.34 Curvas de crescimento

Foram plaqueadas 5×10^4 células ST1 e das populações ST1-pLPCX, ST1-EGFP, ST1-CycG-AS, ST1-CycG B12 e ST1-CycG B8 por poço em placas de 6 poços contendo meio DMEM-SFB 5%. As coletas foram iniciadas 24 h após o plaqueamento, sendo que as monocamadas celulares foram lavadas com PBSA, tripsinizadas com um volume de 0,4 ml de tripsina e ressuspensas adicionando-se 0,5 ml de PBSA. As células ressuspensas foram fixadas adicionando-se 0,1 ml de formaldeído 37%. Foram feitas coletas dos dias 1, 2, 3, 5, 7 e 9, em duplicata, para cada condição. Nas curvas em que foi feito o tratamento com hidrocortisona (100 ng/ml), iniciou-se o tratamento 24 h após o plaqueamento. A troca de meio foi feita de três em três dias. Para as contagens, foi utilizado um contador eletrônico modelo CC530 (CELM).

3.2.35 Análise estatística

Os dados obtidos dos experimentos de curva de crescimento na presença de hidrocortisona (Item 3.2.34) foram analisados através do programa Prism (versão 4) (GraphPad). As diferenças entre as populações celulares analisadas, em cada ponto da curva, foram avaliadas através do teste ANOVA (Analysis Of Variance). Para as comparações pareadas entre as populações foi utilizado o teste de Tukey-Kramer. A significância estatística foi determinada em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Análise dos perfis de expressão protéica das células ST1 tratadas com hidrocortisona

4.1.1 Geração de perfis de expressão protéica das células ST1 tratadas com hidrocortisona

As células ST1 foram plaqueadas conforme descrito no item 3.2.6. A escolha de se trabalhar com as células carenciadas para soro foi feita com base nos dados obtidos durante o doutorado do Dr. Cléber Giovane Vedoy, no qual foi verificado que os genes isolados como diferencialmente expressos em ST1, sob ação de hidrocortisona, apresentavam uma indução mais intensa quando o tratamento era feito com as células carenciadas para soro (Vedoy & Sogayar, 2002). Uma outra razão para a utilização deste esquema de tratamento é o fato das células ST1 responderem mais intensamente ao tratamento com o hormônio, pelo menos quanto à parada na fase G₁ do ciclo celular, quando carenciadas (Mercado, 1997). O período de tratamento de 5 h foi escolhido por ser um período inicial no processo de reversão fenotípica, quando ainda não se observa nem o efeito morfológico nem o acúmulo característico das células ST1 na fase G₁ do ciclo celular (Mercado, 1997), porém, neste período, muitas das alterações moleculares promovidas por GR já devem estar atuantes, como observado com genes diferencialmente expressos isolados anteriormente no laboratório (Vedoy & Sogayar, 2002). Já o período de 24 h foi escolhido por ser quando se observa de forma bem nítida o efeito morfológico e o acúmulo das células ST1 na fase G₁ do ciclo celular. Nossa hipótese foi de que esta condição permitiria o isolamento de genes que estivessem relacionados tanto com o processo de reversão fenotípica, mas, também, de genes que seriam responsáveis pela manutenção deste estado.

Com o intuito de diminuir a complexidade dos perfis 2D gerados e, ao mesmo tempo, enriquecer a amostra com proteínas que não são frequentemente encontradas em perfis 2D, como, por exemplo, proteínas regulatórias do processo de transcrição, foram utilizados extratos protéicos fracionados objetivando o enriquecimento de proteínas nucleares. A partir de extratos protéicos enriquecidos para proteínas nucleares,

provenientes de células ST1 tratadas (5 h e 24 h) ou não (controle) com hidrocortisona, foram gerados perfis 2D em duplicata de cada condição. Como as proteínas estão em solução com uma concentração salina incompatível com a eletrofocalização (Gorg *et al*, 2000), os extratos obtidos foram processados como descrito no item 3.2.8 para dessalinização. Para obtenção dos perfis 2D, foram utilizados fitas IPG de 11cm, faixa de pH 3-10 linear na primeira dimensão e géis contendo gradiente de concentração de 8-18% ou géis homogêneos de 12,5% de poliacrilamida na segunda dimensão (Figuras 1 e 2).

Figura 1: Perfis 2D a partir de extrato nuclear de células ST1 não tratadas (A e C) (controle) e tratadas (B e D) com hidrocortisona (100 ng/ml) por 5 h. As proteínas do extrato nuclear (20 µg) foram primeiramente separadas por focalização isoeletrica em fitas de gradiente pH imobilizado (pH 3-10) de 11 cm e então por peso molecular (SDS-PAGE) em géis contendo gradiente de poliacrilamida (8-18%). Os géis foram corados por prata e depois foram digitalizados.

Figura 2: Perfis 2D a partir de extrato nuclear de células ST1 não tratadas (A) (controle) e tratadas (B) com hidrocortisona (100 ng/ml) por 24 h. As proteínas do extrato nuclear (50 µg) foram primeiramente separadas por focalização isoeétrica em fitas de gradiente pH imobilizado (pH 3-10) de 11 cm e então por peso molecular (SDS-PAGE) em géis homogêneos de poliácridamida (12,5%). Os géis foram corados por prata e depois foram digitalizados.

A faixa de peso molecular de proteínas resolvidas foi de aproximadamente 7 kDa até cerca de 190 kDa. Quanto ao ponto isoeétrico, foram resolvidas proteínas na faixa de pI 4,0-9,0 aproximadamente. Boa parte dos polipeptídeos de pI superior a oito tiveram uma resolução parcial, evidenciado pelo arraste observado na extremidade básica dos perfis.

Foram obtidos dois perfis protéicos independentes de células ST1 tratadas (figura 1B e 1D) ou não (figura 1A e 1C) com hidrocortisona por 5 h, representados na figura 1. A análise de imagem revelou que o número de polipeptídeos obtidos nos perfis em duplicatas foi muito próximo, sendo que para os dois perfis protéicos controles foram detectados 244 (figura 1A) e 250 (figura 1C) polipeptídeos e para os perfis das células tratadas foram detectados 226 (figura 1B) e 232 (figura 1D) polipeptídeos. A porcentagem de polipeptídeos no perfil de células tratadas, representado na figura 1B, que possui um polipeptídeo correspondente no perfil controle, processado paralelamente, representado na figura 1A, foi de cerca de 83%. No caso dos perfis controle da figura 1C e de células tratadas da figura 1D, também processados paralelamente, esta porcentagem é de cerca de 84%. Quando se comparam os perfis controle, a porcentagem de polipeptídeos correspondentes é de cerca de 70%. Este valor menor de correspondência entre os polipeptídeos se deve, principalmente ao

processamento da eletroforese bidimensional destas amostras em períodos diferentes, à polipeptídeos que estão no limite de detecção, sendo detectados em um dos géis e não no outro, à polipeptídeos que ficaram melhores resolvidos em um dos géis e, ainda, à problemas relativos à focalização na região básica. Quando se comparam os perfis das células tratadas, esta porcentagem é de cerca de 62%, provavelmente devido aos mesmos fatores descritos acima.

Após a análise de imagem dos perfis protéicos bidimensionais das células ST1, 33 polipeptídeos foram considerados como sendo diferencialmente representados. Foram selecionados apenas os polipeptídeos diferenciais reprodutivelmente representados nos dois pares de perfis bidimensionais gerados e que, além disso, apresentaram uma modulação de expressão mínima de 1,3 vezes pelo tratamento com o hormônio. Optou-se por esta diferença limite de apenas 1,3 vezes devido à possibilidade de parte destes “spots” serem compostos de mais de um polipeptídio, e, nestes casos, a expressão de um deles estar mascarando a expressão diferencial do outro. Estes polipeptídeos estão presentes na tabela 4 juntamente com os seus respectivos valores de volume normalizado em cada gel e os seus valores médios de massa molecular e pI, estimados a partir dos perfis obtidos. As colunas 1A e 1C se referem aos polipeptídeos provenientes dos perfis controle representados na figura 1A e 1C, sendo que o mesmo se aplica aos perfis correspondentes a 5 h de tratamento.

Spot ¹⁾	1A ²⁾	1C	1B	1D	2A	2B	pI	Mr (Da)
13	0,218	0,205	0,127	0,167	0,173	0,110	7,3 ± 0,2	92.220 ± 1.660
17	0,130	0,112	0,000	0,000	0,106	0,000	6,6 ± 0,3	85.350 ± 350
35	0,066	0,087	0,220	0,165			5,4 ± 0,2	68.520 ± 1.760
38	0,193	0,309	0,000	0,000			7,8 ± 0,3	64.610 ± 370
48	0,7	0,728	1,045	1,027	0,250	0,388	4,9 ± 0,2	64.960 ± 2.300
55	0,072	0,060	0,113	0,166			6,1 ± 0,2	58.690 ± 1.300
67	0,047	0,127	0,186	0,220	0,093	0,146	5,4 ± 0,2	54.390 ± 1.370
75	0,303	0,213	0,583	0,438	0,071	0,151	5,3 ± 0,2	53.810 ± 1.860
101	0,153	0,110	0,000	0,000			7,0 ± 0,3	41.720 ± 330
111	0,119	0,084	0,409	0,318	0,048	0,178	6,2 ± 0,2	39.390 ± 1.470
114	0,092	0,103	0,198	0,151			6,7 ± 0,2	39.400 ± 2.240
115	0,652	1,353	0,134	0,000	1,205	0,000	7,9 ± 0,3	40.780 ± 2.860
118	0,450	0,430	0,000	0,118	0,107	0,000	7,3 ± 0,2	38.180 ± 1.870
128	0,425	0,343	0,000	0,190			8,2 ± 0,3	36.930 ± 1.850
132	0,180	0,148	0,000	0,000			7,2 ± 0,3	36.700 ± 600
134	0,087	0,111	0,000	0,000			5,7 ± 0,3	37.030 ± 1.520
140	0,145	0,112	0,000	0,000	0,298	0,090	6,5 ± 0,3	34.500 ± 1.030
144	0,081	0,145	0,221	0,205			8,4 ± 0,2	33.630 ± 3.840
145	0,180	0,343	0,000	0,000			8,8 ± 0,3	33.160 ± 800
149	0,182	0,291	0,000	0,084			9,5 ± 0,3	31.570 ± 1.670
159	0,609	0,633	0,773	0,837	0,076	0,110	4,7 ± 0,1	30.210 ± 1.580
162	0,840	0,893	0,712	0,624			5,8 ± 0,2	28.540 ± 1.350
174	0,477	0,577	0,289	0,322	0,267	0,183	7,2 ± 0,2	26.820 ± 2.110
178	0,175	0,175	0,000	0,000			7,7 ± 0,3	26.710 ± 1.240
190	0,302	0,278	0,000	0,000	0,434	0,111	7,8	26.010 ± 400
205	0,325	0,686	0,000	0,000			7,7 ± 0,3	21.320 ± 940
220	0,473	0,496	0,078	0,000			7,6 ± 0,2	19.120 ± 1.630
234	0,628	0,777	1,227	0,998	0,524	0,856	4,2 ± 0,1	16.100 ± 1.280
235	0,000	0,111	0,296	0,222	0,000	0,245	9,2	13.740 ± 630
239	0,276	0,143	0,000	0,000			9,1 ± 0,4	13.110 ± 190
246	0,466	0,735	0,111	0,000	1,739	0,904	6,8 ± 0,2	8.620 ± 470
270	0,000	0,000	0,139	0,112	0,000	0,079	4,6	39.070 ± 690

Tabela 4: Polipeptídeos diferencialmente expressos entre os géis controle (1A, 1C e 2A) e os géis representando tratamento com hidrocortisona por 5 h (1B e 1D) e por 24h (2B). 1) Número de identificação dos polipeptídeos no gel controle 1B. 2) Volume normalizado de cada polipeptídeo, obtido através da expressão $\text{vol norm} = (\text{vol polipeptídeo} / \sum \text{vol todos polipeptídeos}) \times 100$.

Quanto aos perfis em duplicata de extratos nucleares independentes de células ST1 tratadas por 24 h com hidrocortisona (ou não), apenas uma das duplicatas apresentou uma qualidade satisfatória para análise. O número de polipeptídeos obtido no perfil protéico controle representado na figura 2A foi de 556 polipeptídeos e para o perfil das células tratadas, representado na figura 2B, foi de 441 polipeptídeos. Sendo assim, com apenas um par de géis não foi possível fazer o mesmo tipo de análise que foi feita com os perfis referentes a 5 h de tratamento. Entretanto, analisando-se os polipeptídeos

diferencialmente representados após 5 h nos perfis gerados após 24 h de tratamento, verificou-se que 16 dos 33 polipeptídeos diferencialmente representados após 5 h de tratamento possuem a mesma variação após 24 h de tratamento. Os valores de volume normalizado destes 16 polipeptídeos estão representados na tabela 4. As colunas 2A e 2B se referem aos polipeptídeos provenientes dos perfis controle e tratado por 24 h, respectivamente, representados na figura 2A e 2B.

As figuras abaixo ilustram alguns dos polipeptídeos (“spots”) (setas) que tiveram seus níveis aumentados (figura 3) ou diminuídos (figura 4) após 5 h de tratamento.

Figura 3: Montagem mostrando polipeptídeos (“spots”) (setas) detectados como tendo seus níveis aumentados nos perfis correspondentes ao tratamento de 5 h com hidrocortisona (1B e 1D) em relação aos géis controle (1A e 1C). Os números de identificação correspondem àqueles do gel controle 1C. As coordenadas destes polipeptídeos se encontram na tabela 4.

Figura 4: Montagem mostrando polipeptídeos (“spots”) (setas) detectados como tendo seus níveis diminuídos nos perfis correspondentes ao tratamento de 5 h com hidrocortisona (1B e 1D), em relação aos géis controle (1A e 1C). Os números de identificação correspondem àqueles do gel controle 1C. As coordenadas destes polipeptídeos se encontram na tabela 4.

A figura 5 ilustra dois polipeptídeos diferencialmente representados tanto após 5 h como 24 h de tratamento.

Figura 5: Montagem mostrando polipeptídeos (setas) detectados como tendo seus níveis diminuídos (polipeptídeo 118) e aumentados (polipeptídeo 235) nos perfis obtidos após o tratamento de 5 e 24 h com hidrocortisona (Hy) (100 ng/ml) em relação aos géis controle (C).

A detecção destes polipeptídeos como sendo diferencialmente representados após 24 h serve como uma evidência adicional da sua regulação durante o tratamento com hidrocortisona das células ST1.

4.1.2 Análise dos polipeptídeos diferencialmente representados por espectrometria de massas

Alguns dos polipeptídeos diferencialmente regulados foram selecionados para análise por espectrometria de massas. Estas análises foram feitas no laboratório do Prof. Antônio Carlos Martins de Camargo, com a ajuda do pós-doutorando Dr. Daniel Carvalho Pimenta. Foram feitas análises dos polipeptídeos 48, 67, 75, 111, 115, 118, 128, 234, 235 e 246, sendo que estes foram detectados como diferencialmente representados tanto após 5 h como após 24 h de tratamento com hidrocortisona, com exceção do polipeptídeo 128, que é reprimido após 5 h de tratamento, sendo que após 24 h não foi possível determinar se ocorre esta inibição, pois a região do gel onde está este polipeptídeo não ficou bem resolvida. Na tabela 5 estão representados os picos de massa exclusivos dos polipeptídeos 48, 67, 75, 118, 128 e 246, ou seja, foram excluídos os picos de massa referentes à autólise da tripsina (~842,600 Da, ~1.045,700 Da e ~2.211,600 Da), alguns picos devido à contaminação com queratina 10 (807,498 Da; 1.165,844 Da; 1.234,955 Da; 1.365,97 Da; 1.435,096 Da e 1.494,112 Da) que aconteceu em alguns dos polipeptídeos analisados, e ainda picos de massa presentes em amostras de polipeptídeos diferentes mas cuja procedência era desconhecida. Para os polipeptídeos 111, 115, 234 e 235 não foram obtidas identificações confiáveis ($p\text{Value} > 1e-5$). O valor de $p\text{Value}$ é a probabilidade de que o valor de “score” atribuído a uma identificação protéica baseada no perfil de digestão triptica seja maior ou igual àquele obtido apenas por chance (Taloup *et al*, 2003; <http://www.expasy.org/tools/alidade/>).

Spot 48	Spot 67	Spot 75	Spot 118	Spot 128	Spot 246
910,460	1.1151,540	975,575	1.037,746	876,991	1.067,620
1.424,731	1.163,511	1.092,595	1.111,826	1.168,442	1.523,808
1.516,746	1.270,670	1.186,670	1.288,747	1.250,571	1.787,907
1.729,920	1.294,629	1.194,715	1.308,953	1.326,584	
1.780,858	1.385,671	1.253,627	1.383,994	1.556,773	
1.833,908	1.394,697	1.286,715	1.405,973	1.577,851	
1.965,021	1.483,692	1.315,678	1.500,068	1.598,743	
	1.492,699	1.398,654	1.542,230	1.623,723	
	1.527,815	1.414,645	1.717,226	1.713,794	
	1.614,812	1.457,721	1.909,364	1.751,812	
	1.667,772	1.481,777	2.481,609	1.882,961	
	1.688,861	1.549,701		1.922,903	
	1.778,934	1.567,762			
	1.793,849	1.582,867			
	2.020,971	1.616,721			
	2.036,949	1.631,716			
	2.056,985	1.648,736			
	2.138,989	1.691,765			
	2.218,280	1.764,795			
	2.284,161	1.781,820			
	2.571,327	1.794,831			
		1.904,953			
		1.920,873			
		1.940,936			
		1.950,971			
		1.996,966			
		2.083,024			
		2.182,109			
		2.228,023			
		2.445,170			
		2.601,242			

Tabela 5: Picos de massa (Da) referentes ao perfil de digestão tríptica dos polipeptídeos 48, 67, 75, 118, 118, 128 e 246. Estão representados apenas os picos exclusivos de cada polipeptídeo. Os picos referentes à autólise da tripsina (~842,7 Da, ~1.045,6 Da e ~2.211,7 Da), a queratina 10 (807,498 Da; 1.165,844 Da; 1.234,955 Da; 1.365,97 Da; 1.435,096 Da e 1.494,112 Da) e picos de origem desconhecida encontrados no perfil de mais um polipeptídeo foram excluídos. Foram considerados os picos de massa na faixa de 800 a 3.000 Da.

Os espectros obtidos, representando os perfis de digestão tríptica dos polipeptídeos 48, 67, 75, 128 e 246, estão representados na figura 6. Na tabela 6 estão resumidos alguns dados referentes aos polipeptídeos identificados através do programa Aldente (<http://www.expasy.org/tools/aldente/>), utilizando os picos de massa representados na tabela 5.

Spot 48

Spot 67

Spot 75

Spot 128

Spot 246

Figura 6: Perfis de digestão triptica obtidos por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. Estão representados os espectros dos polipeptídeos 48, 67, 75, 128 e 246. Estes polipeptídeos foram recortados dos géis e processados conforme descrito em Métodos. Os peptídeos obtidos a partir da digestão triptica dos referidos polipeptídeos foram analisados em um espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF.

Spot	Proteína	pValue ^{A)}	Cobertura (%) ^{B)}	Peptídeos identificados ^{C)}	pI teor.	pI exp.	Mr (Da) teor.	Mr (Da) exp.
48	PDI	9e-10	17	6	4,76	4,9	54.982	64.960
67	PRS6B	1.5e-10	29	8	5,09	5,4	47.408	54.390
67	PDIA6	3.4e-10	28	8	4,95	5,4	46.192	54.390
75	Dinactina 2	5.6e-10	25	7	5,14	5,3	44.147	53.810
75	hnRNP F	3e-9	22	6	5,31	5,3	45.729	53.810
118	ANX 2	1e-6	11	3	7,53	7,3	38.546	38.180
128	hnRNP A3	5.2e-8	17	6	8,46	8,2	37.086	36.930
246	Ubiquitina	2.3e-8	50	3	6,57	6,8	8.565	8.620

Tabela 6: Resumo dos polipeptídeos identificados por MALDI-TOF. Estão representados os dados da análise do perfil de digestão triptica dos polipeptídeos 48, 67, 75, 118, 128 e 246 pelo programa Aldente (www.expasy.org/tools/aldente), usando o banco de digestão de proteínas de rato. Foram usados para a análise os picos de massa representados na tabela 5. Como parâmetros de análise foram utilizados como tolerância da diferença entre o valor experimental e o valor do banco de dados (matching mass) de $\pm 0,5$ Da, pValue de entrada de $1e-5$, digestão com tripsina permitindo até 1 sítio de clivagens perdida (MC), cisteína na forma de carbamidometil-cisteína (modificação fixa) e a metionina na forma oxidada (modificação variável). A) probabilidade de que o valor de “score” atribuído a uma identificação protéica baseada no perfil de digestão triptica seja maior ou igual àquele obtido apenas por chance. B) Porcentagem da sequência do polipeptídeo completo

representada pelos peptídeos identificados. C) Múltiplas formas do mesmo peptídeo foram computadas como um único peptídeo.

O polipeptídeo 48 foi identificado como a Proteína Dissulfeto Isomerase (PDI), com um alto grau de confiança. Existe, também, uma boa concordância entre os valores de pI experimental e teórico, sendo que o pI médio foi de 4,9 enquanto que o valor teórico para a PDI madura (processada proteoliticamente) é de 4,76. Entretanto, não há uma boa concordância entre os valores de massa molecular teórica e experimental, sendo a massa molecular teórica para o precursor de PDI é 56.951 Da e para a proteína madura de 54.982 Da, enquanto que a massa experimental obtida para o polipeptídeo 48 é de 65.746 Da. Este foi um problema comum aos polipeptídeos desta faixa de massa molecular (polipeptídeos 48, 67 e 75), indicando algum problema quanto à estimativa de massa desta faixa.

A análise do polipeptídeo 67 revelou que este é composto por dois polipeptídeos, a subunidade regulatória 6B do proteossoma 26S (PRS6B) e a Proteína Dissulfeto Isomerase A6 (PDIA6), com um alto grau de confiança. Existe uma boa concordância entre os valores de pI experimental e teórico para estes dois polipeptídeos, sendo que o pI médio para este polipeptídeo é 5,4 enquanto que os valores teóricos para a PRS6B e a PDIA6 são 5,09 e 4,95, respectivamente. Assim como o que ocorreu com o polipeptídeo 48, não há uma boa concordância entre os valores de massa molecular teórica e experimental, sendo as massas moleculares teóricas para a PRS6B e a PDIA6 47.408 Da e 46.192 Da respectivamente, e o valor experimental médio para este polipeptídeo 54.390 Da.

A análise do polipeptídeo 75 revelou que este também é composto por dois polipeptídeos, a Dinactina 2 e a Ribonucleoproteína F. Existe também uma boa concordância entre os valores de pI experimental e teórico para ambos os polipeptídeos, sendo que o pI médio para este polipeptídeo é 5,3 enquanto que os valores teóricos para a Dinactina 2 e a Ribonucleoproteína F são 5,14 e 5,31, respectivamente. Novamente não há uma boa concordância entre os valores de massa molecular teórica e experimental, sendo que as massas moleculares teóricas para Dinactina 2 e a Ribonucleoproteína F são 44.147 Da e 45.729 Da, respectivamente, e o valor experimental médio para este

polipeptídeo é 53,810 Da.

O polipeptídeo 118 foi identificado como Anexina 2 com uma confiança razoável, mas não tão elevada como com os outros polipeptídeos. Existe uma boa concordância entre os valores de massa molecular (38.180 Da) e pI (7,3) experimentais do polipeptídeo 118 e os valores teóricos de massa molecular (38.547 Da) e pI (7,53) da Anexina 2, sendo estas, portanto, evidências adicionais da identidade deste polipeptídeo.

O polipeptídeo 128 foi identificado como a Ribonucleoproteína Nuclear Heterogênea A3 (hnRNP A3 - heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein A3), com um alto grau de confiança. Apenas pela análise do perfil de digestão trípica, não foi possível distinguir entre a forma canônica e a isoforma 2 desta proteína. Entretanto, existe uma maior concordância entre os valores de massa molecular e pI experimentais e teóricos com a isoforma 2, sendo que a massa molecular e o pI médios para o polipeptídeo 128 são de 36.930 Da e 8,2, e os valores teóricos para a isoforma 2 são 37.086 Da de massa molecular e pI 8,46, enquanto que a forma canônica possui massa molecular teórica de 39.651 Da e pI 9,10.

O polipeptídeo 246 foi identificado como Ubiquitina também com um alto grau de confiança. Existe uma boa concordância entre os valores de massa molecular (8.630 Da) e pI (6,8) experimentais do polipeptídeo 246 e os valores teóricos de massa molecular (8.565 Da) e pI (6,56) da Ubiquitina.

4.2 Confirmação da expressão diferencial da Anexina 2 nas células ST1 após o tratamento com hidrocortisona

Como descrito no item anterior, foram obtidas evidências, através da análise por espectrometria de massas, de que a identidade do polipeptídeo 118, cujos níveis nos extratos nucleares das células ST1 estão diminuídos tanto após 5 h como 24 h de tratamento com hidrocortisona, seria a Anexina 2. Com o objetivo de se obter evidências adicionais que confirmassem estes dados, foram realizados ensaios de Western blot com a finalidade de verificar se a Anexina 2 era expressa nas células ST1 e se sua expressão era reprimida nos extratos nucleares após o tratamento com hidrocortisona (figura 7).

Figura 7: Análise da expressão da Anexina 2 nas células ST1. (A) Montagem mostrando o polipeptídeo 118 (setas) nos perfis obtidos após o tratamento de 5 h (duplicata) e 24 h com hidrocortisona (Hy) (100 ng/ml) em relação aos géis controle (C). (B) Ensaio de Western blot para a análise da regulação da expressão protéica da Anexina 2 nas células ST1 em meio contendo 0,2% de SFB. Foram usados 15 µg dos extratos nucleares de células ST1 tratadas por 24h (Hy 24h) ou não (C) com hidrocortisona (Hy) (100 ng/ml). Os níveis da proteína α -tubulina foram utilizados como controle dos níveis de proteína em cada canaleta. As amostras foram fracionadas em gel de poliacrilamida 12%.

Foram utilizados, para este ensaio de Western blot, 15 µg de extrato nuclear, obtido através do mesmo protocolo de extração nuclear (Item 3.2.13 Métodos), empregado na obtenção dos perfis 2D, de células ST1 crescendo a 0,2% SFB, tratadas por 24 h ou não com hidrocortisona (100 ng/ml). Na figura 7A, estão as regiões dos perfis 2D dos extratos nucleares das células ST1 controle e tratadas com hidrocortisona por 5 h (duplicata) e 24 h contendo o polipeptídeo 118, ilustrando a diminuição nos seus níveis durante o tratamento. Pode-se observar no ensaio de Western blot da figura 7B que a Anexina 2 é expressa nas células ST1 e que a sua expressão é intensamente reprimida após 24 h de tratamento, da mesma forma que ocorre com o polipeptídeo 118, sendo esta mais uma evidência positiva de que este polipeptídeo seja realmente a Anexina 2, e de que a expressão desta seja realmente regulada durante o tratamento com hidrocortisona. Os níveis da α -tubulina foram usados como controle da quantidade de proteína aplicada por canaleta.

Este ensaio de Western blot foi repetido, utilizando-se extratos enriquecidos para proteínas nucleares de células ST1, crescendo a 0,2% SFB, não tratadas ou tratadas com hidrocortisona (100 ng/ml) por 5 e 24 h (figura 8).

Figura 8: Ensaio de Western blot para a análise da regulação da expressão protéica da Anexina 2 nas células ST1 em meio contendo 0,2% de SFB tratadas ou não com hidrocortisona. Foram usados 15 µg dos extratos nucleares de células ST1 tratadas por 5 e 24 h (Hy 5h e Hy 24h) ou não (C) com hidrocortisona (Hy) (100 ng/ml). Os níveis da proteína α -tubulina foram utilizados como controle dos níveis de proteína em cada canaleta. As amostras foram fracionadas em gel de poliacrilamida 12%.

Foram utilizados para este ensaio de Western blot 15 µg de extratos nucleares de células ST1 crescendo a 0,2% SFB, tratadas ou não com hidrocortisona (100 ng/ml) por 5 e 24 h. Observa-se que, assim como o que ocorre com o polipeptídeo 118, os níveis da Anexina 2 estão diminuídos tanto após 5 h como 24 h de tratamento. Novamente, os níveis da α -tubulina foram usados como controle da quantidade de proteína aplicada por canaleta.

Para melhor avaliar esta expressão diferencial da Anexina 2, bem como sua localização nuclear, foram feitos novos ensaios de Western blot, utilizando extratos protéicos fracionados (Item 3.2.26) (figuras 9A e 9B), e extratos protéicos totais (figura 9C).

Figura 9: Análise da expressão e localização celular da Anexina 2 nas células ST1. (A) Ensaio controle para demonstrar o enriquecimento das histonas H1, H2A, H2B, H3 e H4 no extrato enriquecido para proteínas da cromatina. Foram utilizados 15 µg de extratos de proteínas de citoplasmáticas (CSK), do citoesqueleto e nucleares (RSB), de proteínas associadas à cromatina (CRO) e da matriz nuclear (MN) das células ST1 crescendo em meio contendo 0,2% SFB. As amostras foram fracionadas em gel de poliácridamida 15% e o gel foi corado com Coomassie Blue. (B) Ensaio de Western blot para a análise da localização celular da Anexina 2. Foram utilizados 15 µg dos mesmos extratos em (A). As amostras foram fracionadas em gel de poliácridamida 6% no caso dos Western blot para as proteínas p300 e BRG-1 e 15% para as proteínas ENC-1/NRP/B, c-fos e Anexina 2. (C) Ensaio de Western blot para a análise da regulação da expressão protéica da Anexina 2 nas células ST1 em meio contendo 0,2% de SFB. Foram usados 30 µg dos extratos totais de células ST1 tratadas por 7 (Hy 7h) e 24 h (Hy 24h) ou não (C) com hidrocortisona (Hy) (100 ng/ml). As amostras foram fracionadas em gel de poliácridamida 12%. Os níveis da proteína α -tubulina foram utilizados como controle dos níveis de proteína em cada canaleta.

Foram utilizados para o ensaio representado na figura 9A e 9B, 15 µg de extratos enriquecidos para proteínas da fração mais solúvel do citoplasma (CSK), para proteínas do citoesqueleto e da fração nuclear solúvel, ou seja, de proteínas nucleares não associadas fortemente às estruturas nucleares (RSB), de proteínas associadas à cromatina (CRO) e da matriz nuclear (MN) das células ST1 crescendo em meio contendo 0,2% SFB, utilizando-se o protocolo descrito no item 3.2.26 de Métodos.

Numa análise preliminar para verificar o enriquecimento de proteínas compartimento-específico com foco em proteínas nucleares, buscou-se analisar o enriquecimento para histonas na fração correspondente à proteínas associadas à cromatina. Na figura 9A as amostras foram fracionadas em gel de 15% de poliacrilamida e depois o gel foi corado com Coomassie Blue. Como pode ser observado, ocorre o enriquecimento das histonas H1, H2A, H2B, H3 e H4, que fazem parte do nucleossomo, e estão fortemente associadas ao DNA, na fração de proteínas associadas à cromatina. Como controle do protocolo de enriquecimento para proteínas de cada fração, foi medida a abundância relativa da proteína p300, que possui a função de co-ativação de vários fatores de transcrição e está associada à cromatina; da proteína BRG-1, que, assim como p300, também é um co-ativador de vários fatores de transcrição e está predominantemente associada à cromatina; da ENC-1/NRP/B (Nuclear Related Protein/Brain), cuja função ainda não é bem conhecida e já foi descrita tanto no citoplasma como na matriz nuclear; e c-fos, um componente do fator de transcrição AP-1, encontrado predominantemente no núcleo. Pode-se observar, na figura 9B, que as proteínas p300 e BRG-1 estão bem enriquecidas na fração de proteínas associadas à cromatina (CRO), que a proteína ENC-1/NRP/B é encontrada predominantemente nas frações citoplasmática (CSK) e da matriz nuclear (MN), e que a proteína c-fos está bem enriquecida na fração nuclear (RSB), estando também presente em níveis mais discretos nas frações CRO e MN, refletindo sua capacidade de se associar com estas estruturas, como esperado. Pode-se observar que a proteína Anexina 2 foi encontrada de forma abundante tanto na fração citoplasmática (CSK) como na fração enriquecidas para proteínas do citoesqueleto e nucleares (RSB). Pode-se observar, também, que foram detectados níveis mais discretos desta proteína na fração de proteínas associada à cromatina (CRO) e na matriz nuclear (MN), sugerindo que a Anexina 2 tem a capacidade de se associar com estas estruturas, sendo esta uma evidência positiva para a possível localização nuclear desta proteína.

No ensaio representado na figura 9C, foram utilizados 30 µg de extratos de proteínas totais das células ST1 mantidas a 0,2% SFB, tratadas por 7 h e 24 h (Hy 7h e Hy 24h) ou não (C) com hidrocortisona (100 ng/ml). Pode-se observar que não há variação global da expressão da Anexina 2, indicando que aquela diminuição de seus níveis, observada nos

ensaios de Western blot utilizando extratos enriquecidos para proteínas nucleares, representados nas figuras 7B e 8, seja devida à uma compartimentalização diferencial da Anexina 2, sendo esta provavelmente modulada pelo tratamento com hidrocortisona.

4.3 Análise da localização sub-celular da proteína Anexina 2 utilizando uma construção contendo a proteína de fusão EGFP-Anexina 2 (pLPCX-EGFP-ANX2).

Os dados de expressão obtidos no item anterior sugerem que esteja ocorrendo uma regulação da localização celular da Anexina 2, mediada pelo tratamento com hidrocortisona. Para avaliar esta possibilidade, foi utilizada uma construção em vetor retroviral, contendo a proteína de fusão entre a proteína fluorescente EGFP e a Anexina 2, a qual foi gerada conforme descrito em Métodos. Esta construção foi utilizada para a produção das partículas virais, as quais foram usadas para transduzir as células ST1, gerando a população ST1-EGFP-ANX2, conforme descrito em Métodos, sendo utilizadas nas análises representadas na figura 10.

Figura 10: Análise da localização sub-celular da proteína de fusão EGFP-ANX2. (A) Análise do efeito de hidrocortisona sobre a localização da proteína EGFP. Células ST1-EGFP foram tratadas

por 24 h (Hy 24h) ou não (C) com hidro cortisona (100 ng/ml) em meio DMEM-SFB 0,2%. Estão representados campos representativos das monocamadas celulares em placa de Petri, iluminadas com lâmpada de mercúrio usando filtro de excitação de 450-500 nm, aumento 400x. (B) Análise do efeito de hidro cortisona sobre a localização da proteína EGFP-ANX2. Células ST1-EGFP-ANX2 foram tratadas por 5h (Hy 5h) e 24h (Hy 24h) ou não (C) com hidro cortisona (100 ng/ml) em meio DMEM-SFB 0,2%. Estão representados campos representativos das monocamadas celulares em placa de Petri, iluminadas com lâmpada de mercúrio usando filtro de excitação de 450-500 nm, aumento 400x.

Para o ensaio representado na figura 10, as células ST1-EGFP-ANX2 foram tratadas por 5 (Hy 5h) e 24 h (Hy 24h) ou não (C) com hidro cortisona (100 ng/ml), e fotografadas sob microscopia de fluorescência, como descrito em Métodos. Como controle da influência da proteína EGFP sobre o comportamento da proteína de fusão EGFP-ANX2, foram utilizadas as células ST1-EGFP, as quais foram geradas através da transdução das células ST1 com a construção retroviral pLPCX-EGFP, levando a expressão da proteína fluorescente EGFP nestas células, conforme descrito em Métodos.

Pode-se observar na figura 10A que a fluorescência nas células ST1-EGFP é distribuída por todo o corpo celular, e que o tratamento com hidro cortisona não altera esta distribuição. Já a fluorescência nas células ST1-EGFP-ANX2, na ausência de hidro cortisona (C), se concentra predominantemente no citoplasma e, aparentemente, na região perinuclear, com uma marcação bem fraca no núcleo de algumas células, embora que, sem uma análise por microscopia confocal não seja possível afirmar se este sinal é realmente proveniente do núcleo. Após o tratamento tanto por 5 h como por 24 h com hidro cortisona, observa-se uma alteração desta distribuição observada na ausência do hormônio, caracterizada pelo aumento do sinal fluorescente em uma região do núcleo em parte das células (figura 10B, setas). Entretanto, a precisa localização deste sinal só poderá ser feita através de análises por microscopia confocal.

4.4 Análise da expressão diferencial da Ciclina G nas células ST1

Como parte da análise funcional da *Ciclina G* na reversão fenotípica das células ST1 sob a ação de hidro cortisona, inicialmente, foi feita inicialmente a caracterização do seu perfil de expressão tanto ao nível de mRNA como de proteína (figura 11).

Figura 11: Ensaio de Northern e Western blot para a análise da regulação da expressão da *Ciclina G* durante o tratamento das células ST1 com hidrocortisona. (A) Membrana contendo 15 µg de RNA total de células ST1, mantidas a 0,2% SFB, tratadas (1 h, 3 h, 5 h, 11 h e 24 h) ou não (C) com hidrocortisona (100 ng/ml), foi hibridizada com sondas radioativas correspondente aos mRNAs da *Ciclina G* (CycG) e o controle interno *36B4*. Abaixo está apresentada a foto do gel de fracionamento antes da transferência corado com brometo de etídio, mostrando a banda referente à subunidade 28S do rRNA. (B) Gráfico representando a quantificação relativa dos níveis do transcrito do gene *Ciclina G* em relação ao nível de expressão do controle interno *36B4*. (C) Ensaio de Western blot para a análise da regulação da expressão protéica de *Ciclina G* nas células ST1 crescendo a 5% SFB, tratadas ou não com hidrocortisona. Foram usados 30 µg do extrato protéico nuclear de células ST1 tratadas (5 h e 24 h) ou não (C) com hidrocortisona (100 ng/ml). Os níveis da proteína α-tubulina foram utilizados como controle dos níveis de proteína em cada canaleta. As amostras foram fracionadas em gel de poliácridamida 12%. (D) e (E) Gráficos representando a quantificação relativa da banda superior (D) e da banda inferior (E) da *Ciclina G* em relação ao nível de expressão da α-tubulina.

Para a análise do perfil de expressão do mRNA da *Ciclina G*, foram utilizados 15µg de RNA total das células ST1, mantidas em 0,2% SFB, não tratadas (C) ou tratadas por 1, 3, 5, 11 e 24 h com hidrocortisona (100 ng/ml) (figura 11A). Como controle da quantidade de RNA aplicada nas canaletas, utilizaram-se os níveis da fosforiboproteína 36B4. Na parte inferior da figura estão representados os níveis da sub-unidade 28S do rRNA. O gráfico (figura 11B) representa a quantificação relativa dos níveis da *Ciclina G* frente aos níveis de 36B4. Pode-se observar que ocorre um aumento progressivo dos níveis da *Ciclina G*, atingindo um pico de 2,5 vezes após 24 h de tratamento, confirmando os dados obtidos anteriormente no laboratório, embora o aumento observado anteriormente tenha

sido maior, cerca de nove vezes após 24 h de tratamento (Vedoy & Sogayar, 2002).

Para a análise dos níveis de proteína, foram utilizadas 30 µg de extratos enriquecidos para proteínas nucleares das células ST1, mantidas em 5% SFB, não tratadas (C) ou tratadas por 5h e 24h com hidrocortisona (100 ng/ml) (figura 11C). Foram utilizadas células ST1 mantidas em 5% SFB para análise dos níveis protéicos da Ciclina G pela dificuldade de se detectar esta proteína quando as células ST1 são mantidas em 0,2% SFB. Como controle da quantidade de proteína aplicada nas canaletas, utilizaram-se os níveis de α -tubulina. Nota-se que a banda referente a Ciclina G aparentemente é dupla. Estas duas bandas possuem o peso molecular estimado próximo do peso molecular teórico da Ciclina G, de cerca de 34 kDa, e, além disso, nos ensaios de super-expressão da Ciclina G discutidos mais adiante, observa-se que tanto a banda superior como a banda inferior refletem a super-expressão da Ciclina G, dado que sugere que ambas as bandas correspondem à Ciclina G. Entretanto, a razão que leva ao aparecimento da banda duplete nos experimentos de Western Blot para ciclina G ainda não é conhecido.

Os gráficos das figuras 11D e 11E representam a quantificação relativa da banda superior (figura 11D) e da banda inferior (figura 11E) frente aos níveis de α -tubulina. Verifica-se que após 5 h de tratamento, ocorre um aumento de cerca de 2,5 vezes dos níveis da banda inferior da Ciclina G em relação à amostra controle, e que após 24h de tratamento, este aumento dos níveis da banda inferior desaparece, mas ocorre um aumento discreto de cerca de 1,8 vezes dos níveis da banda superior em relação à amostra controle. Estes dados indicam que, assim como o que ocorre com os níveis de mRNA da Ciclina G, está ocorrendo um aumento discreto dos seus níveis protéicos, e que, aparentemente, este aumento está sendo refletido em duas possíveis isoformas da Ciclina G de maneiras diferentes.

4.5 Geração das populações celulares de ST1 geneticamente modificadas para super-expressar ou atenuar a expressão da Ciclina G de rato.

Com o objetivo de se estudar o papel da Ciclina G no processo de reversão fenotípica das células ST1, propôs-se avaliar tanto o efeito da sua super-expressão, através de uma construção em vetor de expressão para células de mamífero contendo a sua região

codificadora, bem como a inibição de sua expressão, através de uma construção contendo um fragmento do cDNA da *Ciclina G* na orientação "antisense" (Izant & Weintraub, 1984; Whitesell *et al*, 1999).

A região do cDNA escolhida para ser usada na inibição por expressão "antisense" está contida na região utilizada por Skotzko *et al* (1995) com a mesma finalidade de inibir a expressão da *Ciclina G*, trabalho no qual esta inibição foi obtida de forma parcial mas suficiente para permitir a observação de alteração do fenótipo celular (Skotzko *et al*, 1995).

Como vetor, foi escolhido o vetor retroviral de expressão pLPCX, descrito no item Materiais e Métodos. A idéia foi de utilizar o sistema retroviral para transduzir grande parte da população de células ST1, avaliando tanto o efeito da super-expressão da *Ciclina G* como o bloqueio de sua expressão no processo de reversão fenotípica, principalmente avaliando seus efeitos sobre o bloqueio característico de crescimento das células ST1 nas fases G0/G1 do ciclo celular sob ação do hormônio. Para esta finalidade, devido às características do ciclo de vida dos retrovírus, principalmente pela sua capacidade de integração estável em cópia única ou em poucas cópias no DNA genômico, os sistemas de expressão retrovirais permitem uma maior homogeneidade e estabilidade na expressão gênica (Ausubel, 1999). Além disso, com o uso de promotores fortes, é possível a obtenção de altos níveis de expressão.

4.5.1 Construção e caracterização dos vetores de expressão contendo a região codificadora da *Ciclina G* ou o fragmento de cDNA "antisense" para *ciclina G* de rato no vetor retroviral pLPCX

Para a clonagem do cDNA contendo a região codificadora da *Ciclina G* (CycG_{CDS}) no vetor pLPCX, este foi amplificado por RT-PCR a partir de uma preparação de RNA total de células ST1 tratadas com hidrocortisona por 24 horas, condição esta onde se observa o pico máximo de indução da expressão deste transcrito. A clonagem no vetor pLPCX foi feita utilizando o sítio da enzima de restrição *Xho*I, gerando a construção pLPCX-CycG, conforme descrito em Métodos. Para a obtenção da construção contendo o fragmento do cDNA da *Ciclina G* na orientação "antisense", foi utilizado um clone de pLPCX-CycG na orientação "antisense", o qual foi digerido com *Bgl*III e re-ligado, conforme descrito em

Métodos, gerando a construção pLPCX-CycG-AS. Esta construção contém um fragmento parcial do cDNA de *Ciclina G* de rato na orientação “antisense”.

Com a finalidade de se confirmar a identidade e a integridade das construções pLPCX-CycG e pLPCX-CycG-AS, foi feito o seqüenciamento automático do inserto clonado nestes vetores. Inicialmente, foi feito o seqüenciamento do clone B12 do vetor pLPCX-CycG com os "primers" pLPCXF, CycGF2, pLPCXR e CycGR3, conforme descrito em Métodos. A partir do alinhamento das oito seqüências obtidas, traduzidas, com a seqüência protéica de referência da *Ciclina G* de rato do GenBank (dado não mostrado), foram detectadas duas mutações, o que levou à duas trocas de aminoácidos, sendo uma no resíduo 83 (leucina→serina) e outra no resíduo 129 (treonina→alanina). Não foi possível confirmar a identidade dos resíduos 292 e 293 devido à baixa qualidade dos seqüenciamentos nesta região. Para se verificar se esta construção levaria à expressão de uma proteína do tamanho correto, foi feito um ensaio de Western blot, utilizando extratos protéicos das células 293T transfectadas transitoriamente com esta construção, e se verificou que esta construção codifica para uma proteína do tamanho esperado (~34 kDa) (dado não mostrado).

Figura 12: Representação parcial do alinhamento múltiplo presente em Horne *et al*, 1996, contendo a *Ciclina G* de rato, camundongo e humana, a *Ciclina G2* humana, a *Ciclina A* de camundongo e humana e as proteínas *Cig1* e *Cig2* de *Schizosaccharomyces pombe*. A numeração dos resíduos é em relação a *Ciclina G2* humana. Os retângulos em vermelho indicam os resíduos 83 (leucina) e 129 (treonina) mutados no clone B12 da construção pLPCX-CycGB12.

No alinhamento múltiplo representado na figura 12, nota-se que os resíduos mutados

83 (leucina→serina) e 129 (treonina→alanina), destacados em vermelho, estão na região que define a família das ciclinas ("Cyclin box"), e são extremamente conservados, estando presentes tanto em membros mais próximos da família, como a Ciclina G2 e a Ciclina A, como até em ortólogos mais distantes da Ciclina G, como as proteínas *cig1* e *cig2* de *Schizosaccharomyces pombe*, sendo, a única exceção, em um resíduo da Ciclina A de camundongo, que possui uma serina ao invés da treonina. Mesmo com as mutações, esta construção (pLPCX-CycGB12) foi utilizada para geração de células ST1 super-expressando Ciclina G, como descrito abaixo.

Como não era possível prever as consequências destas mutações na função da Ciclina G, decidiu-se buscar um outro clone de cDNA que contivesse a sequência selvagem para a Ciclina G de rato. O sequenciamento do clone B8 foi feito utilizando os quatros "primers" citados acima. Apenas a reação com o "primer" CycGF2 não funcionou. A análise através do alinhamento das seis sequências obtidas, traduzidas, com a sequência protéica de referência da Ciclina G de rato depositada no GenBank (dado não mostrado), revelou que não haviam mutações neste clone. Em um ensaio de Western blot, similar ao realizado com o clone B12, observou-se que esta construção (pLPCX-CycGB8) também codifica uma proteína do tamanho esperado (dado não mostrado). Esta construção (pLPCX-CycGB8) foi utilizada para gerar populações de células ST1 super-expressando a Ciclina G, como descrito abaixo.

Foi feito também o sequenciamento do vetor pLPCX-CycG-AS, para confirmar a orientação e a integridade desta construção. Foram utilizados, para esta reação de sequenciamento, os "primers" pLPCXF e pLPCXR. O sequenciamento com o "primer" pLPCXR não funcionou. O alinhamento da sequência de nucleotídeos obtida com a sequência de referência da Ciclina G de rato do GenBank (dado não mostrado) revelou que a orientação em relação ao promotor está correta e que, a não ser por algumas regiões de baixa qualidade do sequenciamento, a sequência está correta e corresponde à região esperada da Ciclina G. Entretanto, seriam necessárias reações de sequenciamento adicionais para se confirmar a ausência de mutações nesta construção. Esta construção foi utilizada na geração da população de células ST1-CycG-AS.

4.5.2 Transdução das células ST1 com as construções retrovirais

Com a finalidade de se padronizar as condições tanto do processo de produção viral como de transdução das células ST1, a proteína EGFP foi clonada no vetor retroviral pLPCX, conforme descrito em Métodos. O protocolo final otimizado que está descrito em Métodos envolve a produção das partículas virais na linhagem empacotadora anfotrópica ϕ nx-Ampho, concentração das partículas virais por centrifugação e regime de transdução duplo utilizando uma MOI (“Multiplicity Of Infection”) de 100. Este protocolo permite que aproximadamente de 60 a 80% das células sejam transduzidas. Para a obtenção de uma população com aproximadamente 100% das células expressando EGFP, utilizou-se um esquema de seleção com puromicina, utilizando uma concentração sub-ótima (3 μ g/ml) por 3 dias. A concentração ótima de puromicina, ou seja, a concentração onde 100% das células ST1 sem o cassete de resistência a puromicina são mortas (determinada através de curva resposta), é de 5 μ g/ml e o tempo de seleção é de cerca de 5 dias. Mas com este esquema de seleção, ocorre morte de boa parte das células que contém o cassete de resistência, como verificado com a população de células ST1 expressando EGFP, o que é característico da seleção com puromicina (Dinser *et al*, 2001). Já com 3 μ g/ml de puromicina a morte das células que receberam a marca da seleção é bem menor e após 3 dias se observa morte celular de cerca de 80-90% das células que não receberam o vetor (dado não mostrado). A figura 13 representa a transdução das células ST1 com a construção pLPCX-EGFP, utilizando o protocolo descrito, observadas sob microscópio de contraste de fase fluorescente, sendo que a mesma região da monocamada foi fotografada usando luz branca ou fluorescência, conforme descrito em Métodos.

Figura 13: Células ST1 transduzidas com o vírus pLPCX-EGFP. (A) Campo representativo da monocamada celular em placa de Petri, luz branca e aumento 100x; (B) Mesmo campo representativo iluminado com lâmpada de mercúrio, usando filtro de excitação de 450nm-500nm. Observa-se a fluorescência das células que foram transduzidas com o vírus pLPCX-EGFP. Imagem capturada a partir de microscópio de contraste de fase fluorescente.

Pode-se observar, na figura 13, que com o protocolo descrito acima, foi possível obter uma porcentagem elevada de células contendo o vetor de interesse, neste caso pLPCX-EGFP, estimada entre 95-100%. Este protocolo foi utilizado na geração das populações de ST1 contendo os vetores pLPCX, pLPCX-EGFP, pLPCX-CycGB12, pLPCX-CycGB8 e pLPCX-CycG-AS, como descrito abaixo.

4.5.3 Caracterização das populações ST1-CycGB8, ST1-CycGB12 e ST1-CycG-AS quanto à expressão da Ciclina G

Utilizando-se o protocolo de transdução das células ST1 descrito acima, foram geradas as populações de ST1 contendo os vetores pLPCX (ST1-pLPCX), pLPCX-EGFP (ST1-EGFP), pLPCX-CycGB8 (ST1-CycGB8), pLPCX-CycGB12 (ST1-CycGB12) e pLPCX-CycG-AS (ST1-CycG-AS).

No primeiro ensaio de Western blot realizado para a confirmação da super-expressão da Ciclina G, verificou-se que, na população de células ST1 transduzidas com a construção pLPCX-CycGB8, havia um aumento discreto na expressão da Ciclina G, enquanto que na população contendo a construção pLPCX-CycGB12, esta expressão era muito maior (dado não mostrado). Aparentemente, ocorreu algum tipo de problema com

a eficiência de transdução do vírus pLPCX-CycGB8, levando a uma transdução parcial da população de células ST1 e aos menores níveis de Ciclina G observados, apesar de ter sido utilizado o mesmo número de M.O.I. (~100) que foi utilizado para o vírus pLPCX-CycGB12 e do processamento das duas preparações virais ter sido feito em paralelo. Sendo assim, optou-se por fazer uma nova produção dos vírus pLPCX-CycGB8 e pLPCX-CycGB12 para uma nova transdução das células ST1, utilizando como controle dos processos de produção e transdução o vírus pLPCX-EGFP, que possibilita acompanhar estes dois processos de forma direta através do monitoramento tanto da eficiência de transfecção das células empacotadoras como da eficiência de transdução nas células ST1. Tanto o processo de produção como de transdução funcionaram da forma esperada, com a obtenção, no final, de uma população com cerca de 95-100% de células ST1 contendo a construção pLPCX-EGFP (dado não mostrado). Além destas construções, as células ST1 também foram transduzidas com o vírus pLPCX-CycG-AS. Para a confirmação da super-expressão da Ciclina G nas populações de células ST1 transduzidas com as construções pLPCX-CycG B8 e B12, bem como da inibição da expressão da sua expressão na população de ST1 transduzida com a construção pLPCX-CycG-AS, foi feito um novo ensaio de Western blot, representado na figura 14.

Figura 14: Ensaio de Western blot contra Ciclina G para a análise das populações ST1-CycGB8, ST1-CycGB12 e ST1-CycG-AS. Foram usados 30 µg dos extratos nucleares de células ST1, ST1-CycG-AS-A (AS-A), da segunda população de células ST1 transduzidas com a construção pLPCX-CycGB8, ST1-CycGB8-B (B8-B), e a primeira e segunda populações de ST1 transduzidas com a construção pLPCX-CycGB12, ST1-CycGB12-A (B12-A) e ST1-CycGB12-B (B12-B), respectivamente. Os níveis da proteína α-tubulina foram utilizados como controle dos níveis de proteína em cada canaleta. As amostras foram fracionadas em gel de poliacrilamida 15%.

Foram utilizados, para este ensaio de Western blot, extratos enriquecidos para proteínas nucleares (Item 3.2.12 Métodos) de células ST1, da primeira população de

células ST1 transduzidas com a construção pLPCX-CycG-AS (ST1-CycG-AS) (AS-A), da segunda população de células ST1 transduzidas com a construção pLPCX-CycGB8, ST1-CycGB8-B (B8-B), e da primeira e segunda populações de células ST1 transduzidas com a construção pLPCX-CycGB12, ST1-CycGB12-A (B12-A) e ST1-CycGB12-B (B12-B), respectivamente, mantidas em 5% SFB e confluentes no momento da lise. Como controle da quantidade de proteína em cada canaleta, foram utilizados os níveis da proteína α -tubulina. Aparentemente, apenas a canaleta referente à amostra ST1-CycGB8-B possui uma quantidade menor de proteína aplicada. Comparando-se os níveis da Ciclina G entre as populações de ST1 B8-B, B12-A e B12-B, e àqueles da ST1 não transduzida, verifica-se que há uma expressão discretamente mais elevada da Ciclina G na sua forma selvagem (canaleta B8-B), e uma expressão bem mais intensa da Ciclina G mutante nas duas populações analisadas (canaletas B12-A e B12-B), embora exista uma diferença marcante entre as mesmas, sendo que aparentemente, a população ST1 CycGB12-A (canaleta B12-A) expressa a Ciclina G mutante mais intensamente que a população ST1-CycGB12-B (canaleta B12-B). Apesar das bandas da Ciclina G não terem ficado bem resolvidas, há uma predominância marcante da banda superior nas duas populações mutantes analisadas (canaletas B12-A e B12-B), e, aparentemente, na população ST1-CycGB8-B também.

Quanto ao efeito da expressão do fragmento da região codificadora da Ciclina G expressa na orientação "antisense" sobre os níveis protéicos da Ciclina G, quando se compara os níveis de Ciclina G entre as células ST1 e as células ST1-CycG-AS (canaleta AS-A), nota-se que esta estratégia aparentemente não está sendo efetiva para inibir a expressão da mesma. Entretanto, como não foi avaliada a expressão do fragmento "antisense" nas células ST1-CycG-AS, esta aparente falha em se inibir a expressão da Ciclina G poderia ser, também, devida uma menor eficiência de transdução.

Os dados acima, principalmente aqueles referentes à expressão da Ciclina G mutante nas populações ST1-CycGB12-A e ST1-CycGB12-B, indicam que, mesmo se tomando os cuidados discutidos acima, ou seja, fazendo o processamento dos vírus em paralelo, utilizando a mesma MOI no momento da transdução, e ainda, acompanhando todo processo com a construção pLPCX-EGFP, ainda assim ocorrem variações quanto aos

níveis de Ciclina G obtidos, que devem refletir variações inerentes ao procedimento. Sendo assim, foram geradas as terceiras populações de células ST1 expressando a Ciclina G selvagem (ST1-CycGB8-C) e mutante (ST1-CycGB12-C), e uma segunda população de células ST1 expressando o fragmento "antisense" (ST1-CycG-AS-B). Para a confirmação da super-expressão, ou inibição no caso da construção "antisense", da Ciclina G nas novas populações de células ST1 geradas, foi feito um novo ensaio de Western blot, representado na figura 15.

Figura 15: Ensaio de Western blot contra Ciclina G para a análise das populações ST1-CycGB8, ST1-CycGB12 e ST1-CycG-AS. Foram usados 30 µg dos extratos nucleares de células ST1, da segunda população de células ST1 transduzidas com a construção pLPCX-CycG-AS, ST1-CycG-AS-B (AS-B), e das terceiras populações de células ST1 transduzidas com a construção pLPCX-CycGB8 (ST1-CycGB8-C) (B8-C) e pLPCX-CycGB12 (ST1-CycGB12-C) (B12-C). Os níveis da proteína α -tubulina foram utilizados como controle dos níveis de proteína em cada canaleta. As amostras foram fracionadas em gel de poliacrilamida 12%.

Foram utilizados, para este ensaio de Western blot, extratos enriquecidos para proteínas nucleares de células ST1-CycGB12-C, ST1-CycGB8-C, ST1-CycG-AS-B e ST1-pLPCX, mantidas em 5% SFB e confluentes no momento da lise. Como controle da quantidade de proteína aplicada em cada canaleta, foram utilizados os níveis da α -tubulina. Quanto à super-expressão da Ciclina G, pode-se observar que há super-expressão tanto da Ciclina G selvagem (canaleta B8-C), como da mutante (canaleta B12-C) em relação às células ST1-pLPCX contendo o vetor vazio (canaleta pLCPX). Curiosamente, no caso da super-expressão da Ciclina G selvagem, ocorre uma predominância da banda de Ciclina G de menor peso molecular, enquanto no caso da Ciclina G mutante ocorre, como observado anteriormente, uma predominância da banda de maior peso molecular, embora as duas sejam super-expressas em ambos os casos.

Diferentemente do que vinha sendo observado, apesar da diferença entre a abundância relativa entre as bandas de maior e menor peso molecular, os níveis de expressão da Ciclina G selvagem e mutante foram similares.

Quando se comparam os níveis da Ciclina G na população ST1-CycG-AS-B (canaleta AS-B) com os níveis da população controle ST1-pLPCX (canaleta pLPCX), aparentemente há uma redução nos níveis da Ciclina G, entretanto este dado deveria ser confirmado com ensaios de Western blot adicionais.

Com a finalidade de se comparar o nível de super-expressão entre as diversas populações geradas (controle e super-expressando a Ciclina G), foi feito um novo ensaio de Western blot, representado na figura 16.

Figura 16: Ensaio de Western blot contra Ciclina G para a análise das populações ST1-CycGB8 e ST1-CycGB12. Foram usados 30 µg dos extratos nucleares de células ST1-CycGB8-A (B8-A), ST1-CycGB8-B (B8-B), ST1-CycGB12-A (B12-A), ST1, ST1-pLPCX (pLPCX), ST1-EGFP (EGFP), ST1-CycGB8-C (B8-C), ST1-CycGB12-B (B12-B) e ST1-CycGB12-C (B12-C). Os níveis da proteína α -tubulina foram utilizados como controle dos níveis de proteína em cada canaleta. As amostras foram fracionadas em gel de poliacrilamida 12%.

Foram utilizados, para este ensaio de Western blot, extratos enriquecidos para proteínas nucleares de células ST1-CycGB8-A, ST1-CycGB8-B, ST1-CycGB12-A, ST1, ST1-pLPCX, ST1-EGFP, ST1-CycGB8-C, ST1-CycGB12-B e ST1-CycGB12-C, mantidas em 5% SFB e confluentes no momento da lise. Como controle da quantidade de proteína aplicada em cada canaleta, foram utilizados os níveis da proteína α -tubulina, podendo-se observar que houve um problema de detecção dos níveis desta proteína na canaleta B12-C. Comparando-se os níveis da Ciclina G entre as diferentes populações expressando a proteína selvagem ST1-CycGB8 (canaletas B8-A, B8-B e B8-C), a proteína mutante ST1-CycGB12 (canaletas B12-A, B12-B e B12-C), as populações controle ST1-pLPCX (canaletas pLPCX) e ST1-EGFP (canaleta EGFP), e as células ST1,

pode-se observar que, assim como nos ensaios anteriores, a expressão da Ciclina G selvagem nas populações ST1-CycGB8-A e ST1-CycGB8-B é discretamente mais elevada que nas populações controle e nas células ST1. Já as populações ST1-CycGB12-A, ST1-CycGB8-C, ST1-CycGB12-B e ST1-CycGB12-C, super-expressam a Ciclina G em relação às células ST1 e as populações controle, e a relação de abundância entre as bandas de maior e de menor peso molecular foi a mesma observada nos ensaios anteriores, ou seja na população ST1-CycGB8-C há uma predominância da banda de menor peso molecular, enquanto que nas populações ST1-CycGB12 há uma predominância da banda de maior peso molecular, excetuando-se as populações ST1-CycGB8-B e ST1-CycGB12-B, sendo observado níveis mais intensos da banda de menor peso molecular, ao contrário do que tinha sido observado anteriormente.

4.6 Análise do efeito da super-expressão da Ciclina G em células ST1: proliferação celular e resposta a glicocorticóides

As populações de ST1 geradas conforme descrito nos itens anteriores, foram utilizadas para a análise dos efeitos da super-expressão da Ciclina G sobre a reversão fenotípica tumoral-normal das células ST1 na presença de hidrocortisona. Baseados nos dados de Western blot descritos no item anterior, foram escolhidas as populações super-expressando a Ciclina G mutante ST1-CycGB12-A, a população super-expressando a Ciclina G selvagem ST1-CycGB8-C, além da população ST1-CycG-AS-B, para a realização dos ensaios descritos abaixo.

Inicialmente, foram feitos ensaios de curvas de crescimento para se analisar os parâmetros gerais de crescimento destas populações (figura 17).

A

B

C

	B8-C	AS-A	EGFP	ST1	pLPCX	B12-A
Td (h)	24,2	19,9	19,5	19,2	18,9	21,6
Ds (10 ⁵ cel/cm ²)	3,0	6,1	5,2	5,2	4,9	4,6

D

	B8-C	AS-A	EGFP	ST1	pLPCX	B12-A
Ds (10 ⁵ cel/cm ²)		0,7	0,6	0,8	0,7	0,6

E

ST1

pLPCX

EGFP

AS

B12

B8

Figura 17: Curvas de crescimento das células ST1 e das populações ST1-pLPCX, ST1-EGFP, ST1-CycGB8-C, ST1-CycGB12-A e ST1-CycG-AS-B. (A) Curva de crescimento das células ST1, ST1-pLPCX, ST1-EGFP, ST1-CycGB8-C, ST1-CycGB12-A e ST1-CycG-AS-B na ausência de hidrocortisona. Foram plaqueadas 5×10^4 células em duplicata, que foram mantidas em meio DMEM-SFB 5%. As coletas foram feitas nos tempos indicados no gráfico. As curvas representam a média de dois experimentos independentes. (B) Curva de crescimento das células ST1, ST1-pLPCX, ST1-EGFP, ST1-CycGB8-C, ST1-CycGB12-A e ST1-CycG-AS-B, na presença de hidrocortisona (100 ng/ml). Foram plaqueadas 5×10^4 células em duplicata, que foram mantidas em meio DMEM-SFB 5%. As coletas foram feitas nos tempos indicados no gráfico. As curvas representam a média de três experimentos independentes (* $p < 0,05$, $n = 3$). (C) e (D) Tabelas com os dados de tempo de dobramento (Td) e densidade de saturação (Ds), das células ST1 e das demais populações analisadas, calculados a partir dos dados das curvas A e B respectivamente. (E) Análise do efeito de hidrocortisona sobre a densidade celular das células ST1-CycGB8. Células ST1, ST1-pLPCX, ST1-EGFP, ST1-CycGB8-C, ST1-CycGB12-A e ST1-CycG-AS-B foram tratadas com hidrocortisona (100 ng/ml) por nove dias em meio DMEM-SFB 5%. Campos representativos das monocamadas celulares em placas de seis poços, após tratamento por 9 dias com hidrocortisona (100 ng/ml), iluminadas em luz branca, aumento 100x. Imagem capturada a partir de microscópio de contraste de fase visível.

Foram feitos dois conjuntos de curvas de crescimento em 5% SFB, sendo um destes na ausência (figura 17A) e o outro na presença de hidrocortisona (figura 17B). Nas figuras 17C e 17D estão representados os tempos de dobramento e a densidade de saturação das populações mantidas na ausência e na presença da hidrocortisona, respectivamente. Não foi possível estimar os tempos de dobramento de todas as populações, referente às curvas de crescimento da figura 17B, pois algumas destas curvas não seguem um padrão exponencial. A figura 17E representa os campos representativos das monocamadas das células ST1 e as demais populações, após crescimento em 5% SFB e hidrocortisona (100 ng/ml) por nove dias.

Quanto à curva feita na ausência de hidrocortisona, foram detectadas uma pequena diferença no tempo de dobramento e uma diferença um pouco mais intensa na densidade de saturação (figura 17C) entre a população ST1-CycGB8-C e as demais populações. Entretanto, como foram realizados apenas dois experimentos independentes, não foi possível afirmar se estas diferenças são significativas.

Considerando as curvas de crescimento feitas na presença de hidrocortisona (17B), existe uma diminuição marcante e significativa ($p < 0,05$, $n = 3$) no número de células após sete e nove dias de tratamento entre a população ST1-CycGB8-C e as demais populações.

Esta diminuição no número de células ST1-CycGB8-C na presença de hidrocortisona está refletida na diferença de densidade celular, ao final do experimento, entre esta população e as demais populações (figura 17E).

Para avaliar melhor este efeito da super-expressão da Ciclina G sobre a ação da hidrocortisona nas células ST1, foram feitos ensaios de citometria de fluxo nas células ST1 e nas demais populações tratadas com hidrocortisona (figura 18).

Figura 18: Análise, por citometria de fluxo do padrão de distribuição no ciclo celular das células ST1, ST1-pLPCX, ST1-EGFP, ST1-CycG-AS-B, ST1-CycGB12-A e ST1-CycGB8-C tratadas com hidrocortisona (100 ng/ml) por 24 h em meio DMEM-SFB 5%. Ao lado de cada histograma estão representadas as percentagens de células nas fases do ciclo celular.

Para os ensaios de citometria de fluxo da figura 18, as células foram coletadas após 24 h de tratamento com hidrocortisona em meio contendo SFB 5%, e analisadas conforme descrito em Métodos. Dados anteriores do laboratório mostram que as células ST1 mantidas na ausência de hidrocortisona possuem cerca de 65-70% de células nas fases G0/G1, cerca de 15% de células na fase S e cerca de 13% na fase G2/M (Mercado, 1997). Pode-se observar na figura 18, que as populações ST1-pLPCX, ST1-EGFP, ST1-CycG-AS e ST1-CycGB12-A apresentam, com pequenas variações, a mesma resposta

característica das células ST1 quando tratadas com hidrocortisona, ou seja, um aumento de células nas fases G0/G1 (74%-84%) do ciclo celular, com uma concomitante diminuição da fração de células nas fases S (6-11%) e G2/M (9-15%). Já a população ST1-CycGB8-C, apresentou um bloqueio intenso na fase G0/G1 do ciclo celular, com quase a totalidade das células nesta fase (~96%), e com poucas células nas fase S (~1%) e G2/M (~3%). Embora sejam necessárias repetições destes ensaios, estes resultados indicam que a intensa redução no número de células ST1-CycGB8-C na presença de hidrocortisona, observada no ensaio de curva de crescimento, seja devido a um bloqueio mais intenso na fase G0/G1 do ciclo celular nestas células sob ação do hormônio. Sendo assim, estes dados indicam que a super-expressão da Ciclina G selvagem, mas não do respectivo cDNA mutante, intensifica o efeito da hidrocortisona sobre o bloqueio do ciclo celular nas células ST1.

Para explorar melhor esta possibilidade, foram feitos ensaios de citometria de fluxo para se avaliar o efeito da super-expressão da Ciclina G sobre a reversibilidade do efeito da hidrocortisona sobre as células ST1 (figura 19).

Figura 19: Análise, por citometria de fluxo do padrão de distribuição no ciclo celular das células ST1-pLPCX, ST1-EGFP, ST1-CycGB8-C, ST1-CycGB12-A e ST1-CycG-AS-B carenciadas em meio DMEM-SFB 0,2% por 24 h, tratadas com hidrocortisona (100 ng/ml) por 24 h em meio DMEM-SFB 0,2% e re-estimuladas em meio DMEM-SFB 5% na ausência de hidrocortisona por 24 h. Ao lado de cada histograma estão representadas as percentagens de células nas fases do ciclo celular.

Para os ensaios de citometria de fluxo da figura 19, as células ST1-pLPCX, ST1-EGFP, ST1-CycGB8-C, ST1-CycGB12-A e ST1-CycG-AS-B foram carenciadas para soro por 24 h em meio de cultura contendo 0,2% SFB e tratadas por 24 h com hidrocortisona neste mesmo meio de cultura. Nestas condições, as células ST1 e as demais populações apresentaram um intenso bloqueio na fase G0/G1 do ciclo celular (80-90%), com uma concomitante redução no número de células na fase S (0,5-2,5%) (dados não mostrados). Após o tratamento com hidrocortisona na presença de 0,2% SFB, as células foram re-estimuladas com soro (5% SFB) por 24 h na ausência do hormônio e foram analisadas por citometria de fluxo (figura 19). Embora não tenha sido possível obter os resultados para as células ST1 parentais devido à baixa qualidade dos dados, pode-se observar a reversibilidade do efeito da hidrocortisona nas populações celulares ST1-EGFP, ST1-pLPCX, ST1-CycG-AS-B e ST1-CycGB12-A, com uma diminuição expressiva das células em G0/G1 (27-45%) e, sobretudo, um aumento intenso no número de células na fase S (42-48%), comparando-se com as células tratadas com hidrocortisona por 24h a 0,2% SFB. Já a população ST1-CycGB8-C, mesmo após o re-estímulo com soro, possui uma fração maior de células na fase G0/G1 (~ 66%) e um número menor de células em S (~ 21%) quando comparado com as demais populações.

O conjunto de resultados descritos acima sugere que, de alguma forma, a super-expressão da Ciclina G selvagem nas células ST1 está levando não só a uma intensificação do efeito da hidrocortisona sobre as células ST1, mas, também, a um prolongamento do seu efeito. Entretanto, com a finalidade de confirmar e complementar estes dados, seriam ainda necessários experimentos adicionais de citometria de fluxo.

Além disso, o conjunto dos resultados acima indica que a presença do vetor vazio ou, ainda, a super-expressão da proteína EGFP, a qual não possui função definida em células de mamíferos, não causam efeito algum sobre a capacidade proliferativa das células ST1,

tanto na ausência como na presença do hormônio. Aparentemente, a expressão do fragmento do cDNA da Ciclina G na orientação “antisense” também não está alterando as características proliferativas das células ST1, tanto na ausência como na presença do hormônio. E, por último, os dados acima sugerem que as mutações no cDNA da Ciclina G, presentes na construção pLPCX-CycGB12, usada para a obtenção das células ST1-CycGB12-A, estão influenciando negativamente com o efeito potencial da Ciclina G selvagem, quando super-expressa, de intensificar e prolongar o efeito da hidrocortisona nas células ST1.

4.7 Análise do perfil de expressão de p21 durante a reversão fenotípica das células ST1

Como o gene *Ciclina G* foi primeiramente descrito como tendo sua expressão regulada pelo fator de transcrição p53 (Okamoto & Beach, 1994) e como esta regulação já foi demonstrada em alguns modelos celulares, uma das questões que surgem quanto ao papel da *Ciclina G* nas células ST1 é se o aumento de seus níveis durante reversão fenotípica está sendo mediada pela ativação da atividade transcricional de p53 mediada por glicocorticóides. Neste caso, seria esperado que outros genes-alvo de p53 também estivessem sendo regulados positivamente. Com o intuito de se avaliar esta possibilidade foi feita uma caracterização do perfil de expressão de p21, um dos alvos transcricionais clássicos de p53, tanto ao nível de mRNA como de proteína (figura 20).

Figura 20: Ensaio de Northern e Western blot para a análise da regulação da expressão de *p21* durante o tratamento das células ST1 com hidrocortisona. (A) Membrana contendo 15µg de RNA total de células ST1, mantidas a 0,2% SFB, tratadas (1 h, 3 h, 5 h, 11 h e 24 h) ou não (C) com hidrocortisona (100 ng/ml), foi hibridizada com sondas radioativas correspondente ao gene *p21* e o controle interno *36B4*. Abaixo está apresentada a foto do gel de fracionamento antes da transferência, corado com brometo de etídio, mostrando a banda referente à subunidade 28S do rRNA. (B) Gráfico representando a quantificação relativa dos níveis dos transcrito do gene *p21* em relação ao nível de expressão do controle interno *36B4*. (C) Ensaio de Western blot para a análise da regulação da expressão protéica de *p21* nas células ST1 crescendo a 5% SFB, tratadas ou não com hidrocortisona. Foram usados 30 µg do extrato protéico nuclear de células ST1 tratadas (5 h e 24 h) ou não (C) com hidrocortisona (100 ng/ml), e extrato protéico total de células 293-T transfectadas transitoriamente com o vetor pBABE-puro-*p21* (+), usado como controle positivo, ou com o vetor pBABE-puro (-), usado como controle negativo. Os níveis da proteína α -tubulina foram utilizados como controle dos níveis de proteína em cada canaleta. As amostras foram fracionadas em gel de poliacrilamida 12%.

Para a análise do perfil de expressão do mRNA de *p21*, foram utilizadas 15 µg de RNA total das células ST1, mantidas em 0,2% SFB, não tratadas (C) ou tratadas por 1, 3, 5, 11 e 24 h com hidrocortisona (100 ng/ml) (figura 20A). Como controle interno da quantidade de RNA aplicada nas canaletas, utilizaram-se os níveis da fosforiboproteína *36B4*. Na parte inferior da figura 20A estão representados os níveis da subunidade 28S do rRNA. O gráfico da figura 20B representa a quantificação relativa dos níveis de *p21*

frente aos níveis de 36B4. Pode-se observar que ocorre um aumento progressivo dos níveis de p21, atingindo um pico de cerca de cinco vezes após 11 h de tratamento. Para a análise dos níveis de proteína foram utilizados 30 µg de extratos enriquecidos para proteínas nucleares das células ST1, mantidas em 5% SFB, não tratadas (C) ou tratadas por 5 h e 24 h com hidroclotisona (figura 20C). Como controle da quantidade proteína aplicada nas canaletas, foram utilizados os níveis da α -tubulina. Como controles positivo e negativo para a reação de Western blot para p21, foram utilizados extratos protéicos totais de células 293-T transfectadas transitoriamente com o vetor de expressão pBABE-puro-p21, que contém o cDNA de p21 humano, e pBABE-puro vazio, respectivamente. Semelhante ao que ocorre com os níveis do seu mRNA, os níveis da proteína p21 aumentam progressivamente com o tratamento. Estes dados demonstram que a expressão de p21 está sendo, assim como a da Ciclina G, estimulada durante o tratamento das células ST1 com hidroclotisona.

5. Discussão

- O uso da tecnologia proteômica no estudo da atividade anti-proliferativa de glicocorticóides

A eletroforese bidimensional combinada à espectrometria de massas foi empregada para a identificação de proteínas nucleares, cujos níveis são modulados durante a reversão fenotípica tumoral-normal das células ST1, tratadas com o glicocorticóide hidrocortisona. A análise comparativa dos perfis 2D, em duplicatas, das células ST1 tratadas (ou não) por 5 h com hidrocortisona, possibilitou a detecção de 33 polipeptídeos diferencialmente representados entre estas amostras. A análise comparativa feita entre os perfis 2D das células tratadas (ou não) por 24 h com hidrocortisona, revelou que 16 destes 33 polipeptídeos também estão diferencialmente representados nestes perfis, sendo esta mais uma evidência da regulação diferencial dos mesmos.

A identidade de seis destes polipeptídeos foi determinada pela análise do perfil de massas da digestão triptica dos mesmos.

O polipeptídeo 48 foi identificado como a Proteína Dissulfeto Isomerase (PDI). As PDIs constituem uma família de enzimas estruturalmente relacionadas, que catalisam a formação de pontes dissulfeto, redução, ou isomerização de proteínas recém sintetizadas no lúmen do retículo endoplasmático (Wilkinson, 2004), atuando, assim, como chaperonas, permitindo que estas proteínas recém sintetizadas assumam a sua configuração tridimensional adequada. A designação PDI se refere não só à família destas proteínas, mas, também, a primeira e, conseqüentemente, a mais estudada, proteína desta família (Wilkinson, 2004), sendo aquela identificada neste trabalho. Todas as proteínas desta família exercem a maior parte das suas funções exclusivamente no retículo endoplasmático, entretanto, alguns membros da família vêm sendo identificados em outros compartimentos celulares e, no caso da PDI, inclusive no núcleo (Turano, 2002). Não se sabe ainda a exata função da PDI no núcleo e qual a relevância das funções que vêm sendo descritas, já que os níveis nucleares desta proteína são bastante baixos.

Mas as funções que lhe vêm sendo atribuídas estão relacionadas com aquelas que ela exerce no retículo endoplasmático, ou seja, controle do estado redox, promoção de isomerização e associação com várias outras proteínas devido à sua atividade de chaperona. De acordo com estas funções, PDI estaria relacionada a processos como o controle da atividade de certos fatores de transcrição e o controle da estrutura do núcleo através da modulação da interação entre o DNA e a matriz nuclear (Turano, 2002). Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que está ocorrendo um aumento muito discreto dos níveis desta proteína no núcleo. O polipeptídeo 48 foi selecionado para a análise por espectrometria de massas por apresentar um aumento, apesar de discreto (cerca de 1,5 vezes), porém reprodutível nos perfis 2D analisados. Acreditava-se que, na verdade, este polipeptídeo fosse uma mistura de pelo menos dois polipeptídeos, e que a expressão de um deles estaria mascarando a expressão diferencial do outro. Seriam necessárias análises adicionais por espectrometria de massas deste polipeptídeo para revelar se realmente este é composto apenas pela PDI ou por um polipeptídeo adicional. Quanto à sua localização celular na linhagem ST1, somente sua presença nos extratos enriquecidos para proteínas nucleares não é evidência suficiente de que, nestas células, a PDI realmente esteja no núcleo. O retículo endoplasmático, o qual é o principal compartimento onde a PDI é encontrada, é uma estrutura contínua com a membrana externa do núcleo, e as proteínas que fazem parte desta estrutura poderiam estar sendo extraídas durante o processo de obtenção das proteínas nucleares. Portanto, seriam necessárias evidências mais diretas de que realmente a PDI está sendo encontrada no núcleo e que seus níveis neste compartimento estão sendo regulados nas células ST1.

A análise do polipeptídeo putativo 67 revelou que este é composto por duas proteínas, a saber: a subunidade regulatória 6B do proteassoma 26S (PRS6B), também conhecida como TBP-7 (Tat-Binding Protein-7), e a Proteína Dissulfeto Isomerase A6 (PDIA6). A intensidade deste polipeptídeo está aumentada de 1,6–2 vezes, tanto após 5 h como após 24 h de tratamento. A PDIA6, mais conhecida como CaBP1 (Calcium Binding Protein 1), também faz parte da família das PDIs e, assim, como a PDI descrita acima (polipeptídeo 48), é encontrada predominantemente no retículo endoplasmático e, aparentemente, também participa de processos relacionados com o “controle de qualidade” durante as

etapas de síntese e “folding” protéicos no interior do retículo (Meunier *et al*, 2002). Entretanto, uma outra função desta proteína seria a modulação da via de sinalização envolvendo o IP3 e a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, através da modulação da atividade do receptor da membrana do retículo endoplasmático para IP3 (Haynes *et al*, 2004). Já a proteína PRS6B faz parte do complexo contendo atividade ATPásica 19S do proteossoma 26S, e pode ser encontrada tanto no citoplasma como no núcleo. Acredita-se que o complexo 19S auxilie no processo de desnaturação ou “unfolding” das proteínas conjugadas à ubiquitina de modo que estas entrem na sub-unidade 20S do proteossoma e sejam degradadas (Sakao *et al*, 2000). O complexo 19S contém várias ATPases putativas, entre elas a PRS6B. Algumas destas ATPases do complexo 19S, entre elas a PRS6B, além da função no processo de proteólise, também estão envolvidas no processo de regulação transcricional (Sakao *et al*, 2000). Seriam necessárias análises adicionais para se determinar qual destas duas proteínas está realmente contribuindo para o aumento de intensidade observada do polipeptídeo putativo 67.

A análise do polipeptídeo putativo 75 revelou que este também é composto por duas proteínas, a Dinactina 2 e a Ribonucleoproteína F (hnRNP F). A intensidade deste polipeptídeo está aumentada cerca de duas vezes, tanto após 5h como 24h de tratamento. A Dinactina 2 é uma das sub-unidades que compõem o complexo multiprotéico Dinactina. Este complexo se associa com e modula a atividade das Dineínas, as quais, por sua vez, se associam com várias organelas, vesículas e complexos protéicos celulares, participando do transporte destas estruturas, via microtúbulos, para diferentes regiões no citoplasma. Entretanto, os mecanismos de como estes processos ocorrem ainda não são conhecidos (Schroer, 2004). Aparentemente, a Dinactina 2 sempre está associada ao complexo multiprotéico Dinactina, que por sua vez se encontra associado a microtúbulos ou membranas, inclusive a nuclear (Schroer, 2004), o que poderia explicar a sua presença nos extratos nucleares. Entretanto, como é uma proteína predominantemente citoplasmática, a hipótese de contaminação do extrato nuclear utilizado, com esta proteína deve ser considerada. A hnRNP F, por sua vez, é uma proteína nuclear, fazendo parte de uma classe de proteínas conhecidas como ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas. Esta classe de proteínas está envolvida com vários aspectos relacionados

com a biogênese do mRNA, entre eles: transcrição, “splicing”, poliadenilação, transporte núcleo-citoplasma e regulação da estabilidade, dentre outros (Caputi & Zahler, 2001). A hnRNP F participa, principalmente, do controle do processo de “splicing” de mRNAs específicos. Um destes mRNAs, para o qual o papel no controle do processo de “splicing” da proteína hnRNP F esta mais bem caracterizado, é o da proteína quinase c-Src. A proteína hnRNP F está envolvida no mecanismo de “splicing” alternativo do mRNA da c-Src, encontrado, especificamente, em células neuronais (Caputi & Zahler, 2001). Além desta função, a hnRNP F parece estar também envolvida no processo de transcrição através da sua interação com a proteína TBP (TATA-Binding Protein) (Yoshida *et al*, 1999). Assim como o que ocorre com o polipeptídeo 67, seriam necessárias análises adicionais para se determinar qual destas duas proteínas está realmente contribuindo para o aumento de intensidade observada do polipeptídeo putativo 75.

O polipeptídeo 128 foi identificado como sendo a Ribonucleoproteína heterogênea nuclear A3 (hnRNP A3 – heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein A3). A intensidade deste polipeptídeo está diminuída cerca de quatro vezes após 5 h de tratamento com hidrocortisona, sendo que após 24 h não foi possível determinar se esta modulação devido a problemas com a eletrofocalização nesta região do gel. Somente pela análise do perfil de digestão trípica, não foi possível determinar se o polipeptídeo 128 é a forma canônica ou a isoforma 2 da hnRNP A3, mas, levando-se em conta os valores de massa molecular e pI estimados para esta proteína, é muito provável que o polipeptídeo putativo 128 seja a isoforma 2 desta proteína, embora seja necessária uma evidência mais direta para comprovar esta possibilidade. A hnRNP A3 e as suas isoformas foram caracterizadas em um estudo destinado a isolar proteínas que se associavam à sequência de 21 nucleotídeos, encontrada em alguns mRNAs, conhecida como “elemento responsivo a ribonucleoproteína heterogênea A2” (A2RE - A2 Response Element) (Ma, 2002). Neste estudo foram identificadas e caracterizadas quatro isoformas desta proteína, tendo sido demonstrado que a hnRNP A3 realmente se associa à sequência A2RE. Pelo menos uma de suas funções, assim como para a hnRNP A2, o membro mais caracterizado desta família de proteínas, é a participação em processos de exportação de

transcritos específicos do núcleo para o citoplasma. Através da associação com estruturas granulares de transporte, estas proteínas encaminham estes mRNAs para compartimentos celulares específicos onde serão traduzidos. Um dos transcritos mais bem caracterizados que possui a sequência A2RE, reconhecida tanto pela hnRNP A2 como pela hnRNP A3, é a proteína básica da mielina (MBP - Myelin Basic Protein), mas esta sequência já foi encontrada em vários outros mRNAs, como, por exemplo, no da Protamina 2, da MAP2A (Microtubule Associated Protein 2A), da Neurogranina e da ARC (Activity-Regulated Cytoskeleton-associated protein) (Ainger *et al*, 1997). No caso da MBP, o mRNA correspondente à proteína se concentra próximo à mielina em oligodendrócitos, onde ocorre a sua tradução, tendo sido demonstrado que a sequência A2RE é necessária para esta localização específica do seu mRNA (Ainger *et al*, 1997). A hnRNP A3 é expressa em vários tecidos, sendo particularmente mais abundante no cérebro, pulmão e testículos, e quase não expressa no tecido muscular, nos rins, no músculo cardíaco e no fígado (Ma *et al*, 2002).

O polipeptídeo 246 foi identificado como correspondendo a Ubiquitina, com um alto grau de confiança. A intensidade deste polipeptídeo está diminuída cerca de 10 vezes após 5 h de tratamento com hidrocortisona, entretanto, esta diferença após 24 h de tratamento é de cerca de duas vezes. A Ubiquitina pode ser encontrada tanto no citoplasma quanto no núcleo, estando envolvida na regulação de diversos processos celulares, como divisão celular, sinalização, apoptose, entre outros. A função mais bem caracterizada da Ubiquitina é no processo de proteólise, mas várias outras funções regulatórias têm sido atribuídas a Ubiquitina, entre elas, a internalização de alguns receptores, tráfego de vesículas, reparo de DNA, ativação de certas quinases, entre outras (revisto em Sun & Chen, 2004). A ubiquitina exerce todas estas funções através da sua ligação covalente às proteínas, modulando desta forma a função e/ou a estabilidade de várias proteínas. Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que esteja ocorrendo uma diminuição dos níveis de Ubiquitina livre durante a reversão fenotípica das células ST1 mediada por hidrocortisona. A diminuição dos níveis da Ubiquitina livre já foi relatada em processos envolvendo situações de estresse celular, como, por exemplo, morte celular neuronal induzida por isquemia (Tan *et al*, 2000). Entretanto, não se sabe

ainda qual seria o papel funcional desta diminuição dos níveis da ubiquitina. Em um trabalho, a diminuição dos níveis de Ubiquitina livre foi relacionada com a estabilização de p53 durante o processo de apoptose de células neuronais (Tan *et al*, 2001). Entretanto, diversas questões necessitariam ser abordadas para a melhor caracterização do papel funcional da diminuição dos níveis da Ubiquitina livre, principalmente como esta diminuição ocorre e qual o impacto desta diminuição na função e estabilidade de diversas proteínas, considerando a variedade de processos celulares com os quais a Ubiquitina está relacionada.

Os dados obtidos através das análises por espectrometria de massas indicam que o polipeptídeo 118 corresponda a Anexina 2. Os ensaios de Western blot realizados com extratos enriquecidos para proteínas nucleares (figuras 7 e 8), mostram que os níveis da Anexina 2, assim como o que ocorre com o polipeptídeo putativo 118, estão diminuídos tanto após 5 h como após 24 h do tratamento com hidrocortisona nas células ST1, sendo esta mais uma evidência positiva da identidade e da regulação diferencial deste polipeptídeo.

A Anexina 2 é encontrada predominantemente no citoplasma, na forma de heterodímero com a proteína p11. Nesta forma, a principal propriedade da Anexina 2 é a de se associar à membranas na presença de Ca^{2+} . Especula-se que a Anexina 2 module a interação entre membranas ou entre membranas e o citoesqueleto, controlando desta forma o tráfego de vesículas, entre outras funções (Eberhard *et al*, 2001). Entretanto, foi demonstrado que a sua forma monomérica pode existir tanto no citoplasma como no núcleo, sendo que esta forma parece possuir uma função distinta da forma heteromérica. A sequência responsável pela expulsão desta proteína do núcleo já foi inclusive caracterizada (Eberhard *et al*, 2001).

Sendo assim, como os níveis desta proteína no citoplasma são abundantes, existia a possibilidade de sua detecção nos extratos enriquecidos para proteínas nucleares das células ST1 utilizados ser devida a uma contaminação deste extrato com proteínas citoplasmáticas. Uma maneira mais segura de se determinar se a Anexina 2 realmente estaria localizada no núcleo das células ST1, seria a obtenção de indícios de que esta proteína se associa com alguma estrutura nuclear. O conjunto de ensaios de Western blot

realizados com extratos protéicos fracionados enriquecidos para proteínas que se associam com a cromatina e com a matriz nuclear (figura 9), indica que a Anexina 2 estaria se associando com estruturas nucleares, sendo esta uma evidência adicional de que esta proteína também se encontra no núcleo nas células ST1.

A análise dos níveis da Anexina 2 através da utilização de extratos de proteínas totais (figura 9), demonstra que não há uma variação global aparente dos seus níveis ao longo do tratamento das células ST1 com hidrocortisona, indicando que aquela diminuição observada nos extratos nucleares seja devida à localização diferencial desta proteína modulada pelo tratamento com hidrocortisona. Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar esta diminuição dos níveis da Anexina 2 nos extratos nucleares das células ST1 tratadas com hidrocortisona: a) esta diminuição poderia estar ocorrendo devido à expulsão da Anexina 2 do núcleo para o citoplasma após o tratamento; b) devido à associação mais intensa da Anexina 2 à alguma estrutura nuclear que dificultasse sua extração, ou ainda c) considerando que parte do sinal observado no extratos nucleares seja, pelo menos em parte, devido à contaminação desse extrato com proteínas citoplasmáticas, esta diminuição poderia ser devida à uma associação desta proteína com alguma estrutura no citoplasma, deixando menos proteína disponível para contaminar o extrato nuclear.

Os ensaios de microscopia de fluorescência (figura 10), utilizando a proteína de fusão EGFP-ANX2, indicam, nas células ST1 sem tratamento, um sinal muito fraco da Anexina 2 no núcleo, embora seja necessária a realização deste ensaio utilizando microscopia confocal para a confirmação da localização deste sinal. Nas células ST1 tratadas com hidrocortisona, foi observado um aumento deste sinal fluorescente em uma região específica do núcleo em parte das células, indicando que a Anexina 2 pode, realmente, estar se associando com alguma estrutura deste compartimento, mas, novamente, a exata localização deste sinal deve ser determinada por microscopia confocal. Neste momento, é difícil correlacionar os dados obtidos através de ensaios de Western blot com esses realizados com a proteína de fusão. Pelos dados de Western blot utilizando proteínas nucleares, se esperaria um sinal muito mais intenso de fluorescência proveniente do núcleo das células ST1 controle. Mas, como não é possível delimitar exatamente os

limites do núcleo nos ensaios de microscopia realizados, também não é possível descartar a hipótese de que, nestas condições, a Anexina 2 esteja localizada, predominantemente, na região perinuclear. É difícil também fazer esta correlação entre os dados de Western blot e os ensaios com a proteína de fusão quando se considera a modulação da localização celular da Anexina 2 pelo tratamento com hidrocortisona. Embora, aparentemente, esteja ocorrendo a associação da Anexina 2 com uma região específica do núcleo em parte das células após o tratamento, somente este dado não explica a intensa diminuição observada, após o tratamento com hidrocortisona, dos níveis da Anexina 2 nos extratos enriquecidos para proteínas nucleares. Um outro ponto a se considerar sobre os ensaios realizados com a proteína de fusão, é que este sistema ainda precisa ser validado com ensaios de imunofluorescência contra a proteína endógena. Apesar da construção utilizada já ter sido caracterizada em outras linhagens celulares, tendo sido inclusive utilizada para a caracterização do sinal de exportação nuclear da Anexina 2 (Eberhard *et al*, 2001), não se pode afirmar, com absoluta segurança, que a presença da proteína EGFP em fusão com a região N-terminal da Anexina 2 não esteja tendo alguma influência sobre a modulação da função desta proteína modulada por glicocorticóides. Existem poucos trabalhos relatando esta modulação da localização nuclear da Anexina 2, sendo que foi descrito que alguns resíduos de aminoácidos são importantes para esta modulação e que o processo pode ser modulado por fosforilação (Liu *et al*, 2003; Eberhard *et al*, 2001), mas não estão descritos que tipo de estímulos estão relacionados com essa modulação. Caracterizações adicionais, no futuro, possivelmente venham a desvendar a natureza e quais as possíveis implicações desta modulação de compartimentalização da Anexina 2 no contexto da ação anti-proliferativa de GCs sobre as células ST1.

- O papel da Ciclina G na reversão fenotípica das células ST1 promovida por hidrocortisona

Como parte da análise funcional do papel de Ciclina G na reversão fenotípica das células ST1, foi feita a análise do seu perfil de expressão tanto ao nível de mRNA como

de proteína. Além disso, avaliou-se como a super-expressão desta proteína nas células ST1 influenciaria as características proliferativas destas células, principalmente a resposta característica que estas células apresentam aos hormônios glicocorticóides quanto à inibição da proliferação.

Os dados referentes ao perfil de expressão da Ciclina G (figura 11) indicam que ocorre um aumento dos seus níveis de mRNA de cerca de 2,5 vezes nas células ST1 carenciadas para soro. Este aumento está de acordo com o que já havia sido relatado pelo laboratório, havendo apenas uma discrepância quanto à intensidade deste aumento, que tinha sido estimado em cerca de nove vezes (Vedoy, 2000; Vedoy & Sogayar, 2002). Quanto aos níveis de proteína, há um aumento discreto de seus níveis nas células ST1 mantidas em 5% de SFB, de cerca de duas vezes, sendo similar ao que ocorre com os níveis de mRNA nestas mesmas condições (Vedoy & Sogayar, 2002). Entretanto, aparentemente, este aumento está representado em duas isoformas potenciais da Ciclina G, considerando a banda duplete que se obteve nos ensaios de Western blot. Embora sejam necessários dados mais conclusivos para se confirmar a natureza destas duas bandas, os dados de super-expressão revelam que as duas bandas têm os níveis aumentados, sugerindo que elas realmente correspondam às duas possíveis isoformas da Ciclina G.

Apesar das variações encontradas quanto à eficiência de transdução das células ST1, foram obtidas populações de células ST1 super-expressando tanto a forma mutante como a selvagem da Ciclina G. Quanto ao uso da estratégia “antisense”, uma das populações geradas aparentemente apresenta níveis protéicos reduzidos da Ciclina G, entretanto são necessários dados adicionais que confirmem que esta redução foi, de fato, significativa.

Os dados dos ensaios de curva de crescimento e de citometria de fluxo obtidos com as populações de ST1 geradas (figuras 17, 18 e 19), sugerem que a super-expressão da Ciclina G selvagem nas células ST1 não só intensifica, mas, também, prolonga o efeito da hidrocortisona sobre estas células quanto à inibição de proliferação, aparentemente devido à um bloqueio mais intenso nas fases G0/G1 do ciclo celular. Os dados também indicam que a super-expressão da Ciclina G mutante não produz os mesmos efeitos relacionados com a super-expressão da forma selvagem, sugerindo que as mutações encontradas estão influenciando negativamente a função da proteína.

Mas como a super-expressão da Ciclina G estaria atuando para mediar este efeito de intensificação e prolongamento da ação de hidrocortisona sobre as células ST1? Será que estes efeitos observados estão relacionados com a função real da Ciclina G na reversão fenotípica das células ST1 promovida por hidrocortisona, ou serão devidos a algum artefato da sua super-expressão? Ou seja, será que a super-expressão da Ciclina G está apenas exacerbando suas funções reais ou está criando uma função nova e artificial para a Ciclina G? Para responder estas perguntas, seria crucial avaliar o impacto da inibição da expressão da ciclina G sobre a resposta das células ST1 a GCs. Embora não seja possível, no momento, responder as estas perguntas, dados da literatura permitem que algumas hipóteses sejam levantadas.

Trabalhos recentes demonstraram que ao menos uma das funções da Ciclina G está relacionada com o controle da estabilidade de p53 (Okamoto *et al*, 2002; Ohtsuka *et al*, 2003; Zhao *et al*, 2003), e que a natureza deste controle pode ser tanto positiva, estabilizando p53, como negativa, dependendo do contexto e tipo celular considerado. Outros trabalhos apontam para uma relação entre o receptor dos hormônios glicocorticóides (GR) e p53, sendo que, num sistema celular semelhante ao empregado em nosso laboratório, baseado numa linhagem (HT-22) de neuroblastoma de camundongo, a ativação de GR induz um bloqueio nas fases G0/G1 do ciclo celular, e, aparentemente, p53 está mediando, ao menos em parte, este processo (Crochemore *et al*, 2002). Além disso, as células A549 de carcinoma humano de pulmão também apresentam inibição de crescimento em resposta a hormônios glicocorticóides (Greenberg *et al*, 2002) similar àquela apresentada pelas células ST1, com bloqueio nas fases G0/G1 do ciclo celular, sendo que esta resposta é, pelo menos em parte, dependente da funcionalidade de p53 (Urban *et al*, 2003). O papel de p53 na reversão fenotípica das células ST1, mediada por glicocorticóides, vem sendo explorado pelo aluno de doutorado Antero F. de Almeida Macedo (projeto FAPESP nº 01/12.286-9) em nosso laboratório, com diversas evidências diretas e indiretas indicando que, assim como nos trabalhos citados acima, p53 está sendo ativado durante o processo.

Portanto, um cenário para o possível papel da Ciclina G na reversão fenotípica das células ST1 mediado por glicocorticóides, seria que, a ativação de GR durante o

tratamento das células ST1, estaria levando, entre outros efeitos, à ativação de p53. Esta ativação estaria levando à transcrição de seus genes-alvo, como *p21*, *Ciclina G*, *Trombospondina-1*, *NRP/B* e *MKP-1* (Mitogen-activated protein Kinase Phosphatase-1), todos esses com expressão diferencial confirmada em células ST1 durante o tratamento com hidrocortisona (Vedoy & Sogayar, 2002). É possível que esses produtos gênicos estariam mediando, pelo menos em parte, o efeito da hidrocortisona sobre as células ST1. A indução de p21, por exemplo, poderia explicar, em parte, a indução do bloqueio nas fases G0/G1 do ciclo celular das células ST1 sob efeito de GCs, já que este gene é um inibidor clássico da transição da fase G1 para S (el-Deiry *et al*, 1993). Já a indução de *Ciclina G* nas células ST1 poderia ser um dos eventos necessários para a estabilização de p53, e a conseqüente manutenção de seus níveis, durante sua ativação por GR. A super-expressão da *Ciclina G*, por sua vez, poderia estar exacerbando esta sua função, levando à estabilização de p53 e à ativação de seus genes-alvo de uma forma mais intensa e duradoura em relação àquela que normalmente ocorre nas células que expressam *Ciclina G* apenas endogenamente.

- Considerações finais

Através do modelo das células ST1 de glioma de rato, nosso laboratório tem procurado desvendar as bases moleculares do efeito anti-proliferativo dos hormônios glicocorticóides. A caracterização dos alvos da ação destes hormônios poderia levar a um melhor entendimento da função de vários produtos gênicos no controle da transição entre as fases G1/S do ciclo celular em contextos celulares específicos. Neste sentido, o mecanismo molecular do efeito anti-proliferativo de GCs em células da glia ainda é pouco caracterizado, e a determinação destes mecanismos poderia levar à identificação de alvos moleculares potenciais específicos para se traçar novas estratégias no tratamento dos gliomas.

Os dados do presente trabalho indicam que, assim como ocorre em outros tipos celulares, o tratamento com GCs está levando à uma indução dos níveis de p21 nas células ST1, de origem glial. Este dado, aliado a outros dados na literatura citados acima,

indicam que, aparentemente, a indução de p21 por GCs é um evento comum a vários tipos celulares diferentes. Entretanto, como discutido anteriormente, esta indução de p21 pode ser promovida de várias formas dependendo do tipo celular considerado. Portanto, seria necessária a determinação destes mecanismos, avaliando-se o possível papel de p53 neste processo.

Vários dados do laboratório sugerem o envolvimento de p53 na reversão fenotípica das células ST1, induzida por GCs. No presente trabalho, o papel funcional da Ciclina G, um dos alvos transcricionais de p53, na proliferação celular e na modulação da resposta a GCs, foi examinado. Embora não tenha sido possível se chegar a evidências mecanísticas sobre o papel deste produto gênico na reversão fenotípica das células ST1, uma possibilidade interessante seria, no futuro, verificar se realmente a super-expressão da Ciclina G está realmente levando à uma estabilização e, conseqüentemente, à uma maior ativação de p53, como descrito em outros contextos celulares. Neste sentido, seria interessante, também, avaliar se os níveis de Ciclina G também estão sendo modulados em outros sistemas celulares onde a ativação de p53 faz parte da ação anti-proliferativa de GCs. Mesmo que os efeitos observados nas células ST1 super-expressando a Ciclina G sejam um artefato da sua super-expressão, a elucidação dos mecanismos moleculares que estão por trás desses efeitos da Ciclina G sobre a resposta destas células a glicocorticóides, principalmente sobre a reversibilidade do seu efeito, poderiam fornecer pistas importantes sobre os mecanismos pelos quais estes hormônios atuam no controle da proliferação celular.

O estudo proteômico revelou quais tipos de processos, relacionados com a modulação da função dos produtos gênicos, podem estar sendo regulados por GCs, entre eles: a translocação núcleo-citoplasma, compartimentalização e tradução de mRNAs específicos, além da compartimentalização diferencial de determinadas proteínas. Estes dados ilustram a diversidade de processos adicionais que podem estar sendo regulados pela ação destes hormônios, além daqueles que já vêm sendo descritos. Além disso, estes dados enfatizam a necessidade da abordagem proteômica no estudo da modulação da função protéica. A futura caracterização da expressão diferencial dos polipeptídeos identificados e do papel da Anexina 2 na reversão fenotípica das células ST1 podem contribuir para o melhor entendimento do mecanismo anti-proliferativo de GCs.

6. CONCLUSÕES

6.1 Análise proteômica do efeito de glicocorticóides sobre as células ST1

- Com a análise dos perfis a partir de extratos nucleares de células ST1 tratadas (ou não) com hidrocortisona por 5 h foram detectados 33 polipeptídeos como sendo diferencialmente representados entre as duas amostras.

- A análise dos perfis de células ST1 tratadas por 24 h revelou que 16 dos 33 polipeptídeos diferencialmente representados após 5h de tratamento, também se encontram diferencialmente representados após 24 h.

- Com os dados da análise por espectrometria de massas, foi possível identificar o polipeptídeo 48 como sendo a Proteína Dissulfeto Isomerase, o polipeptídeo 128 como a Ribonucleoproteína Heterogênea Nuclear A3 e o polipeptídeo 246 como a Ubiquitina. Os polipeptídeos putativos 67 e 75 são ambos compostos por pelo menos duas proteínas, a subunidade regulatória 6B do proteassoma 26S (PRS6B) e a Proteína Dissulfeto Isomerase A6, no caso do polipeptídeo 67, e a Dinactina 2 e a Ribonucleoproteína F no caso do polipeptídeo 75.

- Os dados de espectrometria de massas para o polipeptídeo 118, sugerem que sua identidade seja a Anexina 2. Dados de expressão da Anexina 2 mostram que, assim como ocorre com o polipeptídeo 118, há uma diminuição dos seus níveis nos extratos nucleares das células ST1 tratadas por 5 e 24 h com hidrocortisona, sendo esta mais uma evidência da identidade deste polipeptídeo.

- A análise dos níveis da Anexina 2 em extratos de proteínas totais, indica que não há regulação global de seus níveis protéicos durante o tratamento, sugerindo uma compartimentalização diferencial desta proteína mediada pelo tratamento com glicocorticóides.

- As análises feitas com extratos protéicos fracionados sugerem que a Anexina 2 está presente no núcleo das células ST1.

- Não foi possível determinar qual a natureza da modulação da localização celular da Anexina 2 mediada por glicocorticóides, através dos ensaios com a proteína de fusão EGFP-ANX2, embora os dados sugiram que esteja ocorrendo a associação desta proteína

com alguma estrutura nuclear.

6.2 Análise do papel da Ciclina G na reversão fenotípica das células ST1 promovida por hidrocortisona

- Os níveis do mRNA da Ciclina G apresentam um aumento discreto e progressivo durante o tratamento das células ST1 com hidrocortisona. O mesmo ocorre com os níveis da proteína, embora isto pareça estar refletido em duas possíveis isoformas distintas da Ciclina G.

- A super-expressão da forma selvagem da Ciclina G nas células ST1 intensifica e prolonga o efeito anti-proliferativo da hidrocortisona, quando comparada à resposta das outras populações geradas, incluindo a população que super-expressa a sua forma mutada, e da própria ST1, como avaliado através de ensaios de curva de crescimento e citometria de fluxo.

- Não foi possível confirmar se a expressão do fragmento de cDNA da Ciclina G na orientação “antisense” está sendo efetiva para diminuir os níveis protéicos da Ciclina G. Não foi observado nenhum efeito aparente quanto a proliferação celular nas células ST1 transduzidas com a construção contendo o fragmento na orientação “antisense” da Ciclina G.

- Os níveis protéicos de p21 apresentam um aumento progressivo durante o tratamento das células ST1 com hidrocortisona, similar ao que ocorre com os níveis de seu mRNA.

7. BIBLIOGRAFIA

Addeo R, Casale F, Caraglia M, D'Angelo V, Crisci S, Abbruzzese A, Di Tullio MT, Indolfi P. (2004). **Glucocorticoids induce g(1) arrest of lymphoblastic cells through retinoblastoma protein rb1 dephosphorylation in childhood acute lymphoblastic leukemia in vivo.** *Cancer Biology Therapy* 3: 470-476.

Aebersold R, Mann M. (2003). **Mass spectrometry-based proteomics.** *Nature* 422(6928): 198-207.

Ainger K, Avossa D, Diana AS, Barry C, Barbarese E, Carson JH. (1997). **Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA.** *Journal of Cell Biology* 138: 1077-1087.

Almawi WY, Melemedjian OK. (2002). **Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor.** *J Leukoc Biol.* 71(1): 9-15.

Altucci L, Gronemeyer H. (2001). **The promise of retinoids to fight against cancer.** *Nature Reviews Cancer* 3: 181-193.

Armelin HA, Gambarini AG, Armelin MCS. (1982). **Pituitary fibroblast growth factors and the growth of rat C6 glial cell variants.** *Cold Spring Harbor Conf. on Cell Proliferation* 9: 987-996.

Armelin MCS, Stocco RC, Armelin HA. (1983). **Control of rat glioma cell proliferation: uncoupling of the inhibitory effects of hydrocortisone hormone in suspension and monolayer cultures.** *J. Cell Biol.* 97: 455-458.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. (1999). **Current Protocols in Molecular Biology.** Boston, John Wiley.

Bates S, Rowan S, Vousden KH. (1996). **Characterisation of human cyclin G1 and G2: DNA damage inducible genes.** *Oncogene* 13: 1103-1109.

Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. (1968). **Differentiated rat glial cell strain in tissue culture.** *Science* 161(839): 370-371.

Bradford, MM. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical biochemistry* 72: 248-254.

Campagne ML, Okamoto K, Prives C, Gill R. (1999). **Developmental expression and co-localization of cyclin G1 and the B' subunits of protein phosphatase 2a in neurons.** *Molecular brain research* 64: 1-10.

Caputi M, Zahler AM. (2001). **Determination of the RNA binding specificity of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) H/H'/F/2H9 family.** *J Biol Chem.* 276(47): 43850-43859.

Celis JE, Rasmussen HH, Gromov P, Olsen E, Madsen P, Leffers H, Honore B, Dejgaard K, Vorum H, Kristensen DB. (1995). **The human keratinocyte two-dimensional gel protein database (update 1995): mapping components of signal transduction pathways.** *Electrophoresis* 16(12): 2177-2240.

Celis JE, Ostergaard M, Jensen NA, Gromova I, Rasmussen HH, Gromov P. (1998). **Human and mouse proteomic databases: novel resources in the protein universe.** *FEBS Lett.* 430(1-2): 64-72.

Cha HH, Cram EJ, Wang EC, Huang AJ, Kasler HG, Firestone GL. (1998). **Glucocorticoids stimulate p21 gene expression by targeting multiple transcriptional elements within a steroid responsive region of the p21waf1/cip1 promoter in rat hepatoma cells.** *J Biol Chem.* 273(4): 1998-2007.

Cram EJ, Ramos RA, Wang EC, Cha HH, Nishio Y, Firestone GL. (1998). **Role of the CCAAT/enhancer binding protein-alpha transcription factor in the glucocorticoid stimulation of p21waf1/cip1 gene promoter activity in growth-arrested rat hepatoma cells.** *J Biol Chem.* 273(4): 2008-2014.

Crochemore C, Michaelidis TM, Fischer D, Loeffler JP, Almeida OF. (2002). **Enhancement of p53 activity and inhibition of neural cell proliferation by glucocorticoid receptor activation.** *FASEB J.* 16(8): 761-770.

Dignam JD, Libovitz RM, Roeder RG. (1983). **Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei.** *Nucleic Acids Res.* 11: 1475-1489.

Dinser R, Kreppel F, Zaucke F, Blank C, Paulsson M, Kochanek S, Maurer P. (2001). **Comparison of long-term transgene expression after non-viral and adenoviral gene transfer into primary articular chondrocytes.** *Histochemical Cell Biology* 116: 69-77.

DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. (1987). **Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system.** *Molecular Cell Biology* 7: 379-387.

Dunn MJ. (1997). **Proceedings of the 2nd Siena 2-D Electrophoresis Meeting. Siena, Italy, September 16-18, 1996.** *Electrophoresis* 18: 307-660.

Eberhard DA, Karns LR, VandenBerg SR, Creutz CE. (2001). **Control of the nuclear-cytoplasmic partitioning of annexin II by a nuclear export signal and by p11 binding.** *Journal of Cell Science* 114: 3155-3166.

el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. (1993). **WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression.** *Cell* 75(4): 817-825.

Feinberg AP, Vogelstein B. (1984). **"A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum.** *Anal Biochem.* 137(1): 266-267.

Fey EG, Capco DG, Krochmalnic G, Penman S. (1984). **Epithelial structure revealed by chemical dissection and unembedded electron microscopy.** *Journal of Cell Biology* 99(1 Pt 2): 203s-208s.

Görg A, Postel W, Günther S. (1988). **The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients.** *Electrophoresis* 9: 531-546.

Görg A, Obermaier C, Boguth G, Csordas A, Diaz JJ, Madjar JJ. (1997). **Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins.** *Electrophoresis* 18(3-4): 328-337.

Görg A, Weiss W, Dunn MJ. (2004). **Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics.** *Proteomics* 4(12): 3665-2685.

Gottlicher M, Heck S, Herrlich P. (1998). **Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action.** *J Mol Med.* 76: 480-489.

Greenberg AK, Hu J, Basu S, Hay J, Reibman J, Yie TA, Tchou-Wong KM, Rom

WN, Lee TC. (2002). **Glucocorticoids inhibit lung cancer cell growth through both the extracellular signal-related kinase pathway and cell cycle regulators.** *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 27(3): 320-328.

Haynes LP, Tepikin AV, Burgoyne RD. (2004). **Calcium-binding protein 1 is an inhibitor of agonist-evoked, inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated calcium signaling.** *J Biol Chem.* 279(1): 547-555.

Hanahan D, Weinberg RA. (2000). **The hallmarks of cancer.** *Cell*, 100: 57-70.

He QY, Lau GK, Zhou Y, Yuen ST, Lin MC, Kung HF, Chiu JF. (2003). **Serum biomarkers of hepatitis B virus infected liver inflammation: a proteomic study.** *Proteomics* 3(5): 666-674.

Hebert B. (1999). **Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis.** *Electrophoresis*, 20: 660-663.

Horne MC, Goolsby GL, Donaldson KL, Tran D, Neubauer M, Wahl AF. (1996). **Cyclin G1 and cyclin G2 comprise a new family of cyclins with contrasting tissue-specific and cell cycle-regulated expression.** *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 6050-6061.

Izant JG, Weintraub H. (1984). **Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis.** *Cell* 36(4): 1007-15.

Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ. (1969). **Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells.** *J Virol.* 4(5): 549-553.

Jenkins BD, Pullen CB, Darimont BD. (2001). **Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms.** *Trends Endocrinol Metab.* 12(3): 122-126.

Jiang M, Jia L, Jiang W, Hu X, Zhou H, Gao X, Lu Z, Zhang Z. (2003). **Protein dysregulation in red blood cell membranes of type 2 diabetic patients.** *Biochem Biophys Res Commun.* 309(1): 196-200.

Kimura SH, Ikawa M, Ito A, Okabe M, Nojima H. (2001). **Cyclin G1 is involved in G2/M arrest in response to DNA damage and in growth control after damage recovery.** *Oncogene* 20(25): 3290-3300.

Kimura SH, Nojima, H. (2002). **Cyclin G1 associates with MDM2 and regulates accumulation and degradation of p53 protein.** *Genes to Cells* 7(8): 869-880.

Kinyamu HK, Archer TK. (2003). **Estrogen receptor-dependent proteasomal degradation of the glucocorticoid receptor is coupled to an increase in mdm2 protein expression.** *Molecular Cell Biology*, 23: 5867-5881.

Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, Shigematsu H, Zagozdzon A, Sicinska E, Geng Y, Yu Q, Bhattacharya S, Bronson RT, Akashi K, Sicinski P. (2004). **Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins.** *Cell* 118(4): 477-491.

Laz EV, Wiwi CA, Waxman DJ. (2004). **Sexual dimorphism of rat liver nuclear proteins: regulatory role of growth hormone.** *Mol Cell Proteomics* 3(12): 1170-1180.

Li C, Chen Z, Xiao Z, Wu X, Zhan X, Zhang X, Li M, Li J, Feng X, Liang S, Chen P, Xie JY. (2003). **Comparative proteomics analysis of human lung squamous carcinoma.** *Biochem Biophys Res Commun* 309(1): 253-260.

Liu JW, Shen JJ, Tanzillo-Swartz A, Bhatia B, Maldonado CM, Person MD, Lau SS, Tang DG (2003). **Annexin II expression is reduced or lost in prostate cancer cells and its re-expression inhibits prostate cancer cell migration.** *Oncogene* 22(10): 1475-1485.

Ma, AS, Moran-Jones K, Shan J, Munro, TP, Snee MJ, Hoek KS, Smith R (2002). **Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3, a novel RNA trafficking response element-binding protein.** *Journal of Biological Chemistry*, 277: 18010-18020.

Malumbres M, Sotillo R, Santamaria D, Galan J, Cerezo A, Ortega S, Dubus P, Barbacid M. (2004). **Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6.** *Cell* 118(4): 493-504.

Mann M, Jensen ON. (2003). **Proteomic analysis of post-translational modifications.** *Nat Biotechnol.* 21(3): 255-261.

Massague J. (2004). **G1 cell-cycle control and cancer.** *Nature* 432(7015): 298-306.

Mercado, JMM. **Reversão fenotípica de células ST1 induzida por hormônios glicocorticóides: análise ao nível de ciclo celular e de genes supressores de tumor.** São Paulo, 1997. (Tese de mestrado – Departamento de bioquímica – USP).

Meunier L, Usherwood YK, Chung KT, Hendershot LM. (2002). **A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins.** *Mol Biol Cell.* 13(12): 4456-4469.

Morgenstern JP, Land H. (1990). **Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line.** *Nucleic Acids Res.* 18(12): 3587-3596.

Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. (1998). **Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.** *Electrophoresis* 9(6): 255-262.

Ohtsuka T, Ryu H, Minamishima YA, Ryo A, Lee SW. (2003). **Modulation of p53 and p73 levels by cyclin G: implication of a negative feedback regulation.** *Oncogene* 22(11): 1678-1687

Okamoto K, Beach D. (1994). **Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein.** *The EMBO Journal* 13: 4816-4822.

Okamoto K, Prives C. (1999). **A role of cyclin G in the process of apoptosis.** *Oncogene* 18(32): 4606-4615.

Okamoto K, Li H, Jensen MR, Zhang T, Taya Y, Thorgeirsson SS, Prives C. (2002). **Cyclin G recruits PP2A to dephosphorylate Mdm2.** *Molecular Cell* 9: 761-771.

Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martin A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JL, Malumbres M, Barbacid M. (2003). **Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice.** *Nat Genet.* 35(1): 25-31.

Ramalingam A, Hirai A, Thompson EA. (1997). **Glucocorticoid inhibition of fibroblast proliferation and regulation of the cyclin kinase inhibitor p21Cip1.** *Mol Endocrinol.* 11(5): 577-586.

Ramos RA, Meilandt WJ, Wang EC, Firestone GL. (1999). **Dysfunctional glucocorticoid receptor with a single point mutation ablates the CCAAT/enhancer binding protein-dependent growth suppression response in a steroid-resistant rat hepatoma cell variant.** *FASEB J.* 13(1): 169-180.

Reimer CL, Borrás AM, Kurdistani, SK, Garreau, JR, Chung M, Aaronson, SA, Lee SW. (1999). **Altered regulation of cyclin G in human breast cancer and its specific localization at replication foci in response to DNA damage in p53 +/- cells.** *The Journal of biological chemistry* 274: 11022-11029.

Renner K, Ausserlechner MJ, Kofler R. (2003). **A conceptual view on glucocorticoid-induced apoptosis, cell cycle arrest and glucocorticoid resistance in lymphoblastic leukemia.** *Curr Mol Med.* 3(8): 707-717.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. (2001) **Stem cells, cancer, and cancer stem cells.** *Nature* 414: 105-111.

Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ. (1997). **Glucocorticoid receptor-mediated cell cycle arrest is achieved through distinct cell-specific transcriptional regulatory mechanisms.** *Mol Cell Biol.* 17(6): 3181-3193.

Sakao Y, Kawai T, Takeuchi O, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeda K, Akira S. (2000). **Mouse proteasomal ATPases Psmc3 and Psmc4: genomic organization and gene targeting.** *Genomics* 67(1): 1-7.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). **Molecular Cloning - A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sawyers C. (2004). **Targeted cancer therapy.** *Nature* 432(7015): 294-297.

Schroer TA. (2004). **Dynactin.** *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20: 759-779.

Sengupta S, Wasylyk B. (2004). **Physiological and pathological consequences of the interactions of the p53 tumor suppressor with the glucocorticoid, androgen, and estrogen receptors.** *Ann N Y Acad Sci.* 1024: 54-71.

Sherr CJ, McCormick F. (2002). **The RB and p53 pathways in cancer.** *Cancer Cell* 2: 103-112.

Sherr, CJ. (2004). **Principles of tumor suppression.** *Cell* 116(2): 235-246.

Shimizu A, Nishida J, Yousuke U, Kiyoko K, Hachiya T, Kuriaki Y, Wake N. (1998). **Cyclin G contributes to G2/M arrest of cells in response to DNA damage.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242: 529-533.

Skotzko M, Wu L, Anderson WF, Gordon EM, Hall FL. (1995). **Retroviral vector-mediated gene transfer of antisense cyclin G1 (CYCG1) inhibits proliferation of human osteogenic sarcoma cells.** *Cancer research* 55: 5493-5498.

Smith ML, Chen IT, Zhan Q, Bae I, Chen CY, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, Fornace AJ Jr. (1994). **Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen.** *Science* 266(5189): 1376-1380.

Smith, ML, Kontny, HU, Bortnick, R, Fornace, AJ. (1997). **The p53-regulated cyclin G gene promotes cell growth: p53 downstream effectors cyclin G and Gadd45 exert different effects on cisplatin chemosensitivity.** *Exp. Cell Res.* 230: 61-68.

Spira AI, Carducci MA. (2003). **Differentiation therapy.** *Current Opinion Pharmacology* 4: 338-343.

Sun L, Chen ZJ. (2004). **The novel functions of ubiquitination in signaling.** *Curr Opin Cell Biol.* 16(2): 119-126.

Tuloup M, Hernandez C, Coro I, Hoogland C, Binz PA, Appel RD. (2003) **Aldente and BioGraph: An improved peptide mass fingerprinting protein identification environment**, Swiss Proteomics Society 2003 Congress: *Understanding Biological Systems through Proteomics*, Basel, Switzerland, 2-4 Dec. 2003, Ed. FontisMedia (ISBN 2-88476-004-0), 174-176.

Tamura K, Kanaoka Y, Jinno S, Nagata A, Ogiso Y, Shimizu K, Hayakawa T, Nojima H, Okayama H. (1993). **Cyclin G: a new mammalian cyclin with homology to fission yeast Cig1.** *Oncogene* 8: 2113-2118.

Tan Z, Qu W, Tu W, Liu W, Baudry M, Schreiber SS. (2000). **p53 accumulation due to down-regulation of ubiquitin: relevance for neuronal apoptosis.** *Cell Death Differentiation* 7(7): 675-681.

Turano C, Coppari S, Altieri F, Ferraro A. (2002). **Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions.** *Journal of Cell Physiology* 193: 154-163.

Urban G, Golden T, Aragon IV, Cowser L, Cooper SR, Dean NM, Honkanen RE. (2003). **Identification of a functional link for the p53 tumor suppressor protein in dexamethasone-induced growth suppression.** *J. Biol. Chem.* 278: 9747-9753.

Valentini SR, Oliveira MLS, Sasahara RM, Armelin MCS. (1994). **Glucocorticoid-regulated gene in transformed to normal phenotypic reversion.** *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27: 541-546.

Valentini SR, Armelin MCS. (1996). **Cloning of glucocorticoid-related genes in ST1 rat glioma phenotypic reversion.** *J. Endocrinol.* 147: 11-17.

Vedoy CG. **Isolamento, identificação e caracterização de sequências expressas de DNA (ESTs) de genes regulados por glicocorticóides na reversão fenotípica tumoral-**

normal de células ST1 de glioma de rato. São Paulo, 2000 (Tese de Doutorado, Bioquímica USP).

Vedoy CG, Sogayar MC. (2002). **Isolation and characterization of genes associated with the anti-tumor activity of glucocorticoids.** *Molecular Brain Research* 106: 57-69.

Volgelstein B, Kinzler KW. (2004). **Cancer genes and the pathways they control.** *Nature Medicine* 10: 789-799.

Weiss W, Postel W, Görg A. (1992). **Application of sequential extraction procedures and glycoprotein blotting for the characterization of the 2-D polypeptide patterns of barley seed proteins.** *Electrophoresis* 13: 770-773.

Weiss W, Vogelmeier C, Görg A. (1993). **Electrophoretic characterization of wheat grain allergens from different cultivars involved in bakers' asthma.** *Electrophoresis* 14: 805-816.

Whitesell L, Liu X, Bagatell R. (1999). **Inhibition of oncogene expression using vector-generated RNA antisense.** *Methods* 18(3): 296-303.

Whitfield GK, Jurutka PW, Haussler CA, Haussler MR. (1999). **Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function.** *Journal of Cellular Biochemistry* 75(S32): 110-122.

Wilkinson B, Gilbert HF. (2004). **Protein disulfide isomerase.** *Biochim. Biophys. Research* 1699: 35-44.

Wu L, Liu L, Yee A, Carbonaro-Hall D, Tolo VT, Hall F. (1994). **Molecular cloning of the human CAK1 gene encoding a cyclin dependent kinase activating kinase** *Oncogene* 9(7): 2089-2096.

Yoshida T, Makino Y, Tamura T. (1999). **Association of the rat heterogeneous nuclear RNA-ribonucleoprotein F with TATA-binding protein.** *FEBS Letters* 457(2): 251-254.

Yudt MR, Cidlowski JA. (2002). **The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene.** *Molecular Endocrinology* 16(8): 1719-1726.

Zauberman A, Lupo A, Oren M. (1995). **Identification of p53 target genes through immune selection of genomic DNA: the cyclin G gene contains two distinct p53 binding sites.** *Oncogene* 10: 2361-2366.

Zhao L, Samuels T, Winckler S, Korgaonkar C, Tompkins V, Horne MC, Quelle DE. (2003). **Cyclin G1 has growth inhibitory activity linked to the ARF-Mdm2-p53 and pRb tumor suppressor pathways.** *Molecular Cancer Research* 1(3): 195-206.

CURRICULUM VITAE

Nome: Marcos Angelo Almeida Demasi

Nascimento: 15/01/1975, São Paulo, SP.

EDUCAÇÃO

EEPG “Prof. Arthur de Guimarães”, São Paulo, SP, 1982-1984.

EEPG “Profa. Marina Cintra”, São Paulo, SP, 1985-1987.

EEPSG “Prof. Alarico Silveira”, São Paulo, SP, 1988-1989.

ETFSP – Escola Técnica Federal de São Paulo – SP, 1990-1993. Técnico em Telecomunicações.

Graduação: Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP, SP, 1996-2000.

Farmacêutico-Bioquímico, modalidade Análises Clínicas.

OCUPAÇÃO

Estudante de pós-graduação, nível Doutorado, Instituto de Química-USP.